

Artigo Original

Recebido em 20/07/2009, aceito em 30/04/2010

Reconhecimento e quantificação de expressão de imunoistoquímica empregando aprendizado de métricas de distância

*Recognition and quantification of
immunohistochemistry expression
employing distance metric learning*

Antonio Carlos Sobieranski*

Laboratório de Processamento de Imagens e
Computação Gráfica, LAPIX / UFSC
The Cyclops Group, Departamento de Informática e
Estatística - sala 320 / UFSC
Campus Universitário Trindade
88040-900 Florianópolis, SC – Brasil
E-mail: asobieranski@cyclops.ufsc.br

Leandro Coser

Departamento de Engenharia e Gestão do
Conhecimento / UFSC

Sylvio Luiz Mantelli Neto

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE
Departamento de Engenharia e Gestão do
Conhecimento / UFSC

Eros Comunello

Programa de Pós Graduação em Ciência
da Computação Aplicada
Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

Aldo von Wangenheim

Laboratório de Processamento de Imagens e
Computação Gráfica, LAPIX / UFSC

Gabriella Di Giunta

Serviço de Patologia / UFSC

Eduardo Cargnin-Ferreira

Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos,
Departamento BEG / UFSC

*Autor para correspondência

Resumo

Este artigo apresenta uma abordagem de segmentação para o reconhecimento e quantificação de expressão de imunoistoquímica (IHC) através do aprendizado de uma métrica de distância. Este método é baseado em duas etapas: treinamento e segmentação. A etapa de treinamento é realizada pela seleção supervisionada de algumas áreas típicas de expressão de IHC na imagem. Nesta etapa o padrão esperado de IHC é estatisticamente caracterizado, onde ocorre o aprendizado da métrica de distância e um espaço característico é modelado. Através desse espaço são obtidos os mapas de similaridade para cada imagem de IHC, com os níveis de intensidade correspondendo ao grau da reação do biomarcador sobre o tecido. A etapa de segmentação é guiada por um parâmetro de escala que controla a quantidade de áreas marcadas com base nos valores de intensidade dos mapas de similaridade. O método é baseado no aprendizado da distância de Mahalanobis para produzir um espaço característico, para posteriormente ser utilizado na distinção entre marcações positivas de expressão de IHC e tecidos normais, bem como quantificar o grau de intensidade da reação. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com a classificação linear no espaço de cores HSV (*Hue, Saturation and Value*) utilizando diferentes categorias de biomarcadores. Os resultados mostram que os limites da fronteira da distribuição dos padrões são mais bem definidos no método proposto, permitindo assim uma melhor discriminação entre tecidos normais e expressão de IHC.

Palavras-chave: Segmentação colorida de imunoistoquímica (IHC), Aprendizado de métricas de distância, Espaços de cores adaptativos, Distância de Mahalanobis.

Abstract

*This paper presents a segmentation approach to the recognition and quantification of immunohistochemistry (IHC) expression employing a distance metric learning method. This method is based in a two-step procedure, training and segmentation. The training step is performed by the supervised selection of a few IHC typical stained areas on image. In that step the desired IHC pattern is statistically characterized, where a distance metric is learned and a featured space is created. With this space, similarity maps are obtained by each IHC image with its intensity levels corresponding to degrees of reaction provided by the biomarker over the tissue. The segmentation step is guided by a scale-space parameter that controls the amount of labeled areas based on intensity values of the similarity maps. This method learns a Mahalanobis distance metric to produce a featured space used to distinguish between IHC positive staining and normal tissues, as well as quantifying the reaction intensity degrees. The results obtained by the proposed method were compared to the linear classification on HSV (*Hue, Saturation and Value*) color space using different biomarkers categories. The comparison results show that the boundary limits of the pattern distributions are better defined in the proposed method, allowing better discrimination between normal tissues and IHC expression.*

Keywords: Immunohistochemistry color image segmentation, Distance metric learning, Adaptive color spaces, Mahalanobis distance.

Extended Abstract

Introduction

Immunohistochemistry (IHC) is a well-established technique used to study the distribution and intensity of biomarkers in tissues in the histopathological diagnose. The analysis is often performed by visual inspection, where a simple technique divides the sample in grids by means of an eyepiece graticule. The grid intersections over stained regions are manually counted, making this technique labor-intensive and error-prone by human subjectivity, especially in quantifying alterations in proportions of normal and abnormal cells in an organ, cell proliferation index and other histopathological markers. Some computational techniques were employed in the last years to improve the quantification of such structures in histopathological domain. However, these techniques are presented as generic tools available on the market, and when are specifically used to the recognition and quantification of IHC expression, these tools have turned out to be limited. Some IHC samples can present very complex patterns distribution in the color space, making the identification process a hard task when performed with traditional methods and/or linear classification approaches. Figure 1 shows the histograms of IHC samples in the RGB (Red, Green and Blue), HSV (Hue, Saturation and Value) and CIE-lab color spaces respectively; we can observe that changing the color space does not provide an effective perceptual classification and the solution for the problem. The identification in this space is shown in the Figure 2, and some limitations such as low expressiveness with pattern distribution boundaries can be observed.

In this paper we present the use of a learned distance metric to obtain a featured color space in order to get a better discrimination function of the IHC areas and normal tissues. The Mahalanobis distance is used to create an adaptive space, which provides similarity maps for each IHC corresponding to the intensities staining values, and it is used to guide a color threshold process. The results of our method show effectiveness and robustness to IHC expression identification.

Material and Methods

In this work human skin biopsies of iNOS and CD1a biomarkers were used. The computational method consists in selecting a few IHC typical areas, and uses them as an initial set of the training step. The training step learns a discrimination function given by the Mahalanobis distance, and creates an adapted color space, where the similarity function provides a better classification between stained areas and normal tissues. Figure 3 shows a general overview of this approach, where (a) shows the IHC samples; (b) depicts the training process where typical IHC areas are collected to learn a distance metric and to create a featured space in (c);

once this color space is obtained, the classification of the input images shown in (d) provides the similarity maps corresponding to intensities of reaction, as shown in (e). A thresholding process is applied to these similarity maps, resulting in the segmented areas for the IHC samples. The adaptability observed by the adapted color space can be analogously understated with the tensor properties extended from the multi-linear algebra. The covariance of the training set has a predominant direction over the color space. The main idea is mapping these properties with an eigensystem, where the eigenvalues denote magnitude of the tensor and the eigenvector the orientation on the space.

Figure 4 shows the similarity maps produced by the learned distance metric described in equation 10, and as we can note these maps present strong intensity levels (white pixel values) in stained IHC areas over the tissue, as shown in Figure 5.

Although the threshold process has its effects minimized because the similarity maps already provide a pre-classification of the stained areas, it is important to define a final classification of IHC samples. It's important to notice that the proposed method produces discrimination functions adapted to specific and general pattern distributions problems and different complexities degrees.

Results and Discussion

Figures 6 and 7 show the results obtained by this computational method. Figure 6 depicts the results of input samples used in Figure 1, where the three-dimensional histograms had denoted the complexity to discriminate between stained and non-stained patterns. Differently of linear approaches, the boundary of IHC expression has been better preserved, and it consecutively reflects in an accurate classification process of the presented IHC samples. Figure 7 shows other segmentation results, where a typical histopathological routine is shown: one session of IHC using the same biomarker (e.g. CD1a), resulting in many partial images of the same sample. In this case, the training step was performed with a set of typical areas collected from various images, creating a particular featured space used to classify them. The similarity maps were obtained for each sample image using this space, and the same scale-space parameter was applied to all images of the session.

Conclusion

The results obtained by this approach show that even in simple classification problems, where linear approaches can achieve acceptable results; the results can be improved with the used of this method. The adaptability ensured by the featured space, provides robustness and effectiveness to the identification and quantification of IHC stained areas, showing it as a promising solution to be used in other histopathological domains.

Introdução

Imunoistoquímica (IHC) é uma técnica regularmente utilizada no diagnóstico histopatológico para o estudo da distribuição e da intensidade de biomarcadores em diferentes categorias de tecidos (Jennette, 1988; Kiernan, 2004). A quantificação da expressão desses biomarcadores é realizada através da análise da extensão e do grau da marcação produzida nas amostras. A técnica mais frequentemente utilizada para quantificar este tipo de reação é baseada em um método manual (Gundersen *et al.*, 1988) e é realizada pela simples divisão da amostra de IHC em *grids* com o uso de uma ocular denominada graticula. As intersecções dos *grids* coincidentes nas regiões de expressão de IHC são manualmente contadas por inspeção visual, tornando esta técnica intensiva e sujeita a erros, algumas vezes dependendo muito da subjetividade do próprio patologista, especialmente na quantificação de alterações em proporções de células normais e anormais, índice de proliferação celular e outros biomarcadores.

A análise efetuada com o auxílio de técnicas computacionais tem sido empregada nos últimos anos para aumentar a precisão e reduzir a subjetividade no diagnóstico clínico (Kamalov *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004). Entretanto, estas ferramentas (comerciais ou de caráter livre) apresentam-se genéricas para os propósitos da histopatologia (Francisco *et al.*, 2004; López *et al.*, 2008). Quando são utilizadas especificamente para o reconhecimento e quantificação de IHC, embora possam apresentar resultados interessantes, mostram-se restritas na identificação das regiões limites da expressão de IHC. Metodologias computacionais que tratam a quantificação de IHC de forma específica podem ser também encontradas na literatura. Law *et al.* (2003) utilizam uma técnica de crescimento de regiões baseada em *watershed*, para segmentar áreas de expressão de IHC. *Threshold* linear e classificação por *k-means* são utilizados por Wu *et al.* (2005) para identificar classes de tecidos. Kaczmarek *et al.* (2004) apresentam uma técnica de segmentação chamada 'visualização especial', onde a amostra é visualizada em perspectiva tridimensional no espaço de cores HSB. Em Hammes *et al.* (2007), o espaço de cores CMYK é utilizado para classificar amostras de IHC de câncer cervical e lesões intra-epiteliais. Contornos ativos e morfologia matemática são utilizados na quantificação de IHC para imagens em tons de cinza em Elmoataz *et al.* (1988).

Embora as metodologias encontradas na literatura sejam extensivamente utilizadas em procedimentos

histopatológicos, a principal limitação fica por conta da função de similaridade utilizada, que geralmente é baseada em métricas lineares de classificação ou na simplificação da imagem em tons de cinza e/ou troca de espaços de cores por outros mais sofisticados (como HSV / HSI, CMYK, CIE-Lab). Essas limitações, entretanto, não significam que a tarefa de segmentar e quantificar a expressão de IHC em um dado marcador não possa ser efetuada por estas metodologias. De fato, para alguns tipos de marcadores, bons resultados são obtidos mesmo quando métricas simples de classificação são utilizadas para selecionar determinados tipos de tecidos. O fato de algumas ferramentas serem comercialmente disponíveis e utilizadas em rotinas clínicas é argumentação suficiente para isto. No entanto, tais ferramentas tendem a apresentar baixa especificidade por duas principais razões: as computações de similaridade de cor são geralmente baseadas em métricas lineares para os vetores de cores correspondentes a áreas de iNOS e tecidos normais, e a generalidade nem sempre pode ser satisfeita para diferentes casos estudados, principalmente quando a escolha de um marcador ou da interação entre o marcador e o tecido pigmentado apresentar um comportamento complexo no espaço de cores. Um modelo mais robusto para a identificação de IHC deve prover flexibilidade na classificação onde a distribuição da amostra apresentar padrões complexos (Gil e Wu, 2003).

Neste trabalho é apresentada uma abordagem computacional para a identificação e quantificação da expressão de IHC. A metodologia proposta baseia-se na idéia de que expressão de iNOS pode ser caracterizada através de espaços de cores adaptativos, modelados estatisticamente para discriminar com maior precisão entre áreas identificadas pelo biomarcador e tecidos normais. A metodologia se baseia na idéia de que um espaço de cores adaptativo, modelado estatisticamente segundo o problema de similaridade através do aprendizado de uma métrica de distância, pode definir uma função útil de discriminação onde as distribuições do objeto de interesse (expressão de IHC) estejam o mais próximo possível do ponto de referência deste espaço, e em contrapartida a discriminação de regiões não similares. O espaço é construído pela seleção de características típicas das marcações de IHC contidas nas imagens, e esta amostragem é utilizada para o aprendizado da métrica de distância. A modelagem do novo espaço característico ocorre através da distância de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936), também conhecida por distância estatística, a qual

possui a capacidade de capturar as propriedades não-isotrópicas de um espaço d -dimensional. Esta métrica de distância apresenta uma propriedade interessante: descrição de magnitude e direção de uma distribuição ao longo do espaço originário, através do seu sistema de autovalores e autovetores. Uma vez que o novo espaço é obtido, ele pode ser então utilizado para obter melhor discriminação na classificação de uma sequência de amostras de uma seção de IHC. O processo de segmentação é guiado por um mapa de intensidades que é obtido para as amostras de IHC, possibilitando identificar picos de intensidade de reação e classificá-los de acordo com um parâmetro de escala.

Materiais e Métodos

Nesta sessão são descritos os materiais, a fundamentação matemática para a geração de espaços característicos e a sua utilização para a identificação das áreas de iNOS.

Análise imunoistoquímica de CD1a e iNOS

As biópsias de pele humana foram colocadas em uma solução fixadora (formaldeído a 4%, 0,1 M Tampão Fosfato-Salino – PBS, pH 7,4) durante 24 horas.

Depois da desidratação em sequência etanólica e diafanização em xilol, as amostras foram embebidas em parafina (Cargnin-Ferreira e Sarasquete, 2008). O material foi cortado a 5 μ m de espessura. Para os tecidos marcados com o anticorpo CD1a, as seções foram tratadas em forno microondas (720 W) por 5 minutos para a incubação do anticorpo monoclonal (Novocasa Laboratories Ltd., code NCL-CD1a-235). Para a expressão de iNOS, as amostras foram incubadas por uma noite em uma câmara úmida em temperatura ambiente com anticorpo policlonal anti-iNOS de coelho (Calbiochem-Novabiochem Corp.) na diluição de 1:500. Para ambas as reações, as seções foram lavadas e depois tratadas com o segundo anticorpo (biotinylated goat IgG antirabbit/mouse IgG) durante 30 minutos, seguido por três lavagens em PBS. O segundo passo foi a incubação com o polímero de amplificação EnVision™ G|2-PA de fosfatase alcalina, coelho/camundongo (Dako Carpinteria).

A reação é visualizada por cromógeno *permanent red* (Dako Carpinteria). As seções então foram contraincoradas com hematoxilina de Mayer. A presença de precipitação vermelha indicou sítios positivos para o primeiro anticorpo. Este estudo foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética da Universidade de São Paulo (projeto número 1055/06).

Exame histológico, aquisição de imagens digitais e controle de qualidade

O exame histológico foi restrito à área da epiderme. Campos com dobras ou componentes de tecido não preservado nas seções histológicas foram excluídos. A fração de pontos de iNOS positiva e expressão CD1a foi determinada com base nos pixels selecionados para cada campo epidérmico. A média de peso dos campos epidérmicos foi calculada para todas as fatias. As imagens digitais foram adquiridas usando câmera digital (Sight, modelo DS-2Mv) conectada com microscópio óptico simples (Nikon, modelo Eclipse 80i). As imagens foram capturadas por *software* (Nikon NSI-elements). Para cada caso, microfotografias de 1.600 × 1.200 pixels de resolução foram obtidas de campos não coincidentemente consecutivos, por todas as epidermes com ampliação de 200 vezes (para anticorpo iNOS) ou 400 vezes (para anticorpo CD1a). Os processos anteriores foram acompanhados por 2 (dois) patologistas para reduzir a subjetividade na análise.

Descrição do problema

A segmentação de algumas amostras digitalizadas de IHC pode ser facilmente realizada através do uso de *threshold* colorido. Na Figura 1 (a1) são mostradas expressões do anticorpo CD1a (marcações em vermelho) apresentando dissimilaridade em relação ao tecido de fundo (*background* em azul). Para estes casos o processo de segmentação utilizando técnicas lineares pode resultar na adequada classificação entre áreas de expressão e tecidos normais, embora algumas áreas difusas de baixa intensidade do reagente dificultem a delimitação da extensão da marcação. Nos exemplos (b1) e (c1) são apresentados casos de expressão de iNOS amplamente distribuída nos tecidos, tornando a discriminação da área do marcador mais complexa, o que pode ser melhor compreendido através dos histogramas tridimensionais da Figura 1 (colunas 2, 3 e 4) nos espaços de cores RGB, HSV e CIE-Lab, respectivamente. Os histogramas mostram que em alguns casos a classificação das áreas de expressão de IHC requer uma descrição complexa do padrão da expressão no espaço de cores. Geralmente essa descrição é a limitação presente em métodos de classificação baseados na norma vetorial, uma vez que possibilitam apenas definir uma ordem parcial (Chanussot e Lambert, 1998). Além disso, métricas lineares de classificação são altamente dependentes de um valor de escala, e o incremento excessivo acaba incluindo uma grande quantidade de falsos negativos e positivos, e muitas vezes tornando um processo de tentativa e erro.

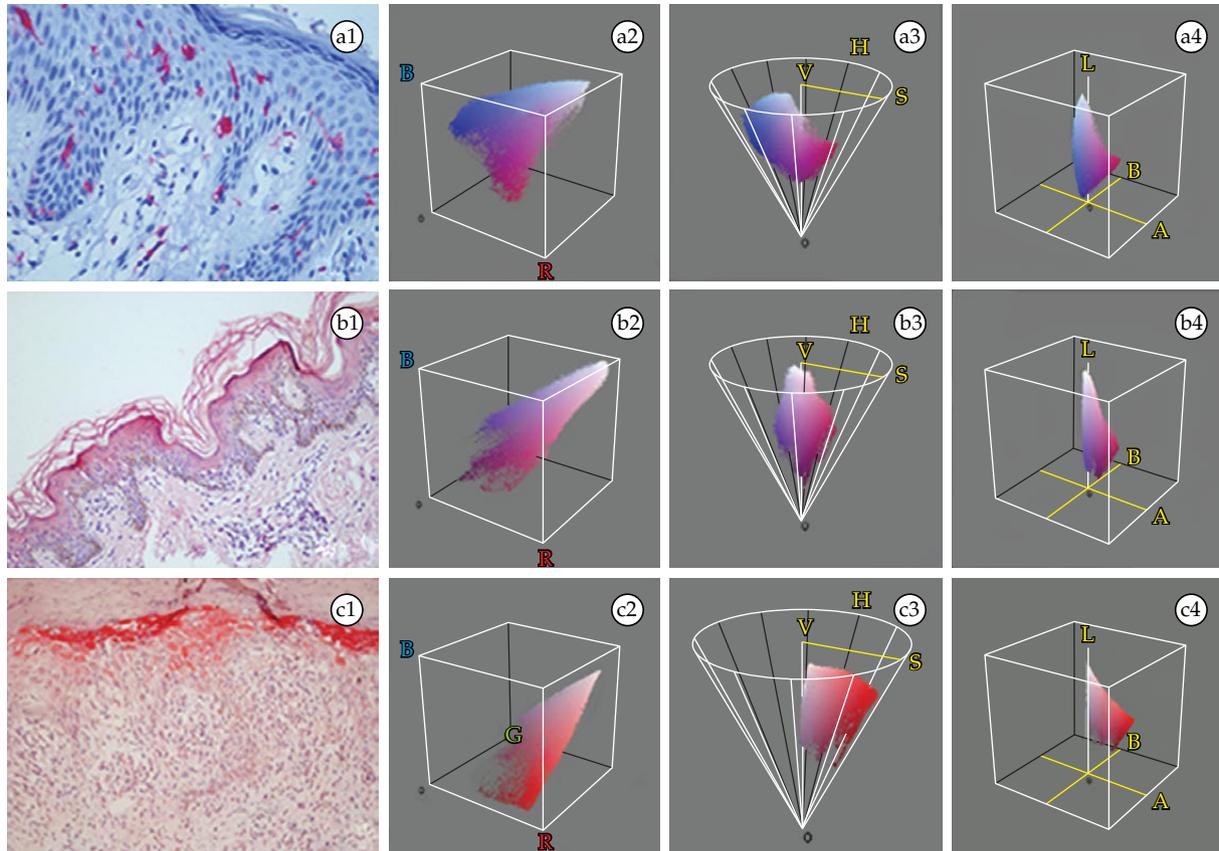


Figura 1. Amostras de IHC utilizando diferentes biomarcadores e graus de intensidade de reação com seus respectivos histogramas. Na primeira coluna são mostradas as amostras de IHC: (a1) anticorpo CD1a com *permanent red* (400x); (b1) Anticorpo iNOS com *permanent red* (200x); (c1) Anticorpo iNOS com *permanent red* (400x). Nas colunas 2, 3 e 4 são mostrados os histogramas tridimensionais das imagens da coluna 1, nos espaços de cores RGB, HSV e CIE-Lab, respectivamente.

Figure 1. IHC samples using different biomarkers and intensities degrees of reaction, with their histograms. At first column are shown the IHC samples: (a1) CD1a antibody with *permanent red* (400x); (b1) iNOS antibody with *permanent red* (200x); (c1) iNOS antibody with *permanent red* (400x). At columns 2, 3 and 4 are shown the three-dimensional histograms of column 1 pictures, in the RGB, HSV and CIE-lab color spaces, respectively.

Alguns espaços de cores tais como HSV ou HSI tendem a produzir resultados mais precisos, uma vez que a componente de luminosidade é separada do matiz de cor e da saturação, fato este que não ocorre, por exemplo, no RGB. Na Figura 2 são apresentados resultados da classificação no espaço HSV, onde (a), (b) e (c) são as amostras iniciais de IHC; (b), (d) e (f) são os resultados obtidos. Em (b), as setas indicam áreas difusas que permaneceram não marcadas pelo método de classificação. Em (d), as setas indicam células com pigmento de melanina no citoplasma ao longo da área de epiderme que foram incorretamente classificadas, devido às componentes de cor que representam ambas as estruturas (células marrons e expressão de IHC) estarem próximas no matiz do espaço de cores. Em (f), as setas apresentam áreas de expressão de IHC que possuem baixo valor de intensidade de reação, que foram ignoradas na classificação; em contrapartida,

na mesma imagem são apresentadas áreas de não expressão que foram marcadas incorretamente como positivas. Este último exemplo mostra que o *stress* ou relaxamento do parâmetro de escala não deve prover uma solução para o problema, e uma nova coordenada de referência torna-se necessária até que um resultado aceitável seja obtido.

Segmentação e quantificação de expressão de IHC

O diagrama da Figura 3 mostra em uma visão geral a metodologia proposta neste artigo, onde (a) representa amostras de IHC. A etapa de treinamento (b) é realizada através da seleção de áreas típicas de expressão de IHC, e a métrica de distância é modelada e um novo espaço de cores é construído (c). Através desse espaço se obtém uma classificação mais precisa das áreas de expressão de IHC (d) em relação aos tecidos normais por meio de um mapa de similaridade gerado em (e).

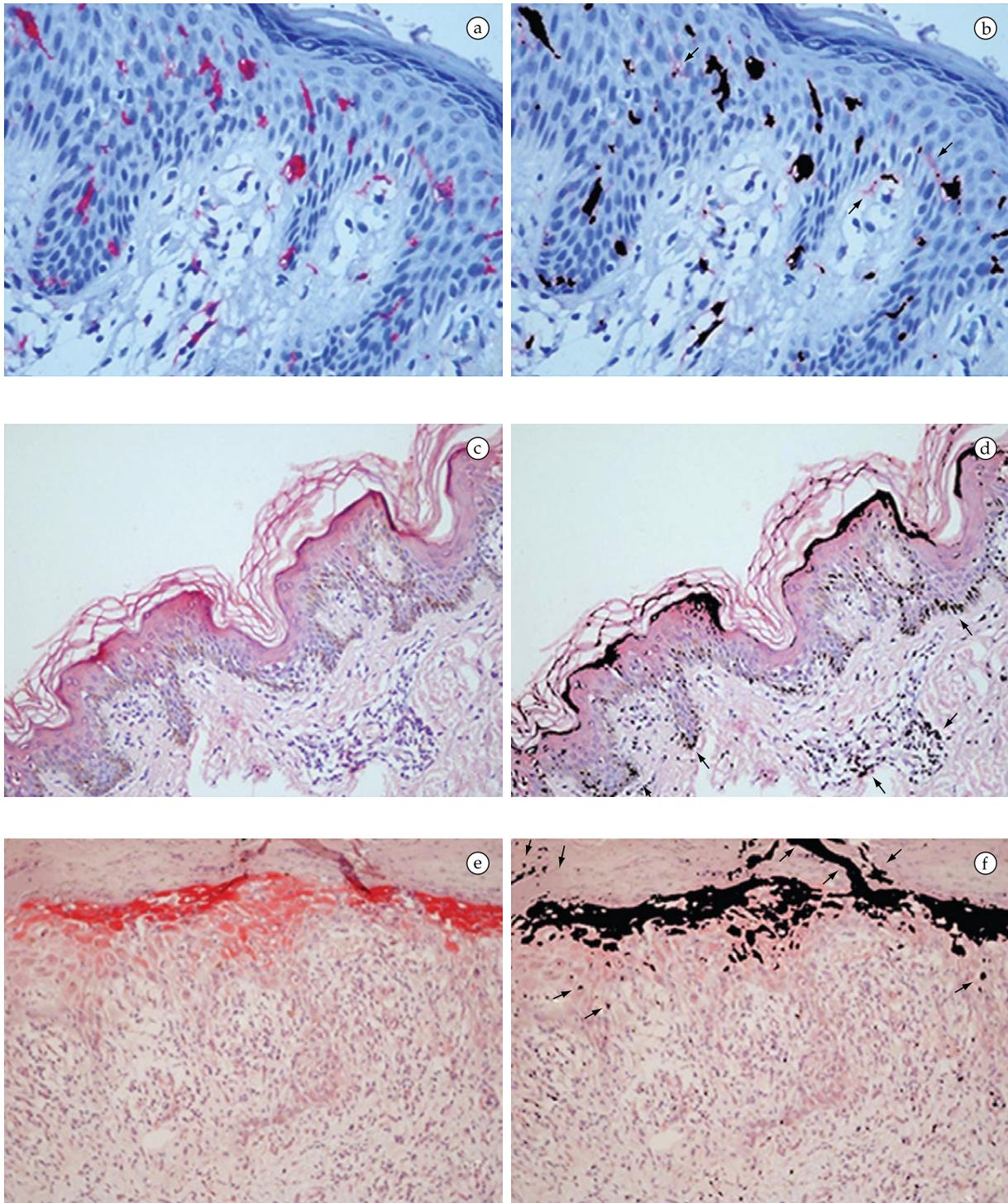


Figura 2. Resultados obtidos utilizando *threshold* colorido no espaço de cores HSV. Amostras de IHC são mostradas a esquerda: (a) anticorpo CDa1 com *permanent red* (400×), (c) e (e) anticorpo iNOS com *permanent red* (400×). À direita (b), (d) e (f) são mostrados os resultados da segmentação no espaço de cores HSV. As setas nas imagens resultados indicam algumas limitações da utilização da métrica de similaridade especificada. **Figure 2.** Obtained results using color thresholding in the HSV color space. IHC samples are shown at left: (a) CD1a antibody with *permanent red* (400×); (c) and (e) iNOS antibody with *permanent red* (400×). At right, (b), (d) and (f) show the segmentation results in HSV color space. The arrows show some limitation when using linear approaches such as presented.

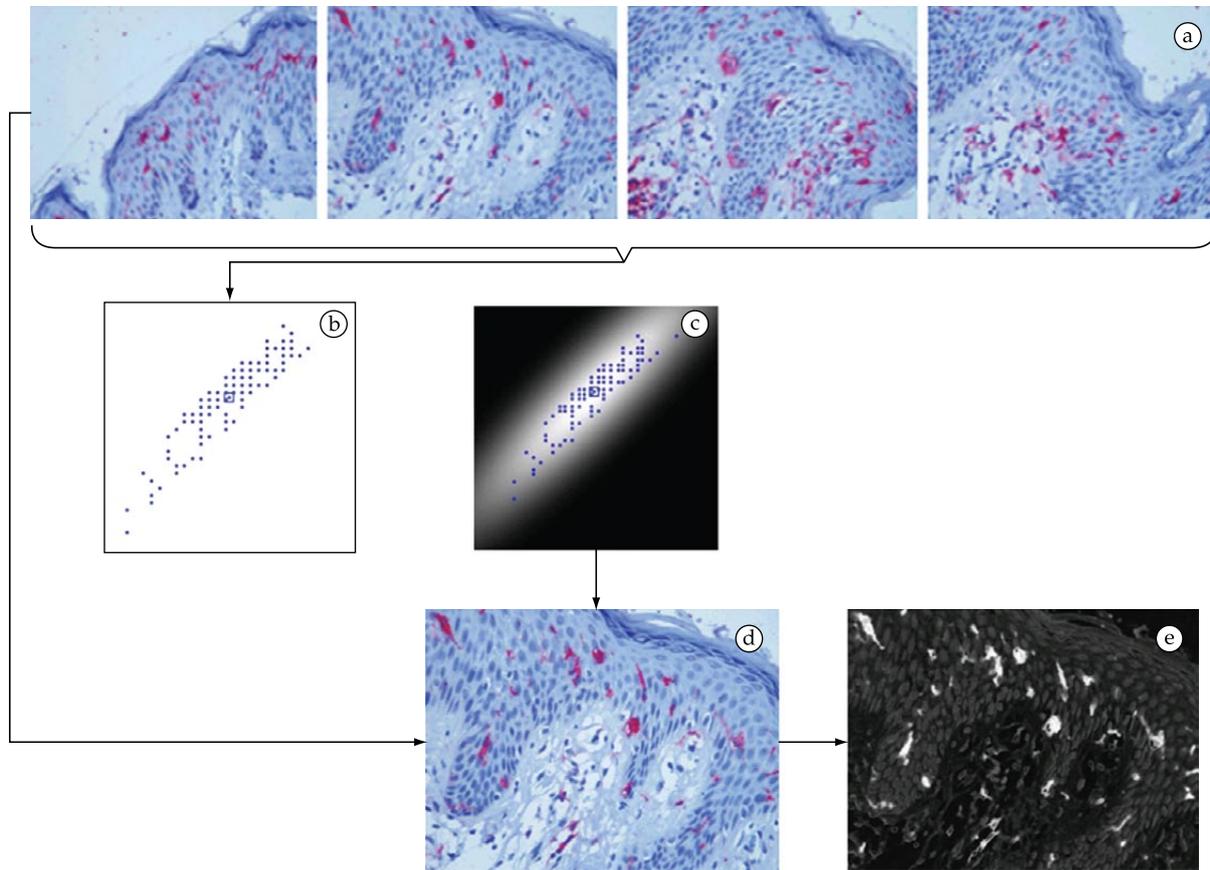


Figura 3. Visão geral da metodologia proposta. Em (a) amostras de IHC de uma mesma sessão são utilizadas no processo de treinamento, onde áreas típicas de expressão de IHC são selecionadas, apresentando a distribuição no espaço de cores conforme mostrado em (b). Em (c) um novo espaço de cores característico é produzido. Em (d) as imagens iniciais são classificadas no novo espaço produzindo os resultados em (e). **Figure 3.** General overview of the proposed approach. In (a) IHC samples of same session are used in the training process, where typical IHC areas were selected presenting the distribution in the color space as shown in (b). A new featured color space is produced in (c). In (d) the input images are classified in this new color space producing the results in (e).

Geração do espaço de cores característico com a distância de Mahalanobis

A distância de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936) e suas variações correspondem a um método estatístico para análise de dados multivariados, e pode ser obtida da seguinte forma: dados z_i e z_j sendo coordenadas d -dimensionais (vetores coluna $z_i \in \mathfrak{R}^d$ e $z_j \in \mathfrak{R}^d$) e um conjunto de dados multivariados S . A similaridade ou a qualidade de aproximação entre z_i e z_j em relação ao conjunto S pode ser obtida por:

$$d_m(z_i, z_j) = \left((z_i - z_j)^T C^{-1} (z_i - z_j) \right)^{1/2} \quad (1)$$

onde C é uma matriz $d \times d$ correspondendo à covariância de S . Em outras palavras, C é um espaço característico que orienta a similaridade entre z_i e z_j , e S é o conjunto inicial de treinamento. A idéia de orientar a similaridade em um espaço característico

para identificação de expressão de IHC é efetuada pela particularidade que C adquire a partir de S . A obtenção de C pode ser dada pela seguinte equação:

$$C = \frac{1}{(N-1)} A^T A \quad (2)$$

onde N é o tamanho do conjunto S , e A é uma matriz $N \times d$ calculada com base em um vetor referência s_0 , sobre o qual as distâncias serão mensuradas. Nesta metodologia foi considerado a média distribuição $S = \{s_1, s_2, \dots, s_N\}$ como vetor de referência s_0 . Com base nesse vetor, a matriz A pode ser obtida a partir de:

$$A = \begin{pmatrix} s_1^T - s_0^T \\ s_2^T - s_0^T \\ \vdots \\ s_N^T - s_0^T \end{pmatrix} \quad (3)$$

Na equação 1 a matriz de covariância C necessita ser invertida. Para casos onde o tamanho de d for muito menor do que N ($d \ll N$) (Takeshita *et al.*, 1993), frequentemente a inversa não existe, necessitando então de um processo de regularização através da decomposição do valor singular (SVD) de $A^T A$ (Wall *et al.*, 2003). Devido ao fato de $A^T A$ ser uma matriz simétrica, ela pode ser expressa por:

$$A^T A = U W V^T = U W U^T \quad (4)$$

A matriz W é a composição dos valores singulares $\{w_1, w_2, \dots, w_d\}$ com um pequeno escalar positivo σ^2 ($\sigma^2 = 10^{-5}$) utilizado para anular casos onde w_i seja 0. A obtenção da matriz inversa também pode ser expressa por:

$$W_{\sigma^2} = \begin{pmatrix} w_1 + \sigma^2 & 0 & & 0 \\ 0 & w_2 + \sigma^2 & & 0 \\ & & \ddots & \\ 0 & 0 & & w_d + \sigma^2 \end{pmatrix} \quad (5)$$

A equação 5 é utilizada para decomposição dos valores singulares de $A^T A$, e quando adicionada ao cálculo da covariância descrito na equação 2 é equivalente a:

$$C = \frac{1}{(N-1)} U W_{\sigma^2} U^T \quad (6)$$

onde

$$C^{-1} = (N-1) U^T W_{\sigma^2}^{-1} U \quad (7)$$

A equivalência demonstrada na equação anterior assume que $W_{\sigma^2}^{-1}$ é obtido diretamente a partir de $(w_i + \sigma^2)^{-1}$ e assegura a inversão de C . Na Figura 4 é mostrada a representação bi-dimensional do espaço característico gerado a partir de S para três exemplos distintos de distribuição (coluna 1). Os pontos marcados em azul mostram o conjunto de treinamento S , e s_0 é o centro da distribuição (*quadrado central da distribuição*). A classificação em relação a s_0 quando realizada por métricas lineares, apresenta distribuição conforme mostrado na coluna 2. O formato "esférico" ao redor do centro da distribuição mostra que a covariância existente na amostragem S (coluna 1) não é levada em consideração, atribuindo sempre os mesmos valores ao longo das componentes x e y . Além disso, o coeficiente de escala deve possuir um valor apropriado para apresentar resultados satisfatórios de classificação. Nesta representação, quanto mais intensos forem os valores de pixel, melhor é a qualidade de aproximação em relação ao centro s_0 . No primeiro caso (a2) a norma vetorial pode prover a classificação adequada, uma vez que a toda a distribuição pode estar contida no

perímetro da norma vetorial com dado valor de escala. Para os casos (b2 e c2) o conjunto de treinamento apresenta-se disperso em relação ao centro da distribuição, e a correta classificação exigiria aumento substancial no valor de escala, e conseqüentemente a inclusão de falsos positivos e falsos negativos.

Nas figuras da coluna 3 (a3, b3, c3) são mostrados os efeitos da utilização da covariância de S para modelagem de um espaço característico. A Figura a3 apresenta um conjunto S onde a distribuição é amplamente dispersa ao longo do espaço, e se observa que com a utilização da covariância de S é possível obter uma descrição mais precisa da orientação ao longo do espaço. Nos exemplos b3 e c3 o tensor característico torna-se mais evidente, uma vez que ele é modelado de acordo com a variação de S , e a métrica distância permite capturar estas propriedades.

Uma característica importante é a dualidade no aprendizado da distância de Mahalanobis, uma vez que esta é reduzida à norma vetorial para casos onde a variação é nula.

Propriedades tensoriais do espaço

de cores adaptativo

O espaço de cores proposto nesta metodologia pode ser também descrito de forma tensorial. A distância de Mahalanobis, calculada a partir da covariância de uma amostragem d -dimensional, é construída com base em um modelo anisotrópico. Este modelo é composto por um conjunto de autovalores e autovetores, que além de possibilitar a obtenção da orientação absoluta no espaço, possibilita obter a magnitude da amostragem S . O tensor característico onde suas propriedades topológicas são descritas nesse sistema é uma extensão da álgebra linear para a álgebra multilinear (Luis-García *et al.*, 2005), podendo ser representado por:

$$C^{-1} = T = \begin{pmatrix} T_{11} & T_{12} & T_{13} \\ T_{21} & T_{22} & T_{23} \\ T_{31} & T_{32} & T_{33} \end{pmatrix} \quad (8)$$

onde a diagonal principal equivale à variação intra-grupos, e a sua decomposição é dada por:

$$T - (\lambda \cdot I)e = 0 \quad (9)$$

sendo que λ são os autovalores do tensor, I é a matriz identidade e e são os autovetores normalizados. A distância de Mahalanobis permite descrever uma característica interessante: a dualidade entre a distância estatística e a norma vetorial Euclidiana. Conforme a variação apresentada em S aumenta, o espaço originário é distorcido por meio do tensor característico, penalizando as componentes de cores no

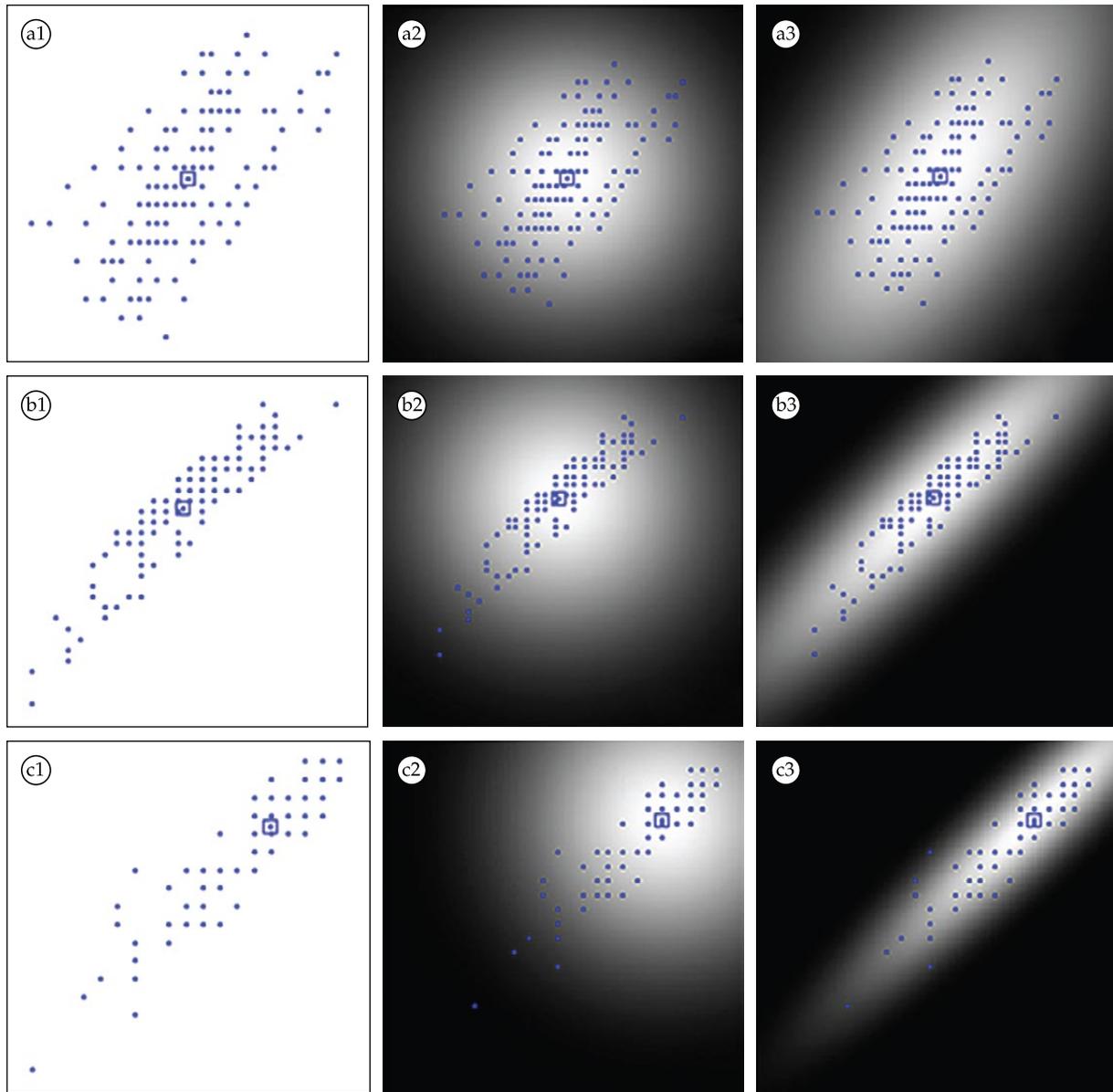


Figura 4. Representação bi-dimensional do conjunto de treinamento S . As figuras da primeira coluna (a1, b1 e c1) representam a distribuição do conjunto de treinamento. Na segunda coluna (a2, b2 e c2) são mostrados os resultados de classificação utilizando uma norma vetorial em relação ao vetor de referência. A terceira coluna apresenta os resultados da metodologia proposta. Os valores de intensidade sugerem melhor similaridade em relação ao padrão. **Figure 4.** Bi-dimensional representation of the training set S . The first column figures (a1, b1, c1) represent the training set distribution. In the second column (a2, b2, c2) the classification results using the vector norm over s_0 are shown. The third column shows the results of our approach. The intensity values suggest a better similarity over the pattern.

sentido de orientação do maior autovalor e na direção do autovetor correspondente. Generalizando, casos onde a variância do conjunto S for nula, a distância de Mahalanobis é reduzida à norma vetorial ou, em outras palavras, o método proposto permite obter para o pior caso uma função de discriminação equivalente à norma vetorial entre as componentes de cores.

Segmentação e quantificação de IHC no espaço de cores adaptativo

A equação resultante da regularização proveniente da equação 7 e a distância de Mahalanobis descrita na equação 1 pode ser computada da seguinte forma:

$$d_{m\sigma^2}(z_i, z_j) = \sqrt{(z_i - z_j)^T (N - 1) (U^T W_\sigma^{-1} U) (z_i - z_j)} \quad (10)$$

onde d_m é um valor escalar correspondendo à similaridade entre z_i e z_j . Dada uma imagem inicial I de uma amostra de IHC com o seu espaço característico previamente determinado, a aplicação de I sobre a equação 10 produz um mapa de similaridade de valores escalares em relação ao vetor de referência s_0 . Na Figura 5 são mostrados os mapas de similaridade

gerados para as amostras de IHC utilizadas na seção de descrição do problema. Os valores com alta intensidade indicam melhor similaridade em relação às áreas de expressão de IHC.

O mapa de similaridade apresenta valores contínuos de intensidade ao longo da reação dos biomarcadores no tecido. Embora o efeito de um

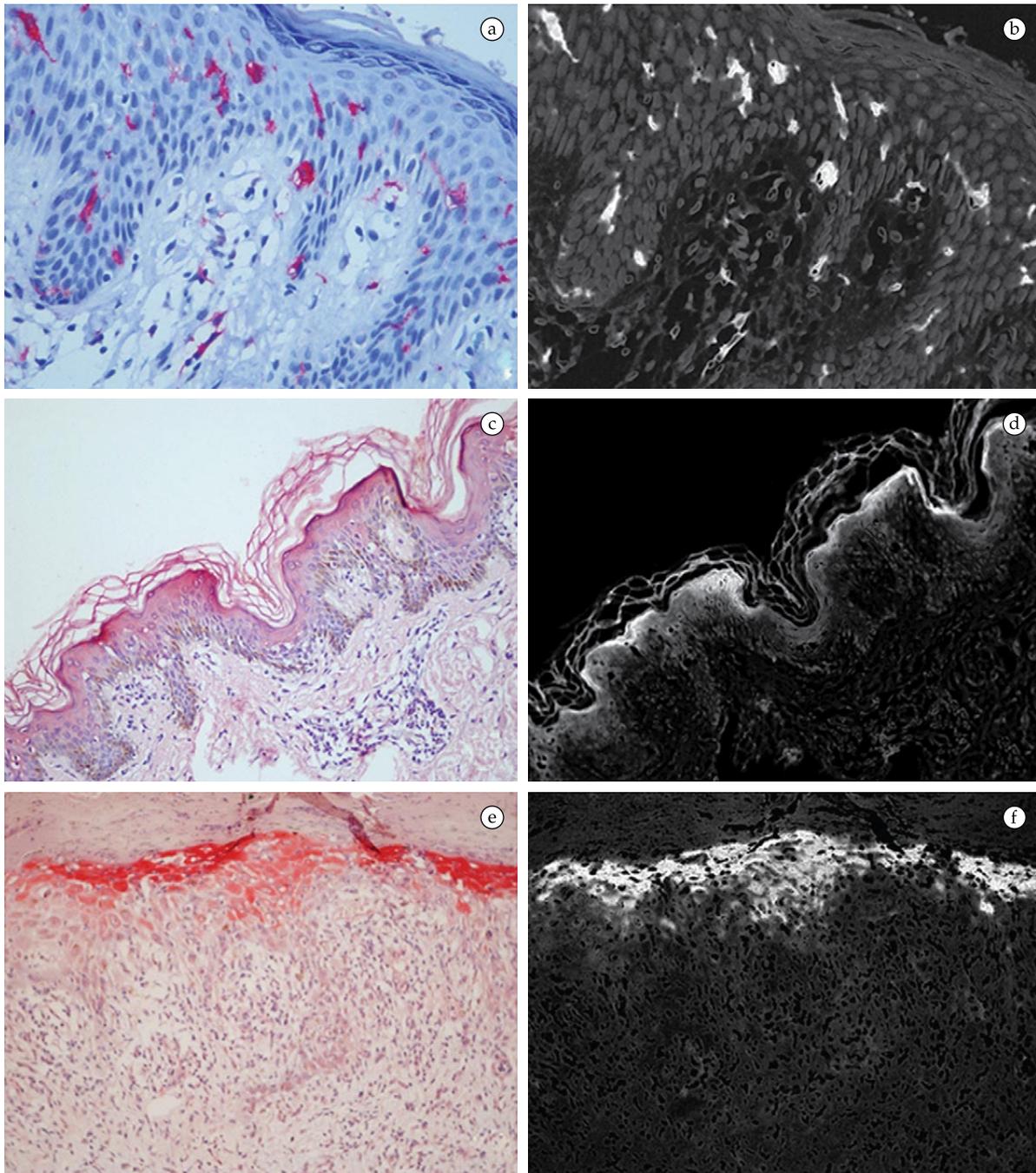


Figura 5. Mapa de similaridade correspondendo aos valores de intensidade da reação. Na primeira coluna são mostradas as imagens iniciais de IHC. A segunda coluna mostra os mapas de similaridade obtidos a partir do espaço adaptativo.
Figure 5. Similarity maps corresponding to reaction intensities values. The first column shows the input IHC images. Second column shows the similarity maps obtained from adapted space.

parâmetro escalar de *threshold* seja minimizado na metodologia proposta, o valor de escala pode ser empregado para obtenção de uma classificação bimodal da toda a expressão de IHC contida em uma determinada amostra. A classificação efetuada sobre o mapa de similaridade é realizada por um parâmetro escalar t , também descrito na seguinte equação:

$$d_{m\sigma^2}(z_i, s_0) \leq t \rightarrow \text{iNOS} \quad (11)$$

onde $d_{m\sigma^2}$ é o valor escalar da similaridade resultante entre o vetor z_i e s_0 , dados pela equação 10, e utilizado para classificação de áreas de expressão de IHC em relação à intensidade da reação. O parâmetro t inicialmente é determinado por um teste estatístico F , onde inicialmente o grau de confiabilidade é fixado em 90%. Este parâmetro, entretanto, pode ser ajustado pelo especialista em histopatologia, uma vez que a identificação das regiões de iNOS são baseadas na intensidade do biomarcador em relação ao mapa de similaridade.

Resultados

Os experimentos apresentados neste artigo mostram que a utilização de um espaço de cores modelado estatisticamente de acordo com o problema da identificação de expressão de IHC é uma solução factível e robusta. Os exemplos das Figuras 1 e 2 apresentam algumas das dificuldades existentes na classificação de padrões de expressão de IHC com complexa distribuição no espaço de cores. Na Figura 6, os resultados obtidos pelo espaço de cores HSV utilizando métricas lineares são comparados com a metodologia proposta. O primeiro caso (a) apresenta áreas difusas que foram incorretamente classificadas como expressão de IHC com o anticorpo CD1a.

O resultado obtido pela metodologia proposta possibilitou a correta classificação das áreas de expressão de IHC em (b), mesmo em áreas difusas que apresentam baixa intensidade de reação. No segundo caso (c - iNOS), as células marrons contidas ao longo da epiderme (pigmentos de melanina) foram consideradas como expressão de IHC devido à similaridade existente entre as cores marrom e vermelho no matiz do espaço de cor HSV. Com a utilização da metodologia proposta, em (d) existe a discriminação entre tais componentes de cores, possibilitando a classificação da expressão de IHC e tecidos normais. No terceiro caso apresentado (e - iNOS) existe a limitação de *stress* do parâmetro escalar, onde dois problemas específicos podem ser identificados: áreas com baixo grau de intensidade, e estruturas muito

próximas das áreas de expressão de IHC no espaço de cores. A imagem resultante (f) mostra que o espaço de cores adaptativo construído especificamente para o caso apresentado possibilitou a correta discriminação entre as áreas de expressão de IHC apresentadas na amostra.

Na Figura 7 são apresentados os resultados obtidos pela aplicação da metodologia proposta em outros três casos utilizando o anticorpo CD1a. Este é um caso típico da rotina histopatológica onde uma dada amostra é composta de várias imagens, e a verificação da intensidade da reação é realizada individualmente em cada uma das partes da amostra. Neste caso, a etapa de treinamento e a geração do espaço ocorreram com base na seleção de áreas típicas de expressão de IHC em várias das partes da amostra (figuras a, c, e). O espaço de cores gerado a partir das amostras iniciais foi utilizado para identificação das expressões ao longo de todo o conjunto de imagens desta sessão de IHC, permitindo classificar várias amostras parciais (b, d, f) com os mesmos parâmetros de escala. Conforme observado, a figura (c) apresenta baixo valor de intensidade de reação e poucas áreas de CD1a, enquanto em (a, e) a reação é mais evidente ao longo do tecido. Em um processo de classificação individual realizado em cada parcial da amostra, a figura (c) apresenta poucas áreas de expressão de IHC para obtenção do espaço característico, sendo que o comportamento do padrão no espaço de cores é capturado das parciais adjacentes. Resultados adicionais da aplicação da metodologia proposta podem ser encontrados em <http://www.lapix.ufsc.br/chptool>.

Reprodutibilidade dos resultados em outros domínios de aplicação em histopatologia

Um questionamento surge quando se analisa os resultados obtidos e o método utilizado para obter os mapas de similaridade: a generalidade do método para aplicar em outros domínios do campo da histopatologia. Nesta subseção é oferecida uma generalização do método proposto para alcançar os resultados obtidos, bem como uma discussão da reprodutibilidade em campos de aplicação correlatos. Descrevendo em termos gerais, o processo utilizado para solucionar o problema da segmentação de IHC pode ser decomposto em duas fases distintas, conforme especificadas abaixo:

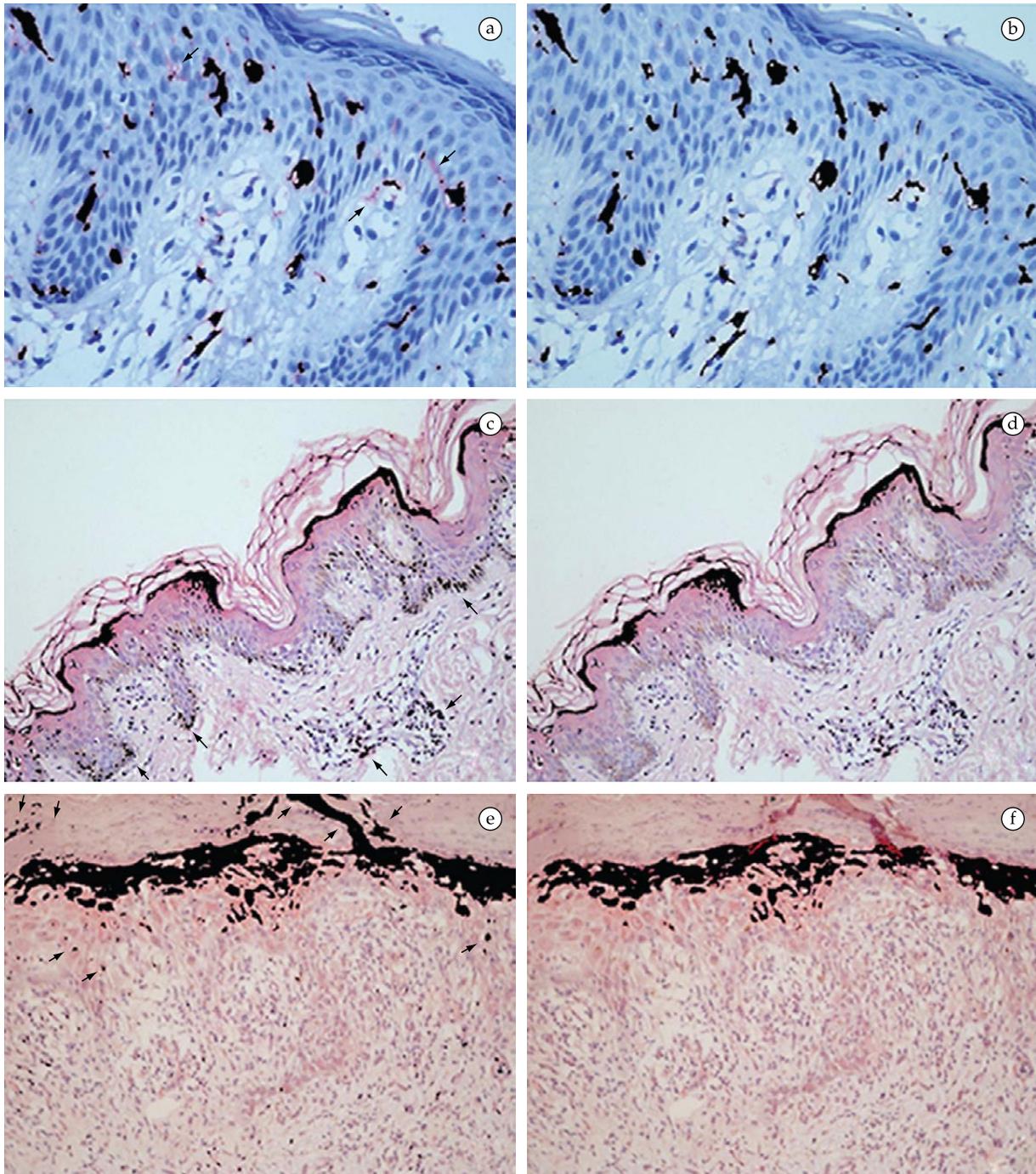


Figura 6. Comparação entre *threshold* linear no espaço de cores HSV (a, c, e) e resultados da segmentação obtida pelo espaço de cores adaptativo (b, d, f). **Figure 6.** Comparison between HSV linear threshold (a, c, e) and the segmentation obtained results by the adapted color space (b, d, f).

Fase 1: modelagem do espaço de cores adaptativo:

- **Passo 1: Seleção da métrica de similaridade / distância:** seleção de uma métrica de distância adequada para a representação das relações de cores características de uma área de aplicação específica de IHC. Esta métrica de similaridade deve permitir o desenvolvimento de uma métrica

específica que defina ordens parciais e totais em um dado conjunto de grupos, baseada nos valores de cores das áreas típicas do reagente biológico.

- **Passo 2: Desenvolvimento do espaço característico:** organização do modelo inicial multivariado e aplicação deste para a modelagem do novo espaço característico.

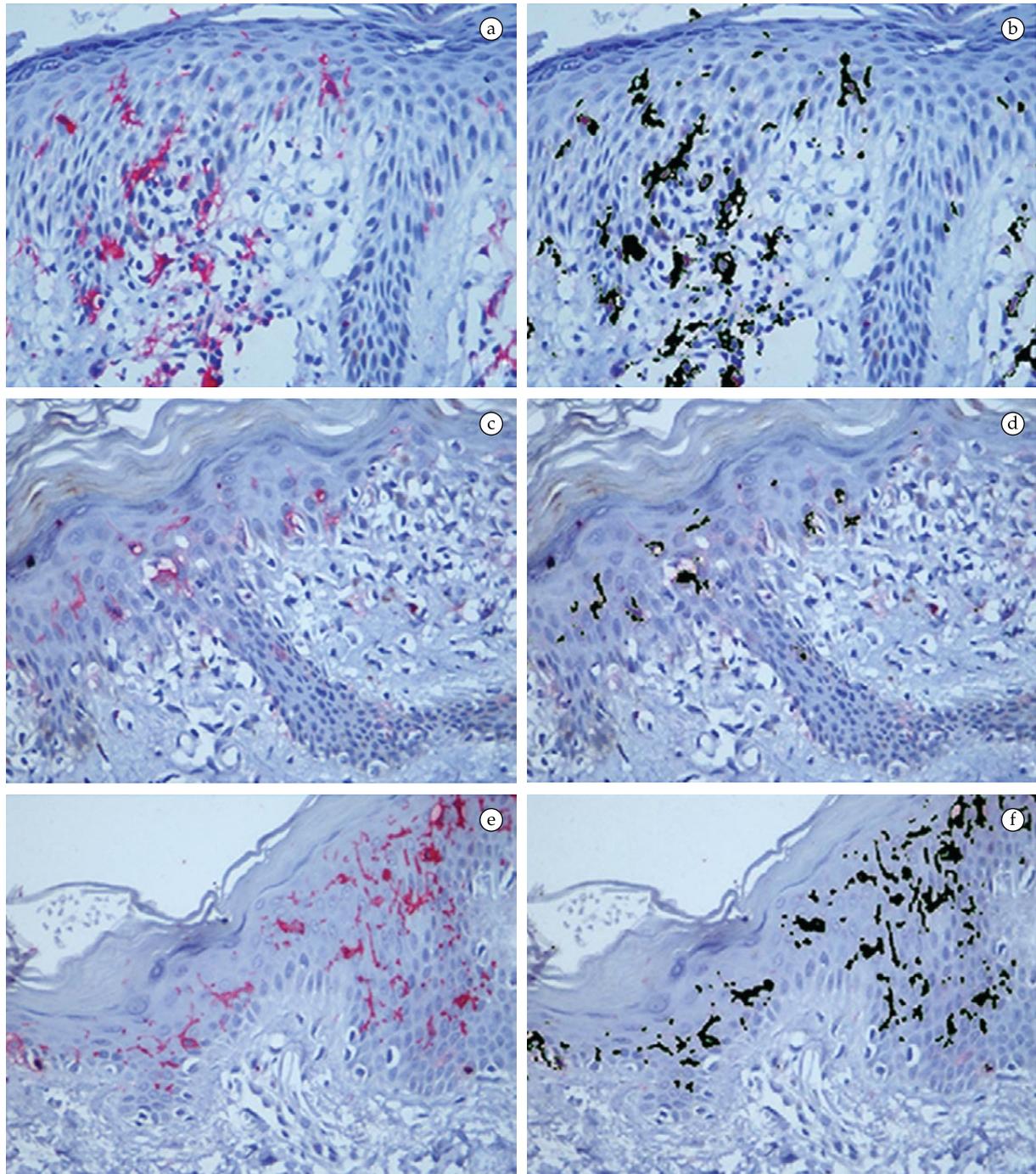


Figura 7. Resultados de segmentação de expressão de IHC de uma mesma sessão do anticorpo CD1a e utilizando o mesmo espaço de cores produzido. (a, c, e): conjunto de treinamento. (b, d, f) resultado da segmentação. **Figure 7.** IHC expression segmentation results of the same antibody session (CD1a) using the same adapted color space. (a, c, e): training set. (b, d, f) segmentation results.

- **Passo 3: Desenvolvimento do classificador:** desenvolvimento de um classificador capaz de efetuar buscas com base no espaço característico de uma determinada seção de IHC, aplicando a métrica e classificando a amostra de IHC em marcação e *background*.

Fase 2: Aplicação do espaço de cores adaptativo na segmentação de novas amostras:

- **Passo 4: Uso da métrica:** apresentar as imagens de IHC a serem analisadas para o classificador modelado, aplicando e classificando cada amostra e rotulando as áreas de expressão de IHC.

Discussão e Conclusões

O uso de espaços de cores modelados estatisticamente para a identificação de expressão de IHC mostrou-se uma abordagem efetiva e robusta. O uso do método proposto aumenta a especificidade na delimitação das áreas de expressão de IHC, e isto se torna particularmente útil nos casos onde o tecido apresentar depósitos de pigmentos ou quando se torna necessário obter o grau de intensidade de determinado reagente. Como resultados preliminares, a metodologia proposta se mostrou efetiva na identificação dos biomarcadores, possibilitando uma alta correlação entre os resultados obtidos em relação à análise realizada pelo especialista em histopatologia. Observa-se também uma melhora significativa em relação ao tempo de análise clínica, e a redução do grau de subjetividade na análise em sessões de IHC. Mesmo em casos considerados simples, que podem ser solucionados por técnicas lineares de classificação, os resultados podem ser melhorados significativamente nesta metodologia.

A extensão da metodologia proposta para outros domínios de aplicação, embora apresente um processo de análise similar, necessita ser avaliada qualitativamente e quantitativamente. Novos experimentos utilizando diferentes contextos de aplicação necessitam ser realizados para verificar o grau de efetividade do método de identificação. Da mesma forma, outros índices estatísticos de avaliação da qualidade dos resultados podem ser utilizados, obtendo-se assim índices finais de sensibilidade e sensibilidade mais precisos.

É importante observar que os candidatos a "outliers" na etapa de treinamento não foram desconsiderados. A qualidade dos resultados de segmentação, entretanto, é dependente do conjunto de treinamento utilizado inicialmente, que dá suporte no desenvolvimento do espaço adaptativo. Para casos onde "outliers" podem induzir a erros, outras métricas tais como Mahalanobis-Taguchi (Taguchi *et al.*, 2001; Taguchi e Jugulum, 2002) consideram apenas "seeds" saudáveis na etapa de treinamento, anulando assim os efeitos de imprecisão produzidos pelos "outliers".

Outras variações da distância de Mahalanobis poderiam ser empregadas na construção do espaço adaptativo: em McCane e Albert (2008), funções de distância para dados categorizadas e variáveis mistas são utilizadas. Novas contribuições tais como o produto tensorial ou a covariância simbólica, além da distância de Mahalanobis clássica, possibilitam gerar boas funções de discriminação. Recentemente outras

abordagens vêm utilizando o aprendizado da distância de Mahalanobis para categorização "pair-wise" (Xiang *et al.*, 2008), que poderiam ser empregados em uma técnica multimodal para a segmentação de expressão de IHC. Entretanto, a categorização "pair-wise" necessita conhecer dois tipos de informações: conjunto de pontos similares, correspondendo a áreas de iNOS, e *background*, correspondendo à pele saudável. Métricas de similaridade tais como Kullback-Leibler (Kullback, 1987) e Bhattacharyya (Bhattacharyya, 1943) são aptas a discriminar entre duas distribuições multivariadas, e obter escalares de similaridade para elas. Para o contexto de iNOS, é muito mais simples para o especialista determinar apenas as áreas que correspondem a expressões positivas do biomarcador, o que pode ser obtido diretamente pelo uso da distância de Mahalanobis. O método proposto neste artigo mostrou-se robusto na solução de uma tarefa computacionalmente complexa, em um método semi-automatizado.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Serviço de Patologia, Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, no Brasil, pelo uso e validação da abordagem computacional em seus experimentos. Gostaríamos de agradecer Daniel Duarte Abdala, da Universidade de Münster - Alemanha, e Cláudia Figueiredo por nos prover as amostras de IHC utilizadas nos experimentos. Agradecemos também à Universidade de São Paulo, pela aprovação do comitê de ética dos experimentos realizados pela doutoranda Gabriella Di Giunta.

Referências

- BHATTACHARYYA, A. On a measure of divergence between two statistical populations defined by probability distributions. *Bulletin of the Calcutta Mathematical Society*, v. 35, p. 99-109, 1943.
- CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE, C. *Histofisiologia de Moluscos Bivalvos Marinos*. Madrid: CSIC, 2008. 93 p.
- CHANUSSOT, J.; LAMBERT, P. Total ordering based on space filling curves for multivalued morphology. In: HEIJMANS, H. J. A. M.; ROERDINK, J. B. T. M. (Eds.). *Mathematical Morphology and its Applications to Image and Signal Processing*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 51-58. (Computational Imaging and Vision, v. 12).
- ELMOATAZ, A.; SCHÜPP, S.; CLOUARD, R.; HERLIN, P.; BLOYET, D. Using active contours and mathematical morphology tools for quantification of

- immunohistochemical images. **Signal Processing**, v. 71, n. 2, p. 215-226, 1988.
- FRANCISCO, J. S.; MORAES, H. P.; DIAS, E. P. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n. 2, p. 100-104, 2004.
- GIL, J.; WU, H. S. Applications of image analysis to anatomic pathology: realities and promises. **Cancer Investigation**, v. 21, n. 6, p. 950-959, 2003.
- GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-94, 1988.
- HAMMES, L. S.; KORTE, J. E.; TEKMAL, R. R.; NAUD, P.; EDELWEISS, M. I.; VALENTE, P. T.; LONGATTO-FILHO, A.; KIRMA, N.; CUNHA-FILHO, J. S. Computer-assisted immunohistochemical analysis of cervical cancer biomarkers using low-cost and simple software. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 15, n. 4, p. 456-462, 2007.
- JENNETTE, J. C. **Immunohistology in Diagnostic Pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 307 p.
- KACZMAREK, E.; GÓRNA, A.; MAJEWSKI, P. Techniques of image analysis for quantitative immunohistochemistry. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (Annales Academiae Medicae Bialostocensis)**, v. 49, Suppl. 1, p. 155-158, 2004.
- KAMALOV, R.; GUILLAUD, M.; HASKINS, D.; HARRISON, A.; KEMP, R.; CHIU, D.; FOLLEN, M.; MACAULAY, C. A Java application for tissue section image analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 77, n. 2, p. 99-113, 2005.
- KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. 3rd ed. London: Hodder Arnold, 2004. 502 p.
- KULLBACK, S. The Kullback-Leibler distance. **The American Statistician**, v. 41, n. 4, p. 340-341, 1987.
- LAW, A. K.; LAM, K. Y.; LAM, F. K.; WONG, T. K.; POON, J. L.; CHAN, F. H. Image analysis system for assessment of immunohistochemically stained proliferative marker (MIB-1) in oesophageal squamous cell carcinoma. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 70, n. 1, p. 37-45, 2003.
- LÓPEZ, C.; LEJEUNE, M.; SALVADÓ, M. T.; ESCRIVÀ, P.; BOSCH, R.; PONS, L. E.; ALVARO, T.; ROIG, J.; CUGAT, X.; BAUCCELLS, J.; JAÉN, J. Automated quantification of nuclear immunohistochemical markers with different complexity. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 3, p. 379-387, 2008.
- LUIS-GARCÍA, R.; DERICHE, R.; ROUSSON, M.; ALBEROLA-LÓPEZ, C. Tensor processing for texture and colour segmentation. In: **LECTURE Notes in Computer Science**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 1117-1127.
- MAHALANOBIS, P. C. On the generalized distance in statistics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 12, p. 49-55, 1936.
- McCANE, B.; ALBERT, M. Distance functions for categorical and mixed variables. **Pattern Recognition Letters**, v. 29, n. 7, p. 986-993, 2008.
- TAGUCHI, G.; CHOWDHURY, S.; WU, Y. **The Mahalanobis-Taguchi System**. New York: McGraw-Hill, 2001.
- TAGUCHI, G.; JUGULUM, R. **The Mahalanobis-Taguchi Strategy: A Pattern Technology System**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 256 p.
- TAKESHITA, T.; NOZAWA, S.; KIMURA, F. On the Bias of Mahalanobis Distance due to limited Sample Size Effect. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON DOCUMENT ANALYSIS AND RECOGNITION, 2., 1993**, Tsukuba. **Proceedings...** p. 171-174.
- WALL, M. E.; RECHTSTEINER, A.; ROCHA, L. M. Singular Value Decomposition and Principal Component Analysis. In: BERRAR, D. P.; DUBITZKY, W.; GRANZOW, M. (Eds.). **A Practical Approach to Microarray Data Analysis**. Norwell, MA: Kluwer, 2003. p. 91-109.
- WU, C.; ZHAO, W.; LIN, B.; GINSBERG, M. D. Semi-automated image processing system for micro- to macro-scale analysis of immunohistopathology: application to ischemic brain tissue. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 78, n. 1, p. 75-86, 2005.
- XIANG, S.; NIE, F.; ZHANG, C. Learning a Mahalanobis distance metric for data clustering and classification. **Pattern Recognition**, v. 41, n. 12, p. 3600-3612, 2008.
- YANG, W. Q.; LUN, X.; PALMER, C. A.; WILCOX, M. E.; MUZIK, H.; SHI, Z. Q.; DYCK, R.; COFFEY, M.; THOMPSON, B.; HAMILTON, M.; NISHIKAWA, S. G.; BRASHER, P. M.; FONSECA, K.; GEORGE, D.; REWCASTLE, N. B.; JOHNSTON, R. N.; STEWART, D.; LEE, P. W.; SENGER, D. L.; FORSYTH, P. A. Efficacy and safety evaluation of human reovirus type 3 in immunocompetent animals: racine and nonhuman primates. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8561-8576, 2004.

