



Bilena Lima de Brito Almeida

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

## Processamento de Imagem de Microscópio para Análise de Biópsia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Dr. José Manuel da Fonseca, Professor Auxiliar com Agregação,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Dr. André Damas Mora, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências  
e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Dra. Carla Maria Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade  
de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Arguentes: Dr. Pedro Manuel Viera, Professor Auxiliar, Faculdade de  
Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017



### **Processamento de Imagem de Microscópio para Análise de Biópsia**

Copyright © Bilena Lima de Brito Almeida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Ao meu irmão, o meu amor para sempre.*

*Aos meus pais e avós por serem os meus pilares de vida.*



## AGRADECIMENTOS

Os meus mais profundos e sinceros agradecimentos,

Ao meu orientador, Professor José Fonseca, por toda amabilidade, motivação e confiança, pela incansável boa-disposição, paciência, disponibilidade e dedicação, pelas condições de trabalho proporcionadas e por todos os valiosos ensinamentos/concelhos (e aqueles “cliques”) transmitidos durante o semestre. A si, estimado Professor, serei sempre grata pela oportunidade de ter trabalhado num projeto tão cativante.

Ao meu co-orientador, Professor André Mora, por toda atenção, disponibilidade e ajuda, pelos concelhos e opiniões transmitidos e pela determinante orientação aquando da segmentação.

Ao Ipatimup, em particular ao Doutores António Polónia e Catarina Eloy, pela imprescindível colaboração e parceria. Obrigada por toda disponibilidade e empenho e por fornecerem as bases sem as quais esta dissertação não seria possível.

À Professora Rita Ribeiro por toda amabilidade, disponibilidade e acompanhamento e pelo exemplo de investigadora. Obrigada pelas oportunidades únicas proporcionadas.

Ao UNINOVA-CA3 Group pelo caloroso acolhimento desde a minha primeira “*friday meeting*”. Obrigada por toda ajuda, pelas agradáveis “*unscheduled meetings*” e por despertarem em mim um crescente fascínio pela inteligência computacional.

À Sara, ao Guilherme, à Inalinda e em especial à Darline (*my darling*), os meus melhores companheiros de “luta”. Obrigada por toda amizade, convívio e companheirismo e pelos bons momentos.

À minha mãe Felismina, minha âncora, minha melhor e maior incentivadora. Longe uma da outra, acordava com aquela infalível mensagem de bom dia e adormecia na certeza que oras por mim todas as noites. Obrigada por me ajudares a formar quem hoje sou e por nunca me teres permitido desistir.

Ao meu pai Domingos, meu reforço, meu maior companheiro de “luta”. Obrigada pelo inestimável apoio e cuidado e por todos os princípios transmitidos nestes 5 anos juntos.

Ao meu irmão, Carlos (eterno “meu pequeno”), que, como ninguém, vibra e torce pelas minhas conquistas. Obrigada por toda alegria e fonte de inspiração e todo incentivo trazidos à minha vida.

Ao meu tio Mateus e esposa, Armanda, por tamanho carinho e cuidado e pelas excelentes quadras festivas e verões passados juntos. Obrigada por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Aos meus avós, exemplos de sabedoria, e a toda minha família por todo encorajamento e motivação e por principalmente sempre acreditarem em mim. Obrigada por me inculcarem o espírito de garra e perseverança e todos os valores que contribuíram para o sucesso deste meu percurso académico.

Ao meu padrinho, Carlos, por todo carinho, orgulho e apoio e pelo exemplo de vida.

À Gisela e ao Lívio por, mesmo longe, manifestarem uma amizade inabalável. Obrigada por toda irmandade, compreensão e palavras de encorajamento.

E a todos que de alguma forma me acompanharam nesta longa jornada e sempre se fizeram presentes, o meu sincero agradecimento.



## RESUMO

---

No âmbito da patologia, o diagnóstico de doenças como o cancro passa pela análise de lâminas microscópicas. Conquanto, quando digitalizadas, as imagens resultantes exibem uma definição extraordinariamente alta, tipicamente da ordem das dezenas de gigapixels ( $10^9$  pixels), necessitando de vários gigabytes de memória para o seu processamento. A dimensão destas imagens dificulta significativamente a aplicação de qualquer algoritmo de processamento de imagem e, conseqüentemente, qualquer análise automática. A falta de ferramentas adequadas leva a que a análise seja efetuada, preferencialmente, sobre a lâmina física, utilizando o microscópio ótico convencional, um processo inerentemente subjetivo. Neste enquadramento, o presente projeto surgiu de uma necessidade manifestada pelo Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto – Ipatimup. Incorporado na área de Imagem Biomédica, pretendeu-se colmatar a carência de uma ferramenta de processamento de imagens de lâminas de biópsia. Numa primeira fase, foi desenvolvida uma interface de apoio à análise assistida de imagens microscópicas de híper-resolução. Ao ser desenvolvida em estreita colaboração com patologistas do Ipatimup, a interface aborda os principais requisitos de um sistema de patologia digital. Por conseguinte, proporciona uma apropriada visualização, sem a introdução de atrasos na exibição, o que permite também uma “navegação” mais agradável e eficiente ao longo da imagem, melhorando conseqüentemente a duração da análise. Esta análise pode ainda ser complementada com a realização e a revisão de anotações e um conjunto de aplicações que facilitam a partilha, a revisão e a análise visual e quantitativa destas imagens de microscopia patológica. A segunda fase abarcou o desenvolvimento de um algoritmo de segmentação automática para identificação de nucleoides em lâminas raspadas da tiroide em campo claro, o que, além de proporcionar uma adequada detecção/segmentação de nucleoides, dispõe de um mecanismo de edição, permitindo ao utilizador total liberdade para validar/alterar o resultado. Complementarmente, são fornecidas medidas de características específicas da morfologia e homogeneidade dos nucleoides, informações determinantes para a avaliação do estado e evolução do cancro da tiroide. Na sequência, este trabalho poderá, ainda, ser complementado com um algoritmo que, baseando no número de nucleoides detetados e suas morfologias, permita, também, propor um diagnóstico.

**Palavras-Chave:** Microscopia Virtual, Patologia Digital, Híper-Resolução, Processamento de Imagem, Sub-Amostragem, Segmentação Automática.



## ABSTRACT

---

In pathology, the diagnosis of diseases such as cancer passes through the analysis of microscope slides. Although, when scanned, the resulting images exhibit an extraordinarily high definition, typically of the order of tens of gigapixels ( $10^9$  pixels), requiring several gigabytes of memory for processing. The size of these images significantly hinders the application of any image processing algorithm and, thereafter, any auto-analysis. The lack of suitable tools leads to the analysis being rather performed on the physical slide using the classical optical microscope, an inherently subjective process. In this context, the present project arose from a need expressed by the Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto - Ipatimup. Incorporated in the field of Biomedical Imaging, it was intended to fill the gap of a tool able of processing biopsy slides images. On a first phase, an interface was developed to support the assisted analysis of hyper-resolution microscopy images. Because it was developed in close collaboration with Ipatimup pathologists, the interface addresses the main requirements of a digital pathology system. Therefore, it provides an appropriate visualization, without introducing delays in the display, which also allows a more pleasant and efficient "navigation" throughout the image, thus improving the duration of the analysis. This analysis can be complemented with the realization and the revision of annotations and a set of applications that facilitate the sharing, the revision and the visual and quantitative analysis of these pathological microscopy images. The second phase covered the development of an automatic segmentation algorithm for nucleoids identification on thyroid scraped slides in light field, which, besides providing a suitable nucleoids detection/segmentation, offers an editing mechanism, allowing the user complete freedom to accept/change the result. In addition, measures of specific characteristics of the nucleoids morphology and homogeneity are provided, which are crucial information for assessing the state and evolution of the thyroid cancer. Given more time and resources, this work could also be complemented with an algorithm that, based on the number of nucleoids detected and their morphologies, could provide the user with a proper diagnosis.

**Keywords:** Virtual Microscopy, Digital Pathology, Hyper-Resolution, Image Processing, Downsampling, Automatic Segmentation.



# CONTEÚDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS</b>	<b>XIX</b>
<b>1 ENQUADRAMENTO</b>	<b>1</b>
<b>2 INTRODUÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
2.1 MICROSCOPIA -----	5
2.1.1 <i>Do microscópio convencional à Patologia Digital</i> -----	6
2.1.2 <i>Requisitos da análise assistida de imagens microscópicas</i> -----	7
2.1.2.1 Pré-Processamento de Imagem -----	8
2.1.2.2 Segmentação Automática de núcleos -----	8
2.1.3 <i>Híper-Resolução</i> -----	9
2.1.3.1 Abordagens ao problema -----	10
2.1.3.2 Plataformas de análise de imagens microscópicas -----	11
2.2 CONTEXTUALIZAÇÃO -----	13
2.3 TRABALHOS RELACIONADOS -----	14
2.3.1 <i>Interfaces para navegação de imagens microscópicas</i> -----	14
2.3.2 <i>SLDC</i> -----	15
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
3.1 FERRAMENTAS DE PROCESSAMENTO DE IMAGEM -----	17
3.1.1 <i>Técnicas de Processamento de Imagem</i> -----	17
3.1.2 <i>Linguagem computacional</i> -----	20
3.2 INTERFACE DE APOIO À ANÁLISE ASSISTIDA DE IMAGEM -----	21
3.2.1 <i>Visualização e Sub-Amostragem</i> -----	22
3.2.1.1 Técnicas de Sub-Amostragem -----	22
3.2.1.2 Metodologia de Sub-Amostragem -----	24
3.2.1.3 Pré-Processamento -----	27
3.2.1.4 Mecanismo de visão global + detalhe -----	29

3.2.2	<i>Navegador</i> -----	31
3.2.3	<i>Anotações</i> -----	33
3.2.4	<i>Análise quantitativa</i> -----	35
3.2.5	<i>Outras funcionalidades</i> -----	36
3.3	SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA DE NUCLEOIDES-----	37
3.3.1	<i>Métodos de segmentação de núcleos</i> -----	38
3.3.2	<i>Detecção e Segmentação Automática de nucleoides</i> -----	39
3.3.2.1	Detecção de nucleoides-----	40
3.3.2.2	Mecanismo de edição de resultado-----	42
3.3.2.3	Segmentação e medição de propriedades de nucleoides-----	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS, DISCUSSÃO E MELHORIAS</b>	<b>47</b>
4.1	INTERFACE DE APOIO À ANÁLISE ASSISTIDA DE LÂMINAS DE BIÓPSIA-----	47
4.1.1	<i>Principais funcionalidades</i> -----	48
4.1.2	<i>Eventuais melhorias</i> -----	50
4.1.3	<i>Futuros complementos</i> -----	50
4.2	ALGORITMO DE IDENTIFICAÇÃO DE NUCLEOIDES-----	51
4.2.1	<i>Desafios ao seu desenvolvimento</i> -----	52
4.2.2	<i>Validação</i> -----	52
4.2.3	<i>Potencial alternativa</i> -----	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>61</b>
	<b>A. PRINCIPAIS DISPOSITIVOS DE ENTRADA</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

2.1	EXEMPLAR DE MICROSCÓPIO BINOCULAR UTILIZADO EM MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.....	6
2.2	DIMENSÃO TÍPICA DE UMA LÂMINA DIGITALIZADA.....	10
2.3	HÍPER-RESOLUÇÃO – ABORDAGENS AO PROBLEMA (PICEIS E SIPF).....	11
2.4	VISÃO GERAL DA CYTOMINE-WEBUI.....	12
3.1	TRANSFORMAÇÕES GEOMÉTRICAS – ROTAÇÃO E ZOOMING.....	18
3.2	IMAGE ENHANCEMENT – AJUSTE DE CONTRASTE E EQUALIZAÇÃO DE HISTOGRAMA.....	19
3.3	OPERAÇÕES MORFOLÓGICAS – PREENCHIMENTO DE BURACOS E FILTRAGEM AREA OPENING.....	20
3.4	SEGMENTAÇÃO – THRESHOLDING E EDGE DETECTION.....	20
3.5	SUB-AMOSTRAGEM PELO VISUALIZADOR DO MATLAB.....	25
3.6	SUB-AMOSTRAGEM PRECEDIDA POR PRÉ-FILTRAGEM UTILIZANDO INTERPOLAÇÃO BICÚBICA.....	26
3.7	CAMPO DE VISÃO PROPORCIONADO POR CADA FATOR DE AMPLIAÇÃO.....	28
3.8	REGISTO DE ÁREAS ANALISADAS.....	31
3.9	EXEMPLOS DE ANOTAÇÕES.....	34
3.10	MECANISMO DE VISUALIZAÇÃO DE ANOTAÇÕES.....	35
3.11	MEDIÇÃO DE DISTÂNCIA ENTRE DOIS PONTOS.....	36
3.12	SUBIMAGENS PARA TESTE DO ALGORITMO DE IDENTIFICAÇÃO DE NUCLEOIDES.....	40
3.13	OUTPUT DO ALGORITMO DE DETECÇÃO DE NUCLEOIDES.....	42
3.14	EDIÇÃO DE RESULTADO PRODUZIDO PELO ALGORITMO DE DETECÇÃO DE NUCLEOIDES.....	43
3.15	APRESENTAÇÃO DE PROPRIEDADES DA MORFOLOGIA E HOMOGENEIDADE DE NUCLEOIDES.....	44
3.16	MEDIÇÃO DE PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DE OBJETOS ESPECIFICADOS.....	45
4.1	IPATHSCOPE – INTERFACE DE PROCESSAMENTO DE IMAGEM PARA ANÁLISE DE BIÓPSIA.....	48
4.2	NUCLEIDS SEGMENTATION – INTERFACE DE SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA DE NUCLEOIDES.....	51
4.3	PRECISION-RECALL CURVE DO ALGORITMO DE DETECÇÃO DE NUCLEOIDES.....	54
4.4	INCONVENIENTES DO ALGORITMO DE IDENTIFICAÇÃO DE NUCLEOIDES.....	54
A.1	LEGENDA DOS BOTÕES UTILIZADOS NO JOYSTICK.....	66



## **LISTA DE TABELAS**

3.1 DURAÇÃO DE UPLOAD DE IMAGEM, PRÉ-PROCESSAMENTO E ARRANQUE DO SOFTWARE.....	29
4.1 DISPOSITIVOS DE ENTRADA E RESPETIVOS MECANISMOS DE NAVEGAÇÃO.....	49
A.1 ATALHOS DO TECLADO.....	65



## LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ACMs – *Active Contour Models*

GUIDE – *Graphical User Interface Development Environment*

GUIs – *Graphical User Interfaces*

HT – *Hough Transform*

IPathScope – *Ipatimup PATHology microSCOPE*

Ipatimup – Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

Matlab – *MATrix LABoratory*

PiCEIS – *Parallel Computational Environment for Imaging Science*

PRC – *Precision-Recall Curve*

ROIs – *Regions Of interest*

RVP – Rácio de Verdadeiros Positivos

SIPF – *Scalable Image Processing Framework*

SLDC – *Segment-Locate-Dispatch-Classify*

VPP – Valor Preditivo Positivo

WSI – *Whole-Slide Image*

WT – *Watershed Transform*



## ENQUADRAMENTO

O diagnóstico de doenças como o cancro passa pela análise microscópica de lâminas de patologia de modo a identificar/detetar células malignas e/ou artefactos. Esta análise pode ser realizada computacionalmente com base nas imagens digitalizadas das lâminas. Contudo, as imagens são de grande dimensão, tipicamente multi-gigapixels. Não só em patologia, como em diversos outros campos de aplicação, imagens de híper-resolução devem ser analisadas para obter informação e/ou tomar decisões. Os grandes desafios incluem não só tornar a qualidade de imagem suficientemente boa, mas também a velocidade de visualização interativa com rapidez suficiente para ser comparável à experiência de utilizar um microscópio ótico. Além da grande quantidade de informação embecida na lâmina, adicionais desafios ao desenvolvimento de uma ferramenta computacional com aplicação em patologia, que permita a inferência de diagnóstico, advêm da preparação da lâmina, de artefactos nela presentes e da sua digitalização, que afetam significativamente a qualidade da imagem e a sua análise visual. A falta de ferramentas adequadas e a grande familiarização dos patologistas com o microscópio ótico convencional levam a que a análise seja efetuada, preferencialmente, via manual sobre a lâmina física (Mormont, 2016; Wang, Huang, & Hung, 2015).

Alternativamente a esta abordagem puramente manual, técnicas de processamento de imagem associadas ao *clustering* e ao *machine learning* têm vindo a ser desenvolvidas com o intuito de permitir a extração de informação de forma automática. Por conseguinte, são frequentemente utilizadas para resolver problemas de detecção e classificação de objetos (Chen, Zhao, Wu, Yao, & Zhang, 2012; Mormont, 2016). No entanto, por um lado, estas técnicas ainda se encontram limitadas a imagens que podem ser inteiramente carregadas na memória. Por outro lado, os objetos que constituem uma imagem biomédica são altamente texturados, apresentando elevado nível de ruído, baixo contraste e grande resolução espacial. Tais características, conjuntamente com a alta variabilidade em forma, tamanho e intensidade dos mesmos, tornam ainda mais difícil o processamento de imagens biomédicas (Gonzalez & Ballarin, 2009). Assim, a segmentação constitui, simultaneamente, um método vital e um dos principais desafios no processamento de imagem. A segmentação de imagem médica vem-se tornando, cada vez mais, um campo de pesquisa bastante desafiador no domínio da análise de imagem médica (Bala, 2012; Li, Wu, & Sun, 2010). As células malignas ou as principais características morfológicas de doenças como o cancro estão

concentradas no núcleo, de modo que a questão mais importante de identificação celular consiste em separar a célula individual da imagem de fundo. Deste modo, diversas ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas no intuito de facilitar e promover um diagnóstico mais preciso. Especialmente neste tipo de doenças, o pré-diagnóstico torna-se uma questão de fulcral importância (Li et al., 2010).

Neste contexto, a motivação para esta dissertação surge de uma necessidade manifestada pelo Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto – Ipatimup, e será realizada em colaboração com os Doutores António Polónia e Catarina Eloy, Médicos Especialistas de Ipatimup Diagnósticos, sob orientação do Professor José Manuel Fonseca. Neste sentido, pretende-se colmatar a carência de uma ferramenta de processamento de imagens de microscopia patológica de hiper-resolução. No Ipatimup, a análise destas imagens é atualmente realizada manualmente, com recurso a microscópios *Leica DM 2000 LED* e aos softwares *D-Sight Viewer* e *SlidePath Gateway*, consistindo num processo dotado de alguma subjetividade, relativamente árduo e até mesmo desgastante para quem o realiza.

Posto isto, este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de uma interface que irá constituir uma ferramenta de apoio à análise assistida de imagens de microscopia. Esta deverá possibilitar uma adequada visualização, “navegação” e subsequente análise de imagens de lâminas de patologia. Inicialmente, pretende-se que este software seja de fácil utilização e capacitado para suportar imagens multi-gigapixels. Além disso, deverá facilitar a análise destas imagens, permitindo a realização e revisão de anotações e medições de propriedades morfológicas de elementos de interesse. Complementarmente, será dada especial atenção à otimização da duração da análise e ao armazenamento da informação de partes da lâmina, bem como de toda a informação da mesma. A interface desenvolvida será, portanto, desenhada com vista a ser utilizada pelo Ipatimup para análise de imagens digitalizadas de lâminas de biópsia. Tendo concluído este objetivo com sucesso, será levada a cabo uma pesquisa científica na qual serão testados diferentes algoritmos de deteção/segmentação automática de núcleos em lâminas de microscópio. Uma vez que o diagnóstico do cancro da tiroide se baseia na deteção de células ou grupos celulares com características distintivas, o propósito específico desta abordagem consiste em desenvolver e/ou adaptar um algoritmo de segmentação automática para identificação de nucleoides em subimagens de lâminas raspadas da tiroide em campo claro. Informações adicionais, de fundamental relevância para a determinação do diagnóstico, como medidas de atributos da morfologia e homogeneidade das células identificadas, deverão, também, ser facultadas. Tendo sido desenvolvidas as ferramentas apropriadas, este algoritmo poderá ser aplicado à imagem na sua íntegra e uma subsequente técnica de diagnóstico poderá ser proposta.

A presente dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos. Da corrente secção, capítulo 1, compôs-se uma pequena familiarização e enquadramento ao tema, relatando sua relevância e os objetivos do projeto desta tese. Na sequência, apresenta-se no capítulo 2 uma introdução teórica que constitui uma simples descrição das razões e implicações da transição da microscopia convencional para a microscopia virtual, tal como uma breve abordagem à hiper-resolução e à necessidade

de pré-processamento e segmentação de imagem no âmbito da microscopia digital. Ainda neste, é incorporada a caracterização da instituição parceira deste projeto, o Ipatimup, e descrito o processo de análise de lâminas de biópsia no cenário do instituto. Ao longo deste capítulo, é também, conjuntamente, resumido o estado de arte respeitante ao tema. Esta duas primeiras secções abrangem as bases em que se encontra assente este trabalho. O capítulo 3 compreende, numa primeira parte, uma introdução às principais técnicas de processamento de imagem aplicadas na microscopia, bem como a definição da linguagem computacional utilizada tanto para o desenvolvimento da interface de apoio à análise assistida de imagens microscópicas, como da interface de segmentação automática de nucleóides. Subsequentemente, os importantes aspetos destas duas interfaces, nomeadamente suas funcionalidades e respetivos benefícios, são sumariadas na segunda e última parte deste capítulo. Os resultados obtidos, e as considerações relativamente aos mesmos, referentes à ferramenta computacional que se propôs a desenvolver, juntamente com potenciais perspetivas futuras que visam a continuação deste projeto, são apresentadas no capítulo 4. Por fim, no capítulo 5 consta uma síntese do trabalho realizado, encontrando-se condensadas as conclusões sobre o mesmo.



## INTRODUÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Microscopia

As origens da microscopia remontam ao século I dc. Inicialmente, as lentes eram pedaços de vidro utilizados para aumentar a dimensão dos objetos e focar raios solares para obter fogo. Em 1590, trabalhos realizados pelos holandeses, Zaccharias Janssen e seu pai, Hans, levaram à invenção do microscópio composto e do telescópio. Robert Hooke, em 1665, foi a primeira pessoa a observar células, sendo considerado o “pai da microscopia inglesa”. Dez anos mais tarde, Anton van Leeuwenhoek, construindo o seu próprio microscópio, foi a primeira pessoa a descrever células e bactérias (Wu, Merchant, & Castleman, 2008). Ao longo dos seus mais de 400 anos de história, diversos modelos de microscópio foram desenvolvidos no intuito de melhorar o seu desempenho e facilidade de uso. Hoje em dia, os microscópios óticos constituem os principais instrumentos em muitos laboratórios biológicos. Quando devidamente alinhados e ajustados, são de fundamental importância na investigação biomédica e no diagnóstico (Levoy, Ng, Adams, Footer, & Horowitz, 2006; Salmon, von Lackum, & Canman, 2005).

Adicionando ao microscópio ótico uma matriz de microlentes e um software de pós-processamento obtém-se o sistema de microscopia de campo claro. Este sistema tem particular interesse na citologia uma vez que permite capturar, numa única fotografia, campos de luz que atravessam espécimes biológicos corados ou contrastados (Levoy et al., 2006). O microscópio utilizado é constituído por 2 sistemas de lentes, lente ocular e lente objetiva, que, em conjunto, permitem observar um objeto em maior detalhe. A lente objetiva é a lente localizada junto ao objeto que se observa, sendo responsável pela formação da imagem real do mesmo, enquanto que a ocular encontra-se próxima do olho do observador e faz a ampliação da imagem real, formando uma imagem virtual e maior (ver Fig. 2.1). O fator de ampliação do microscópio é dado pelo produto da ampliação de cada uma das lentes. Normalmente, a maioria destes microscópios apresenta lentes objetivas intercambiáveis e possui uma lente ocular que amplia 10 vezes, pelo que a notação vulgarmente utilizada para designar a ampliação do microscópio é apenas o valor da ampliação da objetiva (ex. ampliação de x40 corresponde a uma ampliação real de x400, aumento de 10 da ocular vezes um aumento de 40 da objetiva). Esta será a notação utilizada ao longo desta disser-

tação. Os mais modernos microscópios óticos são binoculares, disponibilizando duas lentes oculares, o que permite uma maior percepção de profundidade e, conseqüentemente, uma melhor focagem, reduzindo, deste modo, o cansaço visual associado à exigente rotina de trabalho diário do analista.



**Figura 2.1: Exemplar de microscópio binocular utilizado em microscopia de campo claro.**

O fator de ampliação do microscópio é dado pelo produto das ampliações das lentes oculares e objetiva. Fonte: imagem adaptada de (“Leica Microsystems - Produto: Leica DM2000 & DM2000 LED,” n.d.).

A patologia corresponde ao ramo da ciência exercida com a principal finalidade de rastreamento e/ou diagnóstico de doenças (ex. cancro do pulmão e da tiroide). Os exames patológicos constituem o “*gold-standard*” em muitos protocolos médicos. Em especial para o cancro, os patologistas analisam biópsias de modo a estabelecer prognósticos e diagnósticos. Nesta perspectiva, o microscópio representa a ferramenta primordial para detetar sinais de malignidade em amostras de células. O microscópio de campo claro constitui, portanto, a típica ferramenta dos patologistas para triagem de amostras de células e, na sequência, estabelecer o diagnóstico. O procedimento consiste em coletar e manchar as células em lâminas de vidro, sendo posteriormente aplicado um processamento (que inclui desidratação e clareamento, inclusão, corte e banho-maria), que visa a preparação e conservação das lâminas, seguido por um processo de coloração, destinado para destacar células e outros componentes biológicos de interesse. Em seguida, procede-se à análise das lâminas. A fim de acelerar o processo, o rastreio é, inicialmente, realizado a uma baixa ampliação, x10, e somente caso seja identificada uma célula suspeita seleciona-se uma ampliação mais alta, x40, para verificar os sinais reais de malignidade. É tipicamente utilizada a ampliação de x10 e a duração de uma análise é de aproximadamente 5 a 10 minutos (Mormont, 2016).

### 2.1.1 Do microscópio convencional à Patologia Digital

Apesar da maioria dos modernos microscópios possuírem um design ergonómico, sofisticados mecanismos de focagem e uma alta qualidade ótica, um patologista tem muitas vezes que analisar cerca de 100 ou mais lâminas por dia, o que se revela um processo desgastante para quem o realiza. Além disso, o uso de lâminas físicas apresenta importantes limitações, entre as quais a sua fragilidade, a difícil partilha e a perda de qualidade com o tempo, o que dificulta em muito a

revisão do diagnóstico e a obtenção de uma segunda opinião (Pantanowitz, Farahani, & Parwani, 2015). Para além disso, o seu uso também dificulta a criação de relatórios detalhados e a acumulação de conhecimento. Tudo isto, conjuntamente com a habitual variabilidade entre os patologistas, o aumento da complexidade do caso do paciente e a impraticabilidade de varrer a lâmina por completo a uma alta ampliação (ex. x20), contribui para o aumento da subjetividade inerente ao diagnóstico. Subjetividade esta, principalmente denotada na ocorrência de discrepâncias em estudos comparativos entre sistemas de microscopia de lâmina de vidro. A necessidade de contornar estas dificuldades tem provocado um crescente aumento de interesse na microscopia digital que constitui atualmente um dos campos em maior expansão no domínio da citologia e histologia. O seu principal interesse consiste na utilização de métodos computacionais para investigação microscópica de biópsias ou amostras cirúrgicas em lâminas de vidro com a intenção de estudar a expressão do cancro, a progressão genética e a morfologia celular para fins de diagnóstico e prognóstico do cancro (Irshad, Veillard, Roux, & Racoceanu, 2014). Em (Snead et al., 2016) foi apresentado o maior estudo para avaliação da eficiência da microscopia virtual comparativamente à microscopia de lâmina de vidro, tendo-se considerado o sistema de microscopia digital praticamente tão eficaz quanto o microscópio de campo claro. Neste estudo é referido que, no total dos casos selecionados para serem analisados por ambas as modalidades, a diferença no diagnóstico foi de apenas 2.3%. Tal discrepância encontra-se maioritariamente justificada na literatura pela inferior qualidade de imagem do sistema digital e pela falta de experiência do utilizador. O microscópio ótico proporciona uma sensação de visualização 3D, o que não se verifica para os atuais softwares computacionais. Ademais, as dificuldades impostas pela digitalização da lâmina e a baixa precisão na identificação de detalhes microscópicos específicos constituem também um outro importante fator. Estas falhas, conjuntamente com o longo tempo de carregamento, a navegação relativamente lenta e a difícil calibração de cor e contraste têm constituído as principais razões pelas quais a patologia digital tem visto limitada a sua adoção na prática clínica. Em (Griffin & Treanor, 2017; Pantanowitz et al., 2015; Prochorec-Sobieszek, 2016) são abordadas outras importantes barreiras à adoção da patologia digital, como objeções regulamentais e inconsistências no design de estudos de validação da microscopia digital e a prevalência de formatos proprietários de imagem. É também de salientar que a grande dimensão das imagens digitais (dificultando o seu armazenamento na memória), a falta de hardwares capazes de as manusear e processar e os custos envolvidos justificam, senão todas, pelo menos a maioria das lacunas acima descritas. O facto é que constituem obstáculos “transponíveis” que, com o atual avanço da tecnologia, se espera que venham a ser ultrapassados.

### **2.1.2 Requisitos da análise assistida de imagens microscópicas**

Os requisitos da análise assistida de imagens de microscopia não se resumem em apenas processar a imagem, mas sim em a processar de forma apropriada e efetiva, bem como em beneficiar o utilizador com “assistentes de análise” automáticos e interativos. A segmentação automática de

núcleos, precedida pela sua correta detecção, constitui a base fundamental para a análise automatizada. Uma breve abordagem a estes 2 requisitos (pré-processamento e segmentação automática) é apresentada nas secções que se seguem.

### 2.1.2.1 Pré-Processamento de Imagem

Aquando do diagnóstico do cancro realizado computacionalmente, com base na análise de imagens digitalizadas de lâminas de biópsia, o pré-processamento da imagem emerge como uma necessidade recorrente para uma correta análise visual e subsequente prognóstico ou diagnóstico. No entanto, o pré-processamento comumente aplicado prende-se fundamentalmente com a correção/normalização de variações de cor e iluminação (espectral e espacial) causadas pela preparação, coloração ou digitalização da lâmina (Irshad et al., 2014; Madabhushi & Lee, 2016). Conquanto, a dimensão típica de uma lâmina de microscópio é de 75 x 25 mm. Os sinais de malignidade se encontram na ordem dos micrómetros (milésimo de milímetro), requerendo a inspeção/visualização da imagem microscópica em diferentes ampliações. Especialmente altas ampliações não devem implicar uma redução da qualidade da imagem. Contudo, para uma correta ampliação, um simples *zooming* ou aumento da resolução espacial da imagem se revela insuficiente uma vez fortemente condicionados e limitados pelas dimensões extremamente grandes da imagem digital. A apresentação de uma boa qualidade de imagem permanece um dos principais desafios da análise assistida de imagens de hiper-resolução e os atuais sistemas de microscopia digital ainda se encontram limitados na qualidade de imagem que proporcionam. Neste sentido, no presente projeto propõe-se um pré-processamento adicional, baseado na partição da imagem em subimagens e pré-filtragem *anti-aliasing*, de modo a apresentá-la em diferentes ampliações com qualidade adequada para se inferir o diagnóstico. Tal procedimento é fundamentado pelas considerações apresentadas na secção 3.2.1.2 e descrito na secção seguinte, 3.2.1.3. O inconveniente desta abordagem reside no facto de requerer uma duração indeferida, dependente da dimensão da imagem, e um considerável desempenho computacional. Tendo em conta a metodologia aplicada, uma imagem de citologia de pequenas dimensões (2.4 gigapixels, 6.8 gigabytes), requer a obtenção e a pré-filtragem de aproximadamente 4500 subimagens full HD (1184 x 1856 pixels) de modo a proporcionar a sua análise a uma ampliação de x40. Esta exigência limita notavelmente o pré-processamento da imagem em tempo útil, porém este poderá ser realizado em offline (ex. à noite), antecipadamente à análise da imagem.

### 2.1.2.2 Segmentação Automática de núcleos

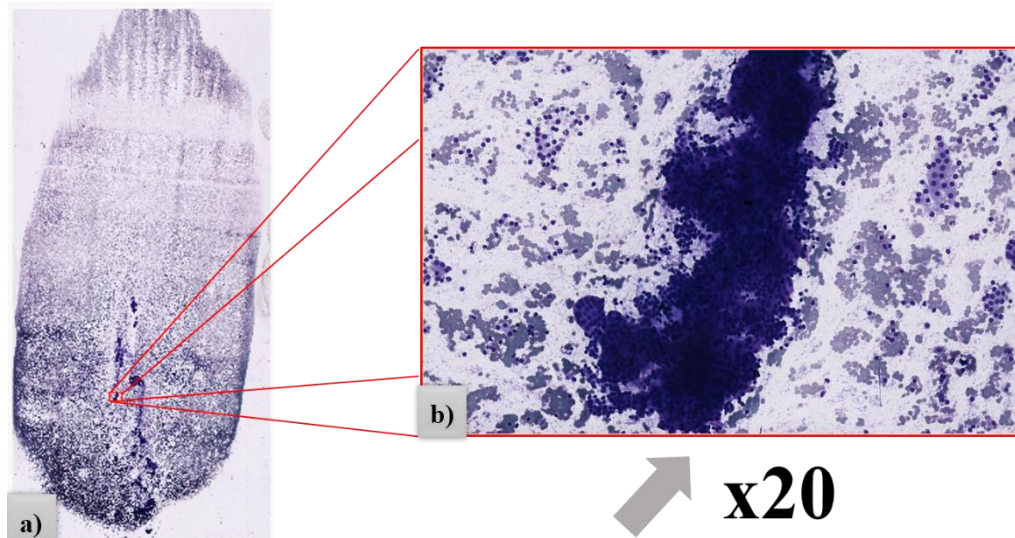
A fisionomia dos núcleos das células, especialmente proeminentes, e suas características singulares desempenham um papel primordial no prognóstico e diagnóstico de doenças como o cancro (Veta et al., 2013; Zarella, Garcia, & Breen, 2017). Os prognósticos e a graduação da gravidade da doença baseiam-se fundamentalmente em seus aspetos morfológicos (como forma, tamanho e textura), atributos de coloração e distribuições dentro do tecido. A aparência dos núcleos varia consoante uma série de fatores, como o seu tipo e ciclo de vida e a malignidade da doença (Irshad et al., 2014). Para o desenvolvimento de uma ferramenta de assistência ao diagnóstico é, portanto,

fundamental a capacidade de identificar com precisão e separar os núcleos da imagem de fundo. A detecção e segmentação de núcleos/células são normalmente consideradas as bases para a análise automatizada (Xing & Yang, 2016).

O primeiro método de segmentação advém dos anos 60, a partir daí uma grande variedade de técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos, contudo cada uma concebida e/ou ajustada especialmente para uma determinada tarefa/aplicação específica. Nenhum método é considerado eficaz em diferentes campos de aplicação e cada um apresenta as suas vantagens e limitações. À vista disso, a segmentação permanece ainda um problema sem solução (Belaid & Mourou, 2009; Jobin Christ & Parvathi, 2011). No âmbito da microscopia, os métodos de segmentação encontram-se destinados a um tipo de imagem microscópica específico uma vez intimamente relacionados/dependentes da técnica de microscopia, do tipo de tecido, da coloração aplicada e dos tipos de núcleos alvo. Um rigoroso controlo de qualidade durante a preparação do tecido e digitalização da lâmina é, por conseguinte, necessário para evitar adicionais efeitos adversos na técnica de segmentação (Veta et al., 2013). Em especial para a microscopia patológica, grandes esforços têm sido empregues para o desenvolvimento de algoritmos de segmentação com aplicação em histologia (estudo dos tecidos vivos – estrutura celular) e citologia (baseada na estrutura intracelular). Conquanto, é na citologia que se encontram os resultados mais promissores, isto porque a grande complexidade e as diversas irregularidades das estruturas histológicas, que embebem os núcleos, tornam ainda mais difícil a implementação de um algoritmo de segmentação clinicamente válido (Irshad et al., 2014). No entanto, tem-se verificado uma grande evolução de métodos computadorizados na área da patologia, com um crescente aumento de número de aplicações relacionadas à detecção, segmentação e classificação de núcleos, designadas para fornecer informações essenciais para a deliberação do diagnóstico. No contexto desta tese, é apresentado na secção 3.3.2 um algoritmo de identificação de nucleóides em lâminas raspadas da tiroide cujo objetivo é auxiliar no diagnóstico do cancro da tiroide. Em 4.2.1 são apresentadas as principais dificuldades ao seu desenvolvimento, muitas delas comuns às diversas técnicas de segmentação existentes.

### 2.1.3 Híper-Resolução

Nos dias que correm, cada vez mais, projetos das mais diversas áreas resultam em imagens de híper-resolução, multi-gigapixels. Estas imagens, geralmente, são analisadas para extrair informação e/ou tomar decisões. Esta informação consiste muitas vezes na presença de objetos de interesse embutidos na imagem. Os estudos de pesquisa biomédica, em grande parte dos casos, dependem da microscopia virtual de toda lâmina. No campo da citologia, as imagens de lâminas de microscópio encontram-se acima dos 4 gigapixels (Maré et al., 2016; Mormont, 2016). Entretanto, estas imagens envolvem gigabytes de memória, o que torna a implementação de qualquer algoritmo de processamento de imagem e, por consequência, qualquer subsequente análise automática, muitas vezes impraticável. Os tempos de execução são normalmente proporcionais à dimensão da imagem, inviabilizando qualquer tentativa de processamento em tempo útil (Mormont, 2016). Na figura seguinte encontra-se um exemplo de uma imagem de lâmina microscópica, neste caso de uma lâmina raspada da tiroide em campo claro (ver Fig. 2.2).



**Figura 2.2: Dimensão típica de uma lâmina digitalizada.**

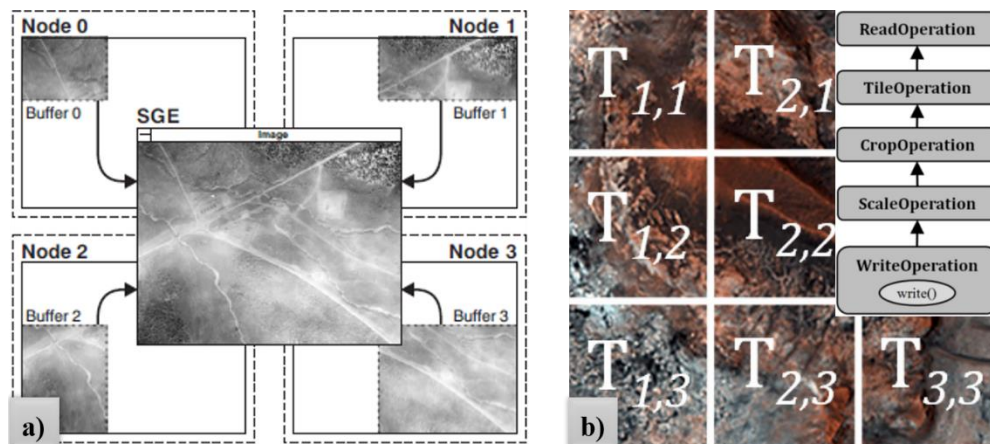
a) Imagem original (77376 x 37488 pixels); b) padrão arquitetônico contido na imagem (1184 x 1856 pixels  $\approx$  2 megapixel). – Ampliação x20.

### 2.1.3.1 Abordagens ao problema

Atualmente, por forma a lidar com dados de dimensões muito grandes, como imagens de hiper-resolução, as abordagens têm-se baseado essencialmente no seu armazenamento em base de dados digitais e processamento através de *parallel* e *distribute computing*, divisão do problema por vários computadores/hardwares. O PiCEIS (*Parallel Computational Environment for Imaging Science*) e o SIPF (*Scalable Image Processing Framework*), recorrendo, respetivamente, ao processamento em paralelo (incluindo CPUs e *clusters*) e a *cloud computing* (uma especialização da *distribute computing*), constituem exemplos de aplicação dessas abordagens. Em ambos os casos a imagem é dividida em *tiles* (blocos), tendo em vista o seu processamento e fácil acesso. O PiCEIS (Jones, Jurrus, Moon, & Perrine, 2003) consiste num pacote de processamento de imagens de grande dimensão, baseado num modelo de programação de memória compartilhada, com recurso à biblioteca Global Arrays do *Pacific Northwest National Laboratory*. O seu objetivo consiste em tirar partido de computadores massivamente paralelos de modo a acelerar a computação (obter processamento praticamente em tempo real). A distribuição da imagem por vários processadores permite superar a impossibilidade de carregar toda a imagem na memória. O SIPF (Powell, Rossi, & Shams, 2010), por sua vez, apresenta um *pipeline* de processamento de imagens gigapixels, destinado para análise de imagens provenientes da exploração de corpos celestes. Com o intuito de resolver o problema da restrição de memória, os *tiles* da imagem são distribuídos e processados por hardwares na *cloud* (serviço de *cloud computing* da Amazon). Cada *tile* é processado independentemente e faz-se uso de uma implementação que possibilita que, num dado instante, apenas a parte da imagem completa (conjunto de *tiles*) que se pretende processar seja armazenada na memória (ver Fig. 2.3).

No entanto, a maioria das ferramentas de análise de imagem não suportam estes recursos. A CATMAID (abordada no próximo tópico, 2.1.3.2) é um dos poucos exemplos. Esta faz uso de

uma metodologia baseada em *tiles*, similar à utilizada pelo PiCEIS e SIPF, para apresentar imagens de microscopia tridimensional.



**Figura 2.3: Híper-resolução – abordagens ao problema (PiCEIS e SIPF).**

a) PiCEIS – distribuição da imagem completa por vários processadores e interconexão para visualização, imagem retirada de (Jones et al., 2003); b) SIPF – divisão da imagem em *tiles* e implementação de um *pipeline* baseado em *Deferred Execution Pattern* (esquema), imagem retirada de (Powell et al., 2010, p. 3,4).

### 2.1.3.2 Plataformas de análise de imagens microscópicas

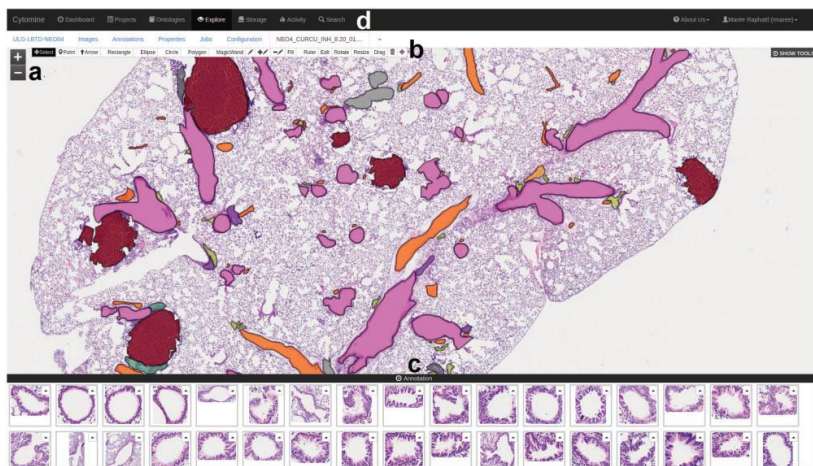
Diversas plataformas baseadas na web têm sido desenvolvidas de modo a permitir a análise de imagens com quantidade massiva de dados. A OMERO, CellProfiler, BisQue, CATMAID, Icy, Fiji, entre outras, permitem a gestão, organização e análise destas imagens através da web. Além disso, disponibilizam ferramentas para efetuar anotações sobre as imagens e possibilitam o armazenamento de resultados estatísticos da análise. Contudo, diferem na sua abordagem. A OMERO (Allan et al., 2012) constitui uma das maiores plataformas de armazenamento de grandes quantidades de imagens de alto rendimento e respetivos dados de aquisição de microscópio. A BisQue (Kvilekval, Fedorov, Obara, Singh, & Manjunath, 2009) apresenta uma arquitetura mais orientada para o serviço, com o objetivo de facilitar a elaboração, gestão e partilha de análises de imagens biológicas. Para tal, permite a execução de módulos de análise internos e externos e inclui aplicações como a BioView3D para visualização de imagens 3D. A CellProfiler (Carpenter et al., 2006), desenvolvida em Matlab, é fundamentalmente direcionada para quantificação de mudanças em imagens biológicas bidimensionais. A sua principal finalidade reside na criação de *pipelines* de processamento de imagem e no desenvolvimento de módulos personalizados de identificação de objetos e de medição. Assim sendo, possui e promove o desenvolvimento de métodos de análise automatizada de imagens de células. A CATMAID (Saalfeld, Cardona, Hartenstein, & Tomančák, 2009) foi especialmente desenvolvida para a microscopia tridimensional, em particular para o registo e análise de dados ssTEM (*serial section Transmission Electron Microscopy*). A Icy (de Chaumont et al., 2012) possui uma mais forte componente dedicada ao desenvolvimento e partilha de workflows, destinados à deteção e classificação de objetos. A Fiji (Schindelin et al., 2012) empenha-se, essencialmente, em facilitar e incentivar o desenvolvimento de novos algoritmos avançados de processamento de imagem. Recentemente, estabeleceu uma parceria com

a Ilastik (Sommer, Straehle, Ullrich, & Hamprecht, 2011), uma ferramenta de processamento de imagem 2D e 3D, destinada para segmentação e classificação.

Entretanto, à exceção da OMERO e da BisQue que pretendem estender as suas versões para integrar imagens de outras áreas, estas plataformas têm como principal objetivo resolver problemas específicos do ramo da biologia e neurobiologia (ex: CATMAID) e promover a colaboração entre peritos na área. Além disso, não apresentam suporte para imagens multi-gigabytes. No âmbito da citologia, atualmente, a Cytomine é uma das poucas que apresenta tal funcionalidade.

### Cytomine

A Cytomine é uma aplicação web, *open-source*, que permite a análise colaborativa de imagens multi-gigapixels. Esta proporciona, então, uma “navegação” através de imagens de hiper-resolução. Aditivamente, possui um sistema de anotações que permite destacar áreas de interesse e associá-las a uma etiqueta. Estas anotações poderão ser revistas e/ou editadas, posteriormente, caso o utilizador assim o desejar. Na figura 2.4 é ilustrada a interface disponibilizada pela Cytomine, *Cytomine-WebUI*. Em relação à análise de imagem, para além de disponibilizar diversos módulos de análise, esta ferramenta ainda possibilita a integração de novos algoritmos e workflows. Esta característica, associada à extensibilidade, compatibilidade com outros softwares e possibilidade de partilha de informação entre peritos na área, apresenta-se como a grande vantagem deste software. No contexto da citologia, a plataforma integra, também, um projeto dedicado à detecção de malignidade de nódulos em lâminas da tiroide (Maré et al., 2016; Mormont, 2016). Não obstante, a Cytomine não suporta todos os padrões e formatos de imagem em microscopia. A necessidade de estar ligado à web e a comunicação relativamente lenta com o servidor constituem também um outro inconveniente.



**Figura 2.4: Visão geral da Cytomine-WebUI.**

a) Zoomable – visualizador de imagens multi-gigapixels com sobreposição com anotações coloridas de acordo com os termos de ontologia (dimensão da imagem: 19968 x 25088 pixels); b) ferramentas de desenho de anotações, incluindo várias formas e operações sobre polígonos. (adaptado). – Fonte: imagem e texto retirados de (Maré et al., 2016, p. 1398).

## 2.2 Contextualização

A instituição parceira deste projeto, o Ipatimup ([site oficial](#)), constitui uma associação privada sem fins lucrativos, um dos primeiros Laboratórios Associados do Ministério da Ciência e Ensino Superior, cujo principal objetivo consiste em compreender as causas e evolução de doenças oncológicas humanas. Os seus inúmeros artigos publicados e resultados importantes relacionados ao cancro gástrico, esofágico, entre outros, tornam-no uma instituição de investigação de cancro de renome não só português como europeu.

Atualmente, no Ipatimup, o processo de rastreamento de amostras de células é realizado manualmente, quer via microscópio (*Leica DM 2000 LED*), por análise de lâminas físicas, quer computacionalmente, com recurso aos softwares *D-Sight Viewer* e *SlidePath Gateway*, analisando as imagens digitalizadas das lâminas. Em ambos os casos não é possível uma análise exaustiva de toda a lâmina. Habitualmente, seleciona-se um conjunto de regiões/áreas de interesse e com base na análise destas é efetuado o diagnóstico (ver secção 2.1), sendo que, em média, um patologista analisa um total de 250 lâminas por dia. Este processo apresenta uma subjetividade inerente, revelando-se ainda uma tarefa exigente e até mesmo desgastante para quem o realiza.

Em relação à análise procedida computacionalmente, a digitalização das lâminas (normalmente efetuada a uma ampliação de x40) é realizada minuciosamente por forma a abranger todo o conteúdo da lâmina, resultando, deste modo, em imagens de hiper-resolução, tipicamente da ordem das dezenas de gigapixels. A análise de uma única imagem tem a duração média de aproximadamente 5 minutos, sendo que diariamente são analisadas cerca de 100 imagens. O software *D-Sight Viewer* (microscópio digital disponibilizado pelo fornecedor do scanner *D-Sight*) permite a visualização da imagem digital e, devido à sua grande dimensão, fornece uma indicação da área da lâmina que se encontra em análise. Adicionalmente, permite realizar medições de pequenas áreas e efetivamente adicionar algumas anotações. Este possibilita ainda guardar a imagem no formato JPEG2000. No entanto, a qualidade de imagem exibida pelo software se encontra pouco adequada e insuficiente para a realização da análise visual da lâmina. Além disso, *D-Sight Viewer* apresenta outras importantes limitações, entre as quais: não dispõe de ferramentas de apoio estatístico à análise da imagem, proporcionando somente uma pesquisa ao longo da mesma e medições de pequenas áreas; durante a navegação pela imagem não fornece a informação referente às regiões da mesma já analisadas/observadas; e, conseqüentemente, não possibilita o registo das áreas analisadas. O software *SlidePath Gateway* (disponibilizado para livre download pela *Leica Microsystems*), por seu lado, exige uma alta ampliação para uma correta visualização dos componentes biológicos de interesse. A título de exemplo, um elemento na lâmina que se vê bem a uma ampliação de x4 no microscópio só é visto com a mesma nitidez no software a uma ampliação de x12. Tendo em conta que quanto maior a ampliação maior o tempo de varrimento da lâmina, tal amplificação leva a um considerável aumento da duração do processo.

Face às limitações apresentadas pelos softwares, a análise é realizada preferencialmente via microscópio. Não obstante, a falta de comodidade ao efetuar a análise computacionalmente é a principal razão pela qual opta-se pelo microscópio ótico. O *Leica DM 2000 LED* possui um design ergonómico, sendo facilmente ajustável e manejável. O seu mecanismo de focagem sofisticado e a sua alta qualidade ótica levam a que a profundidade e o campo de visão por ele assegurados sejam relativamente superiores aos obtidos com os softwares.

## 2.3 Trabalhos relacionados

Neste tópico serão abordados os mais pertinentes trabalhos e aplicações relacionados e inseridos no âmbito deste projeto. Apesar das diversas interfaces atualmente desenvolvidas, que incluem funcionalidades exploradas ao longo desta dissertação, a SLDC constitui a ferramenta cujos propósitos e fundamentos se assemelham mais aos do presente projeto.

### 2.3.1 Interfaces para navegação de imagens microscópicas

Recentemente, devido à muito alta definição das imagens digitalizadas e por questões de formato proprietário das mesmas, a maioria dos fornecedores de scanners de lâminas microscópicas providencia visualizadores juntamente com seus scanners, como, por exemplo, o *Leica Image Scope*, o *Omnix Viewer* e o *Pannoramic Viewer*, disponibilizados pelos provedores Leica, Omnix e Panoramic, respetivamente. Além disso, diversos visualizadores e interfaces se encontram disponíveis na web para livre download, afirmando proporcionarem uma boa qualidade de imagem e diversas ferramentas de análise de imagens microscópicas. Entretanto, todos enfrentam um problema comum, a inexistência de um formato standard de imagem na microscopia. Este problema, dada à sua particular relevância para comunicação entre equipamentos de imagem e softwares computacionais, tem sido abordado pelo DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) cuja finalidade é padronizar a formatação de imagens diagnósticas. Em (Tuominen & Isola, 2009) é sugerido o formato JPEG2000 como o formato standard.

As interfaces para navegação de imagens microscópicas multi-gigapixels têm, de facto, constituído uma temática que vem despertando bastante interesse, sendo alvo de inúmeros estudos. Em particular para a citologia e histologia, diversos modelos de interfaces têm sido apresentados e desenvolvidos, tanto para fins clínicos, de pesquisa ou educacionais. Um dos mais atuais é o apresentado em (Ruddle, Thomas, Randell, Quirke, & Treanor, 2016). A grande particularidade da interface relatada consiste no facto de exceder os parâmetros estabelecidos tanto para a dimensão da *overview* como para a diferença de escala entre a *overview* e a vista de detalhe. Isto, em conjunto com o facto de possuir diversos mecanismos de *panning* e *zooming*, facilitando a navegação, permitiu obter durações de análise praticamente iguais às obtidas com um microscópio ótico convencional. Além disso, o estudo apresenta, também, uma versão da interface destinada à navegação de coleções de imagens multi-gigapixels. Entretanto, interfaces como estas requerem a colaboração com diversos patologistas, especialistas em diversas áreas computacionais, como engenharia de software, e também envolvem um grande investimento financeiro em tecnologias

computacionais, o que se encontra fora do escopo desta dissertação. Ademais, estas interfaces propõem apenas uma alternativa à visualização efetuada via microscópio, não explorando outras importantes funcionalidades, tal como ferramentas para realização de anotações ou que confirmem a cobertura de toda lâmina, atualmente não proporcionadas pelo microscópio, mas sim pela patologia digital. Não obstante, interfaces como as propostas neste trabalho evidenciam que a patologia digital, se já não é, será no futuro próximo a melhor forma de efetuar o diagnóstico.

### 2.3.2 SLDC

A SLDC (*Segment-Locate-Dispatch-Classify*), desenvolvida por Romain Mormont (2016), resulta da sequência de duas teses de mestrado. A primeira tese, realizada por Antoine Deblire, foi dedicada ao desenvolvimento de um workflow de processamento de imagem para detetar células com inclusões e padrões arquitetónicos proliferativos em lâminas de amostras da tiroide. A detecção passava pela implementação de dois procedimentos distintos: segmentação por *colour deconvolution*<sup>1</sup> e operações morfológicas; e posterior classificação utilizando *machine learning*. Na sequência, Jean-Michel Begon implementou um workflow genérico, baseado neste mesmo padrão, segmentação e classificação. Aquando da sua tese, Mormont re-trabalhou, então, este último workflow. Por conseguinte, segundo Mormont, a SLDC consiste numa estrutura genérica, destinada à detecção e classificação automática de objetos em imagens de grande dimensão. Esta faz uso das bibliotecas da linguagem Python e do paralelismo para suportar a manipulação de imagens multi-gigapixels. A imagem é dividida em *tiles*, de modo que só uma parte da mesma é armazenada na memória de cada vez. Em ordem a abranger um extenso campo de aplicação, a *framework* possibilita que os algoritmos de segmentação e classificação sejam adaptados/implementados pelo utilizador consoante o problema que pretendam resolver. O output resume-se na informação da forma e localização de cada objeto e uma etiqueta de classificação. Durante a execução do programa é fornecida ao utilizador a informação sobre o progresso, a duração de cada etapa e possíveis erros. Além disso, permite executar sequências de workflows numa mesma imagem. Uma vez que a sua implementação foi realizada em colaboração com a Cytomine (ver secção 2.1.3.2), o desempenho da estrutura foi avaliado na detecção de malignidade do nódulo tiroi-diano em imagens de lâminas inteiras disponibilizadas pela plataforma. Embora os resultados tenham sido satisfatórios e igualmente promissores, a SLDC apresentou significativas falhas, nomeadamente consideráveis casos de sub-segmentação<sup>2</sup> e classificação errónea de objetos. Inclusive, Mormont, na sua dissertação, especifica um conjunto de elementos a serem melhorados, tanto a nível da *framework* como a nível dos workflows<sup>3</sup>, direcionados a eventuais desenvolvimentos futuros.

---

<sup>1</sup> O *colour deconvolution* é um método utilizado na microscopia de campo claro para obter imagens que representam a concentração dos corantes a partir da imagem a cores da amostra biológica corada.

<sup>2</sup> A sub-segmentação corresponde ao caso em que o objeto é maior do que a única região correspondente determinada pela segmentação.

<sup>3</sup> Neste contexto, um workflow é um algoritmo que, coordenando a execução de outros algoritmos, permite a detecção e classificação de objetos contidos em imagens (Mormont, 2016).

A SLDC apresenta uma solução para lidar com imagens de grande dimensão e propõe um algoritmo de detecção/segmentação automática de objetos em imagens de lâminas da tiroide. Porém, tal como acima referido, necessita de significativas melhorias. Além do que, apoio à análise assistida, como facilitar a exploração da imagem e permitir a realização e revisão de anotações, objetivo deste projeto, não é abordado por esta ferramenta. Conquanto, esta sublinha a necessidade de desenvolvimento de ferramentas com aplicação em citologia, capacitadas para lidar com imagens microscópicas multi-gigapixels.

## METODOLOGIA

Este capítulo é constituído fundamentalmente por 3 secções, abordando o desenvolvimento de uma ferramenta computacional para processamento de imagens digitalizadas de lâminas de biópsia. Na primeira secção introduz-se as técnicas de referência para processamento de imagem no cenário da microscopia, assim como justifica-se a utilização do Matlab como linguagem computacional para a implementação da aplicação constituída pelas interfaces de apoio à análise assistida de imagem e de segmentação automática de nucleoides cujos aspetos relevantes (suas principais funcionalidades e respetivos benefícios) são, respetivamente, sumariados nas duas últimas secções deste capítulo. O desenvolvimento de cada uma das interfaces constituiu, portanto, uma fase do procedimento algorítmico, exigindo ambas uma grande capacidade computacional. Por questões de visualização (resolução de ecrã e qualidade de imagem) e por forma a evitar a sobrecarga computacional, a estação de trabalho consistiu numa OS X El Capitan, especificamente uma iMac (27-inch, Mid 2010), possuindo uma resolução de 2560 x 1440. Tendo em conta, à priori, a necessidade de pré-processamento de imagem, a metodologia aplicada baseou-se na divisão de imagem em blocos (subimagens) uma vez que a grande dimensão das imagens digitalizadas torna impraticável qualquer tentativa de processamento e/ou pesquisa em tempo útil.

### 3.1 Ferramentas de Processamento de Imagem

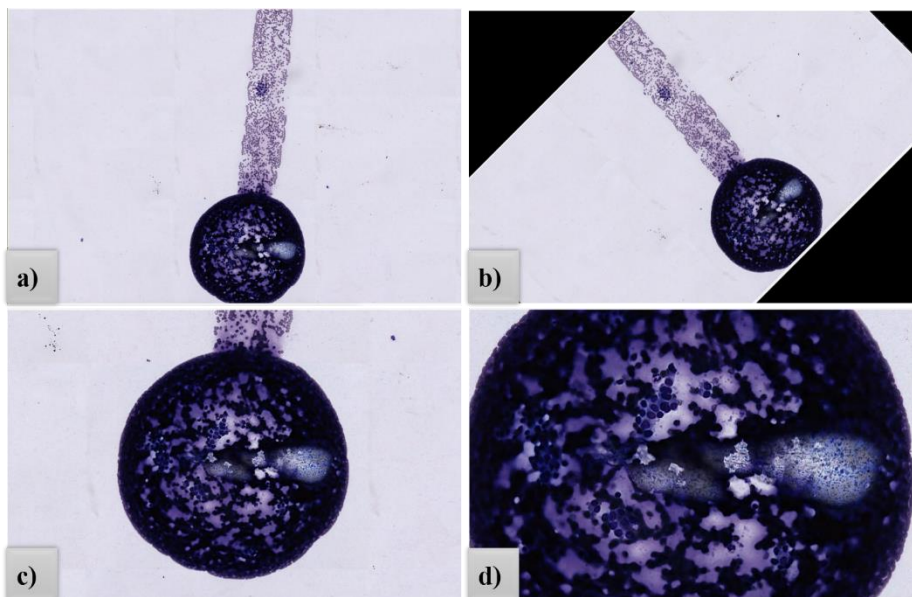
Ferramentas de processamento de imagem incluem não só os métodos, as técnicas e os algoritmos utilizados para processamento e análise de imagem, mas também a linguagem computacional que permite a sua implementação e sua efetiva e imediata aplicação. As secções que se seguem abordam estas questões no âmbito do processamento de imagens de microscopia.

#### 3.1.1 Técnicas de Processamento de Imagem

Diversas são as técnicas de processamento de imagem utilizadas e especialmente desenvolvidas para a microscopia, nomeadamente para facilitar a análise da imagem e a posterior extração de conteúdos de interesse (Marques, 2011; Wu et al., 2008). Os procedimentos mais comumente aplicados são as transformações geométricas, *image enhancement*, as operações morfológicas e a segmentação.

### Transformações geométricas

As transformações geométricas permitem uma transformação espacial da imagem. Levando em conta que a intensidade de cada pixel não é alterada, corresponde simplesmente a um processo de cópia da imagem, contudo alterando as relações físicas entre os objetos nela contidos, distorcendo-a espacialmente. As operações geométricas integram operações simples como translação, rotação e escalonamento. Além destes, incluem deformação, redimensionamento, encolhimento, *cropping*, *flipping*, *zooming*, assim como operações mais complexas, como *control point mapping*, que deformam a imagem e “movem” coisas dentro dela. A especificação da operação pode ser por fórmula ou por uma *control grid*. Posto isto, estas transformações são frequentemente utilizadas no registo de imagem, remoção de distorção e costura (Marques, 2011; Wu et al., 2008) (ver Fig. 3.1).



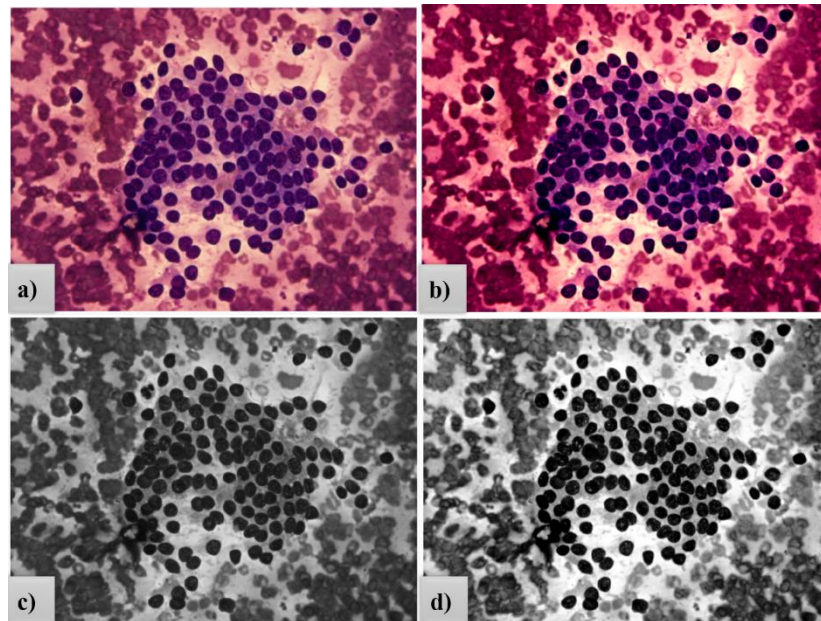
**Figura 3.1: Transformações geométricas – rotação e zooming.**

A imagem em b) representa o efeito de uma rotação a  $45^\circ$  da imagem em a), enquanto que em d) foi efetuado um *zooming* da imagem em c). – Implementação em Matlab.

### *Image enhancement*

Os métodos de *image enhancement* permitem melhorar a qualidade visual da imagem, ou de uma parte dela, consistindo normalmente num processo subjetivo. O seu intuito pode ser, por exemplo, melhorar o contraste, detetar características/detalhes da imagem ou objetos importantes, remover o efeito de *flickering* indesejado, reduzir ruído e interferências, e assim por diante. Deste modo, a informação contida na imagem não é aumentada, mas a sua posterior análise é relativamente facilitada e muito mais precisa, permitindo assim a extração de conteúdos de interesse (Marques, 2011; Petrou & Petrou, 2010). A imagem resultante poderá, portanto, ser utilizada como input para outras técnicas de processamento de imagem, como detecção, reconhecimento e segmentação (Bedi & Khandelwal, 2013). Apesar dos inúmeros algoritmos de *image enhancement* existentes, estes se encontram divididos em duas grandes categorias: métodos de domínio espacial e métodos de domínio da transformação (ex. transformada de Fourier e de Wavelet). *Contrast*

*stretching* e suas derivações, *clipping* e *thresholding*, bem como equalização de histograma e filtragem no domínio espacial, como filtragem homomórfica e filtro de mediana, são exemplos de métodos pertencentes à primeira categoria. A segunda categoria, por sua vez, inclui *Wiener filtering* e *Wiener deconvolution*, filtragem passa-alto e passa-baixo no domínio da frequência, *Wavelet thresholding*, entre outros (Kaur & Nancy, 2013; Maini & Aggarwal, 2010; Wu et al., 2008) (ver Fig. 3.2).

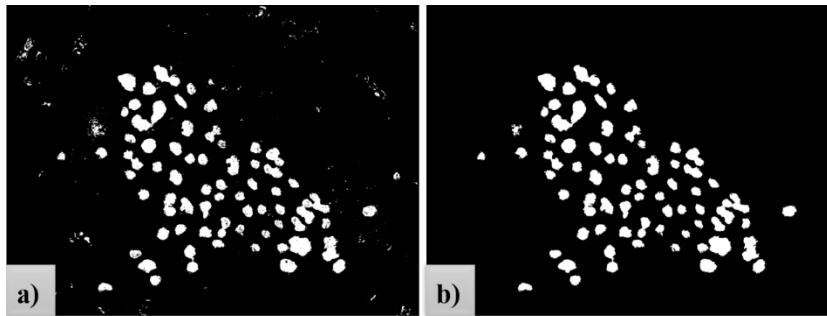


**Figura 3.2: Image enhancement – ajuste de contraste e equalização de histograma.**

a) Imagem original; b) melhoria da qualidade visual da imagem por ajuste de contraste; c) conversão da imagem para tons de cinzento; d) equalização de histograma da imagem em c), realçando os nucleoides embutidos na imagem. – Implementação em Matlab.

### Operações morfológicas

O processamento morfológico tem especial interesse em microscopia, particularmente em diversas técnicas de processamento de imagens binárias e em graus de cinzento, como segmentação, filtragem e reconhecimento de padrões. O princípio básico consiste na utilização de um elemento estruturante (matriz de pixels designada por kernel), minuciosamente escolhido (sua forma e tamanho), para “sondar” a imagem por forma a extrair informações geométricas e topológicas. Por conseguinte, as operações morfológicas têm sido amplamente utilizadas para fornecer ferramentas para representar, descrever e analisar formas em imagens e no pré ou pós-processamento de imagens contendo formas de interesse. As operações básicas, ou ditas primárias, são a erosão e a dilatação. Operações como abertura, fecho, *hit-and-miss*, reconstruções morfológicas, preenchimento de buracos e extração de contornos podem ser obtidas por combinações destas. Das diversas transformações morfológicas, convém ainda referir a watershed, de fundamental importância para a segmentação morfológica de imagens, e a esqueletização, frequentemente utilizada para segmentação e análise de formas (Marques, 2011; Wu et al., 2008) (ver Fig. 3.3).



**Figura 3.3: Operações morfológicas – preenchimento de buracos e filtragem *area opening*.** a) Imagem resultante de segmentação por thresholding; b) pós-processamento da imagem com preenchimento de buracos e filtragem *area opening* de 500 pixels (eliminação/filtragem de objetos com área inferior a 500 pixels). – Implementação em Matlab.

### Segmentação

A segmentação pode ser designada como “*a key step*” para a análise de imagem (Jain, 1989) e, na sequência, um dos principais problemas no processamento de imagem. Iluminação não uniforme, sombras, sobreposição entre objetos e baixo contraste entre objetos e o fundo são exemplos de fatores que dificultam este processo (Marques, 2011). A segmentação é, então, definida como a divisão de imagem em regiões homogêneas, não sobrepostas, cujos pixels possuem um denominador (atributo) em comum, como intensidade, textura ou cor. Estas regiões idealmente correspondem aos objetos, e suas partes significativas, e ao fundo. Tarefas subsequentes como interpretação, reconhecimento e classificação de objetos dependerão fortemente da qualidade do processo de segmentação. As abordagens utilizadas passam, geralmente, pela tentativa de identificar regiões (ex. thresholding, *region growing*, *region merging* e *region splitting*) ou limites dos objetos na imagem (ex. *edge detection*), constituindo duas perspectivas diferentes, contudo complementares (Bala, 2012; Petrou & Petrou, 2010; Wu et al., 2008) (ver Fig. 3.4).



**Figura 3.4: Segmentação – thresholding e *edge detection*.**

a) Imagem original; b) resultado de segmentação por thresholding do canal S (saturação) da imagem no formato HSV, seguido por uma *area opening* de 1300 pixels; c) imagem resultante de *edge detection* utilizando o método *prewitt*, seguido por uma *area opening* de 500 pixels. – Implementação em Matlab.

### 3.1.2 Linguagem computacional

Uma das questões primordiais relacionadas com o desenvolvimento de um software de processamento de imagem consiste na seleção da linguagem computacional na qual será implementado. Este trabalho foi desenvolvido utilizando Matlab (*MATrix LABORatory*), linguagem de programação de quarta geração escrita em C, C++ e Java.

## Matlab

Trata-se de um software altamente sofisticado e de elevada performance, direcionado para o cálculo numérico, que permite expressar problemas tanto de forma numérica como graficamente. A sua aplicabilidade é bastante vasta, abrangendo áreas da ciência, matemática e engenharia (Sigmon, 1993).

A imagem mais não é do que uma matriz. Sendo o Matlab uma multiplataforma essencialmente destinada ao cálculo e à manipulação matricial, pode-se inferir que é um programa orientado para o processamento e análise de imagem. De facto, esta aplicação disponibiliza a *Image Processing Toolbox*, uma caixa de ferramentas inteiramente desenvolvida para processamento de imagem, integrando algoritmos e aplicativos específicos que permitem a execução de procedimentos de segmentação, *image enhancement*, redução de ruído, transformações geométricas, entre outros. Assim sendo, técnicas bem conhecidas de processamento de imagem, como a grande maioria das operações morfológicas e métodos de filtragem, são funções internas do programa. Ademais, versões mais recentes do Matlab disponibilizam a *Parallel Computing* e a *Database Toolbox*, que oferecem soluções alternativas para problemas que envolvem uma enorme quantidade de dados (considerados problemas de *parallel* e *distributed computing*). Assim, além dos habituais computadores, a plataforma inclui a utilização de outros hardwares, como GPUs, *clusters* e *clouds*, e permite a criação e o acesso a múltiplas bases de dados, possibilitando o aceleração do código e lidar com dados que não podem ser armazenados na memória, designados por “*big data*”. No contexto de Imagem Biomédica, o software apresenta ainda suporte para ficheiros DICOM (ficheiros contendo imagens e respetivos dados de procedimento de imagem médica).

Matlab, como sistema interativo, integra o GUIDE (*Graphical User Interface Development Environment*), um ambiente *drag-and-drop*, escrito em linguagem C, que proporciona o desenvolvimento de interfaces gráficas de utilizador (GUIs - *Graphical User Interfaces*). O *GUIDE Layout Editor*, permite determinar o aspeto da interface que será apresentada ao utilizador, disponibilizando uma grande variedade de componentes GUI, como painéis, botões, campos de texto, *sliders*, menus e assim por diante. Simultaneamente, o GUIDE gera automaticamente um *M-file* que controla o funcionamento da GUI (Mathworks, 2011).

## 3.2 Interface de apoio à análise assistida de imagem

No âmbito desta dissertação, propôs-se a desenvolver uma interface que permita uma apropriada visualização, exploração e análise de imagens microscópicas de hiper-resolução, designada ao Ipatimup como utensílio de apoio à análise assistida de lâminas de biópsia. Com vista a alcançar tais intentos, este software foi estruturado de modo a:

- Prover comodidade na análise computacional das imagens;
- Permitir análises (exibição de imagem com boa qualidade) a ampliações inferiores ou iguais às utilizadas nos softwares em uso no Ipatimup;
- Facilitar a “navegação” ao longo da imagem;

- Otimizar a duração de análise;
- Fornecer uma indicação das zonas da lâmina já analisadas/observadas;
- Possibilitar a exportação de subimagens referentes a regiões de interesse da lâmina. A informação sobre as áreas da lâmina analisadas, bem como toda a informação da mesma deverão, também, ser passíveis de ser guardadas;
- Permitir a realização e revisão de anotações, como assinalar células ou grupos celulares;
- Dispor de ferramentas de apoio estatístico à análise.

A interface foi denominada *IPathScope (Ipatimup PATHology microSCOPE)*. As imagens utilizadas para o seu desenvolvimento consistiram em lâminas de biópsia digitalizadas à uma ampliação de x40, disponibilizadas pelo Ipatimup num ficheiro contendo a imagem com a extensão *.jp2*, formato JPEG2000 na qual foram trabalhadas.

### 3.2.1 Visualização e Sub-Amostragem

O processamento de uma imagem de microscopia inicia-se com a sua visualização no ecrã. A qualidade do processamento e a subsequente análise são fortemente dependentes da correta visualização da imagem. Para mais, trata-se de um mecanismo de fundamental interesse para interpretação de resultados, isto é, perceber e confirmar os dados numéricos (Marques, 2011). As principais características que determinam a qualidade de um sistema de exibição são a dimensão do ecrã e da maior imagem digital que o sistema pode manipular, a resolução espacial e fotométrica (capacidade para produzir o brilho correto em cada posição de pixel), a resposta de baixas e altas frequências e as características de ruído do ecrã (Wu et al., 2008).

Sub-amostragem e sobre-amostragem (do inglês *downsampling* e *upsampling*) são duas operações fundamentais e amplamente utilizadas na visualização de uma imagem. A sub-amostragem consiste na redução da resolução espacial da imagem, por outras palavras, redução da imagem digital por remoção de pixels (reamostragem a uma baixa frequência). A sobre-amostragem constitui o contrário, ou seja, aumento da resolução espacial da imagem (reamostragem a uma alta frequência) (Youssef, 1999; Zhang, Zhao, Zhang, Xiong, & Gao, 2011). Estes métodos representam o contrário um do outro, mas não o inverso, pelo que lhes é inerente a perda de informação da imagem original. Contudo, quando devidamente executados, permitem o redimensionamento da imagem de modo a se adaptar apropriadamente à dimensão do ecrã. As imagens de lâminas de microscópio podem estar sujeitas a diferentes ampliações, ou melhor dizendo, ao seu redimensionamento em diferentes fatores de escala.

#### 3.2.1.1 Técnicas de Sub-Amostragem

Ao longo dos anos, diversos estudos foram apresentados pretendendo não só explicar os fundamentos e a importância da sub-amostragem como também propor uma metodologia para a sua aplicação que permita preservar a qualidade da imagem e a informação nela contida. No entanto, este objetivo tem sido grandemente dificultado pela enorme diversidade de conteúdo que uma imagem pode conter e de fins a que poderá ser destinada. Youssef (1999) apresentou o que seria o

esquema ideal de sub/sobre-amostragem. A teoria subjacente é a de que a sub-amostragem deve ser precedida por uma pré-filtragem e a sobre-amostragem seguida por uma pós-filtragem. Quando ambas as filtrações são realizadas por um filtro passa-baixo com frequência de corte igual à metade da frequência de amostragem, o efeito de *aliasing*<sup>1</sup> resultante é mínimo. Este apresentou, conjuntamente, uma comparação entre vários filtros de interpolação, entre os quais destacou os filtros binomiais, por ele propostos, e wavelet biorthogonal como os mais indicados para compor o esquema. Na mesma linha de raciocínio, Frajka e Zeger (2004), baseando-se igualmente na resposta de frequência dos filtros, destacaram, uma vez mais, os filtros Wavelet pela sua relativa superior eficiência comparativamente a métodos como a transformada discreta de cosseno. Além disso, demonstraram que cada método de sub-amostragem possui uma “assinatura” particular que pode ser identificada na imagem reduzida. Partindo deste princípio, apresentaram uma metodologia para estimar a técnica de sub-amostragem utilizada, de modo a aferir o filtro mais adequado para a realização da sobre-amostragem. Segundo estes, a recuperação completa da imagem original só é possível quando ambas as operações são efetuadas com o mesmo filtro de interpolação. Zhang e outros (2011) reforçaram esta ideologia e propuseram o algoritmo *interpolation-dependent image downsampling* para determinar a imagem sub-amostrada ideal para um dado método de interpolação (sobre-amostragem), de forma a minimizar a perda de informação da imagem.

Numa perspetiva diferente, em (Lehmann, Gönner, & Spitzer, 1999; Pan, Yang, & Tang, 2012; Thévenaz, Blu, & Unser, 2009) foram realizadas extensivas revisões sobre filtros de interpolação, conferindo ao filtro B-Spline uma certa superioridade relativamente aos mais comumente utilizados, como bilinear, bicúbica e nearest neighbor. O B-Spline de ordem zero é praticamente indistinguível do nearest neighbor. Quando de ordem um, é idêntico ao bilinear. Ademais, o B-Spline cardinal de ordem superior tende para o filtro sinc, dito filtro de interpolação ideal. Inclusive, Thévenaz e outros, para realçar a sua teoria, disponibilizaram um algoritmo para auxiliar na aplicação do filtro B-Spline.

Roszkwiak e outros (2016) realizaram um estudo mais específico, para determinação do filtro de interpolação mais apropriado para o redimensionamento de imagens de lâminas de histologia de grande dimensão. Requisitos adicionais como a preservação de características importantes para um posterior processamento (segmentação) e o tempo de execução foram igualmente tidos em consideração. O filtro B-Spline apresentou, novamente, a maior semelhança entre a imagem original e a imagem redimensionada, tendo sido considerado, também, um dos métodos de interpolação mais rápidos. Porém, como filtro passa-baixo, leva a uma pequena desfocagem das arestas, causando alguma perda de textura. Além disso, pode provocar mudanças na cor de imagens em formato RGB, o que, em conjunto, o torna menos adequado para segmentação baseada em cor e textura. Para este fim, os mais indicados seriam os filtros sinc, catmull-rom e lagrange.

---

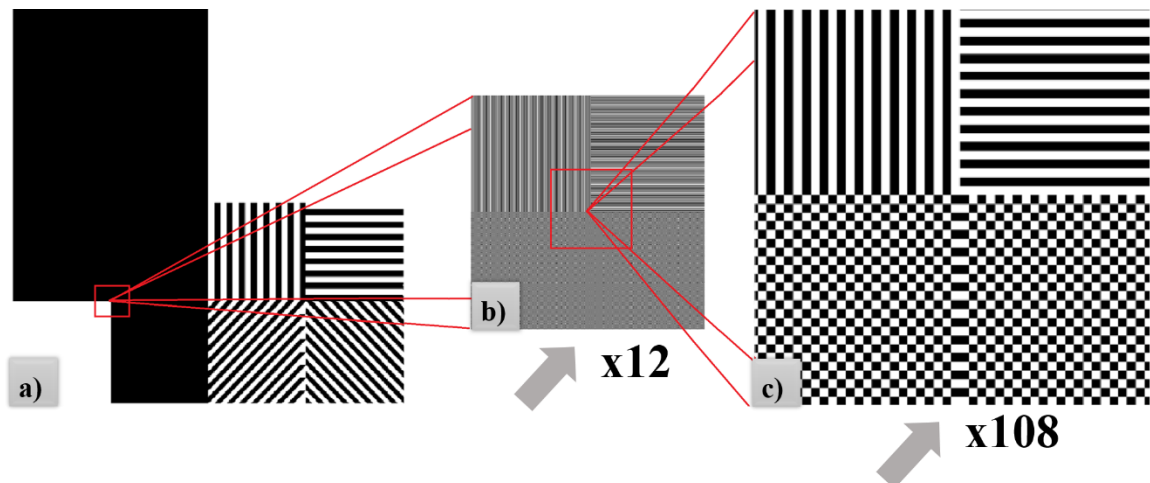
<sup>1</sup> Tendo sido realizada a sub-amostragem, o *aliasing* consiste na sobreposição das repetições do espectro da imagem no domínio da frequência. Tal facto resulta da impossibilidade de respeitar o ritmo de Nyquist na amostragem da imagem. O efeito visual resultante é uma imagem desfocada, com uma significativa perda de textura e muito menos nitidez, onde objetos muito próximos são praticamente indistinguíveis. Aquando da ocorrência deste fenómeno, é impossível a recuperação da imagem original.

Em (Rubinstein, Gutierrez, Sorkine, & Shamir, 2010) encontra-se ainda uma abrangente revisão e comparação de técnicas de redimensionamento de imagens dos mídia, como *Sean-Carving*, *Cropping windows*, *Shift-map*, *Scale-and-Stretch* e *Multi-operator (MULTIOP)*. Estas técnicas mais complexas têm sido amplamente exploradas/utilizadas uma vez que a imagem resultante de métodos de redimensionamento de imagem habitualmente utilizados, baseados, por exemplo, no filtro de interpolação bilinear, ainda se encontra muito aquém da imagem original. Ademais, os autores salientaram a dificuldade existente em encontrar uma medida de comparação entre a imagem original e a redimensionada.

### 3.2.1.2 Metodologia de Sub-Amostragem

A correta visualização da imagem é de fulcral importância para sua análise visual. No âmbito da patologia digital, a qualidade da imagem constitui um dos fatores cruciais para um correto e preciso diagnóstico. À vista disso, o pretendido com o visualizador foi proporcionar uma confiável representação da imagem, por outras palavras, propiciar uma representação apropriada da imagem tão “transparente” quanto possível. Contudo, as imagens de lâminas microscópicas têm dimensões extremamente grandes e durante o diagnóstico, muitas vezes, é necessário o redimensionamento da imagem (mudança de fator de ampliação), o que pressupõe a sua sub-amostragem. Para imagens de alta-resolução, é, portanto, necessário que esta seja realizada de forma adequada de modo que as características de interesse possam permanecer eminentes e que não haja efeitos de *aliasing* (ver nota de rodapé 1), nem distorção do real conteúdo da imagem.

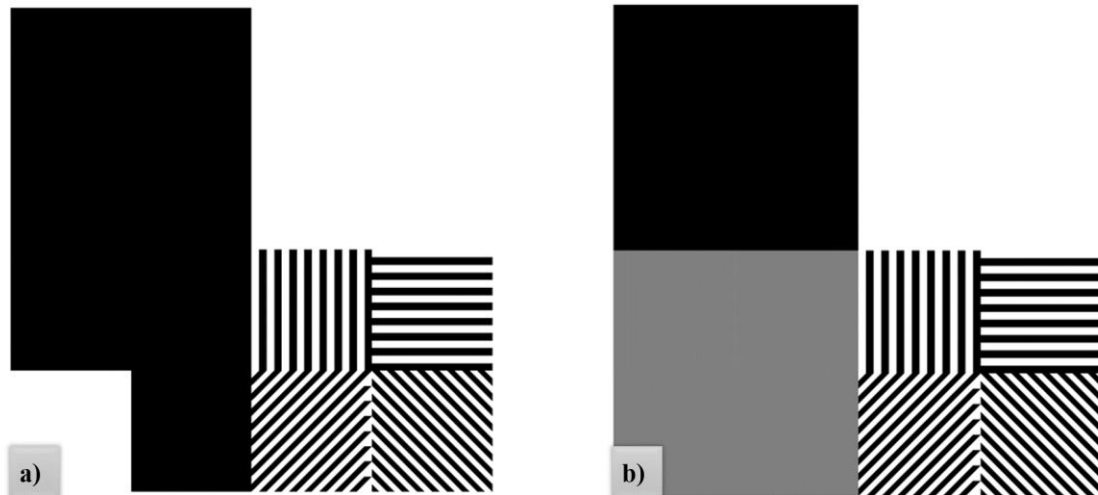
Com o intuito de evidenciar os problemas de *aliasing*, foi criada no Matlab uma imagem de teste (com a dimensão de 11264 x 11264 pixels), contendo diferentes padrões, apresentando simultaneamente altas e baixas frequências, sendo, deste modo, apropriada para salientar os efeitos do processo de sub-amostragem. Os padrões consistiram em riscas horizontais e verticais, com 1 e 22 pixels de espessura, e riscas nas duas diagonais, com igualmente 1 e 22 pixels de espessura. Como se pode constatar na figura 3.5, a grande dimensão da imagem impõe a realização de uma sub-amostragem da mesma, o que, por sua vez, não deverá distorcer nem ocultar a informação nela contida. Contudo, a figura revela uma sub-amostragem realizada sem nenhum cuidado relativamente ao teor da imagem. A exibição inicial da imagem (Fig. 3.5a) encobre os padrões de 1 pixel de espessura e somente após um elevado nível de zoom (Fig. 3.5c) é que estes se tornam “transparentes”. Sem efetuar uma série de zooms, é impossível observar/identificar ou até mesmo deduzir a presença destes padrões embebidos na imagem. Por conseguinte, o *aliasing* apresentado pelo visualizador do Matlab é um exemplo típico que evidencia a necessidade de um pré-processamento (pré-filtragem) da imagem previamente à sua exibição no ecrã.



**Figura 3.5: Sub-amostragem pelo visualizador do Matlab.**

a) Exibição inicial da imagem original (11264 x 11264 pixels); b) primeiro nível de zoom – x12; c) segundo nível de zoom – x108.

Foi, portanto, necessário aperfeiçoar o método de sub-amostragem de forma a evitar este tipo de problemas. Técnicas como as referidas na secção anterior (3.2.1.1) foram exploradas de modo a evitar o efeito de *aliasing* que poderá resultar da redução da resolução espacial da imagem para visualização no ecrã. Uma das abordagens utilizadas baseou-se na realização da sub-amostragem recorrendo aos filtros de interpolação disponibilizados no Matlab, especificamente nearest neighbor, bilinear (interpolação linear a 2 dimensões), bicúbica, caixa (média ponderada em que os pesos possuem o mesmo valor) e lanczos (aproximação do filtro sinc), tendo-se concluído que o mais indicado é o filtro de interpolação bicúbica. A qualidade de imagem apresentada pela interpolação bicúbica foi notavelmente superior a apresentada pelas interpolações nearest neighbor, bilinear e caixa, nomeadamente uma maior preservação de contraste e das arestas. Comparativamente ao filtro lanczos, além de uma qualidade de imagem igual ou ligeiramente superior, a bicúbica apresentou ainda uma maior eficiência computacional. A figura 3.6 comprova como uma apropriada pré-filtragem da imagem, utilizando, por exemplo, a interpolação bicúbica, fornece uma mais justa e confiável representação da imagem do que simples remoção de pixels, na qual, muitas vezes, somente pixels brancos ou pretos são retidos. Na impossibilidade de representar um padrão preto e branco, o tom de cinzento é uma representação muito mais fiel da imagem do que puramente o branco ou o preto.



**Figura 3.6: Sub-amostragem precedida por pré-filtragem utilizando interpolação bicúbica.** Imagem (1080 x 1080 pixels) resultante de: a) sub-amostragem pura – remoção de pixels; b) sub-amostragem utilizando o filtro de interpolação bicúbica disponibilizado no Matlab.

Uma abordagem diferente consistiu em preceder a sub-amostragem com uma pré-filtragem passa-baixo no domínio da frequência. Para este caso, o procedimento baseou-se na pré-filtragem da imagem com um filtro butterworth de quarta ordem, bem como com o filtro de interpolação circular, também designado de filtro de interpolação ideal. A escolha da frequência de corte foi feita tendo em conta o fator de redução da imagem. Uma vez que a imagem original foi redimensionada para a dimensão de 1080 x 1080 pixels, foi aplicado um fator de redução de aproximadamente 10 vezes. Desta forma, respeitando o teorema de Nyquist, a frequência de corte foi estabelecida como sendo  $1080 / (2 \times 11264) \approx 1 / (2 \times 10)$ . Conquanto, ambos os filtros constituem filtros passa-baixo, e como tal, é habitualmente presumível o efeito de *blurring*<sup>2</sup> na imagem resultante. O observado foi que este fenómeno é consideravelmente mais proeminente no caso do filtro circular do que no do butterworth. Tal facto já era de esperar tendo em conta que, apesar de possuir as propriedades ideais de um filtro de interpolação, o filtro circular no domínio da frequência corresponde à função sinc no domínio espacial. Esta, por sua vez, consiste numa função oscilatória, espacialmente ilimitada, que, dada à impossibilidade de ser reproduzida com exatidão, introduz uma quantidade apreciável de *aliasing* e *blurring* na imagem.

No entanto, os melhores resultados obtidos com as duas abordagens, utilizando os filtros bicúbica e butterworth, não apresentaram diferenças significativas em termos de qualidade de imagem. Consequentemente, por questões de eficiência (exigência computacional) e praticidade, optou-se pelo filtro de interpolação bicúbica. A implementação da interpolação bicúbica presente no Matlab baseia-se na técnica de interpolação desenvolvida por Keys (1981), usufruindo das propriedades de separabilidade e simetria. Comparativamente à interpolação bilinear que aplica a

<sup>2</sup> O efeito de *blurring* geralmente ocorre conjuntamente com o *aliasing* e corresponde a uma desfocagem da imagem. No contexto da sub-amostragem, a imagem sub-amostrada resultante é consideravelmente mais “suave” que a original.

média ponderada de 4 pixels, o valor de cada pixel interpolado utilizando a bicúbica é determinado tendo em conta o valor dos seus 16 vizinhos mais próximos, sendo estes pesados de acordo com a sua distância ao pixel em causa. Como uma função interna do Matlab, esta se encontra otimizada pelos desenvolvedores do programa, apresentando um satisfatório compromisso entre complexidade e resultado (Roszkowiak et al., 2016). Desta forma, o seu tempo de execução é relativamente inferior ao da implementação direta da sua fórmula, apresentada de seguida para o caso unidimensional (ver Eq. 3.1).

$$f(x) = \begin{cases} \frac{3}{2}|x|^3 - \frac{5}{2}|x|^2 + 1, & \text{para } 0 \leq x < 1 \\ -\frac{1}{2}|x|^3 + \frac{5}{2}|x|^2 - 4|x| + 2, & \text{para } 1 \leq x < 2 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (3.1)$$

### 3.2.1.3 Pré-Processamento

Durante o diagnóstico, frequentemente, o patologista deseja observar/analisar uma região de interesse ou um elemento biológico numa mais elevada ampliação, o que sugere a ampliação de toda a imagem microscópica. No entanto, a imagem digital na sua resolução nativa contém biliões de pixels, o que acarreta longos tempos de processamento intratáveis (caso inteiramente carregada na memória). Para contornar este inconveniente, a abordagem utilizada baseou-se no paradigma divisão e conquista (do inglês *divide and conquer*), ou seja, em proceder ao redimensionamento da imagem fragmento a fragmento. Assim sendo, a imagem foi dividida em blocos (subimagens) de modo a permitir que regiões de interesse pudessem ser efetivamente processadas e analisadas. De forma a permitir a análise em diferentes graus de detalhe, o particionamento foi realizado para diferentes fatores de ampliação. Seguindo a lógica do microscópio convencional, quanto maior a ampliação, menor o campo de visão e maior o grau de detalhe, em consequência, menor foi a resolução dos blocos extraídos da imagem. Entretanto, dada às dimensões extremamente grandes da imagem de origem, os blocos resultantes deste procedimento possuíram ainda uma alta resolução e necessitaram de ser sub-amostrados por forma a serem adequadamente visualizados no ecrã. Por conseguinte, caso o utilizador pretenda analisar uma nova imagem, este terá inicialmente que a importar, de modo a que seja efetuado o pré-processamento necessário à sua análise. Durante a importação da imagem são, então, gerados os seus respetivos blocos para as diferentes ampliações e efetuada uma apropriada sub-amostragem de cada um deles. Esta operação é facultada através do botão *Import image*.

O botão *Import image* permite selecionar as imagens a serem analisadas, que em seguida são divididas em blocos, e estes últimos simultaneamente sub-amostrados. Os blocos, juntamente com uma imagem reduzida, representativa da imagem original, são armazenados numa matriz de estrutura (uma *structure array*, ficheiro .mat do Matlab) que, por sua vez, é guardada numa pasta com o nome da imagem em causa. Este ficheiro se encontra inserido numa pasta “mãe”, denominada *Ipatimup files*, na qual estarão localizados todos os ficheiros das imagens já pré-processadas (que poderão ser acedidos através do botão *Open Image*). Esta última é automaticamente criada

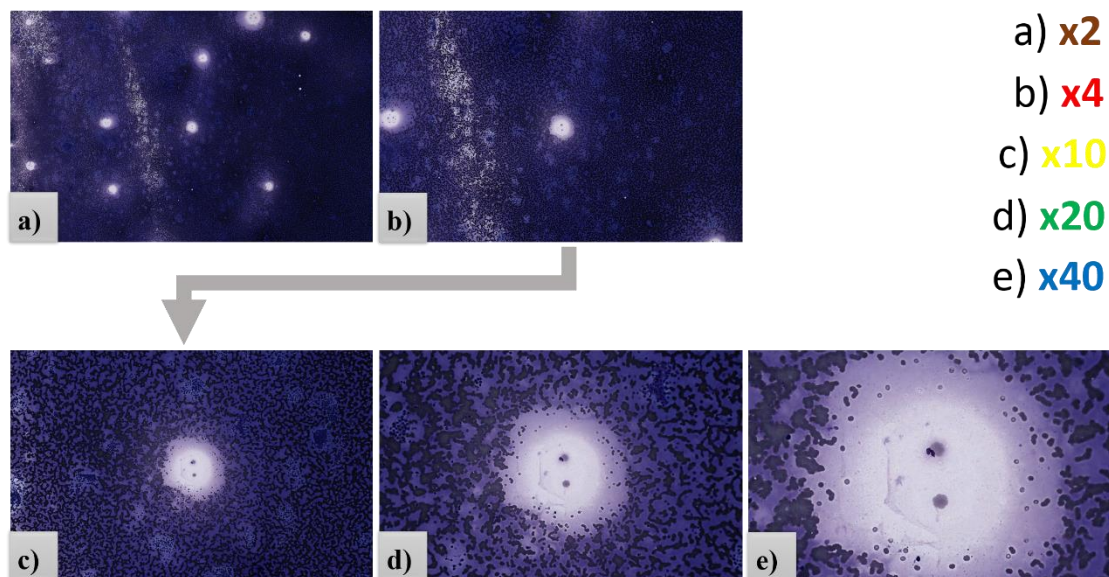
na primeira utilização do programa, por recurso a variáveis ambientes, encontrando-se localizada na subdiretoria *Documents* do utilizador. A variável ambiente *HOME/HOMEPAH* (consoante se trata ou não de um sistema operativo Unix, respetivamente) permite identificar a diretoria principal do utilizador e, na sequência, efetuar a criação de um ficheiro em qualquer subdiretoria.

Os detalhes de cada etapa do pré-processamento são apresentados de seguida.

### Etapas do pré-processamento

Para cada imagem selecionada:

1. Dá-se início ao processo iterativo de geração dos blocos respeitantes a cada fator de ampliação, isto é possível através de uma variável que a cada iteração recebe um valor indicando qual o fator. De modo a obter uma correspondência com o microscópio ótico convencional, foram empregues as principais ampliações nele utilizadas, nomeadamente de x4, x10, x20 e x40, incluindo ainda a ampliação de x2. Por forma a também propiciar um campo de visão equivalente ao do microscópio, a dimensão dos blocos correspondentes a cada uma das ampliações consistiu no produto entre a resolução do ecrã e uma constante determinada pelo fator de ampliação. Deste modo, a constante foi estabelecida como sendo 10, 5, 2, 1 e 0.5 para as ampliações de x2, x4, x10, x20 e x40, respetivamente, equivalendo ao fator de sub-amostragem de cada bloco (ver Fig. 3.7).



**Figura 3.7: Campo de visão proporcionado por cada fator de ampliação.**

As imagens em a), b), c), d) e e) representam, respetivamente, o campo de visão (centrado no mesmo ponto) apresentado para as ampliações de x2, x4, x10, x20 e x40. Estas imagens permitem ter uma noção da dimensão dos blocos correspondentes a cada fator de ampliação.

2. Subsequentemente, logo após a concepção de cada bloco é efetuada a sua sub-amostragem, fazendo uso da interpolação bicúbica disponibilizada no Matlab (ver secção anterior – 3.2.1.2). Uma vez que o visualizador integrado na interface possui uma resolução de 1856 x 1184, os blocos são simultaneamente filtrados e redimensionados para esta dimensão. A título de exemplo, na impossibilidade de serem exibidos no ecrã numa razão de um para um, os

blocos referentes à ampliação de x2, resultantes numa resolução de 18560 x 11840, passam por uma de redução de 10 vezes por forma a serem adequadamente visualizados. A sua filtragem permite evitar efeitos de *aliasing* durante o processo de sub-amostragem. De referir que a sub-amostragem não se aplica à ampliação de x40, neste caso é efetuada uma sobre-amostragem (geração de pixels intermédios), resultando numa ampliação fictícia.

3. Tendo sido realizado os procedimentos descritos nos pontos 1 e 2, o passo seguinte resume-se na criação de uma imagem representativa da imagem original, denominada WSI (*Whole-Slide Image*), efetuando uma sub-amostragem por um fator de 32 (permitindo obter uma imagem de dimensões manejável). A WSI será utilizada para estabelecer o mecanismo de visão global + detalhe, descrita na próxima secção (3.2.1.4).
4. Segue-se, por último, o armazenamento dos blocos, juntamente com a WSI, na matriz de estrutura *structures* (ficheiro *.mat*), sendo esta arquivada numa pasta contendo o nome da imagem escolhida para análise.

Considerando que cada fator de ampliação estabelece/fixa a dimensão dos seus blocos correspondentes, quanto maior a dimensão da imagem maior o número de blocos produzidos para as diferentes ampliações durante o pré-processamento. A duração do pré-processamento é, por conseguinte, uma função do número de blocos gerados durante o procedimento. Na tabela seguinte encontra-se uma estimativa, baseada em 10 ensaios, para os tempos de carregamento, pré-processamento e inicialização do software para uma imagem de 2.4 gigapixels, originando, respetivamente, 10, 44, 270, 1113 e 4494 blocos para as ampliações de x2, x4, x10, x20 e x40.

**Tabela 3.1: Duração de upload de imagem, pré-processamento e arranque do software.** Valores obtidos numa iMac OS X El Capitan (27-inch, Mid 2010) para uma imagem de 2.4 gigapixels.

	Duração média (segundos)	Desvio padrão (segundos)
<b>Carregamento da imagem inteira</b>	152	$1.7 \times 10^{-1}$
<b>Pré-processamento</b>	4932	112
<b>Arranque do programa</b>	399	25

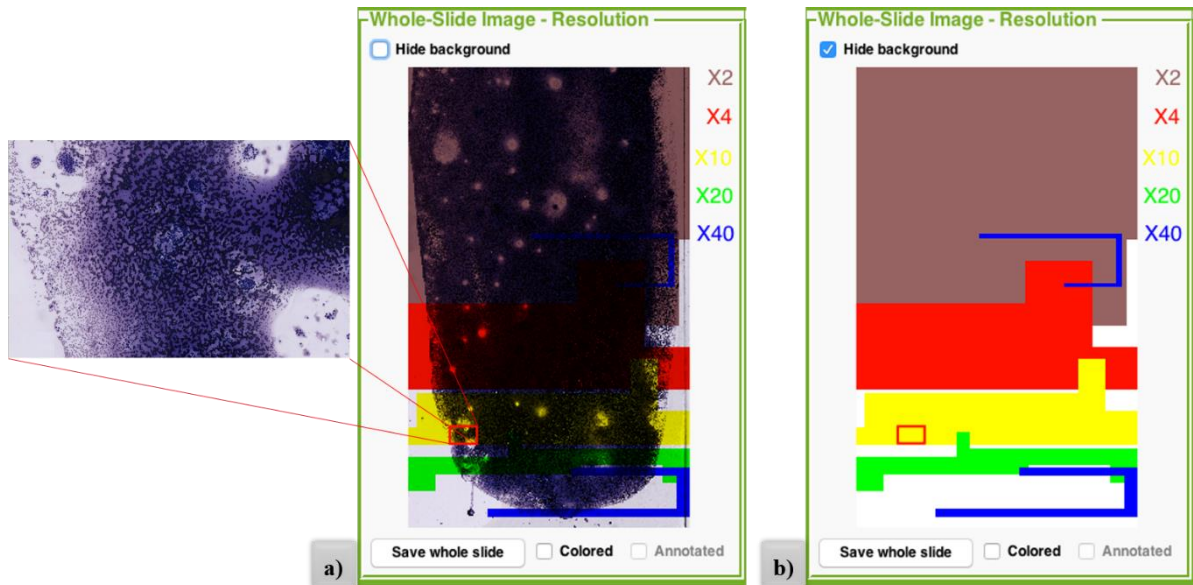
Como se pode verificar na tabela 3.1, o proporcionar da visualização da imagem em diferentes graus de detalhe com qualidade apropriada para a realização da sua análise é obtido à custa de um relativo demorado procedimento (tempo indeferido), exigindo um elevado desempenho computacional. Porém, apesar da dimensão da imagem condicionar o seu pré-processamento e análise de forma sequencial, as etapas de sua importação e pré-processamento poderão ser efetuadas previamente à sua análise, em offline (ex. durante a noite).

### 3.2.1.4 Mecanismo de visão global + detalhe

Ao inicializar o programa, é ajustada a WSI (ver secção anterior, 3.2.1.3) ao visualizador da interface, proporcionando uma visão de um todo da lâmina. Devido à impossibilidade de ser exibida

e analisada na sua resolução nativa, é importante para o patologista ter uma visão global da imagem digitalizada da lâmina. Ao mesmo tempo, é efetuada uma cópia da WSI. Estas duas imagens destinam-se a fins distintos, contudo ambas fornecem um mapa global (*thumbnail overview*) da imagem original. Com a WSI pretendeu-se, inicialmente, facultar ao utilizador um mecanismo que lhe permita selecionar diretamente a região da lâmina que pretende analisar. A ideia era proporcionar ao utilizador um mecanismo de *overview* + detalhe, quer dizer, ele clicar na região de interesse e automaticamente esta ser-lhe apresentada no ecrã. O procedimento implementado consiste em criar uma imagem constituída por 4 blocos, contendo o ponto selecionado nas proximidades do seu centro, e em seguida apresentar a região, centrada nesse ponto, que compreenda uma dimensão idêntica à do visualizador da interface. Esta região é identificada na WSI por um retângulo a vermelho, cuja dimensão é função da ampliação em uso. Este mecanismo permite uma intuitiva orientação e fácil navegação em direção a qualquer região de interessante da lâmina. Com a segunda imagem (designada por WSI2) a intenção foi fornecer a informação sobre a ampliação utilizada para analisar cada região. Por conseguinte, para as ampliações de x2, x4, x10, x20 e x40, a região em observação é colorida (aplicação de um filtro de cor), respetivamente, de castanho, vermelho, amarelo, verde e azul, imitando o código de cores das respetivas lentes objetivas no microscópio. Deste modo, é ao mesmo tempo efetuado o registo das áreas analisadas e da trajetória até então percorrida na lâmina. Suplementarmente, para as duas *overviews* é disponibilizada a opção de “ocultar” o fundo da mesma, isto por meio de duas *checkboxs*, uma para cada imagem, sendo ambas designadas por *Hide background*. É exibido um background totalmente a branco de modo a realçar as áreas coloridas da imagem, o que proporciona ao utilizador um melhor panorama das regiões já analisadas, permitindo-lhe, desta forma, mais facilmente confirmar a cobertura de toda a lâmina (ver Fig. 3.8). O botão *Save whole slide*, conjuntamente com duas *checkboxs*, *Colored* e *Annotated*, permite ainda guardar, respetivamente, a WSI2 e a WSI (contendo uma *overview* das anotações efetuadas pelo utilizador).

Complementarmente, é apresentado junto à WSI as coordenadas (nela referenciadas) do centro da região da lâmina que se encontra exibida no ecrã. Estas coordenadas, conjuntamente com as do cursor referenciadas no visor (instantaneamente atualizadas), ambas fornecidas em unidades de pixels, poderão ser úteis na medida em que possibilitam que, por exemplo, dois utilizadores possam estar simultaneamente a observar a mesma região da lâmina, facilitando, assim, uma análise colaborativa entre os mesmos.



**Figura 3.8: Registro de áreas analisadas.**

a) Apresentação da WSI2 com as regiões já analisadas coloridas de acordo com a sua ampliação de análise;  
 b) omissão do fundo da WSI2, sendo apresentado um background totalmente a branco, permitindo um melhor panorama das áreas analisadas e respectivas ampliações de análise. O retângulo a vermelho indica a região no momento em análise.

### 3.2.2 Navegador

O navegador foi desenvolvido de modo a permitir uma prática e eficiente exploração/ “navegação” ao longo da imagem, tentando, de certa forma, proporcionar uma velocidade de visualização comparável à experiência de utilizar um microscópio. O mecanismo desta aplicação resulta na sequência da funcionalidade de visão global + detalhe (ver secção 3.2.1.4). Tendo esta última sido desenvolvida, a fase seguinte consistiu no desenvolvimento do mecanismo de “navegação” através da imagem. Por questões de praticidade e por forma a facilitar a exploração da imagem, foi inicialmente utilizado um joystick (ver Fig. A.1, apêndice A). A implementação teve por base a integração de um temporizador, neste caso a função *timer* do Matlab, que periodicamente lê o valor dos eixos e botões do joystick. Os botões *Start/Stop Navigation*, integrados na interface, controlam, respetivamente, o início e o término da leitura e, em consequência, o “percorrer” da imagem. Com o intuito de fornecer um guia à navegação, foi criado um cursor virtual, uma cruz verde, tornando assim o “percorrer” da imagem um processo suficientemente intuitivo. O primeiro eixo do joystick determina o seu deslocamento na vertical, enquanto que o segundo eixo é responsável pelo seu movimento na horizontal. O joystick possui a capacidade de *force feedback*, pelo que permite grandes deslocamentos na imagem com apenas pequenos movimentos, o que evita fadiga por parte do utilizador. Atingindo os extremos da imagem apresentada, esta é atualizada, transladada de um offset, apresentando desta forma uma nova porção da lâmina. Este offset é determinado pelo valor do quarto eixo do joystick. Este eixo controla o avançar da cruz, permitindo, portanto, controlar a velocidade de “navegação” ao longo da imagem. O seu intervalo de variação foi determinado após algumas experiências, encontrando-se estabelecido entre 20 e 100.

### Navegações alternativas

A rotina de trabalho diário de um patologista requer que a “navegação” ao longo da imagem seja fácil, simples e eficaz, pressupondo a não restrição do patologista a uma única modalidade de navegação. Em atenção a isso, complementos (e alternativas) à navegação com o joystick foram implementados, encontrando-se descritos de seguida.

- **Navegação normal (não guiada pelo cursor)**

Caso o utilizador deseje que o “navegar” pela imagem seja imediato e mais interativo, quer dizer, que ao movimentar o eixo 1 ou 2 do joystick seja automaticamente atualizada a imagem ao invés do cursor, esta opção é proporcionada via a ativação de uma *checkbox* denominada *Not cursor-guided*. Um atalho para um efeito semelhante foi igualmente implementado com as teclas seta do teclado (↑, ↓, ←, →). A diferença reside no facto da direção de navegação se encontrar restringida pelo sentido da seta. Além disso, para este mesmo atalho, foi adicionalmente acrescentada a opção de varrimento por blocos ou “*structured scan* (*checkbox – Fast scan*), ou seja, em vez de a imagem ser atualizada/transladada de acordo com o offset estabelecido pelo quarto eixo do joystick, é exibida a imagem (subimagem/bloco/painel) imediatamente a seguir de acordo com o sentido da seta. Este modo, orientado por blocos, possibilita um varrimento sistemático e uma rápida cobertura de toda a lâmina, permitindo, por conseguinte, agilizar o processo de análise.

- **Zoom in/out**

Suplementarmente, com o joystick é ainda possível alternar entre as várias ampliações disponibilizadas na interface, permitindo ao utilizador durante a navegação disfrutar de uma espécie de *zooming*, mas de forma discreta. O princípio baseia-se no *zooming* discreto proporcionado pelos microscópios convencionais, sendo assim foram utilizados botões do joystick para zoom in/out. Ao clicar no botão número 3 (zoom in), é aumentada a ampliação da imagem, passando, por exemplo, de x4 para x10. O efeito oposto (ex. alteração de x10 para x4) é obtido ao clicar no botão número 4 (zoom out), ou seja, diminui-se a ampliação da imagem. O cursor virtual permite especificar o centro da subimagem que será exibida na nova ampliação. Esta aplicação possibilita, a título de exemplo, uma melhor avaliação de uma célula suspeita durante a navegação. Ao ser aumentado o fator de ampliação da imagem poderão ser verificados os sinais reais de malignidade que a célula possa apresentar. Dada à sua particular relevância para a análise de imagem, o mecanismo de zoom in/out foi, também, implementado através do rato e do teclado. Nesse sentido, os botões esquerdo e direito do rato desempenham o mesmo papel que os botões número 3 e 4 do joystick, respetivamente. A posição central da nova imagem a ser exibida na diferente ampliação é dada pela posição do cursor sob o clique. Quanto ao teclado, os caracteres i/o permitem, respetivamente, o zoom in e o zoom out centrado no ponto médio da imagem em exibição.

- **Drag-and-drop**

Em modo complementar à navegação, foi conjuntamente disponibilizado um mecanismo de *drag-and-drop*. Este permite, por exemplo, que após o utilizador ter selecionado a região que pretende

analisar, este ainda possa ajustar a área da lâmina em observação, constituindo uma forma “especializada” de navegar pela imagem. A sua implementação é similar à do *zooming* proporcionado pelo joystick e pelo rato à exceção que o fator de ampliação não é alterado. A atualização da imagem é efetuada consoante o deslocamento realizado durante o *drag-and-drop*. Um mecanismo semelhante foi ainda implementado através do duplo clique do botão esquerdo do rato, a região da imagem sob a posição do cursor é deslocada para o centro do visualizador (uma espécie de centralização da posição do cursor).

Observação: O mecanismo de navegação (apoiado no joystick e no teclado) e, conseqüentemente, o zoom in/out e o *drag-and-drop* resultam na sequência da funcionalidade de visão global + detalhe. Mediante isso, todos estes mecanismos beneficiam desta funcionalidade na medida em que, ao mesmo tempo que é atualizada a imagem no visualizador, ambas as *overviews* são atualizadas, indicando a nova área da lâmina em exibição e a respetiva ampliação de análise.

### 3.2.3 Anotações

Para uma ferramenta de apoio à análise assistida de imagens de lâminas microscópicas, um dos principais requisitos apontados por patologistas consiste na possibilidade de efetuar anotações, quer por forma a facilitar a revisão do diagnóstico, quer por forma a simplificar a obtenção de uma segunda opinião. À vista disso, foi implementado um conjunto de funcionalidades que permitem a realização de diferentes tipos de anotações. Em seguida, é especificada a função/utilidade de cada uma delas.

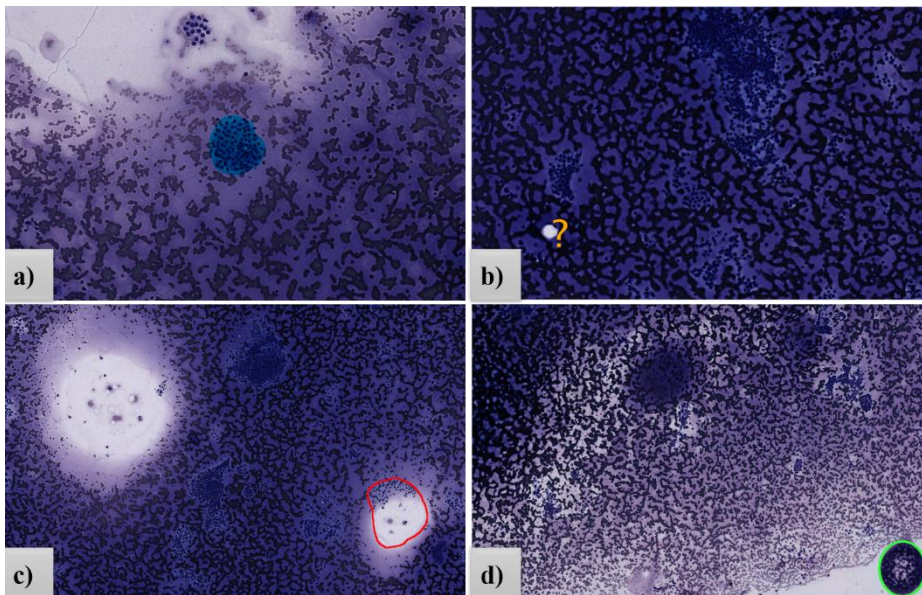
- **Assinalação e coloração de ROIs**

A assinalação de regiões de interesse (ROIs - *Regions Of Interest*) é facultada por meio do botão *Specify ROI*. Através deste, o utilizador é provido de um mecanismo de mão livre para espontaneamente delimitar os contornos da região que pretende destacar. Ao clicar no botão direito do rato poderá alterar a cor com a qual será assinalada a região, tendo como opções amarelo, magenta, ciano, vermelho, azul, verde, entre outros. Uma alternativa à demarcação dos limites da ROI consiste em a colorir por completo (aplicação de um filtro de cor). Esta opção é proporcionada através do botão *Dye ROI*. Para ambas as modalidades a convecção de cores poderá ser estabelecida pelo utilizador (ver Fig. 3.9).

- **Inserção de marcas, formas e texto**

Através dos botões *insertMarker* e *insertShape* poderão, respetivamente, ser inseridas as marcas ×, +, \*, ◦ e □, ou envolvida uma determinada região com formas geométricas básicas, particularmente o círculo, a elipse, o quadrado e o retângulo. Durante a inserção, estas formas poderão ser redimensionadas e arrastadas iterativamente, sendo igualmente possível alterar a sua cor com o botão direito do rato. O botão *insertText*, juntamente com um campo de texto, permite a inserção de caracteres ou texto na imagem (ex. atribuir uma etiqueta a uma dada região). Para qualquer uma destas variantes de anotação, é fornecido ao utilizador dois parâmetros de suporte para especificação da cor e do tamanho (iniciais no caso das formas geométricas) da anotação, podendo

este, na sequência, proceder à sua inserção com um simples clique do rato no botão referente ao tipo de anotação e de seguida no ponto desejado da imagem (ver Fig. 3.9).

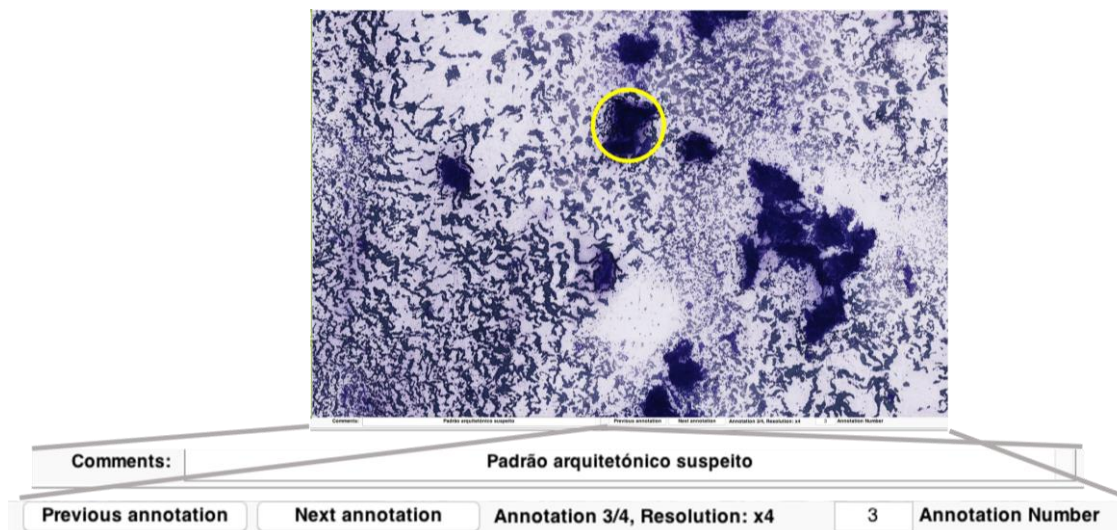


**Figura 3.9: Exemplos de anotações.**

a) Coloração de uma ROI (a ciano); b) inserção de texto (carácter “?”, a laranja); e demarcação duma ROI através: c) de um mecanismo de mão livre; d) do encaixe de uma forma geométrica elíptica cuja espessura é estabelecida, inicialmente, através do *slider LineWidth*. Em ambas as modalidades, a cor e a localização da anotação poderão ser alteradas durante a sua inserção.

### Visualização de anotações

A visualização das anotações é assegurada através de três *radio buttons*, *Mine*, *Imported* e *All*, que juntos compõem a funcionalidade *View annotations*. O *radio button Mine* é ativado imediatamente após a realização da primeira anotação e atualiza a WSI por forma a conter uma *preview* da anotação efetuada pelo utilizador. A WSI é atualizada a cada nova anotação, proporcionando uma visão global das anotações até então efetuadas pelo utilizador. As opções *Imported* e *All*, tal como os nomes sugerem, só são disponibilizadas após se ter procedido à importação de anotações, e permitem, respetivamente, a visualização das anotações importadas e a visualização conjunta das anotações importadas com as do utilizador, caso houver. Para cada uma das três opções, são simultaneamente disponibilizados dois botões, *Previous/Next annotation*, que permitem “navegar” entre as anotações contidas na categoria selecionada (*Mine*, *Imported* ou *All*). Estes botões poderão ainda ser, respetivamente, acedidos através de atalhos do teclado (caracteres p e n) e dos botões direito e esquerdo do rato. Entretanto, o utilizador é provido de um campo de texto de modo a proceder à pesquisa (pelo número) de uma anotação em particular. Cada anotação é exibida no ecrã exatamente como foi realizada. Além disso, para cada uma é fornecida a informação do seu número, sobre a totalidade das anotações da categoria em exibição, e da respetiva ampliação na qual foi efetuada. Complementarmente, o utilizador poderá, também, adicionar algum comentário à anotação (ex. um prognóstico ou um feedback endereçado a um colega) (ver Fig. 3.10).



**Figura 3.10: Mecanismo de visualização de anotações.**

Delimitação de um padrão arquitetônico com uma forma geométrica circular, incluindo um campo de texto para introdução de comentários (*Comments*). Os botões *Previous/Next Annotation* possibilitam uma “navegação” entre as anotações efetuadas pelo utilizador, podendo-se proceder à pesquisa de uma anotação em particular (campo de texto *Annotation Number*).

Por conseguinte, por forma a facilitar a revisão de diagnóstico e a partilha de opiniões (ou uma análise colaborativa), são facultadas as opções de importação e exportação de anotações, botões *Import/Export annotation*, respetivamente. Ao ser importado um ficheiro contendo anotações, é automaticamente ativado o *radio button All*, disponibilizando o mecanismo de navegação conjunta sobre todas as anotações contidas nas categorias *Imported* e *Mine*. Para os casos em que tenham sido inseridos comentários ou acrescentadas novas anotações, é disponibilizada a *checkbox All*, que, ao ser ativada, permite a exportação de todas as anotações da categoria *All* e respetivas informações (ampliação na qual foram efetuadas e seus eventuais comentários). Esta *checkbox* altera o comportamento do botão *Export annotation* que por defeito permite somente a exportação das anotações do utilizador. As anotações são guardadas num ficheiro *.mat (Annotations\_file)* que é arquivado na pasta da imagem que se encontra em análise.

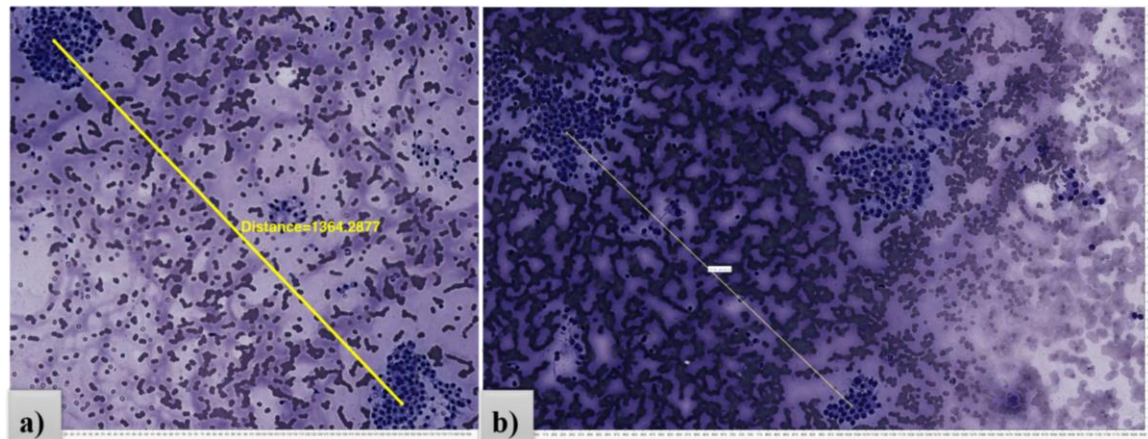
### 3.2.4 Análise quantitativa

Atendendo a que aspetos da morfologia dos núcleos (ex. forma, tamanho e textura) e suas distribuições dentro do tecido são de vital importância no estabelecimento de prognósticos e diagnósticos e na graduação de doenças como o cancro, ferramentas de apoio estatístico, que se descrevem de seguida, foram implementadas por forma a facilitar medições precisas dessas propriedades e uma análise quantitativa da imagem.

- **Medição de distância entre dois pontos**

O botão *DistanceBetweenPoints* permite medir a distância entre dois pontos/objetos selecionados com o rato. Para uma medição mais iterativa é disponibilizado o botão *Ruler*, é sobreposta no visualizador uma linha arrastável e redimensionável que mede a distância entre os seus extremos, imitando o funcionamento de uma régua (ver Fig. 3.11). Estas ferramentas poderão ser utilizadas

para obter as dimensões de espécimes de interesse ou ainda inferir sobre as suas distribuições dentro do tecido. Embora fornecidas em unidades de pixels, estas medidas poderão ser facilmente convertidas para micrómetros (ou outra unidade de interesse) ao ser fornecida a informação da dimensão de cada pixel aquando da digitalização das lâminas.



**Figura 3.11: Medição de distância entre dois pontos.**

Medição da distância entre: a) dois pontos (padrões arquitetónicos) selecionados com o rato; b) os extremos da “régua” facultada através do botão *Ruler*, linha (a amarelo) que pode ser arrastada e redimensionada.

- **Medição de propriedades morfológicas de uma determinada ROI**

Os botões *Add ROIs* e *Specify ROIsToAnalyse* permitem, em conjunto, selecionar um número ilimitado de ROIs com o mecanismo de mão livre e, através da app *Image Region Analyzer* do Matlab, obter diversas medidas, incluindo área, área preenchida, excentricidade, maior e menor eixo, orientação, perímetro, solidez, entre outros. Estas medidas permitem inferir sobre aspetos da morfologia das regiões selecionadas (ex. núcleos). Um exemplo de aplicação desta funcionalidade é ilustrado na figura 3.16.

### 3.2.5 Outras funcionalidades

Em seguida, descrevem-se um conjunto de funções complementares integradas na interface, que poderão ser uma mais-valia ao utilizador durante a análise de imagem e utilização do programa.

- ***Image Adjustments***

Caso seja necessário ajustar/melhorar a qualidade da imagem, o utilizador dispõe de parâmetros que possibilitam o ajuste do brilho, contraste e gama da imagem, *sliders Brightness*, *Contrast* e *Gamma*, respetivamente. Através destes poderá adaptar a sensibilidade à luz do dispositivo de imagem (scanner) à sua própria sensibilidade. O botão *ContrastAdjustTool* permite converter a imagem para tons de cinzento e ajustar o contraste. A rotação da imagem a um ângulo de 90° é viabilizada através do botão *imRotate*. Além disso, são facultados um conjunto de filtros, caso seja necessário, por exemplo, reduzir/remover ruído da imagem (ex. de filtros: média, mediana, gaussiana, sobel, entre outros). Este conjunto de funcionalidades compõe um painel, acedido através do botão *ImageAdjustments*.

- ***Snapshot***

Através do botão *Snapshot* poderá ser exportada a imagem exibida no ecrã. Uma aplicação típica poderá ser enviar a imagem, contendo ou não anotações, a um colega patologista para uma segunda opinião. Um dos grandes benefícios das imagens digitais é poderem ser instantaneamente enviadas e visualizadas por vários outros utilizadores. A imagem poderá, também, ser arquivada e recuperada, posteriormente, para comparação ou revisão de diagnóstico.

- ***Undo e Reset***

O botão *Undo* permite ao utilizador desfazer a última operação, qualquer que seja, que tenha aplicado à imagem em exibição. Ao mesmo tempo, são eventualmente atualizadas as duas *overviews* e repostos os valores dos parâmetros (ex. cor, tamanho, fator de ampliação) associados à operação anulada. O botão *Reset* restitui o estado inicial de análise da imagem, assim sendo todas as alterações até então efetuadas na imagem são, por completo, canceladas.

- **Atalhos do teclado**

No intuito de proporcionar ao utilizador um fácil e cómodo acesso às principais funcionalidades da interface, foram implementos variados atalhos com o teclado (um total de 22). Estes encontram-se listados na tabela A.1 (apêndice A).

### 3.3 Segmentação Automática de nucleoides

A segunda etapa desta tese abarcou o desenvolvimento de um algoritmo de identificação automática de nucleoides, cuja finalidade é auxiliar no diagnóstico do cancro da tiroide. Em particular, foram efetuados testes a algoritmos de segmentação de núcleos de modo a desenvolver e/ou adaptar um algoritmo para identificação de nucleoides em lâminas de citologia não-ginecológica, especificamente em lâminas raspadas da tiroide em campo claro. Para este objetivo específico, uma interface secundária, *Nucleoids Segmentation*, foi desenvolvida e incorporada na interface principal, *IPathScope* (botão *Nucleoids Identification*). Esta interface foi estruturada por forma a que seja possível aplicar o algoritmo desenvolvido à subimagem que esteja a ser analisada na interface principal, como também a subimagens importadas (botão *Open Image*). Durante a navegação com o joystick, o utilizador poderá facilmente acedê-la através do botão número 2 (ver Fig. A.1, apêndice A). A interface é exibida com a subimagem no momento em análise. Adicionalmente, esta dispõe de funcionalidades que permitem o manuseio de imagens (as mesmas disponibilizadas no painel *ImageAdjustments*, ver secção 3.2.5) e poderá proporcionar ao utilizador alguma experiência em processamento de imagem, através da aplicação de algoritmos como *edge detection*, *watershed*, *thresholding*, filtragem *area opening*, equalização de histograma, entre outros. Ferramentas de apoio estatístico (ver secção 3.2.4) são igualmente disponibilizadas na interface. A imagem resultante das alterações efetuadas poderá ser guardada através do botão *Save Image*.

### 3.3.1 Métodos de segmentação de núcleos

Um pré-requisito crítico para a segmentação de imagens de patologia consiste na detecção de núcleos/células, que mais não é do que obter a localização do objeto sem meticulosamente delimitar os seus contornos. Apesar do objetivo único de encontrar um marcador (ou semente) perto do centroide do núcleo, a grande variabilidade entre as imagens de patologia e microscopia deu origem à uma grande diversidade de métodos de detecção, cada um desenvolvido e/ou adaptado para atender às características específicas de um tipo de imagem. Conquanto, estes apoiam-se fundamentalmente em 8 algoritmos: transformada de distância, operações morfológicas, transformada H-mínima/máxima, filtragem *Laplacian of Gaussian* (LoG), detecção de MSER (*Maximally Stable Extremal Region*), transformada de Hough, votação baseada em simetria radial e *machine learning* (aprendizagem supervisionada) (Xing & Yang, 2016).

O resultado da detecção constitui, naturalmente, a base essencial para a subsequente segmentação e classificação dos núcleos. Ao longo dos anos, novamente devido à grande variabilidade entre as imagens microscópicas/patológicas, numerosos e variados métodos de segmentação foram desenvolvidos para efetivamente delinear os contornos do núcleo após a sua detecção. Estes baseiam-se maioritariamente na utilização ou combinação de técnicas como *thresholding*, transformações morfológicas, *region growing*, *watershed*, *active contour*, *clustering* e *graph cuts*. Por conseguinte, exploram e empregam informações de intensidade (textura e gradiente), morfológicas e geométricas para demarcação dos contornos do núcleo.

Em condições ideais, nas quais os objetos se encontram dispersos num fundo contrastante, uma simples operação de *thresholding*, computacionalmente expedita, permite obter os resultados pretendidos (Marques, 2011). A sua aplicação resulta numa imagem binária distinguindo os objetos do fundo. Estabelecido um limiar de nível de cinzento, todos os pixels cuja intensidade seja inferior são colocados a preto (designado fundo) e aos com nível de intensidade superior são atribuídos a cor branca<sup>1</sup> (correspondem aos objetos) (Wu et al., 2008). Na presença de imagens com alguma complexidade (a maioria dos casos), em que as condições para a aplicação do *thresholding* não se verificam, técnicas igualmente mais complexas, que resultam de variações ou combinações de técnicas básicas, deverão ser utilizadas. Nos últimos anos, umas das técnicas de segmentação que vem sendo bastante explorada no âmbito da citologia e histologia é a operação morfológica *watershed* (WT - *Watershed Transform*). Citando exemplos, (Elmoataz et al., 1996; Lezoray & Cardot, 2002; Mouelhi, Sayadi, Fnaiech, Mrad, & Romdhane, 2013) representam 3 dos muitos trabalhos assentes nesta técnica. Tal como a *region growing*, a WT constitui, portanto, um dos principais métodos de segmentação baseados em regiões. A classificação dos pixels é efetuada tendo em conta a sua proximidade espacial, o gradiente de seus níveis de cinzento e a homogeneidade das suas texturas (Gonzalez & Ballarin, 2009). Consequentemente, esta técnica possibilita identificar objetos complexos em imagens altamente texturadas. No entanto, é extremamente

---

<sup>1</sup> Em alguns estudos presentes na literatura, é também possível encontrar a convenção de cores inversa.

suscetível à sobre-segmentação<sup>2</sup> e, tal como o thresholding e as operações morfológicas, não é autossuficiente para uma efetiva segmentação de núcleos sobrepostos ou tocantes. As operações morfológicas são normalmente utilizadas na fase de pré-processamento de imagem para facilitar uma posterior segmentação. *Active Contour Models* (ACMs) constituem técnicas de refinamento de contornos e são frequentemente utilizadas quando os contornos dos objetos não podem ser fielmente descritos por representações gráficas rígidas. O seu intuito é encontrar de entre um conjunto de splines deformáveis (funções definidas por polinómios), que se podem mover em direção aos exatos contornos do objeto, aquela que minimiza uma função de energia pré-estabelecida para o problema (Irshad et al., 2014; Wu et al., 2008). Algoritmos de *clustering* particionam a imagem em subconjuntos (clusters), cada um dos quais idealmente correspondente a um objeto, visando sempre alta similaridade intracluster e baixa similaridade intercluster. Conquanto, a precisão destas técnicas é fortemente dependente da inicialização dos clusters e do número de clusters previamente estabelecido. Os métodos de *graph cut* modelam a imagem como um gráfico ponderado não direcionado e, de certa forma, podem ser considerados como combinações de *clustering* e ACMs na medida em que particionam a imagem em múltiplos conjuntos, cada um representando um objeto, utilizando como critério o da minimização de uma função de energia. Estas últimas técnicas têm permitido os melhores resultados de segmentação de núcleos/células, contudo à custa de um alto empenho computacional. Recentemente, diversos estudos vêm explorando combinações destes métodos tradicionais de segmentação com o *machine learning* no intuito de dar resposta aos desafios remanescentes de heterogeneidade, sobreposição e agrupamento de núcleos, os poucos métodos de segmentação atualmente em uso na prática clínica são resultantes destas combinações (Irshad et al., 2014; Xing & Yang, 2016).

Uma mais compreensiva revisão sobre os algoritmos supracitados de detecção e segmentação de núcleos em imagens de microscopia e patologia, incluindo formalismos e aplicações, pode ser encontrada em (Irshad et al., 2014; Xing & Yang, 2016). Por fim, é de referir que a detecção e segmentação de núcleos sobrepostos e tocantes e a escalabilidade dos algoritmos, por forma a serem aplicados à lâmina digitalizada na sua totalidade, são e provavelmente continuarão a ser os principais alvos de estudos de pesquisadores e cientistas da computação.

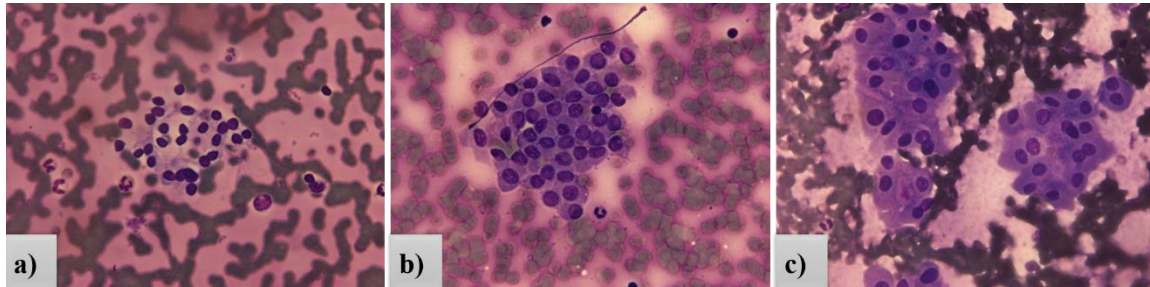
### 3.3.2 Detecção e Segmentação Automática de nucleoides

Com o intuito de fornecer assistência ao diagnóstico do cancro da tiroide, propôs-se a desenvolver um algoritmo para detecção/segmentação de nucleoides (quer dizer similar ao núcleo) em lâminas raspadas da tiroide em campo claro. Não obstante, a grande dimensão das imagens digitalizadas torna inexecutável a aplicação de qualquer algoritmo de segmentação à imagem toda. Deste modo, foram utilizadas subimagens (1200 x 1600 pixels) de lâminas de biópsia. Estas foram disponibilizadas pelo Ipatimup, consistindo em exemplares de regiões de alta incidência de nucleoides pertencentes a lâminas de casos benignos, malignos e tumorais (ver Fig. 3.12). Uma vez que as

---

<sup>2</sup> A sobre-segmentação corresponde ao caso em que um único objeto é segmentado em mais do que uma região na imagem.

imagens foram adquiridas a uma ampliação de x40, o algoritmo foi desenvolvido nesta ampliação. Essencialmente, o racional é o utilizador seleccionar a região da lâmina (subimagem) que pretende avaliar e nesta ser aplicado o algoritmo.



**Figura 3.12: Subimagens para teste do algoritmo de identificação de nucleoides.**  
Exemplo de subimagem pertencente a um caso: a) benigno; b) maligno; e c) tumoral.

### 3.3.2.1 Detecção de nucleoides

O primeiro algoritmo de segmentação que se testou limitou-se na aplicação do thresholding ao canal S (saturação) da imagem no formato HSV. Este canal normalmente apresenta um proeminente contraste entre os objetos e o fundo. Contudo, apesar de melhoradas as imagens resultantes após o seu pós-processamento com operações morfológicas (ex. preenchimento de buracos e filtragem *area opening*), o resultado foi considerado satisfatório em apenas um reduzido número delas. Um outro algoritmo testado consistiu na técnica *watershed*, pelas razões referidas na secção anterior, 3.3.1. No entanto, a grande diversidade e quantidade de conteúdo presente nas imagens levou a uma excessiva sobre-segmentação das imagens resultantes. De modo a melhorar o seu desempenho, foram analisadas e testadas algumas soluções (ex. *watershed* baseada em marcadores), porém sem resultado. Para a estratégia seguinte, concentrou-se sobretudo nas características morfológicas dos nucleoides. Assim sendo, a metodologia baseou-se na sua forma particular (aproximadamente circular ou elíptica), geralmente distinta dos outros elementos compreendidos na imagem. Deste modo, foi utilizada a transformada de Hough (*HT – Hough Transform*) para detecção de círculos na imagem (botão *Find Circles*).

A HT é um método de detecção de objetos especialmente utilizado para detetar curvas (contornos) com forma regular ou que podem ser parametrizadas por linhas, círculos ou elipses, sendo particularmente útil devido à sua tolerância a lacunas nos dados e à sua relativa robustez a ruído e dados dispersos e à variação de iluminação. Esta técnica, apesar de algoritmicamente complexa e computacionalmente exigente, possui uma implementação otimizada no Matlab. A teoria subjacente à HT consiste em assumir que os objetos a serem detetados apresentam formas regulares, que podem ser especificadas de forma paramétrica, e aplicar uma estratégia de votação discreta num espaço de parâmetro para obter a sua localização. Em particular para a HT circular bidimensional, um círculo centrado em  $(a, b) = (a_0, b_0)$  e com raio igual a  $r = r_0$  é descrito parametricamente por:

$$(x - a_0)^2 + (y - b_0)^2 = r_0^2 \quad (3.2)$$

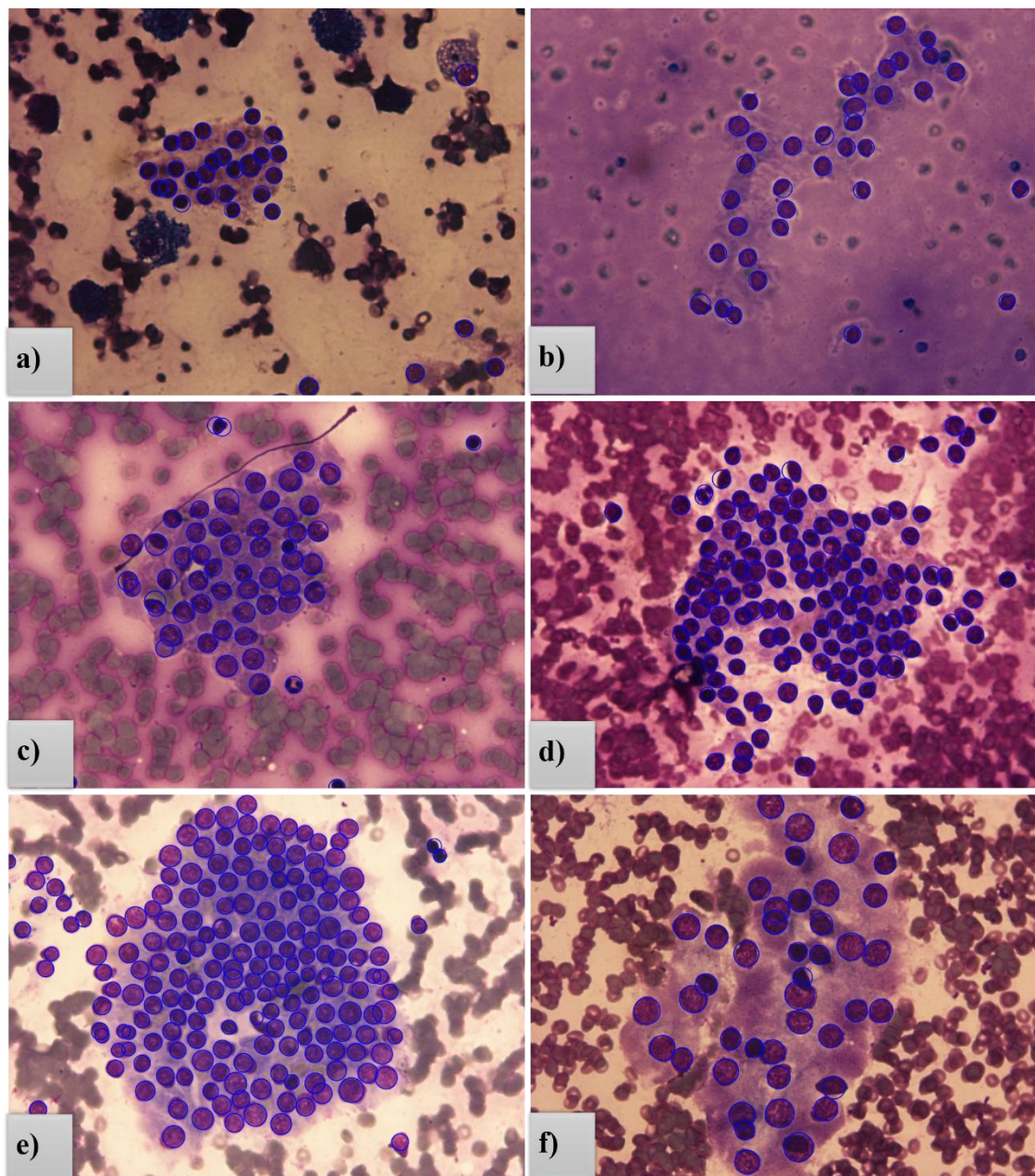
Assim sendo, cada círculo no espaço de imagem  $(x, y)$  é representado por um ponto  $(a, b, r)$  no espaço de parâmetro. Cada ponto da imagem é, então, solicitado para “votar” nos círculos que passam sobre ele. O conjunto dos pontos  $(a, b, r)$  correspondentes a esses círculos forma um cone no espaço de Hough que é único para cada ponto de imagem. No entanto, para os pontos  $(x, y)$  localizados num mesmo círculo, os seus respetivos cones possuem um ponto em comum no espaço de parâmetro (todos “votaram” nesse círculo). Um histograma tridimensional (comumente referido na linguagem digital como acumulador) é construído no espaço de Hough para contabilizar as votações para cada ponto desse espaço, representando a força de evidência que o correspondente círculo é detetado na imagem. Consequentemente, os pontos  $(a, b, r)$  com as maiores pontuações (máximos locais) correspondem à localização e ao raio dos círculos (ex. núcleos ou células com forma circular) presentes na imagem.

Não obstante, verificou-se que a simples aplicação da HT fornecia um resultado ainda aquém do pretendido, isto devido à ocorrência de uma quantidade considerável de falsos positivos e negativos. Foi, portanto, necessário aprimorar a transformada de Hough circular aplicada. Uma vez que a sua implementação presente no Matlab (*imfindcircles*) possui e baseia-se em parâmetros como a polaridade dos objetos (ex. se são mais escuros ou mais claros que o background), foi efetuado um pré-processamento por forma a destacar os nucleoides da imagem de fundo. A implementação da HT assume que as distribuições de intensidade dos objetos (nucleoides) e do fundo são suficientemente e consistentemente distintas, o que não se verifica para a maioria das imagens microscópicas/patológicas. Por conseguinte, o pré-processamento consistiu em criar uma nova imagem, a partir da imagem original no formato RGB, por aplicação de uma sequência de operações aritméticas entre os valores dos canais verde e azul (canais G e B). Esta expressão algébrica (ver Eq. 3.3) aumenta o contraste entre os objetos de interesse e o fundo, permitindo que os nucleoides se apresentem consideravelmente mais claros.

$$Img = \frac{G - B}{G + B} \quad (3.3)$$

Outro input que desempenha um papel crítico na HT circular é a gama de raios, esta deve ser estabelecida cuidadosamente a fim de lidar com a variação de tamanho dos nucleoides. À vista disso, para uma melhor performance do algoritmo, é requerido ao utilizador que indique o menor e o maior diâmetro assumidos pelos nucleoides presentes na imagem, compondo assim os limites inferior e superior da gama de raios. Isto permite não só estabelecer a gama de raios apropriada para a imagem em análise, independentemente da ampliação, como também acelerar o processo de estimação do raio dos círculos.

Atendendo a que o output do algoritmo consiste nas coordenadas do centro de cada nucleoide e no seu respetivo raio, a imagem exibida após a sua aplicação resume-se na imagem original com os nucleoides detetados envolvidos por um círculo de cor azul cujo diâmetro é dado pelo raio retornado pelo algoritmo (ver Fig. 3.13).



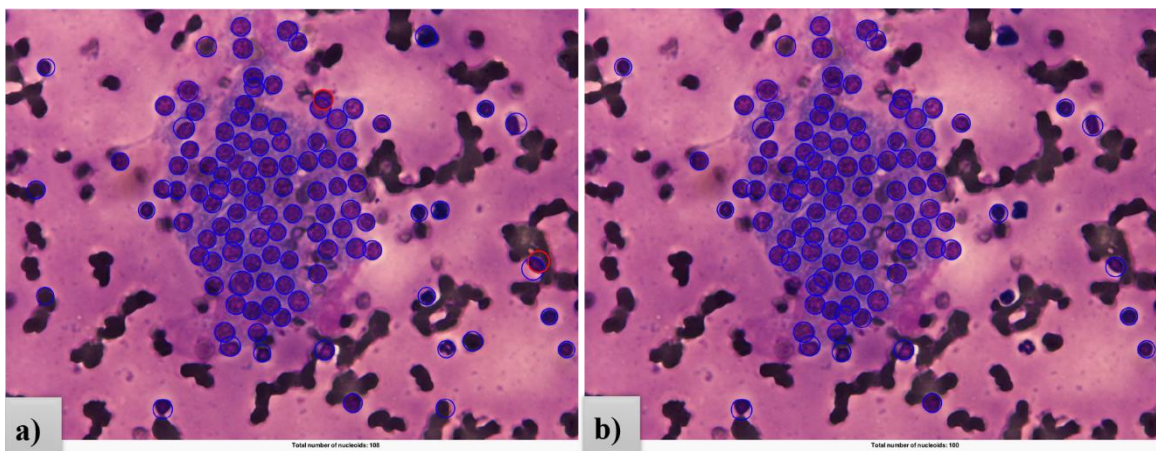
**Figura 3.13: Output do algoritmo de detecção de nucleoides.**

Resultado do algoritmo para: a) e b) 2 casos benignos; c), d) e e) 3 casos malignos; e f) 1 caso tumoral. Os nucleoides detetados encontram-se envolvidos por um círculo de cor azul cujo diâmetro é dado pelo raio retornado pelo algoritmo.

### 3.3.2.2 Mecanismo de edição de resultado

Os cenários apresentados pelas imagens patológicas de casos tumorais e não tumorais são de notavelmente grande inconsistência. Tendo em consideração que o algoritmo de detecção desenvolvido não possuirá o mesmo desempenho em qualquer imagem e que, conseqüentemente, poderá acarretar consideráveis casos de falsos positivos e negativos, foi desenvolvido um mecanismo de edição de resultado (acedido através do botão *Edit*). A sua implementação assegura ao utilizador total liberdade para aceitar/alterar o resultado. Com simples cliques do rato e *drag-and-*

*drops*, este poderá, respetivamente, remover objetos indesejados detetados pelo algoritmo ou incluir no resultado exibido nucleoides não identificados. Através do duplo clique do rato, o círculo do objeto mais próximo é colocado a preto (para remoção), bem como um círculo verde é desenhado consoante o *drag-and-drop* realizado, indicando a adição de um nucleoide. Além disso, através de uma coloração distinta dos círculos, vermelho e amarelo, possíveis falsos positivos são destacados no resultado apresentado, estes correspondem a círculos que sobrepõem (em pelo menos 60%) ou incluem outros círculos no seu interior, respetivamente. O utilizador poderá analisá-los e remover os que realmente não correspondem a nucleoides. Ao longo das várias edições, é disponibilizado o botão *Undo* que permite desfazer alterações indesejadas, sendo sempre automaticamente atualizado o número total de nucleoides (círculos) identificados na imagem. Através do botão *Save* é, então, efetuada a validação do resultado final (ver Fig. 3.14).



**Figura 3.14: Edição de resultado produzido pelo algoritmo de detecção de nucleoides.**

a) Imagem resultante da aplicação do algoritmo, os círculos a vermelho indicam possíveis falsos positivos, neste caso círculos que sobrepõem consideravelmente um outro círculo e que poderão não corresponder a um nucleoide; b) imagem subsequente após a edição do resultado.

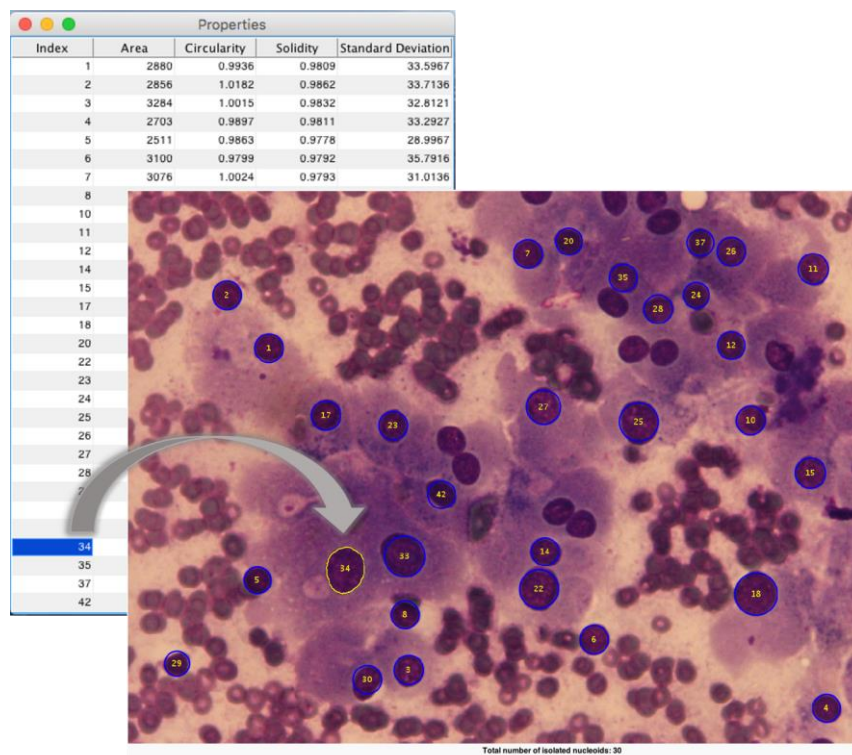
### 3.3.2.3 Segmentação e medição de propriedades de nucleoides

Após a detecção de nucleoides, foi também implementado um algoritmo para medição de suas propriedades morfológicas, particularmente área, circularidade e solidez, e de homogeneidade, expressa pelo desvio padrão de intensidade. Este algoritmo baseia-se essencialmente na segmentação de nucleoides utilizando thresholding e um conjunto de operações morfológicas, e inclui os seguintes passos:

1. Para cada nucleoide identificado, criar uma imagem de pequenas dimensões (uma mini imagem) envolvendo a sua região circundante;
2. Transformação da mini imagem por aplicação da expressão algébrica dada pela equação 3.3 (é efetuado o mesmo pré-processamento realizado aquando da detecção dos nucleoides);
3. Thresholding da mini imagem pré-processada utilizando a função *im2bw*. Esta função aplica um *threshold* global, calculado através do método *Otsu*;
4. Na imagem binária, preencher buracos localizados no interior do nucleoide. Para esta etapa é aplicada a função *imfill*;

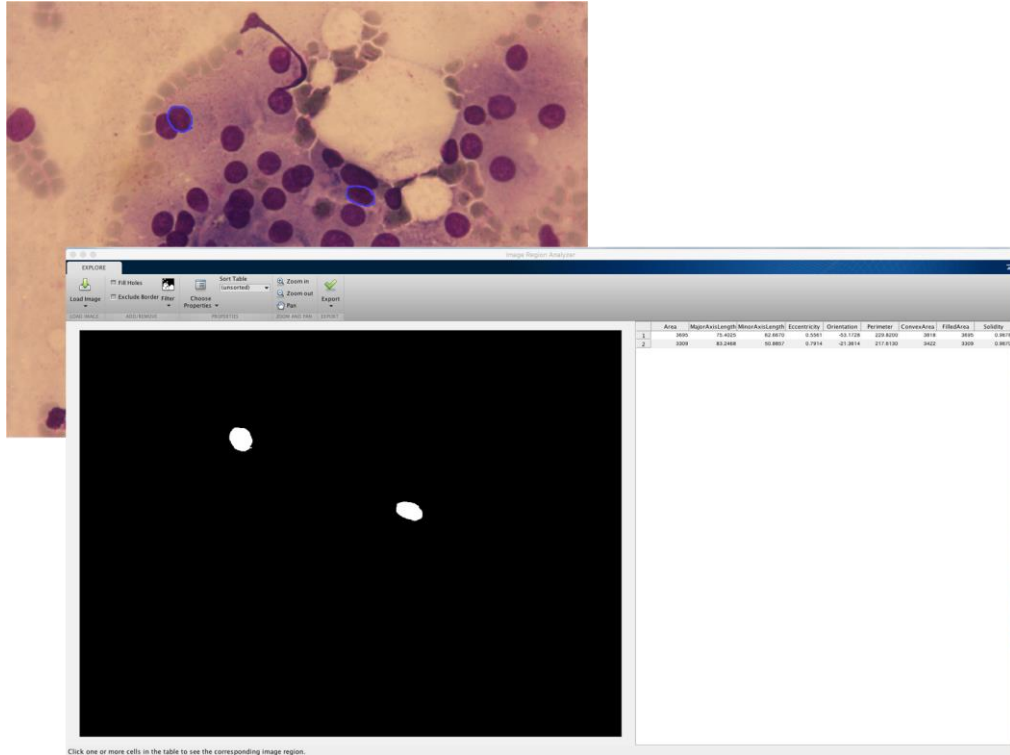
5. Eliminação de objetos localizados nos bordos da imagem (função *imclearborder*). Este procedimento tem como principal objetivo evitar que nucleoides sobrepostos ou tocantes sejam considerados como um único nucleoide;
6. Eliminação de objetos com área inferior a 500 pixels (filtragem *area opening*). Este passo destina-se à remoção de *outliers* que possam estar contidos na imagem;
7. Por fim, obtenção das medidas através da função *regionprops*.

Estas medidas, acedidas através do botão *getMeasures* e apresentadas sob a forma de uma tabela, conferem ao patologista informações importantes de diagnóstico, nomeadamente a variação do tamanho e da forma dos nucleoides identificados e a homogeneidade da sua intensidade intracelular, noções determinantes para a avaliação da gravidade da doença. Uma medição precisa de tais propriedades proporciona ao patologista uma maior segurança/confiança na determinação do diagnóstico. No entanto, estas medidas são apenas disponibilizadas para nucleoides que não se encontram sobrepostos ou adjuntos, isto devido à impossibilidade de isolar com precisão cada nucleoide individualmente, o que poderia induzir ao erro. Nesse sentido, cada nucleoide isolado possui um número de identificação distinto, localizado no seu centro e com correspondência direta com o índice da tabela. Quando selecionado uma célula da tabela, é automaticamente apresentado o contorno do nucleoide correspondente (ver Fig. 3.15).



**Figura 3.15: Apresentação de propriedades da morfologia e homogeneidade de nucleoides.** Cada nucleoide isolado possui um número de identificação distinto, localizado no seu centro e com correspondência direta com o índice da tabela. Ao ser selecionado uma célula da tabela é automaticamente delimitado o contorno do nucleoide correspondente, a partir do qual foram determinadas as suas medidas.

Por forma a contornar a restrição imposta pela agregação dos nucleoides, o utilizador (patologista) poderá sempre recorrer aos botões *Add ROIs* e *Specify ROIsToAnalyse*, que, apesar de não permitirem uma medição tão precisa, proporcionam uma boa aproximação das reais medidas dos objetos/nucleoides selecionados (ver Fig. 3.16). Através do mecanismo de mão livre é possível aproximar o exato contorno do nucleoide, minimizando a interferência de nucleoides adjacentes ou sobrepostos.



**Figura 3.16: Medição de propriedades morfológicas de objetos especificados.**

Neste caso, medição de propriedades morfológicas de nucleoides especificados através de um mecanismo de mão livre. A app *Image Region Analyzer* do Matlab permite medidas de características como área, área preenchida, excentricidade, maior e menor eixo, orientação, perímetro, solidez, entre outros.



## RESULTADOS, DISCUSSÃO E MELHORIAS

### 4.1 Interface de apoio à análise assistida de lâminas de biópsia

A interface que se desenvolveu, *IPathScope* (ver Fig. 4.1), propõe soluções às principais necessidades expostas pelo Ipatimup, e, em particular, às limitações apresentadas pelos softwares atualmente utilizados na instituição. De modo a dar resposta às questões relacionadas com a inferior qualidade de imagem e a lenta velocidade de navegação, ainda incorretamente abordadas pelas atuais interfaces comerciais, esta propõe uma abordagem tradicional de visualização de lâminas. O aumento da qualidade de visualização da imagem baseia-se no seu pré-processamento (em tempo indeferido) com vista à criação prévia de subimagens nos diferentes fatores de ampliação ajustadas à resolução do ecrã utilizado. Assim, permite visualizar e, através de dispositivos de entrada ergonómicos, navegar lâminas digitalizadas num ecrã digital em diferentes ampliações, sem a introdução de atrasos na exibição, reproduzindo a experiência de utilizar um microscópio ótico convencional. Esta metodologia, conjuntamente com diversas ferramentas de apoio à análise assistida de imagens de microscopia patológica, como aplicações que permitem a realização e revisão de anotações e que facilitam o manuseio, a partilha, a revisão e a análise visual e quantitativa da imagem, permite uma melhoria na duração da análise. Ao explorar estas funcionalidades da microscopia digital, este software aborda os principais requisitos de um sistema de patologia digital, apresentando, deste modo, potencial para se tornar uma ferramenta de uso diário dos patologistas, proporcionando uma maior eficiência e confiança na tomada das suas decisões, conduzindo, desta forma, a uma melhoria na qualidade do diagnóstico. Inclusive, para além da melhoria na qualidade do diagnóstico, interfaces como esta potencialmente levarão a uma redução de despesas de hospitais e serviços de saúde. Ademais, esta ferramenta, como aplicação autónoma (compilado num executável através do Matlab), não necessariamente restringe o utilizador a um laboratório, podendo ser utilizada em qualquer instalação com condições devidas.

A validação conjunta da interface com o Ipatimup permitiu inferir das suas diversas potencialidades, em especial da sua particular adequação à citologia. Conquanto, esta ferramenta deverá, ainda, ser aperfeiçoada de modo a ser efetivamente utilizada na prática clínica. Em seguida são resumidas as suas principais aplicabilidades e indicados um conjunto de elementos a melhorar, assim como propostas futuras novas funcionalidades.

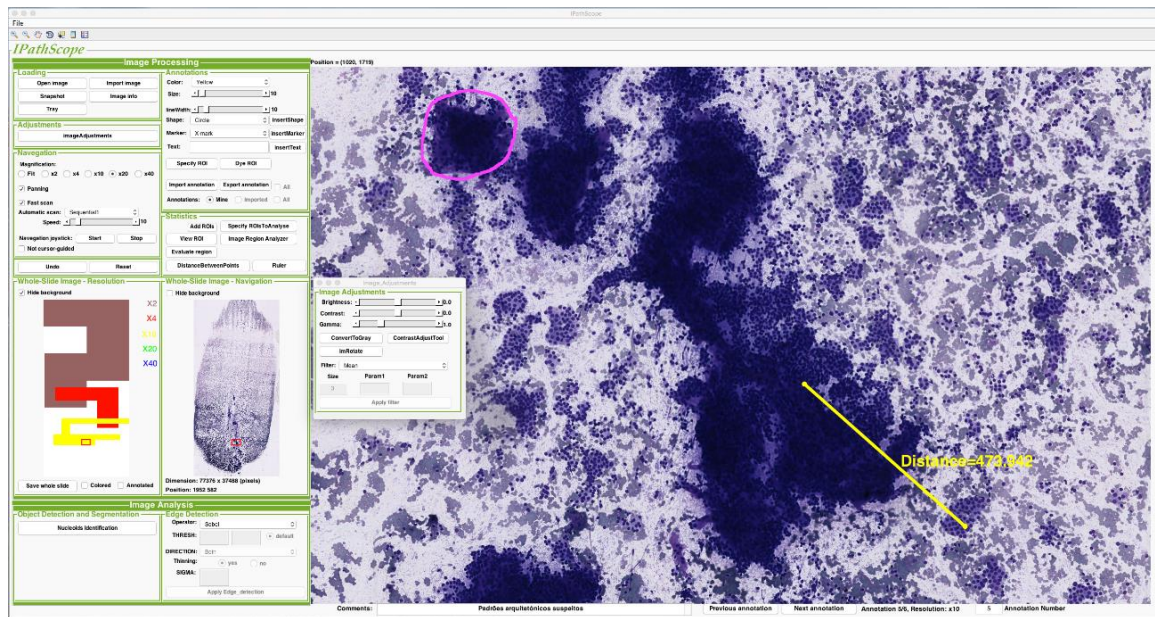


Figura 4.1: *IPathScope* – Interface de processamento de imagem para análise de biópsia.

#### 4.1.1 Principais funcionalidades

Em síntese, o conjunto de ferramentas disponibilizadas na interface *IPathScope* (ver secção 3.2) pode ser sumariado nas seguintes funcionalidades:

- **Imagem apresentada em diferentes fatores de ampliação com qualidade melhorada por pré-filtragem *anti-aliasing*.** Esta será talvez o principal fator distintivo da interface comparativamente aos softwares em uso no Ipatimup (e não só). A possibilidade de visualizar a imagem com boa qualidade independentemente da ampliação (x2, x4, x10, x20 ou x40) permite ao utilizador total liberdade para efetuar a análise da imagem da forma mais apropriada e eficiente;
- **Mecanismo de visão global + detalhe.** Este mecanismo proporciona uma intuitiva orientação de navegação e instantânea visualização de regiões de interesse. Adicionalmente, é indicada a área da lâmina em exibição, sendo esta colorida de acordo com a sua ampliação de análise. Deste modo, o utilizador é provido do registo das áreas analisadas e suas respetivas ampliações de análise e, em consequência, do registo da sua trajetória até então percorrida na imagem, o que lhe permite confirmar a cobertura de toda a lâmina. Além disso, ao serem apresentadas as exatas coordenadas de análise, referenciadas tanto nas *overviews* como no visualizador, é facilitada qualquer iniciativa de análise colaborativa;
- **Múltiplos mecanismos de navegação.** O software dispõe de eficientes mecanismos de navegação, baseados em dispositivos de entrada ergonómicos, tais como o rato, o teclado e o joystick, que proporcionam o “percorrer” da imagem, o *zooming* e o *drag-and-drop*, ou melhor dizendo, uma completa exploração da imagem. Todavia, acredita-se que a navegação através de atalhos do teclado será provavelmente a escolha da maioria dos utilizadores. Particularmente o modo varrimento sistemático (navegação orientada por blo-

cos) certamente será a modalidade mais utilizada pelos patologistas uma vez especialmente desenvolvida para acelerar o processo de análise da imagem. Na tabela 4.1 é especificado o tipo de navegação proporcionado por cada dispositivo;

- **Realização e revisão de anotações.** Durante a análise o utilizador é provido de um leque de ferramentas para realização de diferentes anotações em variadas cores e formatos. Este poderá proceder à inserção de marcas e texto ou à delimitação de uma região de interesse (de forma espontânea ou recorrendo a formas geométricas), dispondo ainda de um mecanismo de “navegação” sobre as anotações efetuadas. Dada à possibilidade de serem exportadas, estas anotações poderão ser utilizadas para revisão de diagnóstico, realização de uma análise colaborativa de um caso complicado ou ainda criação de uma base de dados de imagens digitais e análises correspondentes;
- **Análise quantitativa.** O conjunto de ferramentas de apoio estatístico implementado permite uma correta inferência sobre a morfologia de núcleos/nucleoides (ex. área, solidez, perímetro e orientação) e suas distribuições dentro do tecido (medindo distância entre dois pontos ou tirando medidas com uma régua). Um dos grandes benefícios da análise assistida por computador é possibilitar medições precisas e reproduzíveis de propriedades de elementos biológicos de interesse ou áreas suspeitas;
- **Exportação de subimagens.** Subimagens ou “*snapshots*” de determinadas regiões de interesse da lâmina poderão ser partilhadas, anotadas, arquivadas e recuperadas posteriormente para revisão de diagnóstico. Em especial, a análise colaborativa e a revisão do diagnóstico são significativamente mais expeditas e seguras manuseando imagens digitalizadas ao invés das lâminas físicas. Além disso, a informação das áreas da lâmina analisadas, bem como toda a informação da mesma poderão, também, ser guardadas;
- **Atalhos do teclado.** Através de variados atalhos do teclado o patologista poderá agilizar a análise (através de uma eficiente navegação) e aceder de forma prática e cômoda à maioria das ferramentas implementadas, o que aumenta a sua produtividade.

**Tabela 4.1: Dispositivos de entrada e respetivos mecanismos de navegação.**

Joystick	Teclado (teclas)	Rato
Navegação guiada por cursor	Navegação normal (setas)	<i>Overview + detalhe</i>
Navegação normal	Navegação orientada por blocos (setas)	Zoom in/out
Zoom in/out	Zoom in/out (i/o)	<i>Drag-and-drop</i>
	Navegação pelas anotações (p - <i>previous</i> /n - <i>next</i> )	Navegação pelas anotações (botão esquerdo - <i>next</i> /botão direito - <i>previous</i> )
		Centralização da posição do cursor (duplo clique com o botão esquerdo)

### 4.1.2 Eventuais melhorias

As melhorias que se descrevem de seguida são endereçadas à otimização do software, que devido à limitação de tempo e recursos não foi possível ser realizada.

- As imagens microscópicas possuem dimensões extremamente grandes, pelo que ecrãs de elevada resolução poderão fornecer uma maior quantidade de informação durante a análise. O ecrã utilizado possui uma resolução de 2560 x 1440, contudo sugere-se a utilização de ecrãs de mais alta resolução, de preferência de grau médico, o que, em conjunto, proporcionaria uma melhoria na qualidade de visualização e, como resultado, uma significativa redução da duração de análise;
- A importação da imagem, apesar de poder ser realizada em offline, apresenta, todavia, uma duração relativamente longa. Seria eventualmente interessante explorar o uso de GPUs e tecnologias web (ex. *cloud computing*) a fim de acelerar este processo, como também otimizar a execução do programa e/ou armazenar as subimagens resultantes do pré-processamento, evitando a sobrecarga da memória do computador;
- A necessidade de pré-processamento de imagem e a metodologia aplicada limitaram o mecanismo de *zooming* implementado à uma réplica do *zooming* proporcionado pelo microscópio ótico convencional, quer dizer, um mecanismo discreto de alteração da ampliação da imagem. De grande utilidade seria encontrar uma forma de ultrapassar este inconveniente e efetivamente implementar o *zooming* contínuo;
- Apesar da diversidade de ferramentas para realização de anotações e de apoio estatístico à análise já implementadas, uma mais-valia consistiria em aumentar o leque destas ferramentas dada à sua notável importância perante os patologistas.

### 4.1.3 Futuros complementos

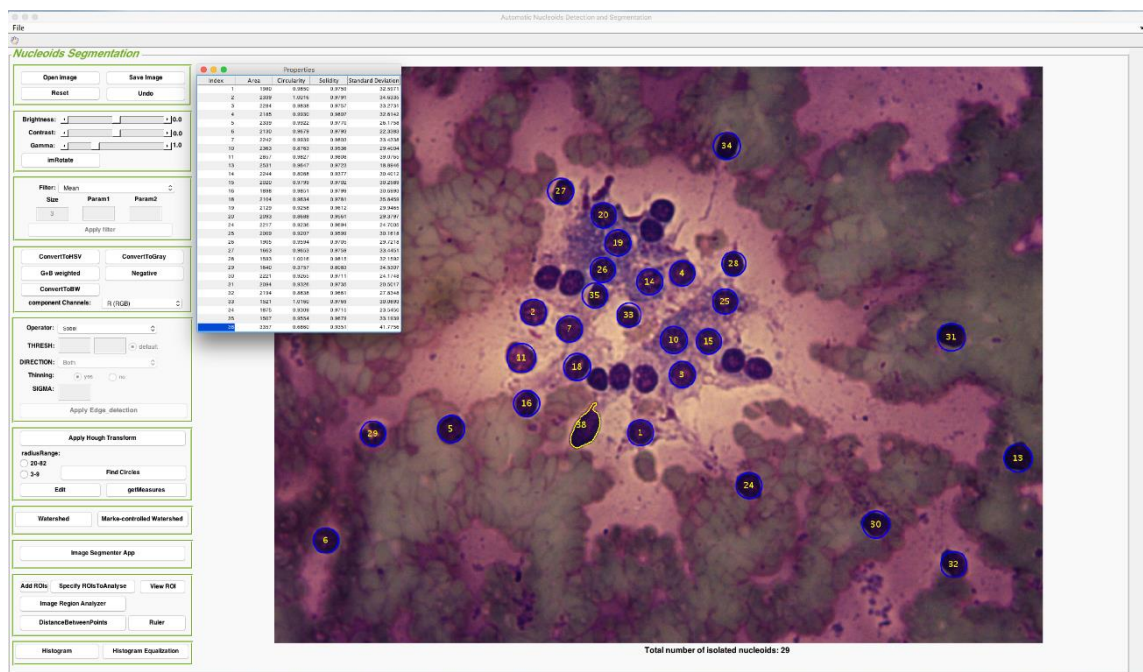
No intuito de dar seguimento ao presente projeto, foram sugeridas pelo Ipatimup novas funcionalidades a implementar no futuro, nomeadamente:

- Mecanismo de identificação do número de registo do paciente na lâmina;
- Navegação automática por toda lâmina (varrimento completo) com velocidade e término controlados pelo utilizador;
- Navegação sobre todas as lâminas do caso do paciente (dispostas numa “bandeja”);
- Visualização simultânea de duas lâminas (ex. da mesma lâmina adquirida com diferentes técnicas de coloração, como por exemplo H&E e imunohistoquímica, ou ainda de lâminas de diferentes casos);
- Criação de uma base de dados de imagens digitais e análises correspondentes. Tal base de dados proporcionaria a criação de atlas patológicos que podem ser utilizados tanto para educação e formação de patologistas, bem como para fornecer as bases para desenvolvimento de algoritmos de processamento de imagem, como por exemplo segmentação (de núcleos) baseada em *deep learning*;

- Integração de informação *z-stack* (noção de profundidade) durante a análise da imagem.

## 4.2 Algoritmo de identificação de nucleoides

O algoritmo de segmentação automática de núcleos foi desenvolvido tendo em conta que o diagnóstico do cancro da tiroide baseia-se no reconhecimento de células ou grupos celulares com características específicas e igualmente singulares. Por conseguinte, este foi destinado à identificação de nucleoides em lâminas raspadas da tiroide em campo claro. Como resultado, apesar de em termos médicos não apresentar uma deteção precisa (cl clinicamente autossuficiente), este algoritmo proporciona uma relativa adequada deteção/segmentação de nucleoides, que, ao ser complementada com medidas de suas propriedades morfológicas (área, circularidade e solidez) e de homogeneidade (desvio padrão de intensidade), apresentadas de forma intuitiva, fornece informações determinantes para avaliação do estado e evolução da doença (ver Fig. 4.2). Tendo em consideração a grande variabilidade das imagens de lâminas tiroidianas, a metodologia apresenta ao patologista sugestões de possíveis falsos positivos, disponibilizando conjuntamente um mecanismo de edição de resultado. Este mecanismo permite ao utilizador remover objetos indesejados do output apresentado, incluindo as sugestões que realmente correspondem a falsos positivos, ou neste incluir nucleoides não detetados, o que, em conjunto, proporciona-lhe total liberdade para validar/alterar o resultado proposto pelo algoritmo. Ao fazer uso de uma abordagem não definitiva, mas sim baseada no feedback e nas orientações do utilizador, esta ferramenta confere ao patologista um adicional suporte e bases estatísticas concretas para mais eficazmente e com maior confiança deliberar o diagnóstico.



**Figura 4.2: Nucleoids Segmentation – Interface de segmentação automática de nucleoides.** Destinada para identificação de nucleoides em subimagens de lâminas raspadas da tiroide em campo claro.

Em seguida, são apontados os desafios ao desenvolvimento do algoritmo, assim como abordadas questões relacionadas com a sua validação e sugerida uma alternativa de segmentação de objetos/nucleoides.

#### 4.2.1 Desafios ao seu desenvolvimento

A grande variabilidade das imagens e das características dos objetos a detetar constituiu o principal inconveniente à uma identificação precisa dos nucleoides, especialmente o ajuste dos parâmetros para atender à maioria das imagens de teste. As maiores dificuldades enfrentadas no desenvolvimento do algoritmo de segmentação automática de nucleoides consistiram em:

- Os algoritmos de detecção/segmentação existentes se encontrarem limitados a imagens que podem ser inteiramente carregadas na memória;
- Aspectos heterogêneos da imagem e dos elementos biológicos presentes na mesma (a variação de intensidade na imagem, a variedade na forma de nucleoides, a aglomeração e sobreposição de nucleoides, etc). Em especial, a forma dos nucleoides é sobretudo afetada pelo grau de malignidade da doença. Nucleoides que apresentem formas que não circular ou elíptica são particularmente difíceis de serem detetados pela atual versão do algoritmo;
- Presença de elementos indesejados com características similares aos nucleoides (ex. manchas de forma circular);
- Diferenças na preparação das lâminas (ex. variação na concentração de corantes);
- Incapacidade, enquanto desenvolvedores do algoritmo, para uma identificação precisa de quais os objetos de interesse a detetar na imagem (ausência de experiência clínica).

A metodologia aplicada permitiu atenuar ou até mesmo contornar estas contrariedades, embora em alguns casos ainda se reflitam nos resultados, como se poderá verificar na próxima secção aquando da validação do algoritmo (ver Fig. 4.4).

#### 4.2.2 Validação

Além de fornecer as bases para o seu desenvolvimento, a validação do algoritmo de identificação de nucleoides foi, também, realizada conjuntamente com o Ipatimup. Por inspeção visual, os analistas do instituto consideraram esta aplicação bastante promissora, apresentando resultados satisfatórios e sobretudo relevantes. A grande relevância da metodologia baseia-se fundamentalmente na sua capacidade de otimização do trabalho diário dos patologistas. Com a implementação deste género de algoritmo, a navegação/análise da imagem digital poderá ser orientada/dirigida a regiões de alta incidência de nucleoides (áreas que valem a pena analisar), o que promoveria uma significativa diminuição da duração de análise. Além disso, um prognóstico preliminar da malignidade e/ou do grau de gravidade da doença, baseado, por exemplo, no número de nucleoides detetados e suas morfologias, iria aumentar em muito a confiança e eficiência do patologista na determinação do diagnóstico.

O algoritmo de detecção de nucleoides foi também sujeito a uma validação estatística. Nesse sentido, a sua principal função, *imfindcircles* do Matlab, possui como parâmetros de entrada a

polaridade dos objetos, a gama de raios, o método (*TwoStage* ou *PhaseCode*, o utilizado) e a sensibilidade. De entre estes, o algoritmo é particularmente e significativamente afetado pela sensibilidade, pelo que se optou por definir uma PRC (curva Precisão vs Sensibilidade ou *Precision-Recall Curve*) em função desta variável, onde:

$$\text{Precisão} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (4.1)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (4.2)$$

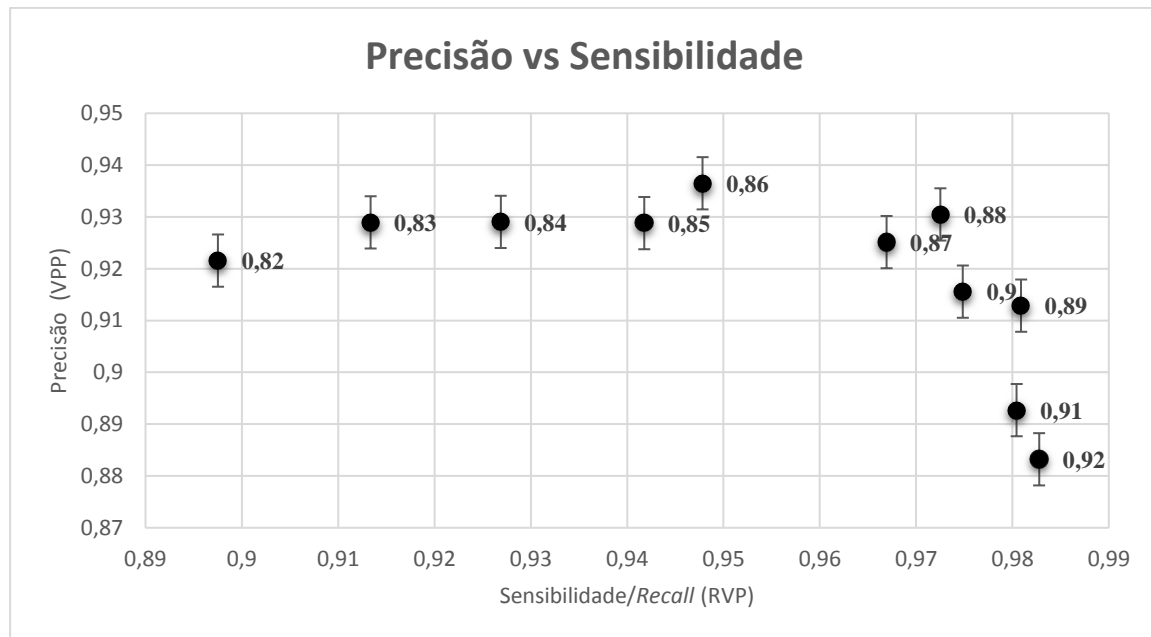
$$F - score = \frac{2VP}{2VP + FN + FP}, \quad 0 \leq F - score \leq 1 \quad (4.3)$$

*VP* – verdadeiros positivos

*FP* – falsos positivos

*FN* – falsos negativos

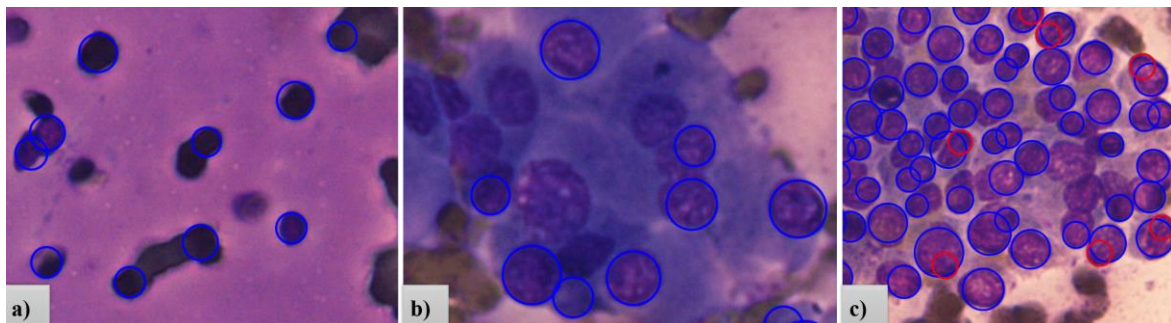
Para a construção da PRC, foram utilizadas 30 subimagens, entre as quais 12 casos benignos, 13 casos malignos e 5 casos tumorais. O intervalo de variação da variável sensibilidade foi selecionado entre 0.82 e 0.92 (com incremento de 0.1). Para cada valor do intervalo, as equações 4.1, 4.2 e 4.3 foram avaliadas sobre a totalidade das 30 imagens. A precisão ou Valor Preditivo Positivo (VPP) representa a fração de verdadeiros positivos no conjunto dos objetos detetados (medida qualitativa da detecção), enquanto que a sensibilidade/*recall* ou Rácio de Verdadeiros Positivos (RVP) exprime a fração de verdadeiros positivos detetados entre a totalidade de verdadeiros positivos existentes (medida quantitativa da detecção). Consequentemente, estas duas medidas se encontram inversamente relacionadas, uma maior taxa de verdadeiros positivos detetados (sensibilidade) só é obtida à custa de uma redução da precisão (aumento de falsos positivos). A análise da PRC na figura 4.3 sugere que o valor ótimo para o parâmetro sensibilidade se encontra entre 0.86 e 0.89, sendo 0.88 o valor estabelecido no algoritmo. Este valor foi considerado o mais adequado ao propósito do algoritmo, apresentando o melhor balanço entre VPP e RVP (*F-score* de 0.95, média ponderada entre VPP e RVP e medida de performance da detecção). Assim, proporciona uma adequada detecção de nucleoides, conferindo a confiança necessária de que o maior número possível de nucleoides é identificado na imagem, o que pode ser verificado pela sua maior sensibilidade que acarreta uma menor quantidade de falsos negativos. Além disso, apresenta uma precisão compatível, produzindo uma quantidade aceitável de falsos positivos. No entanto, é de salientar a particular dificuldade em estabelecer um valor para a variável sensibilidade que se adegue a todas as imagens. Inclusive, em vários casos, não há um valor que funcione bem para todos os nucleoides contidos numa mesma imagem. Tal facto é até mesmo observável na PRC e resulta da existência de diferentes tipos de cancro da tiroide com distintas aparências, o que se reflete na grande diversidade de cenários apresentados pelas imagens digitalizadas das lâminas.



**Figura 4.3: Precision-Recall curve do algoritmo de detecção de nucleoides.**

O valor do parâmetro sensibilidade corresponde à etiqueta dos pontos de dados.

Em suma, por inferência da sua validação estatística e por análise visual, o algoritmo implementado permite ao patologista inferir adequadamente sobre a presença de nucleoides, e suas propriedades significativas, a partir da qual poderá concluir sobre a morfologia e malignidade do cancro da tireoide. As principais imprecisões da metodologia são verificadas em regiões com uma quantidade elevada de nucleoides sobrepostos e/ou tocantes. Além disso, em imagens em que os nucleoides possuem uma baixa concentração de corantes (ou se encontram pouco contrastados) é também denotada uma ligeira diminuição do seu desempenho (ver Fig. 4.4). Em vista disso, este algoritmo necessitará ainda de aumentar a sua robustez a variações na forma e tamanho, bem como na textura dos nucleoides. É também de referir que tanto a avaliação visual como a validação estatística do algoritmo possuem uma subjetividade inerente uma vez que este requer parâmetros definidos pelo utilizador (maior e menor diâmetro apresentado pelos nucleoides), o que introduz um viés indesejável na sua avaliação. O objetivo da validação foi, na verdade, simplesmente fornecer uma medida de desempenho da metodologia.



**Figura 4.4: Inconvenientes do algoritmo de identificação de nucleoides.**

a) Detecção de objetos circulares não correspondentes a nucleoides; b) inabilidade para detetar nucleoides em regiões completamente coradas (ou de deficiente contraste); c) insuficiente deteccção de nucleoides quando estes se encontram aglomerados (particularmente tocantes ou sobrepostos).

### 4.2.3 Potencial alternativa

Em relação a melhorias e/ou alternativas, uma metodologia de segmentação que tem sido amplamente abordada e explorada em diversos estudos de segmentação de imagens de patologia, quer histológicas, quer citológicas, consiste no uso de *machine learning*. Estes estudos afirmam a sua superior eficiência, particularmente do *deep learning*, comparativamente aos métodos convencionais de segmentação (ver secção 3.3.1). De facto, na maioria das recentes competições de segmentação e detecção de objetos em imagens patológicas, as melhores pontuações foram obtidas por métodos que incorporaram o *deep learning* (Irshad et al., 2014; Schmidhuber, 2015). Assim sendo, uma outra possibilidade para identificação de nucleoides consistiria em envergar no estudo de técnicas de *deep learning* e sua aplicação ao problema (recorrendo, por exemplo, à *Neural Network Toolbox* do Matlab). Certamente, uma melhoria no resultado e, portanto, na curva PRC irá ser lograda. Além disso, tal técnica poderá facilitar e/ou possibilitar a classificação de nucleoides quanto à sua malignidade e, assim, permitir propor uma metodologia de diagnóstico.



## CONCLUSÕES

O rastreamento de sinais de malignidade em lâminas de microscópio constitui um processo árduo, exigindo alta concentração, sendo, por conseguinte, suscetível a erros cujas repercussões e consequências podem ser irreparáveis. No entanto, os softwares atualmente desenvolvidos para colmatar as limitações apresentadas pela análise microscópica ainda se revelam limitados na análise que proporcionam e pouco adequados para este fim. Neste panorama, o tema da presente dissertação, *Processamento de Imagem de Microscópio para Análise de Biópsia*, enquadra-se na área de Imagem Biomédica e teve como principal finalidade propor uma ferramenta computacional de processamento de imagens microscópicas de híper-resolução para análise de biópsia, necessidade manifestada pela instituição parceira deste projeto, o Ipatimup. Com este propósito, o trabalho foi fundamentalmente dividido em duas fases. O objetivo da primeira fase consistiu em desenvolver uma interface de apoio à análise assistida de imagens de microscopia patológica. A subsequente complementação desta aplicação com um algoritmo de identificação de nucleoides em lâminas de amostras tiroidianas abarcou o objetivo da segunda fase.

A interface desenvolvida na primeira fase do trabalho, denominada *IPathScope*, apresenta um software de apoio à análise assistida de imagens de híper-resolução de lâminas digitalizadas, desenhado com vista a ser utilizado pelo Ipatimup. Por conseguinte, por forma a propor soluções às principais necessidades expostas pela instituição, a interface proporciona a visualização da imagem em diferentes fatores de ampliação com qualidade apropriada, bem como práticos e intuitivos mecanismos de navegação ao longo da mesma, complementados por *zooming* e *drag-and-drop*, que, em conjunto, permitem reproduzir a experiência de utilizar um microscópio ótico convencional. O pré-processamento da imagem, incluindo sua divisão em blocos e filtragem *anti-aliasing* dos mesmos, possibilita um aumento da sua qualidade visual. Operando com dispositivos de entrada ergonómicos, como o joystick, o rato e o teclado, é propiciada uma eficiente e agradável exploração/navegação ao longo da imagem, melhorando, conseqüentemente, a duração da análise. Especialmente a navegação orientada por blocos através do teclado possibilita uma significativa otimização da duração da análise. Análise esta, que poderá ser adicionalmente complementada uma vez disponibilizada uma variedade de ferramentas para realização de anotações (podendo o utilizador proceder à exportação e “navegação” pelas mesmas) e de apoio estatístico, assim como um conjunto de aplicações que permitem a partilha (exportação de subimagens), a

revisão e a análise visual da imagem, entre as quais um eficiente mecanismo de registo das áreas analisadas, facilitada por um mecanismo de visão global + detalhe. Não obstante, esta interface poderá, ainda, ser aperfeiçoada, quer por otimização das funções nela implementadas, quer por acréscimo de novas funcionalidades, como, por exemplo, a exibição de todas as lâminas do caso do paciente e o proporcionar da visualização simultânea de diferentes lâminas. Uma substancial melhoria e, seguramente, uma interface de mais alto nível poderá ser alcançada, tal como sugerido em (Ruddle et al., 2016), por meio de pesada artilharia computacional (monitores de grau médico, armazenamento, largura de banda de rede, integração de sistemas, entre outros), o que, provavelmente, proporcionaria uma duração de análise competitiva com a obtida utilizando o microscópio ótico. Posto isto, em síntese, este software não pretende substituir o microscópio e muito menos a análise humana, mas sim dotar o citologista/histologista de ferramentas que possam facilitar a sua rotina de trabalho e, deste modo, melhorar a qualidade do diagnóstico. Espera-se, também, que com esta ferramenta se tenha demonstrado que a análise computacional/digital apresenta importantes vantagens que de outra forma não poderiam ser obtidas utilizando microscópios óticos convencionais. Na verdade, a possibilidade de efetuar revisões e comparações entre diferentes análises, a incentivação à análise colaborativa e a medição precisa de propriedades de elementos biológicos de interesse só aumentam a segurança do diagnóstico, principalmente tendo em conta a usual variabilidade de diagnóstico entre os patologistas. Variabilidade esta, que, inclusive, é consideravelmente reduzida ao ser fornecido um feedback ao utilizador. Deste modo, apesar das barreiras e melhorias a serem realizadas, especialmente a nível ergonómico e de hardware, a patologia digital apresenta um enorme potencial e será certamente o futuro.

Na segunda fase do projeto, com a intenção de facultar uma ferramenta de assistência ao processo de diagnóstico, propôs-se, também, a desenvolver e/ou adaptar um algoritmo de segmentação automática de núcleos. Contudo, dada à impossibilidade de desenvolver um algoritmo genérico, aplicável a qualquer tipo de imagem, pelas mais diversas razões, como a grande variabilidade entre as imagens de microscopia/patologia, este foi destinado a uma aplicação específica, identificação de nucleoides em lâminas de citologia não-ginecológica, particularmente em lâminas raspadas da tiroide em campo claro. Como resultado, por inferência da sua avaliação visual e validação estatística, este algoritmo possibilita uma relativa adequada deteção/segmentação de nucleoides, que, ao ser complementada com medidas de suas propriedades específicas (de morfologia e homogeneidade), fornece informações e noções determinantes de diagnóstico, possibilitando, desta forma, uma objetiva conclusão sobre a morfologia e malignidade do cancro da tiroide. No entanto, devido à grande variedade de conteúdo das imagens e das características dos objetos a detetar, este algoritmo apresenta ainda certas imprecisões, produzindo em determinadas situações específicas consideráveis casos de falsos positivos e negativos. Inclusive, de modo a colmatar as suas limitações e a atender à inconsistência apresentada pelas imagens de lâminas tiroidianas, sugestões de falsos positivos são apresentados e um mecanismo de edição de resultado é também disponibilizado, permitindo ao utilizador total liberdade para “afinar” o resultado. Conquanto, vários estudos na literatura têm relatado grande eficiência do *machine learning*, em especial do *deep learning*, na segmentação de imagens patológicas, pelo que uma possível alternativa

consistira no estudo de técnicas de *deep learning* e sua aplicação ao problema. Convêm também referir que foram utilizadas subimagens de lâminas microscópicas, contudo esta abordagem, possuindo um carácter puramente de investigação e pesquisa científica, fornece as bases para que, num estudo posterior, tendo sido desenvolvidas as ferramentas adequadas, este algoritmo de segmentação automática (ou versão melhorada) possa ser aplicado à imagem na sua totalidade. Consequentemente, uma subseqüente técnica de diagnóstico poderá ser proposta. Esta poderá, por exemplo, ser baseada no número de células do agrupamento e suas morfologias ou na eventual classificação dos nucleoides proporcionada pela aplicação do *deep learnig*.

Em conclusão e por inferência da sua validação conjunta com o Ipatimup, a ferramenta computacional que se desenvolveu para processamento de imagens de lâminas de biópsia constitui um protótipo com potencial para se tornar um instrumento de uso diário (suporte de decisão clínica) de patologistas, particularmente no domínio da citologia, permitindo uma significativa redução das suas cargas de trabalho e uma maior eficiência no desempenho das suas funções. Esta poderá, por exemplo, ser integrada no Sistema de Informação Laboratorial (SLI) de institutos de patologia. Com vista a tais finalidades, o software deverá, ainda, ser aperfeiçoado. Não obstante, ao longo desta dissertação são apresentadas bases para desenvolvimentos futuros, o que inclui a especificação de um conjunto de aspetos a melhorar e sugestões de futuras novas funcionalidades.



## BIBLIOGRAFIA

- Allan, C., Burel, J.-M., Moore, J., Blackburn, C., Linkert, M., Loynton, S., ... Swedlow, J. R. (2012). OME Remote Objects (OMERO): a flexible, model-driven data management system for experimental biology. *Nature Methods*, 9(3), 245–253. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1896>
- Bala, A. (2012). An Improved Watershed Image Segmentation Technique using MATLAB. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 3(6), 1–4.
- Bedi, S., & Khandelwal, R. (2013). Various image enhancement techniques-a critical review. *Journal of Advanced Research in Computer*, 2(3).
- Belaid, L. J., & Mourou, W. (2009). Image segmentation: A watershed transformation algorithm. *Image Analysis and Stereology*, 28(2), 93–102. <https://doi.org/10.5566/ias.v28.p93-102>
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., ... Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, 7(10), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Chen, S., Zhao, M., Wu, G., Yao, C., & Zhang, J. (2012). Recent advances in morphological cell image analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/101536>
- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., ... Olivo-Marin, J.-C. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*, 9(7), 690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>
- Elmoataz, A., Belhomme, P., Herlin, P., Schupp, S., Revenu, M., & Bloyet, D. (1996). Automated segmentation of cytological and histological images for the nuclear quantification: An adaptive approach based on mathematical morphology. *Microscopy Microanalysis Microstructures*, 7(5–6), 331–337.
- Frajka, T., & Zeger, K. (2004). Downsampling dependent upsampling of images. *Signal Processing: Image Communication*, 19(3), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.image.2003.10.003>
- Gonzalez, M. A., & Ballarin, V. L. (2009). Automatic marker determination algorithm for watershed segmentation using clustering. *Latin American Applied Research*, 39(3), 225–229.
- Griffin, J., & Treanor, D. (2017). Digital pathology in clinical use: Where are we now and what is holding us back? *Histopathology*. <https://doi.org/10.1111/his.12993>
- Irshad, H., Veillard, A., Roux, L., & Racoceanu, D. (2014). Methods for nuclei detection, segmentation, and classification in digital histopathology: A review-current status and

- future potential. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 7, 97–114. <https://doi.org/10.1109/RBME.2013.2295804>
- Jain, A. K. (1989). *Fundamentals of Digital Image Processing*. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall, Inc.
- Jobin Christ, M. J., & Parvathi, R. M. S. (2011). Segmentation of medical image using clustering and watershed algorithms. *American Journal of Applied Sciences*, 8(12), 1349–1352. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2011.1349.1352>
- Jones, D. R., Jurrus, E. R., Moon, B. D., & Perrine, K. A. (2003). Gigapixel-size real-time interactive image processing with parallel computers. *Proceedings International Parallel and Distributed Processing Symposium*. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2003.1213426>
- Kaur, E. S., & Nancy. (2013). Image Enhancement Techniques : A Selected Review. *Journal of Computer Engineering*, 9(6), 84–88.
- Keys, R. (1981). Cubic convolution interpolation for digital image processing. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 29(6), 1153–1160. <https://doi.org/10.1109/TASSP.1981.1163711>
- Kvilekval, K., Fedorov, D., Obara, B., Singh, A., & Manjunath, B. S. (2009). Bisque: A platform for bioimage analysis and management. *Bioinformatics*, 26(4), 544–552. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp699>
- Lehmann, T. M., Gönner, C., & Spitzer, K. (1999). Survey: interpolation methods in medical image processing. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 18(11), 1049–1075. <https://doi.org/10.1109/42.816070>
- Leica Microsystems - Produto: Leica DM2000 & DM2000 LED. (n.d.). Retrieved February 10, 2017, from <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/clinical/details/product/leica-dm2000/>
- Levoy, M., Ng, R., Adams, A., Footer, M., & Horowitz, M. (2006). Light field microscopy. *ACM Transactions on Graphics*, 25(3), 924. <https://doi.org/10.1145/1141911.1141976>
- Lezoray, O., & Cardot, H. (2002). Cooperation of color pixel classification schemes and color watershed: A study for microscopic images. *IEEE Transactions on Image Processing*, 11(7), 783–789. <https://doi.org/10.1109/TIP.2002.800889>
- Li, S., Wu, L., & Sun, Y. (2010). Cell image segmentation based on an improved watershed transformation. *Proceedings - International Conference on Computational Aspects of Social Networks (CASoN)*, 93–96. <https://doi.org/10.1109/CASoN.2010.28>
- Madabhushi, A., & Lee, G. (2016). Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, 33, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.06.037>
- Maini, R., & Aggarwal, H. (2010). A comprehensive review of image enhancement techniques. *Journal Of Computing*, 2(3), 8–13. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1003.4053>
- Maré, R. L., Rollus, L., Sté Vens, B., Hoyoux, R., Louppe, G., My Vandaele, R., ... Murphy, R. (2016). Collaborative analysis of multi-gigapixel imaging data using Cytomine. *Bioinformatics*, 32(9), 1395–1401. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw013>
- Marques, O. (2011). Practical Image and Video Processing Using MATLAB. *Wiley Online Library*, 561–589. <https://doi.org/10.1002/9781118093467>
- Mathworks. (2011). *MATLAB: Getting Started Guide. R2011b*.
- Mormont, R. (2016). A workflow for large scale computer-aided cytology and its applications.

- (Unpublished master's thesis). Université de Liège, Liège, Belgique. Retrieved from <https://matheo.ulg.ac.be/handle/2268.2/1314>
- Mouelhi, A., Sayadi, M., Fnaiech, F., Mrad, K., & Romdhane, K. Ben. (2013). Automatic image segmentation of nuclear stained breast tissue sections using color active contour model and an improved watershed method. *Biomedical Signal Processing and Control*, 8(5), 421–436. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2013.04.003>
- Pan, M., Yang, X., & Tang, J. (2012). Research on Interpolation Methods in Medical Image Processing. *Journal of Medical Systems*, 36(2), 777–807. <https://doi.org/10.1007/s10916-010-9544-6>
- Pantanowitz, L., Farahani, N., & Parwani, A. (2015). Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives. *Pathology and Laboratory Medicine International*, 7, 23. <https://doi.org/10.2147/PLMI.S59826>
- Petrou, M., & Petrou, C. (2010). *Image Processing: The Fundamentals*. Image Processing. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119994398>
- Powell, M. W., Rossi, R. A., & Shams, K. (2010). A scalable image processing framework for gigapixel mars and other celestial body images. *IEEE Aerospace Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1109/AERO.2010.5446706>
- Prochorec-Sobieszek, M. (2016). Future perspectives of digital pathology. *Nowotwory*, 66(4), 277–284. <https://doi.org/10.5603/NJO.2016.0054>
- Roszkowiak, L., Korzynska, A., Zak, J., Pijanowska, D., Swiderska-Chadaj, Z., & Markiewicz, T. (2016). Survey: interpolation methods for whole slide image processing. *Journal of Microscopy*, 265(2), 148–158. <https://doi.org/10.1111/jmi.12477>
- Rubinstein, M., Gutierrez, D., Sorkine, O., & Shamir, A. (2010). A comparative study of image retargeting. *ACM Transactions on Graphics*, 29(6). <https://doi.org/10.1145/1882261.1866186>
- Ruddle, R. A., Thomas, R. G., Randell, R., Quirke, P., & Treanor, D. (2016). The Design and Evaluation of Interfaces for Navigating Gigapixel Images in Digital Pathology. *ACM Trans. Comput.-Hum. Interact.*, 23(1), 1–29. <https://doi.org/10.1145/2834117>
- Saalfeld, S., Cardona, A., Hartenstein, V., & Tomančák, P. (2009). CATMAID: Collaborative annotation toolkit for massive amounts of image data. *Bioinformatics*, 25(15), 1984–1986. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp266>
- Salmon, E. D., von Lackum, K., & Canman, J. C. (2005). Proper Alignment and Adjustment of the Light Microscope. In *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02a01s00>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... A., C. (2012). Fiji: an open source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidhuber, J. (2015). Deep Learning in neural networks: An overview. *Neural Networks*. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2014.09.003>
- Sigmon, K. (1993). *MATLAB® Primer*. America (Vol. 49). <https://doi.org/10.1201/9781420034950>
- Snead, D. R. J., Tsang, Y. W., Meskiri, A., Kimani, P. K., Crossman, R., Rajpoot, N. M., ... Cree, I. A. (2016). Validation of digital pathology imaging for primary histopathological diagnosis. *Histopathology*, 68(7), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/his.12879>
- Sommer, C., Straehle, C., Ullrich, K., & Hamprecht, F. a. (2011). ILASTIK : INTERACTIVE

- LEARNING AND SEGMENTATION TOOLKIT Heidelberg Collaboratory for Image Processing ( HCI ), University of Heidelberg. *Eighth IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, (1), 230–233. <https://doi.org/10.1109/ISBI.2011.5872394>
- Thévenaz, P., Blu, T., & Unser, M. (2009). Image interpolation and resampling. *Handbook of Medical Image Processing and Analysis*, 465–493. <https://doi.org/10.1016/B978-012373904-9.50037-4>
- Tuominen, V. J., & Isola, J. (2009). The application of JPEG2000 in virtual microscopy. *Journal of Digital Imaging*, 22(3), 250–258. <https://doi.org/10.1007/s10278-007-9090-z>
- Veta, M., van Diest, P. J., Kornegoor, R., Huisman, A., Viergever, M. A., & Pluim, J. P. W. (2013). Automatic Nuclei Segmentation in H&E Stained Breast Cancer Histopathology Images. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070221>
- Wang, C., Huang, C., & Hung, C. (2015). VirtualMicroscopy : ultra-fast interactive microscopy of gigapixel / terapixel images over internet. *Nature Publishing Group*, (August), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14069>
- Wu, Q., Merchant, F. A., & Castleman, K. R. (2008). *Microscope Image Processing. Microscope Image Processing*. Elsevier/Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372578-3.00001-5>
- Xing, F., & Yang, L. (2016). Robust nucleus/cell detection and segmentation in digital pathology and microscopy images: A comprehensive review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1109/RBME.2016.2515127>
- Youssef, A. (1999). Image Downsampling and Upsampling Methods. *International Conference on Imaging, Science, Systems, and Technology (CISST '99)*, 132–138.
- Zarella, M. D., Garcia, F. U., & Breen, D. E. (2017). A Template Matching Model for Nuclear Segmentation in Digital Images of H&E Stained Slides. In *Proceedings of the 9th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology* (pp. 11–15). New York, NY, USA: ACM. <https://doi.org/10.1145/3093293.3093307>
- Zhang, Y., Zhao, D., Zhang, J., Xiong, R., & Gao, W. (2011). Interpolation-dependent image downsampling. *IEEE Transactions on Image Processing*, 20(11), 3291–3296. <https://doi.org/10.1109/TIP.2011.2158226>



## PRINCIPAIS DISPOSITIVOS DE ENTRADA

### Principais dispositivos de entrada da interface *IPathScope*

- Teclado - Atalhos

Tabela A.1: Atalhos do teclado.

Atalhos	Item da interface	Ação
<b>A</b>	<i>Annotations: All</i>	Exibe, simultaneamente, as anotações importadas e as do utilizador, caso houver.
<b>CTRL + E</b>	<i>All + Export annotations</i>	Ativa a <i>checkbox All</i> , permitindo a exportação de todas as anotações presentes na categoria <i>All</i> .
<b>CTRL + H</b>	<i>Hide background</i> ( <i>Navigation image</i> )	“Oculta” o background da WSI. É exibido um fundo totalmente a branco com o registo das regiões analisadas.
<b>CTRL + I</b>	<i>Annotations: Imported</i>	Exibe as anotações importadas, caso houver.
<b>CTRL + N</b>	<i>Not cursor-guided</i>	Alternativamente à navegação com o joystick guiado pelo cursor virtual, este é fixo no centro e a imagem é atualizada automaticamente.
<b>CTRL + P</b>	<i>Pan</i>	Ativa/desativa o mecanismo de <i>drag-and-drop</i> .
<b>CTRL + R</b>	<i>imRotate</i>	Roda a imagem a um ângulo de 90 graus.
<b>CTRL + S</b>	<i>Save whole slide</i>	Permite guardar a WSI2 se a <i>checkbox Colored</i> estiver ativada, ou a WSI anotada, caso for a <i>checkbox Annotated</i> a ativada. Caso contrário, permite exportar somente a WSI.
<b>E</b>	<i>Export annotations</i>	Permite exportar as anotações das categorias <i>All</i> ou <i>Mine</i> , consoante a <i>checkbox All</i> estiver ou não selecionada, respetivamente.
<b>F</b>	<i>Fast scan</i>	Ativa/desativa o modo <i>fast scan</i> (navegação “estruturada”).
<b>H</b>	<i>Hide background</i> ( <i>Resolution image</i> )	“Oculta” o background da WSI2. É exibido um fundo totalmente a branco contendo o registo das ampliações utilizadas.

		Torna possível ver claramente o percurso e as ampliações usadas durante a análise.
<b>I</b>	Nenhum	Zoom in
<b>M</b>	<i>Annotations: Mine</i>	Exibe as anotações efetuadas pelo utilizador, caso houver.
<b>N</b>	<i>Next annotation</i> (quando disponível)	Exibe a anotação seguinte da categoria em exibição ( <i>Mine</i> , <i>Imported</i> ou <i>All</i> ).
<b>O</b>	Nenhum	Zoom out
<b>P</b>	<i>Previous annotation</i> (quando disponível)	Exibe a anotação anterior.
<b>R</b>	<i>Reset</i>	Restitui a análise inicial da imagem.
<b>S</b>	<i>Snapshot</i>	Permite guardar a imagem exibida no ecrã.
<b>Setas</b>	Nenhum	As setas (↑, ↓, ←, →) do teclado permitem navegar na imagem de acordo com a direção da seta. A navegação pode ser contínua, com a velocidade controlada pelo quarto eixo do joystick ou de forma “estruturada” (orientada por blocos) se a <i>checkbox Fast scan</i> estiver selecionada.
<b>SHIFT + N</b>	<i>Nucleoids Identification</i>	Expõe a interface <i>Nucleoids Segmentation</i> para a imagem exibida no ecrã.
<b>SHIFT + R</b>	<i>Ruler</i>	Permite a medição interativa entre dois pontos da imagem.
<b>U</b>	<i>Undo</i>	Anula a última operação realizada na imagem.

- **Joystick – botões utilizados**



**Figura A.1: Legenda dos botões utilizados no joystick.**

2017

Bilena Almeida

Processamento de Imagem de Microscópio para Análise de Biópsia

