

André Rodrigues Ventura

# Análise da Heterogeneidade Intra- tumoral em Imagens PET-FDG

Instituto de Biofísica e Biomatemática, IBILI – FMUC

2010



Trabalho realizado nos seguintes locais:

- Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas de Mestrado em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Francisco José Amado Caramelo e da Doutora Célia Maria Freitas Gomes.

Parte deste trabalho foi publicado no seguinte *Abstract*:

Ventura A., Caramelo F.,Gomes C., Rodrigues A., (2010). *Computational simulation of tumor lesions: A tool for evaluating heterogeneous uptake of FDG in PET images*. Acceptance for poster presentation at the Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (October 9-13, 2010 in Vienna, Austria).

Aos meus pais



# Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Francisco José Amado Caramelo, e à minha supervisora, Doutora Célia Maria Freitas Gomes, por terem estruturado este trabalho, pela paciência e pelo tempo gasto comigo. Os seus conselhos, dedicação, sentido crítico e boa disposição foram fulcrais para o desenrolar deste projecto.

Ao IBILI pelo acolhimento e pelo espaço cedido para realização deste trabalho.

Ao ICNAS e ao Prof. Doutor Adriano José Carvalho Rodrigues pela cedência dos volumes de imagens PET-FDG, indispensáveis à realização deste projecto.

Ao Professor Doutor Durval Campos Costa, pela pronta disponibilidade em ajudar, pelas dicas e pelo incentivo dado neste trabalho.

À Doutora. Maria João Santiago Ribeiro, que apesar da distância esteve sempre disposta a colaborar.

A todas as grandes amigas que fiz durante os 5 anos de curso e que proporcionaram momentos inesquecíveis, muito importantes na vida académica.

À Patrícia, por todo o apoio e incentivo demonstrado, pelos momentos passados e pela cumplicidade partilhada durante a realização deste trabalho.

Por último, os mais sentidos agradecimentos aos meus pais, pela educação dada, pelo esforço que nunca abdicaram, por estarem sempre presentes e por nunca duvidarem das minhas capacidades. À minha avó, por todo o apoio e carinho, por querer ajudar sempre mais e pelo espírito aberto que a torna uma pessoa especial. Ao meu irmão, por nunca ter falhado quando precisei dele, por ser um exemplo a seguir. Um beijinho especial à minha irmã.





# Índice

Agradecimentos .....	VII
Índice.....	IX
Lista de figuras .....	XI
Lista de tabelas .....	XIII
Resumo .....	XV
Summary .....	XVII
Capítulo 1 .....	1
1. Introdução.....	1
Capítulo 2 .....	3
2. Noções Gerais .....	3
2.1 Heterogeneidade Intra-Tumoral.....	3
2.2 Tomografia por Emissão de Positrões.....	8
2.3 Radioisótopos.....	12
2.4 Métodos de análise e interpretação PET .....	17
Capítulo 3 .....	21
3. Aprendizagem Estatística e Reconhecimento de Padrões.....	21
3.1. Support Vector Machine .....	21
Capítulo 4 .....	27
4. Desenvolvimento do software.....	27
4.1 Simulação computacional de lesões tumorais.....	27
4.2 Classificação da heterogeneidade tumoral e auxílio à tomada de decisão .....	30
Capítulo 5 .....	35
5. Resultados.....	35
5.1 Algoritmo de simulação dos tumores .....	35
5.2 Validação do algoritmo de simulação .....	38
5.3 Classificação da heterogeneidade.....	40

5.4. Avaliação por isolinhas.....	46
Capítulo 6 .....	49
6. Discussão e Conclusões .....	49
Referências Bibliográficas .....	53

# Lista de figuras

FIGURA 1. MODELO HIERÁRQUICO DA FORMAÇÃO DE UM TUMOR. OS TUMORES SÃO CONSTITUÍDOS POR DIVERSOS TIPOS DE CÉLULAS COM COMPORTAMENTOS BIOLÓGICOS DISTINTOS. APENAS UMA PARTE DELAS TÊM CAPACIDADE TUMORIGÉICA, AS ESTAMINAIS. ....	4
FIGURA 2. DESENVOLVIMENTO DE UM TUMOR HETEROGÉNEO. INICIALMENTE EXISTE UM TUMOR HOMOGÉNEO MODELADO POR UM ESFERÓIDE (A). NOVE MESES DEPOIS OBSERVA-SE UM TUMOR LOBULADO QUE PODE SER REPRESENTADO PELO SURGIMENTO DE NOVAS ESFERAS A PARTIR DA ORIGINAL (B). ESSA EXPANSÃO CONTINUA, ACOMPANHADA PELO SURGIMENTO DE NOVAS SUBPOPULAÇÕES E APÓS TRÊS MESES OBSERVA-SE UM TUMOR COM ELEVADO GRAU DE HETEROGENEIDADE. ....	6
FIGURA 3. MODELO ELIPSOIDAL TRIDIMENSIONAL PARA TECIDOS HOMOGÉNEOS.....	7
FIGURA 4. DECAIMENTO DO PROTÃO COM EMISSÃO DE UM NEUTRINO E UM POSITRÃO QUE SE ANIQUILA APÓS COLISÃO COM UM ELECTRÃO, PRODUZINDO 2 FOTÕES GAMA. ....	10
FIGURA 5. ANEL DE UM SCANNER RODEADO POR DETECTORES CINTILADORES ACOPLADOS A FOTOMULTIPLICADORES. UM EVENTO DE ANIQUILAÇÃO OCORRE NO CAMPO DE VISÃO (FOV) E PRODUZ 2 RAIOS GAMA QUE SÃO DETECTADOS POR UM PAR DE DETECTORES. CADA PAR DE DETECTORES É CONECTADO PELO CFD (CONSTANT FRACTION DISCRIMINATORS) E PELO CIRCUITO DE DETECÇÃO DE COINCIDÊNCIAS. ....	10
FIGURA 6. ESTRUTURA MOLECULAR DA 18F-FDG. ....	14
FIGURA 7. PROCESSO DE SÍNTESE DA 18F-FDG. ....	17
FIGURA 8. MODELO DE UM CLASSIFICADOR DE APRENDIZAGEM SUPERVISIONADA. ....	22
FIGURA 9. HIPERPLANO DE SEPARAÇÃO DAS CLASSES -1 E +1.....	23
FIGURA 10. DIFERENTES TIPOS DE FRONTEIRAS DE CLASSIFICAÇÃO. ....	24
FIGURA 11. CLASSIFICAÇÃO MULTI-CLASSE.....	26
FIGURA 12. CORTES CORONAIS DE DOIS VOLUME DE IMAGENS PET-FDG REAL DE CORPO INTEIRO. A - PESSOA SAUDÁVEL; B - PESSOA COM UM TUMOR PULMONAR.....	28
FIGURA 13. INTERFACE DE SIMULAÇÃO DE LESÕES TUMORAIS. ....	29
FIGURA 14. INTERFACE DE SELECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA HETEROGENEIDADE TUMORAL. ....	32
FIGURA 15. MODELOS DE TUMORES SIMULADOS REPRESENTATIVOS DOS DIFERENTES GRAUS DE HETEROGENEIDADE. A - MODELO DE HETEROGENEIDADE DE GRAU 1; B - MODELO DE HETEROGENEIDADE DE GRAU 2; C - MODELO DE HETEROGENEIDADE DE GRAU 3; D - MODELO DE HETEROGENEIDADE DE GRAU 4.....	33
FIGURA 16. VOLUME DE IMAGENS REAIS DE UMA PESSOA SAUDÁVEL (A) E RESPECTIVA SIMULAÇÃO DE LESÃO TUMORAL (B). ....	36
FIGURA 17. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, BASTANTE HETEROGÉNEO E DE BAIXA INTENSIDADE. ....	36
FIGURA 18. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, HETEROGÉNEO E DE ELEVADA INTENSIDADE. ....	36
FIGURA 19. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO ESQUERDO, HOMOGÉNEO E DE ELEVADA INTENSIDADE.....	37

FIGURA 20. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, POUCO HETEROGÊNICO E DE ELEVADA INTENSIDADE. ....	37
FIGURA 21. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, POUCO HETEROGÊNICO E DE INTENSIDADE MÉDIA. ....	37
FIGURA 22. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, HETEROGÊNICO E DE BAIXA INTENSIDADE. ....	37
FIGURA 23. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, HETEROGÊNICO E DE ELEVADA INTENSIDADE. ....	37
FIGURA 24. TUMOR SIMULADO NO PULMÃO DIREITO, HETEROGÊNICO E DE BAIXA INTENSIDADE. ....	38
FIGURA 25. ISOLINHAS DE INTENSIDADE DE UM CORTE AXIAL DE UM TUMOR; A - SEM PRÉ-PROCESSAMENTO, B - COM PRÉ-PROCESSAMENTO. ....	41
FIGURA 26. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE AS TRANSFORMADAS DE FOURIER DOS DIVERSOS MODELOS TUMORAIS. ....	41
FIGURA 27. COMPARAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DEFINIDA INICIALMENTE PARA O GRUPO DE TESTE (VECTOR TESTE), COM OS RESULTADOS OBTIDOS PELO CLASSIFICADOR (RESULTADO TESE). ....	43
FIGURA 28. COMPARAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DEFINIDA INICIALMENTE PARA O GRUPO DE TREINO (VECTOR TREINO), COM OS RESULTADOS OBTIDOS PELO CLASSIFICADOR (RESULTADO TREINO). ....	43
FIGURA 29. TUMOR HOMOGÊNICO (GRAU 1) BEM CLASSIFICADO. ....	45
FIGURA 30. TUMOR HETEROGÊNICO, DE GRAU 2, BEM CLASSIFICADO. ....	45
FIGURA 31. TUMOR HETEROGÊNICO, DE GRAU 4, BEM CLASSIFICADO. ....	45
FIGURA 32. TUMOR HETEROGÊNICO, DE GRAU 3, CLASSIFICADO COMO SENDO DE GRAU 4. ....	46
FIGURA 33. TUMOR HETEROGÊNICO, DE GRAU 3, CLASSIFICADO COMO SENDO DE GRAU 4. ....	46
FIGURA 34. VISUALIZADOR DAS ISOLINHAS DE INTENSIDADE DE VÁRIOS CORTES SEGUNDO O PLANO CORONAL, SAGITAL E AXIAL. ....	47

# Lista de tabelas

TABELA 1. ISÓTOPOS COM MAIOR AFINIDADE BIOLÓGICA, E POR ISSO OS MAIS UTILIZADOS EM PET.....	12
TABELA 2. FRACÇÃO DE $^{18}\text{F}$ NUMA AMOSTRA AO LONGO DO TEMPO. ....	14
TABELA 3. FUNÇÕES KERNEL UTILIZADAS EM SVM. ....	25
TABELA 4. RESULTADOS OBTIDOS DA AVALIAÇÃO DE VERACIDADE DOS TUMORES PRESENTES EM CADA VOLUME DE IMAGENS DE TESTE, POR PARTE DE 3 OBSERVADORES. ....	39
TABELA 5. IV DA AVALIAÇÃO DE CADA OBSERVADOR E RESPECTIVAS PERCENTAGENS DE TUMORES REAIS E SIMULADOS CLASSIFICADOS DE MODO ERRADO.....	40
TABELA 6. VALORES DE ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO CLASSIFICADOR PARA CADA GRAU DE HETEROGENEIDADE. .....	44



# Resumo

A heterogeneidade intra-tumoral, típica em tumores sólidos, é condicionada por múltiplos factores celulares, o que influencia o comportamento biológico do tumor, podendo assim ter um importante valor na resposta à terapêutica. A FDG em PET permite detectar alterações no metabolismo celular, onde níveis de captação elevados traduzem maior actividade celular (consumo de glicose) e por conseguinte maior potencial de agressividade, sendo utilizado como método de diagnóstico e estadiamento da doença oncológica, assim como na resposta à terapêutica. A análise quantitativa da distribuição espacial do radiofármaco poderá reflectir a heterogeneidade metabólica tumoral e por conseguinte ser utilizado como um novo parâmetro preditivo da resposta à terapêutica.

Neste trabalho desenvolveu-se um algoritmo de análise e classificação da heterogeneidade intra-tumoral em imagens PET-FDG 3D em função da distribuição e quantificação da captação celular de FDG. Para isso recorreu-se a *Support Vector Machine* como método de treino e respectiva classificação. Foram utilizados 20 volumes de imagens tumorais como grupo de treino e 10 como grupo de teste, sendo ambos constituídos por tumores reais e tumores simulados. Para teste e validação deste método foi desenvolvido outro algoritmo que permite simular tumores com as características desejadas, nomeadamente a localização, número de focos, raio e intensidade.

O classificador foi construído por decomposição *One-Against-All* para SVM, utilizando Kernel RBF e uma constante de regularização igual a 10. O classificador foi caracterizado calculando a sua sensibilidade e especificidade para cada grau de heterogeneidade. Sensibilidade (%): Grau 1 - 100; Grau 2 - 0.75; Grau 3 - 0; Grau 4 - 100. Especificidade (%): Grau 1 - 0.89; Grau 2 - 100; Grau 3 - 100; Grau 4 - 0.69.

A heterogeneidade está directamente relacionada com a agressividade tumoral, podendo esta técnica vir a desempenhar um papel importante na radioterapia, permitindo a definição de estratégias terapêuticas mais

direccionadas para cada zona específica do tumor. Assim, conseguir-se-ia um tratamento mais rápido e eficaz, com a eliminação de toda a massa tumoral e diminuição da probabilidade de recidiva.

Palavras-chave: Heterogeneidade Tumoral, PET, FDG, Support Vector Machine.



# Summary

Intra-tumoral heterogeneity is determined by multiple cellular factors, which influences biologic tumor behavior and thereby may have an important role in the response to therapy. PET-FDG images allow detecting changes in the cellular metabolism, where high uptake levels reflect an increased cellular activity (glucose consumption) and therefore a greater potential of aggressiveness. Hence it particularly suited as a method for tumoral diagnosing and tumoral staging, and also as a response to therapy assessment. The quantitative analysis of the regional distribution of FDG can be correlated with metabolic tumor heterogeneity and thus may be used as a new predictive parameter.

In this work we developed an algorithm to analyze and classify intra-tumoral heterogeneity in PET-FDG images based on the quantitative analysis of the FDG spatial distribution. The proposed classification ranges from 1 to 4 corresponding the value 1 to a homogeneous tumor whereas the value 4 to a rather heterogeneous tumor. We applied a Support Vector Machine (SVM) routine as the classification method. We used 20 whole body PET scans as the training group and 14 whole body PET scans as the testing group. Both groups included real and simulated tumors. The simulated tumours were implemented by means of another algorithm which allows simulate tumors with specified features such as location, number of foci, radius and intensity.

The classifier was built with a SVM *One-Against-All* decomposition, with a RBF kernel and a regularization constant equal to 10. In order to evaluate the classifier performance we determine the sensibility (Sb) and specificity (Sp) for each heterogeneity degree. The obtained results were: Sb(%): Degree 1 - 100; Degree 2 - 0.75; Degree 3 - 0; Degree 4 - 100. Sp(%): Degree 1 - 0.89; Degree 2 - 100; Degree 3 - 100; Degree 4 - 0.69.

Heterogeneity is directly related with tumoral aggressiveness and the presented method could be successful in radiotherapy allowing a more specific strategy for therapeutic procedures. Therefore, faster and more efficient

treatment can be achieved with complete tumoral resection and, also important, decreasing the possibility of tumoral recidivism.

Key-words: Tumoral Heterogeneity, PET, FDG, Support Vector Machine.

# Capítulo 1

## 1. Introdução

A oncologia é uma área da medicina em constante desenvolvimento, procurando aplicar técnicas de diagnóstico e terapêutica eficazes, de modo a eliminar e evitar o desenvolvimento de tumores. Por vezes, um tumor é encarado como uma entidade homogénea, constituído todo ele pelo mesmo tipo de células. No entanto, na realidade e tipicamente nos tumores sólidos, isto não acontece. Os tumores apresentam uma heterogeneidade associada que resulta da co-existência de múltiplas subpopulações celulares neoplásicas com características e comportamentos biologicamente distintos. A heterogeneidade tumoral está relacionada, entre outros factores, com a actividade proliferativa celular, a existência de áreas de necrose, o grau de vascularização, o metabolismo energético, a hipoxia e a expressão de receptores específicos. Uma vez que o grau de heterogeneidade condiciona o comportamento biológico do tumor, influenciando a evolução da doença e a sua resposta à terapia, pode ter um valor de prognóstico bastante promissor. Para estudos tumorais é frequente recorrer-se a Tomografia por Emissão de Positrões (PET) com [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodesoxiglicose (FDG). Trata-se de uma técnica minimamente invasiva e com capacidade de detectar *in vivo* alterações no metabolismo celular. É muito utilizada como método de diagnóstico e estadiamento de doenças oncológicas, bem como na avaliação da resposta à terapêutica. Uma vez que a FDG é um marcador metabólico, níveis de maior captação celular traduzem maior actividade metabólica, e deste modo maior agressividade e maior potencial metastático. Actualmente, o principal parâmetro extraído das imagens FDG-PET, tanto no diagnóstico como no estadiamento, é o valor normalizado de captação máxima ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) no volume tumoral total. Deste modo, a análise quantitativa da distribuição espacial de  $^{18}\text{F}$ -FDG poderá reflectir a heterogeneidade metabólica tumoral e assim ser utilizada como um novo parâmetro preditivo da evolução, comportamento e essencialmente da resposta do tumor à terapia.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objectivo desenvolver uma ferramenta computacional de análise da heterogeneidade intra-tumoral em imagens FDG-PET, tendo como base a quantificação e a distribuição do radiofármaco. Associado a este ponto, pretende-se também criar um algoritmo de simulação de lesões tumorais de modo a evitar a constante aquisição de volume de imagens FDG-PET.

O trabalho foi realizado quase na sua totalidade no Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina de Coimbra, tendo sido os volumes de imagens FDG-PET fornecidos pelo Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde.

De modo a enquadrar o presente trabalho é feita uma revisão bibliográfica nos capítulos 2 e 3. O capítulo 2 introduz o conceito de heterogeneidade tumoral, enquadra-o na técnica FDG-PET e descreve alguns dos parâmetros extraídos desta. São também revistos alguns métodos já existentes de avaliação da heterogeneidade tumoral.

No capítulo 3 são apresentadas algumas noções de aprendizagem estatística e de reconhecimento de padrões, incidindo sobre Support Vector Machine (SVM).

No capítulo 4 são descritos os métodos e técnicas utilizadas para desenvolver os vários algoritmos do presente trabalho, bem como os testes de validação das imagens simuladas.

No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na simulação de novos tumores e na classificação do grau de heterogeneidade tumoral.

No capítulo 6 é feita uma discussão geral dos resultados e dos métodos utilizados, da qual se retiram as conclusões mais relevantes.

# Capítulo 2

## 2. Noções Gerais

### 2.1 Heterogeneidade Intra-Tumoral

Um tumor (neoplasia) surge quando células adquirem a capacidade de se multiplicarem de modo anormal, com tendência à autonomia e perpetuação, fugindo parcial ou totalmente ao controle do organismo. Estas células invadem tecidos ou órgãos provocando efeitos prejudiciais sobre o hospedeiro. Isto ocorre de forma cumulativa e continuada, geralmente durante um longo período de tempo, podendo ser provocado por diversos factores carcinogénicos, tais como radiação ou agentes químicos [1].

#### 2.1.1 Modelo Hierárquico

O modelo hierárquico estabelece a existência de grupos de células biologicamente distintas, com comportamentos e capacidades funcionais variadas. De acordo com a teoria das células estaminais, apenas uma pequena quantidade das células existentes num tumor têm capacidade tumorigénica. Estas células, denominadas de células estaminais tumorais (CSC, do inglês *cancer stem cells*), têm a capacidade de se dividirem de forma assimétrica, dando origem a uma célula semelhante a ela própria (auto-renovação) e a outra mais diferenciada, a qual em divisões sucessivas, dá origem a células em diferentes estados de diferenciação com propriedades não tumorigénicas (Figura 1). Como o processo de diferenciação é progressivo e é acompanhado da diminuição da taxa proliferativa, as células diferenciadas são incapazes de proliferar, promovendo assim, após algum tempo, o início do processo de apoptose. Deste modo, os tumores apresentam células em diferentes estágios de proliferação e diferenciação, o que contribui para a heterogeneidade tumoral.

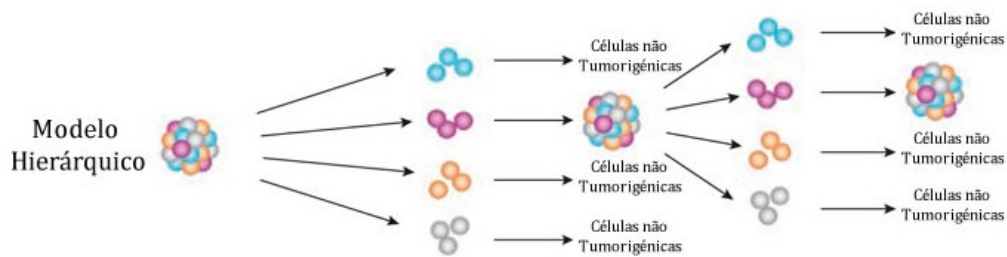


Figura 1. Modelo hierárquico da formação de um tumor. Os tumores são constituídos por diversos tipos de células com comportamentos biológicos distintos. Apenas uma parte delas têm capacidade tumorigênica, as estaminais [2].

Este modelo prevê que as células estaminais tumorais, também denominadas de células tumorais de iniciação, possam ser identificadas e separadas das restantes com base nas suas características intrínsecas [2].

O microambiente tumoral tem influência directa no comportamento das células estaminais tumorais durante o seu processo de auto-renovação, e por conseguinte no comportamento biológico do tumor. Num microambiente mais adverso, as CSCs têm a capacidade de entrar e permanecer num estado de quiescência até que sejam conseguidas as condições propícias à divisão celular. Outra característica intrínseca das CSCs, com implicações na resposta à terapêutica é a expressão acentuada de proteínas transportadoras específicas (Glicoproteína-P e BCRP). Estas proteínas funcionam como bombas de efluxo de múltiplos agentes citotóxicos, diminuindo a sua acumulação no meio intracelular e por conseguinte a sua eficácia terapêutica. Estas propriedades implicam, desde logo, uma baixa eficiência na eliminação destas células por quimioterapia, que tem como alvo preferencial células proliferativas [2-4].

### 2.1.2 Implicações terapêuticas da heterogeneidade intratumoral

O princípio da heterogeneidade tumoral é bastante importante em oncologia, já que muitas vezes considera-se um tumor como uma entidade homogénea, quando na realidade pode ser constituído por vários tipos de células com características e comportamentos distintos. Isto acontece porque essas células podem revelar diferentes mutações, actividades de genes e

proteínas, tendo assim diferentes comportamentos [3, 5]. Esta heterogeneidade pode ser condicionada por variados factores, quer intrínsecos, a nível genético, quer extrínsecos, inculidos pelo micro-ambiente circundante [5, 6]. Pode assim resultar de ploidia de ADN, aberrações cromossómicas, mutações em genes específicos, expressão de factores de crescimento e dos seus receptores, expressão de proteínas específicas e de antigénios, metabolismo energético, citotoxicidade. A nível macroscópico pode-se revelar na vascularização, na perfusão sanguínea, bioquímica das membranas, oxigenação (células tumorais oxigenadas são em média três vezes mais susceptíveis a danos por radiação, comparativamente a células em hipoxia) e pressão de fluidos intersticiais [3, 5, 7-9].

Dependendo do grau de heterogeneidade, ou seja, do tipo e quantidade de subpopulações celulares, o tumor poderá apresentar comportamentos variados ao longo de toda a sua massa, e influenciar a progressão tumoral, o processo de metastização e angiogénese, a capacidade de antigenicidade, e assim como a resposta à terapêutica. [5, 6].

A heterogeneidade tumoral constitui um obstáculo a uma terapia simples, já que um tratamento que tem como alvo terapêutico uma população celular com determinadas características, pode não ser eficaz na eliminação de populações celulares neoplásicas com propriedades distintas e deste modo falhar na erradicação do tumor. Deste modo, é necessário desenvolver novas abordagens terapêuticas, incluindo terapias combinadas, no sentido de eliminar as células tumorais na sua totalidade [3, 10].

Considera-se que o grau de heterogeneidade tumoral, o qual está directamente relacionado com o tamanho do tumor, tem relevância clínica, uma vez que contribui para o desenvolvimento de resistência condicionando a resposta dos doentes à terapêutica.

### **2.1.3 Heterogeneidade nas imagens PET-FDG**

A maior acumulação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células tumorais está associada à sobre-expressão de transportadores membranares Glut-1, Glut-3 e da enzima hexocinase II (HK-II) para fazer face às maiores necessidades energéticas destas células. No entanto, outros factores, como o micro ambiente e estado de

hipoxia parecem afectar a expressão destes transportadores e assim condicionar a captação e distribuição de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células tumorais. Zhao *et al.* observaram uma distribuição heterogénea de  $^{18}\text{F}$ -FDG em tumores malignos e que essa heterogeneidade intra-tumoral está correlacionada com a expressão do Glut-1, Glut-3 e HK-II, estando estes aumentados em regiões de hipoxia, resultantes de um mecanismo adaptativo desenvolvido pelas células tumorais [10].

#### 2.1.4 Formação e crescimento de um tumor heterogéneo

Num ambiente uniforme, os tumores seguem, numa primeira fase, um padrão de crescimento esférico ou elipsoidal devido a forças resultantes da divisão celular. Elipsóides podem ser usadas para modelar o crescimento tumoral em ambientes anisotrópicos, que podem surgir de variações na vascularização ou na presença de obstruções anatómicas. O crescimento tumoral é assim baseado na expansão e surgimento de novos esferóides, cada um representando uma subpopulação de células tumorais (Figura 2). Do mesmo modo, a regressão de um tumor pode ser modelada pela diminuição ou desaparecimento desses esferóides [3].

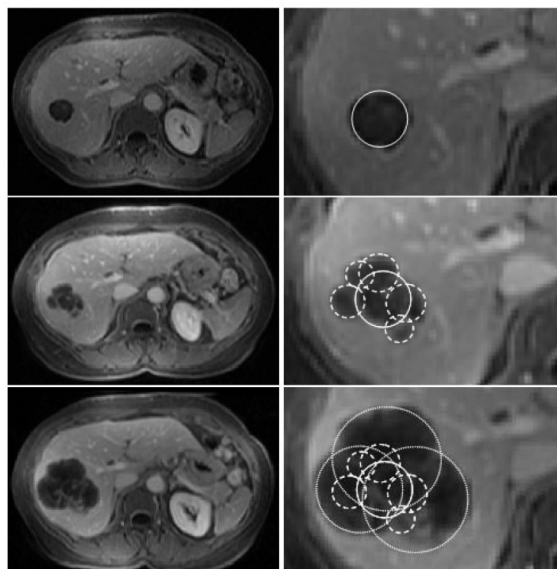


Figura 2. Desenvolvimento de um tumor heterogéneo. Inicialmente existe um tumor homogéneo modelado por um esferóide (A). Nove meses depois observa-se um tumor lobulado que pode ser representado pelo surgimento de novas esferas a partir da original (B). Essa expansão continua, acompanhada pelo surgimento de novas subpopulações e após três meses observa-se um tumor com elevado grau de heterogeneidade [3].



### 2.1.5 Técnicas existentes para avaliar a heterogeneidade tumoral

O'Sullivan *et al.*, desenvolveram, em 2003, um índice estatístico da heterogeneidade de um tumor baseado no desvio da distribuição do tecido a partir do contorno espacial de um modelo elíptico. Foi gerado um algoritmo baseado na região volumétrica de interesse do tumor, sendo aplicado a imagens FDG-PET de doentes com sarcoma. Uma análise de Cox (riscos proporcionais) sobre os dados obtidos revelara que o grau de heterogeneidade do sarcoma é o maior factor de risco associado à morte desses doentes. Demonstraram que a heterogeneidade é um indicador relevante do prognóstico do doente, sendo de grande interesse e importância desenvolver novas medidas de heterogeneidade [11].

Mais tarde, em 2008, O'Sullivan e a sua equipa propuseram que a heterogeneidade na distribuição espacial de  $^{18}\text{F}$ -FDG pode ser utilizada para prever a agressividade de um tumor. Desenvolveram assim um novo algoritmo de análise de heterogeneidade, aplicado e validado a imagens tumorais PET-FDG de doentes com sarcoma, com o objectivo de avaliar e prever os seus estados clínicos. Os resultados dessa análise são comparados com as características e dados do doente e informação histológica recorrendo a análises uni e multivariada. Análises estatísticas demonstraram que a análise da heterogeneidade é um eficaz e independente factor de avaliação da evolução clínica do doente. É um modelo simples e baseia-se na comparação da distribuição da captação ao longo do volume tumoral com um objecto elíptico sólido com densidade homogénea, tal como o representado na Figura 3 [4].

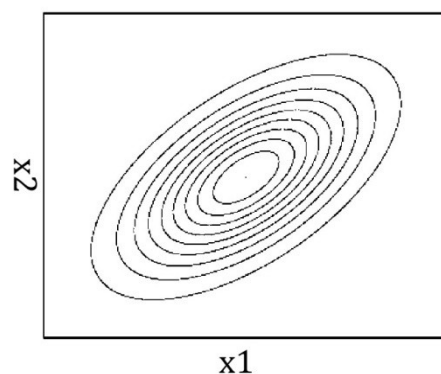


Figura 3. Modelo elipsoidal tridimensional para tecidos homogéneos [4].

No mesmo ano, Elizabeth A.K. e Perry W. Grigsby propuseram avaliar a heterogeneidade metabólica de  $^{18}\text{F}$ -FDG intra-tumoral no pré-tratamento de tumores cervicais. Esta análise consiste no cálculo de um “threshold” adaptativo tridimensional para o volume tumoral, de imagens FDG-PET, a partir da segmentação da imagem. A heterogeneidade intra-tumoral é assim obtida para cada doente calculando a derivada ( $dV/dT$ ) da função do “threshold” tridimensional (volume). É estabelecida uma relação entre a heterogeneidade intra-tumoral, os factores específicos do tumor e o diagnóstico do doente. Este indicador, aplicado no pré-tratamento tumoral, permite auxiliar a tomada de decisão da terapêutica e prever o risco de reincidência e progressão tumoral. Concluíram ser um melhor índice de previsão da recidiva tumoral do que  $\text{SUV}_{\text{max}}$ , apresentando, no entanto, uma limitação directamente ligada ao volume tumoral, uma vez que pequenos tumores também podem ser heterogéneos [12].

## 2.2 Tomografia por Emissão de Positrões

O PET é uma técnica de imagem utilizada em medicina nuclear, sendo uma ferramenta médica e de investigação. Utiliza pequenas quantidades de materiais radioactivos (radiotraçadores/radiofármacos) para diagnosticar diversas doenças, fornecendo imagens tridimensionais do corpo humano. Permite analisar *in vivo* diversos processos bioquímicos do organismo possibilitando aos clínicos avaliar as condições e funcionamento de diversos tecidos e órgãos [13]. É uma técnica minimamente invasiva, sendo a dose absorvida média por cada doente semelhantes à de outras técnicas, como por exemplo C [14].

### 2.2.1 Aplicações

O PET apresenta diversas aplicações, desempenhando um papel preponderante na oncologia [13]. De seguida são apresentadas algumas das suas aplicações mais específicas nesta área:

- Avaliar o metabolismo energético das células;
- Detectar tumores e metástases e avaliar a respectiva dispersão pelo corpo;

- Avaliar a eficácia de um plano de tratamento e acompanhar a terapia;
- Verificar se um tumor regride após a respectiva terapia. [13-15]

### **2.2.2 Procedimento**

Para realizar o exame PET é administrado ao doente um radiofármaco marcado com um isótopo radioactivo (com um tempo de semi-vida adequado à preparação do radiofármaco e à realização do exame) por via endovenosa, por inalação ou mesmo por ingestão, sendo a primeira opção a mais frequente. O isótopo radioactivo é ligado quimicamente a uma molécula biologicamente activa, cuja escolha depende naturalmente do alvo em estudo e, por isso, varia em função do exame a realizar. Após a administração do radiofármaco, o doente é sujeito a um tempo de espera (de acordo com o tipo de exame e do radiofármaco administrado) para que o radiofármaco se distribua pelo organismo e se acumule nas zonas de interesse, e só depois é realizada a aquisição de imagens na câmara PET que revelam a distribuição precisa do radiofármaco [14].

### **2.2.3 Processo físico e aquisição de imagem**

Ao decair, o radioisótopo emite um positrão (antipartícula do electrão, com carga oposta) de energia cinética média da ordem de 1 MeV e também um neutrino (partícula com carga neutra e massa extremamente pequena, interagindo de forma fraca com a matéria). Após percorrer algumas fracções de milímetros de tecido, os positrões encontram electrões, levando à aniquilação de ambos, que por sua vez liberta um par de fotões gama de 511 keV (equivalente à massa de repouso de um electrão). Este processo encontra-se esquematizado na Figura 4. Como o electrão e o positrão são as partículas mais leves entre todas as partículas (com excepção dos neutrinos), a aniquilação destes só pode resultar em criação de fotões ( $m=0$ ) [14, 16, 17].

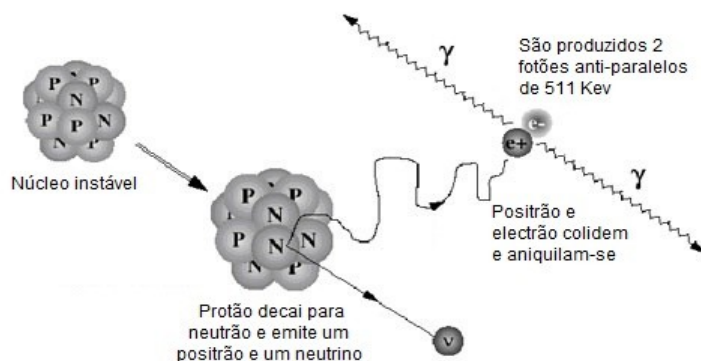


Figura 4. Decaimento do protão com emissão de um neutrino e um positrão que se aniquila após colisão com um electrão, produzindo 2 fótons gama [18].

Os fótons resultantes da aniquilação possuem uma correlação angular entre si que resulta da conservação do momento linear. Assim, se a aniquilação se efectuasse com o positrão e electrão em repouso, os dois fótons seriam emitidos anti-paralelamente (com um ângulo relativo entre si de  $180^\circ$ ). No entanto, diversos efeitos físicos contribuem para o alargamento da distribuição angular, tendo assim grande importância a resolução angular dos detectores usados [19]. Os fótons são detectados quando colidem com um anel de detectores que rodeiam o doente. Esses detectores capturam múltiplas imagens bidimensionais, obtidas em pontos definidos (normalmente a cada 3-6 graus). Assim, um exame tem duração total média entre 15 a 20 minutos.

Os detectores são revestidos com cristais cintiladores que quando excitados emitem luz [14].

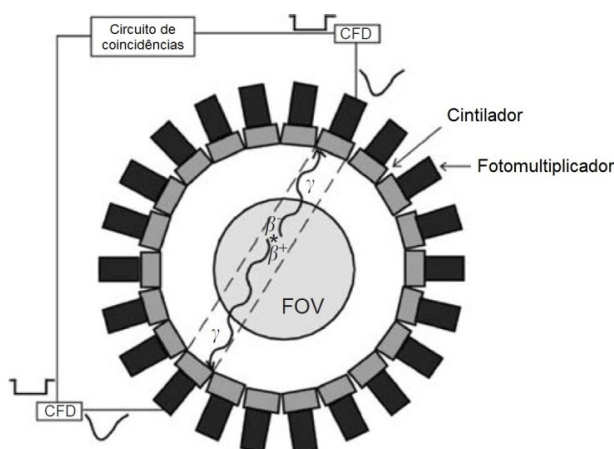


Figura 5. Anel de um scanner rodeado por detectores cintiladores acoplados a fotomultiplicadores. Um evento de aniquilação ocorre no campo de visão (FOV) e produz 2 raios gama que são detectados por um par de detectores. Cada par de detectores é conectado pelo CFD (Constant Fraction Discriminators) e pelo circuito de detecção de coincidência [14].

Os fótons gama provenientes da aniquilação do mesmo positrão produzem sinais coincidentes no tempo. Deve-se então usar coincidências para garantir que os dois fótons detectados são correlacionados. Os detectores ligados electronicamente permitem detectar essas coincidências, ou seja, se a radiação registada por cada um foi emitida simultaneamente ou com uma pequena diferença de tempo. Através desta linha de coincidências, também conhecida por LOR (Line of Response), é possível localizar (pelo menos numa dimensão) a fonte de emissão de cada par de fótons detectados. Ou seja, a definição de uma linha de resposta (LOR) pressupõe que a aniquilação se deu na recta assim determinada não se conhecendo, contudo, a posição exacta da mesma. Este processo de aquisição está esquematizado na Figura 5. Câmaras PET que possuam informação de tempo de voo (Time of Flight) permitem todavia diminuir a incerteza de posicionamento da aniquilação numa dada linha de resposta o que pode permitir melhor qualidade de imagens. Todos os fótons que não se encontrem emparelhados são ignorados. Um volume PET normal é composto por milhões de contagens para toda a aquisição [19].

No final, os eventos são geralmente agrupados em sinogramas (conjunto de projecções), a partir das quais se obtêm, com maior frequência, imagens 2D, que justapostas contêm informação 3D, estrutural e funcional, dos órgãos e tecidos. Um sinograma corresponde a um histograma bidimensional das coordenadas (distância e ângulo) das LORS [16, 19].

A obtenção de uma imagem utilizando um radiofármaco PET resume-se assim a três fases: i) Aquisição dos dados, ii) Processamento e reconstrução dos dados, iii) Obtenção da imagem.

#### **2.2.4 Ruído e Resolução**

Num estudo PET a taxa de ocorrências resulta da soma de três tipos de acontecimentos físicos durante a aquisição: i) coincidências verdadeiras, as que são o verdadeiro sinal e realmente nos interessam, ii) coincidências fortuitas, em que os dois fótons detectados são provenientes de dois decaimentos  $\beta^+$  diferentes (duas aniquilações distintas), iii) scattering, em que os dois sinais coincidem no tempo mas a energia de um ou ambos fótons têm energia inferior a 511 keV. Os acontecimentos ii) e iii) irão assim contribuir para a presença de

ruído nas imagens. Para reduzir o ruído proveniente de ii) pode-se melhorar a resolução em tempo, e para reduzir o de iii), melhorar a resolução em energia dos detectores [14].

## 2.3 Radioisótopos

A rápida expansão do PET tem sido proporcionada pelos grandes desenvolvimentos na área da produção de radiotraçadores [20].

Um traçador é um composto sintético, biologicamente activo, que quando administrado a um doente, tem comportamento similar ao natural correspondente. Como se detecta o traçador através da sua radioactividade, é possível observar a sua distribuição no organismo. Para além disso, é possível, desenvolvendo o traçador de modo apropriado, observar e estudar um processo metabólico isolado [21].

Os radioisótopos utilizados em PET apresentam um curto tempo de semi-vida comparativamente com radioisótopos de medicina nuclear convencional.

Tabela 1. Isótopos com maior afinidade biológica, e por isso os mais utilizados em PET [14, 18, 22].

Isótopo	Semi-vida	Energia $\beta^+$ (MeV)*	Alcance (mm)**	Precursor
$^{11}\text{C}$	20.4 min	0.96	4.11	$^{14}\text{N}$ (p, $\alpha$ )
$^{13}\text{N}$	9.96 min	1.19	5.39	$^{16}\text{O}$ (p, $\alpha$ )
$^{15}\text{O}$	2.07 min	1.72	8.2	$^{14}\text{N}$ (d,n)
$^{18}\text{F}$	109.8 min	0.64	2.39	$^{18}\text{O}$ (p,n)

\*- Energia libertada no positrão após decaimento  $\beta^+$ .

\*\* - Distância percorrida pelo positrão na água até colidir com um electrão.

Reacções de transferência:

(p, $\alpha$ ) – recebe um protão e liberta uma partícula  $\alpha$  (2 protões + 2 neutrões)

(d,n) – recebe um deutério (1 protão + 1 neutrão) e liberta um neutrão

(p,n) – recebe um protão e liberta um neutrão

Os radioisótopos são átomos instáveis e nos seus núcleos desencadeia-se o decaimento de um protão (decaimento  $\beta^+$ ), resultando desse processo um neutrão e a libertação de um positrão e de um neutrino. O positrão, ao

abandonar o núcleo, irá colidir com um electrão, aniquilando-se, o que resulta na libertação de 2 fótons gama de 511 keV de energia [20].

### 2.3.1 Características dos radioisótopos

Após a produção dos radioisótopos, estes são adicionados a moléculas específicas, tendo em conta a parte do corpo que será estudada, qual o processo metabólico em causa e qual a sua especificidade e capacidade de captação pelo organismo [21].

Deste modo, para que os radiofármacos sejam passíveis serem utilizados em PET devem reunir as seguintes características:

- O radioisótopo deve ter um tempo de semi-vida efectivo suficientemente longo para se conseguir realizar o exame, mas não demasiado longo de modo a não expor o doente a radiação desnecessária.
- A energia libertada no positrão, após decaimento, deve ser relativamente baixa para não percorrer uma grande distância no corpo até termalizar e aniquilar com um electrão do meio. Essa distância produz um erro na informação interpretada pelo médico, não sendo passível de correcção.
- Deve ter uma actividade específica elevada no organismo. No entanto, esta condição nem sempre é fácil de reproduzir, já que muitos órgãos, tal como o fígado, lidam com uma grande variedade de compostos.
- Deve ser idêntico a compostos encontrados no organismo ou muito semelhante em comportamento químico-fisiológico (e.g.  $^{18}\text{F}$ -FDG).
- Deve ser de fácil e rápida síntese a partir de um precursor já existente. Se a síntese ou o seu transporte até ao doente for lento, grande parte da radiação será desperdiçada.
- Não deve estar exposto a um metabolismo extenso. Se o composto for metabolizado, alguns dos produtos daí resultantes poderão apresentar na sua estrutura o radioisótopo e entrar noutros processos metabólicos diferentes do estudado, camuflando e dificultando assim a interpretação dos dados obtidos no exame [20, 21].

### 2.3.2 $^{18}\text{F}$ -FDG

O radioisótopo mais frequentemente utilizado em PET é 2- $^{18}\text{F}$ -desoxi-D-glicose (*fluorodesoxiglicose* F 18), também identificado por  $^{18}\text{F}$ -FDG. Tem como fórmula química  $\text{C}_6\text{H}_{11}^{18}\text{FO}_5$ , assumindo a estrutura da Figura 6, e apresenta um peso molecular de 182.15 g/mol.

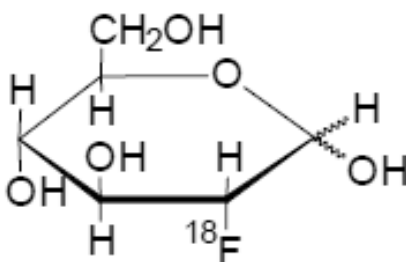


Figura 6. Estrutura molecular da  $^{18}\text{F}$ -FDG [23].

Esta molécula assumiu o título de *gold standard*, devido à sua segurança e eficácia. Veio mudar decisivamente a prática médica, beneficiando diariamente em todo mundo, milhares de doentes sendo já uma abordagem indispensável em medicina oncológica [6].

A  $^{18}\text{F}$ -FDG é uma molécula análoga à glicose, tendo o oxigénio da posição 2 substituído por fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ). Esta modificação tem um efeito capital uma vez que irá inibir a progressão da molécula na via glicolítica [23], o que vai permitir aferir regionalmente o consumo de glicose.

Tabela 2. Fração de  $^{18}\text{F}$  numa amostra ao longo do tempo [23].

Tempo (min)	Fração Restante
0	1.00
15	0.909
30	0.826
60	0.683
110	0.500
202	0.250

A  $^{18}\text{F}$ -FDG apresenta um tempo de semi-vida (físico) de aproximadamente 110 min e tendo em conta o tempo necessário à eliminação do 'pool' sanguíneo



não é de estranhar que geralmente o exame seja realizado no intervalo de 1h após ser administrado o radiofármaco ao doente. Supõe-se que este intervalo de tempo aumenta a relação entre a ligação específica/não específica o que em termos de sinal traduz uma otimização da relação sinal/ruído.

Sendo a solução de  $^{18}\text{F}$ -FDG administrada por via endovenosa, esta percorre a corrente sanguínea do doente e é transportada para o interior das células pelo mesmo processo de transporte facilitado da glicose normal. Por outro lado, as células tumorais tendem a apresentar um aumento na densidade e número de proteínas transportadoras de glicose (Glut-1 e Glut-3) na superfície das membranas celulares. Uma vez no interior das células, a  $^{18}\text{F}$ -FDG, tal como a glicose, é fosforilada por hexocinases (Hk-II) resultando como produto  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfatase ( $^{18}\text{F}$ -FDG-6- $\text{PO}_4$ ). No entanto, não sofre mais nenhuma fosforilação, permanecendo deste modo no interior das células, saindo apenas por processos normais de difusão simples [10, 24, 25].

As células tumorais tendem a utilizar a glicose como principal substrato metabólico, apresentando geralmente uma maior actividade e por consequência maior captação de glicose do que as células normais. Assim, a  $^{18}\text{F}$ -FDG revela um papel preponderante na área da oncologia médica, quer na detecção, como no estadiamento e seguimento de tumores, recidivas e metástases, bem como da determinação do valor prognóstico. Permite a avaliação precoce dos resultados da terapêutica (dado que a informação funcional precede, largamente com frequência, à informação anatómica), providenciando um mapeamento local e regional da utilização da glicose ao longo de todo o corpo, onde áreas com maior actividade metabólica surgirão mais intensas do que as áreas com menor captação de glicose [10, 25, 26]. Pode também ser utilizado para caracterizar alterações morfológicas, diferenciando não só entre lesões malignas e benignas, mas também entre células tumorais viáveis e áreas de necrose e /ou fibrose resultantes de tratamentos. Esta técnica permite, em muitos casos, reduzir o número de cirurgias mal sucedidas, direccionando de imediato os doentes para tratamentos por quimio e radioterapia o que sobretudo os beneficia, mas também permite reduzir os custos finais [24, 27].

Apesar de todas estas aplicações, o PET-FDG revela falta de informação anatómica, o que impede em alguns casos a precisa localização da acumulação da  $^{18}\text{F}$ -FDG. Por outro lado, tumores com pouca ou nenhuma captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG poderão não ser visualizados por esta técnica. Deste modo, é usual

complementar-se a informação metabólica do PET-FDG com a informação anatómica de CT ou mesmo de MR [28, 29].

Apesar de este radiofármaco permitir realizar bons diagnósticos em tecidos com grande actividade metabólica, tal como tumores, o coração, o cérebro e também em doenças inflamatórias, é muito importante manter o doente o mais imóvel e relaxado possível para evitar a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG nos tecidos musculares, que são igualmente muito activos metabolicamente. A  $^{18}\text{F}$ -FDG é também absorvida por macrófagos e neutrófilos, o que pode originar falsos positivos, principalmente em áreas de inflamação e infecção que não se encontrem sob estudo. Doentes jovens podem, por outro lado, gerar falsos negativos devido à elevada captação de glicose por parte do cérebro, timo e músculo liso ou estriado. Falsos negativos podem também ocorrer quando um tumor tem um crescimento lento e absorve, por isso, menos quantidade de glicose [30].

O PET-FDG, apesar de apresentar uma baixa resolução espacial (aproximadamente 4 mm) continua a permanecer uma das técnicas de pesquisa com maior capacidade de acesso a informação fisiológica e bioquímica [31].

Este radiotraçador foi primeiramente sintetizado através de uma reacção de adição electrofílica, no entanto, nos dias de hoje, recorre a reacções de substituição nucleofílica (Figura 7). Estas reacções químicas envolvem a adição de uma molécula nucleofílica (elevada carga negativa) a uma molécula com um grupo livre. Neste caso, utiliza-se como precursor o triflato de manose (1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluormetanosulfonil- $\beta$ -D-manopiranoose) [6, 32].

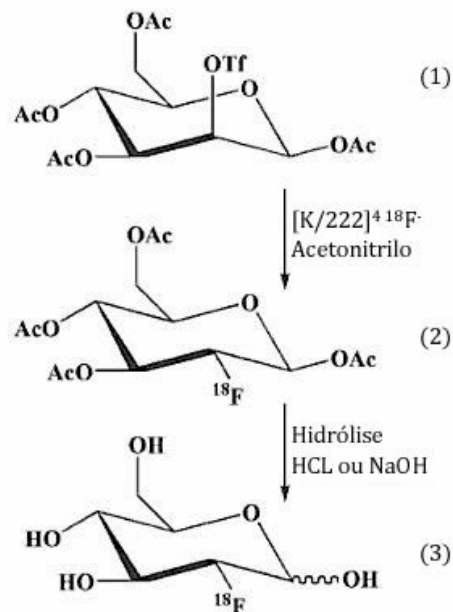


Figura 7. Processo de síntese da  $^{18}\text{F}$ -FDG [6].

Os carbonos 1,3,4 e 6 da molécula manose encontram-se protegidos por um grupo acetil e o triflato apresenta-se como o grupo livre no segundo carbono. Na presença de Kryptofix 222<sup>TM</sup> (amino-poliéter de potássio complexo) como catalisador e acetonitrilo como solvente, o  $^{18}\text{F}$  vai-se ligar ao segundo carbono da manose enquanto o grupo triflato abandona esta. Deste modo forma-se um composto intermediário, que irá originar a  $^{18}\text{F}$ -FDG final por hidrólise, recorrendo a uma base (NaOH) ou a ácido (HCl) [6, 32].

## 2.4 Métodos de análise e interpretação PET

Após a realização de um exame PET e obtenção das respectivas imagens, é necessário proceder a uma análise atenta e cuidada dos dados por parte dos clínicos responsáveis. Deste modo, efectua-se uma avaliação qualitativa puramente visual, fruto dos conhecimentos e experiências adquiridas. Porém, para uma melhor avaliação, é possível adicionar a esta interpretação qualitativa um índice quantitativo ou semi-quantitativo, adquirido computacionalmente pela análise das imagens PET. Essa análise computacional pode ser feita, de entre outros, por análise espectral, por MTGA (Multiple-Time Graphical Analysis) ou recorrendo ao FUR (Fractional Uptake Rate), também conhecido por índice de

retenção. No entanto, o índice utilizado com maior frequência, nomeadamente para FDG-PET, é o SUV (Standard Uptake Value) [33].

### 2.4.1 Standard Uptake Value

O SUV, também por vezes referido com DUR (Dose Uptake Ratio) é um índice semi-quantitativo, fácil de obter e amplamente utilizado em FDG-PET [34].

Esta técnica permite distinguir tecidos de alta e baixa malignidade, bem como diferenciar um tecido maligno de um benigno, recorrendo à análise do metabolismo da  $^{18}\text{F}$ -FDG [10]. É uma técnica que não requer amostra de sangue nem técnicas de imagem dinâmicas. Tem de ser realizado num instante específico do tempo, e sempre nesse preciso instante caso os resultados sejam para comparação [34].

Este índice representa a concentração de radioactividade por centímetro cúbico de tecido, sendo normalizado em função da actividade injectada (mCi ou MBq no instante  $t=0$ ) e da massa corporal do doente (em kg) [26, 34].

$$SUV = \frac{C_{PET(t)}}{Dose\ Injectada/Massa\ Corporal} \quad (mCi/ml\ ou\ kBq/ml)$$

Se a actividade fosse uniformemente distribuída no corpo, sem perdas, e corrigida para decaimento, o valor de SUV seria 1.

O SUV é normalmente calculado sobre uma ROI (Region of Interest) para cada imagem de uma série. É influenciado por diversos factores, o que torna a sua interpretação potencialmente errónea. Depende da selecção da ROI, da duração da aquisição, sendo também afectado pelo ruído e pela baixa resolução da imagem [35].

A resposta a tratamento de um tumor é geralmente avaliada através de FDG-PET, medindo no pixel de maior intensidade no slice com maior concentração radioactiva ( $SUV_{max}$ ), ou estabelecendo uma ROI fixa na área com maior captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $SUV_{peak}$ ). Por outro lado, o volume do tumor pode ser estimado usando um threshold adaptativo ou semi-adaptativo, calculando o SUV médio correspondente ao volume tumoral (GMTV) [34, 36].

O parâmetro SUV é assim uma medida útil para analisar imagens FDG-PET, sendo, no entanto, necessário ter cuidado com as suas limitações e respectivas interpretações de resultados. É também conveniente ter em conta que esta técnica ainda prevalece a outras, como por exemplo a FUR, devido à não necessidade de recorrer a amostras de sangue. Deste modo é importante para a técnica FDG-PET, fundamentalmente na área da oncologia, criar um novo método de análise da captação e distribuição de  $^{18}\text{F}$ -FDG, que seja mais eficiente e possa induzir menos erros [34].



# Capítulo 3

## 3. Aprendizagem Estatística e Reconhecimento de Padrões

A classificação de dados é por vezes complexa, não sendo possível separar classes de baixa dimensionalidade por serem geralmente muito semelhantes. Essas classes podem então ser separadas com um alto grau de precisão num espaço de alta dimensão recorrendo a classificadores não paramétricos, sendo exemplo disso o SVM (Support Vector Machine).

### 3.1. Support Vector Machine

SVM é uma técnica de aprendizagem supervisionada utilizada para classificação e regressão. Desenvolve e aplica algoritmos que permitem classificar e reconhecer padrões em diversos tipos de dados. Esta técnica revela importantes aplicações, tais como reconhecimento de caracteres e de faces, diagnósticos clínicos, supervisão de processos industriais e com maior relevância para este trabalho, a análise de imagens [37, 38].

As SVMs são baseadas na aprendizagem estatística e empregam o princípio da aprendizagem indutiva, no qual se obtêm conclusões genéricas a partir de um conjunto particular de exemplos. Por outro lado, é uma aprendizagem super-visionada, ou seja, pretende-se que a representação gerada seja capaz de reproduzir saídas correctas para novas entradas não conhecidas. Segundo este tipo de aprendizagem, dado um conjunto de exemplos do tipo  $(x_i, y_i)$ , em que  $x_i$  representa um exemplo e  $y_i$  a sua classificação, deve-se reproduzir um classificador capaz de prever qual a classe a que pertencem novos dados. Este processo é conhecido por treino. O

classificador final pode também ser visto como uma função  $f$ , a qual recebe um dado  $x$  e fornece uma previsão  $y$  [39, 40]. Todo este processo pode ser visualizado, de um modo genérico, na Figura 8.

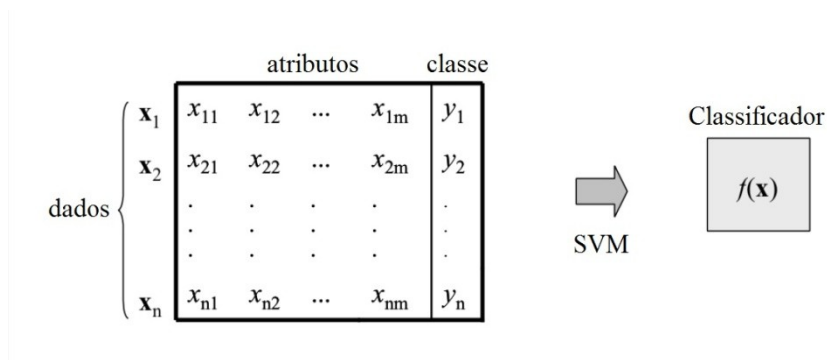


Figura 8. Modelo de um classificador de aprendizagem supervisionada [37].

Procura-se assim, entre todas as hipóteses que o algoritmo consiga gerar, a que melhor descreva o domínio em que ocorre a aprendizagem. No final é possível estimar uma taxa de previsões correctas e incorrectas obtidas pelo classificador perante novos dados (dados de teste). O classificador algorítmico (binário) é, geralmente, melhor descrito pelo cálculo da especificidade e da sensibilidade que apresenta,

$$Sensibilidade = \frac{VP}{VP+FN} \qquad Especificidade = \frac{VN}{VN+FP}$$

sendo VP o número de verdadeiros positivos, FN o número de falsos negativos, VN o número de verdadeiros negativos, e FP o número de falsos positivos.

Segundo a aprendizagem estatística, um conjunto de treino de padrões será linearmente separável se existir pelo menos um classificador linear definido pelo par  $(w,b)$  que classifique correctamente todos os padrões de treino. Este classificador é representado pelo hiperplano  $H$  ( $f(x) = w \cdot x + b = 0$ ) e define uma região para a classe +1 ( $w \cdot x + b > 0$ ) e outra para a classe -1 ( $w \cdot x + b < 0$ ). Idealmente, o hiperplano será equidistante das 2 classes [38, 41-43].



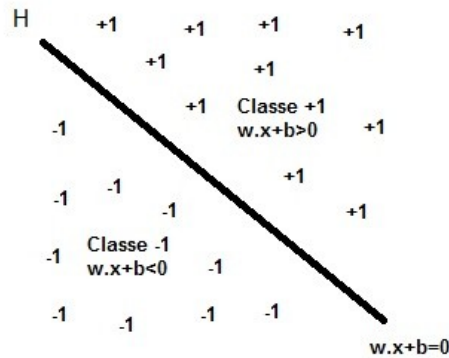


Figura 9. Hiperplano de separação das classes -1 e +1 [41].

Existem várias possibilidades de classificadores lineares que podem separar os dados, contudo, há apenas um que maximiza as margens, ou seja, a distância entre o hiperplanos e o ponto mais próximo de cada classe (Figura 9). Este hiperplano é designado por hiperplano óptimo de separação. Assim, esta fronteira é tida como a que maior capacidade apresenta para classificar correctamente novos exemplos, de um modo mais generalista [39, 43, 44].

Após o treino, o classificador será capaz de prever a classe a que pertencem novos exemplos, diferentes dos utilizados no treino. A classe de um exemplo  $x_k$  será determinada pela seguinte equação:

$$classe(x_k) \begin{cases} +1 & \text{se } w \cdot x_k + b > 0 \\ -1 & \text{se } w \cdot x_k + b < 0 \end{cases}$$

Assim, a classificação dos novos dados irá depender apenas do sinal da expressão  $w \cdot x + b$  [38, 39, 44].

A técnica SVM tem vindo a receber crescente atenção, cujos resultados são comparáveis, e muitas vezes superiores aos obtidos por outros algoritmos de aprendizagem, como as redes neuronais artificiais (ANN).

Enquanto a partir das ANNs podem resultar múltiplos mínimos locais, a solução obtida por SVM é global e única. Por outro lado, as SVMs revelam uma interpretação geométrica simples e uma solução esparsa. Contrariamente às ANNs, a complexidade computacional das SVMs não depende da dimensionalidade do espaço de entrada e recorrem à minimização do erro estrutural, enquanto as primeiras utilizam a minimização do erro empírico. As SVMs são também menos propícias a overfitting (sobre-ajustamento), um dos

maiores problemas das ANNs. O overfitting corresponde à perda de capacidade de prever correctamente as saídas relativas a pontos que não se encontrem no grupo de treino. Isto surge com o excesso de pesos relativamente aos que seriam necessários para a aprendizagem do problema e com o elevado número de épocas de treino. Contrariamente, pode também ocorrer underfitting (subajustamento), ou seja, o classificador ter uma baixa taxa de acerto, mesmo sobre o conjunto de treino, que se pode verificar quando, por exemplo, esses dados são pouco representativos ou quando o modelo de classificação utilizado é demasiado simples [39, 41, 42].

Na Figura 10 estão representados diferentes classificadores pelas fronteiras de decisão traçadas entre as classes.

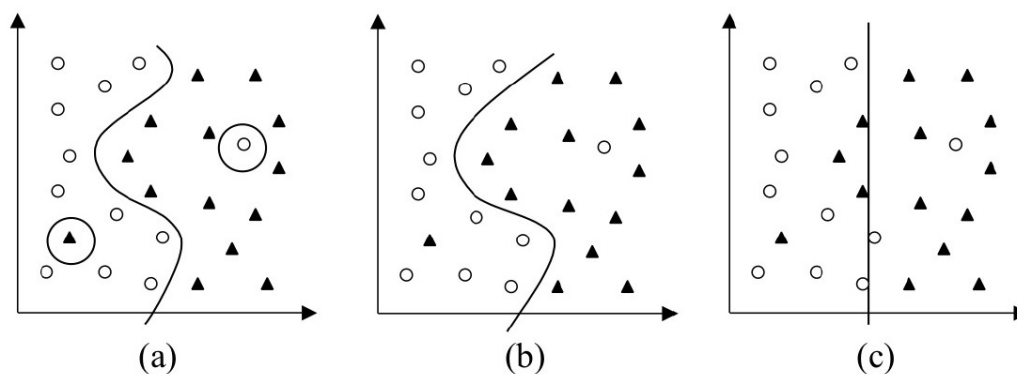


Figura 10. Diferentes tipos de fronteiras de classificação [37].

Na Figura 10 (a) está representada uma hipótese que classifica correctamente todos os exemplos do conjunto de treino, incluindo 2 possíveis ruídos. Sendo muito específica para o conjunto de treino, apresentará grande susceptibilidade a cometer erros na presença de novos dados. Ocorre assim um sobre-ajustamento. Na Figura 10 (c) estamos perante uma hipótese que comete muitos erros, mesmo para casos considerados simples. Ocorre assim um subajustamento, já que o classificador não consegue ajustar os próprios exemplos de treino. Entre estes 2 tipos de classificadores encontra-se o da Figura 10 (b), que apresenta complexidade intermédia e classifica correctamente grande parte dos dados, sem se fixar demasiado em qualquer ponto individual [37].

As técnicas de aprendizagem devem então ser robustas a ruído, já que estão presentes em muitos conjuntos de dados, bem como a presença de dados com atributos incorrectos. Deve-se evitar a obtenção de classificadores que se

fixem sobre esses casos, bem como minimizar a influência de dados aberrantes (outliers) no processo de treino.

SVMs lineares são eficazes na classificação de dados linearmente separáveis ou que apresentem uma distribuição aproximadamente linear. Contudo, na vida real, há muitos casos em que isso não acontece, em que os dados não são lineares ou se verifica presença de ruído ou outliers. Será então necessário recorrer a SVMs não lineares. Estas seguem o teorema de Cover, que afirma que um conjunto de dados não lineares no espaço de entradas (espaço original) pode ser transformado num espaço de características em que os dados são, com elevada probabilidade, linearmente separáveis. Para que isso aconteça, a transformação tem de ser não linear e a dimensão do espaço de características suficientemente alta. Por outro lado, como essa dimensão será elevada, a computação do mapeamento pode ser extremamente pesada, ou por vezes inviável. No entanto, a única informação necessária sobre o mapeamento é a de como realizar o cálculo de produtos escalares entre os dados no espaço de características. Isso pode ser obtido com funções Kernel, que determinam esses produtos escalares com simplicidade e permitem representar espaços abstractos [38, 39, 45].

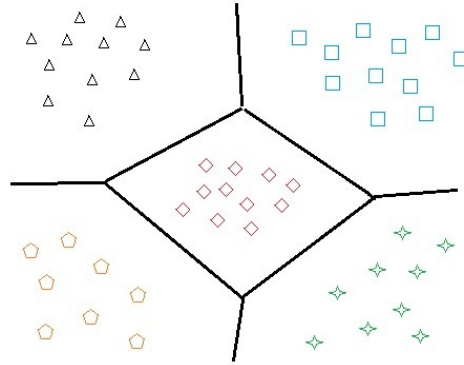
Alguns dos Kernel mais utilizados estão representados na Tabela 3. Cada um deles apresenta parâmetros a determinar pelo utilizador. A função polinomial com  $d=1$  torna-se linear.

Tabela 3. Funções Kernel utilizadas em SVM [37, 38, 42, 46, 46].

Tipo de Kernel	Função $K(x_i, x_j)$	Parâmetros
Polinomial	$(\delta(x_i \cdot x_j) + k)^d, \delta > 0$	$\delta, k$ e $d$
RBF	$\exp(-\sigma \ x_i - x_j\ ^2), \sigma > 0$	$\sigma$
Sigmoidal	$\tanh(\delta(x_i \cdot x_j) + k)$	$\delta$ e $k$

Estas funções são robustas perante dados de grandes dimensões, sobre os quais outras técnicas de aprendizagem normalmente obtêm classificadores super ou sub-ajustados. Na não linearidade das SVMs tornam o algoritmo eficiente, permitindo a construção de simples hiperplanos em espaços de alta dimensão, de forma aceitável em termos computacionais [38, 39, 42, 46].

Do mesmo modo que é possível separar dados em 2 classes, as SVM permitem também classificações em multi-classes, sendo exemplo disso a Figura 11.



**Figura 11. Classificação multi-classe.**

# Capítulo 4

## 4. Desenvolvimento do software

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados diversos volumes de imagens PET-FDG reais, de corpo inteiro, devidamente anonimizados, gentilmente cedidos pelo ICNAS.

Sendo a heterogeneidade um factor relevante na terapêutica tumoral faz sentido desenvolver este estudo sobre tumores que normalmente sigam essa via ao invés da cirurgia. Para os tumores que são sujeitos a ressecção cirúrgica o seu grau de heterogeneidade é irrelevante, uma vez que toda a sua massa será extraída. Deste modo, os algoritmos foram arquitectados e testados em imagens de tumores pulmonares, que são geralmente eliminados por radioterapia.

Os dados cedidos pelo ICNAS, em formato DICOM, constavam em 27 volumes de imagens PET-FDG, de corpo inteiro, de doentes com tumores pulmonares, e 32 volumes PET-FDG, de corpo inteiro, de indivíduos sem tumor. De todos estes volumes apenas alguns foram seleccionados para posterior análise e manipulação computacional.

### 4.1 Simulação computacional de lesões tumorais

Num primeiro passo deste trabalho desenvolveu-se um algoritmo, implantado numa interface simples e intuitiva, para simular tumores heterogêneos em imagens PET-FDG. Este algoritmo foi desenvolvido com o intuito de auxiliar o processo de teste e validação do classificador final de heterogeneidade tumoral, o qual representa o principal alvo deste trabalho. Uma vez que não se obtém com facilidade vários volumes de tumores reais com diferentes graus de heterogeneidade, esta rotina permitirá gerar lesões tumorais com características específicas, colmatando assim este entrave. Assim, uma

correcta validação desta rotina permitiria uma implementação mais rápida e precisa do classificador de heterogeneidade.

Esta rotina foi desenvolvida em Matlab® e adiciona lesões tumorais a volumes PET-FDG reais de corpo inteiro. Neste trabalho optou-se por adicionar as lesões tumorais apenas a volumes de imagens de doentes sem tumor, tal como o da Figura 12 A, sendo no entanto, também possível adicionar a volumes com tumores reais, sendo exemplo disso a Figura 12 B.

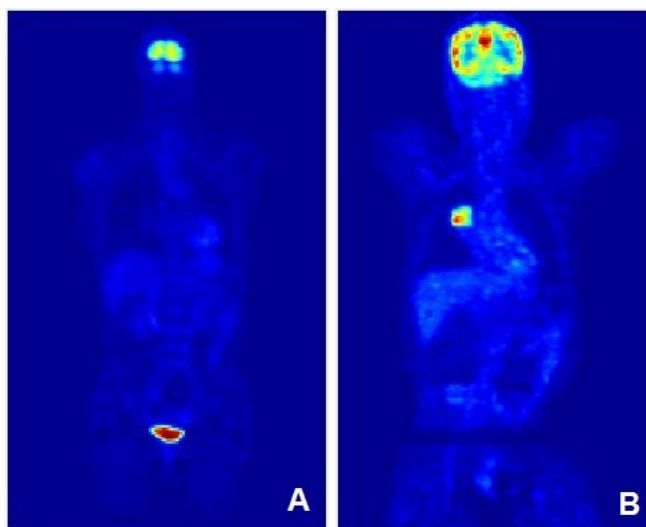


Figura 12. Cortes coronais de dois volume de imagens PET-FDG real de corpo inteiro. A - pessoa saudável; B - pessoa com um tumor pulmonar.

Na interface da Figura 13, o utilizador tem a capacidade de controlar diversos parâmetros como a localização exacta do tumor (ajustada segundo os 3 planos anatómicos: coronal, sagital e axial), o número de focos, o raio e o grau de intensidade do tumor, podendo este assumir três valores qualitativos, “Baixa”, “Média” ou “Elevada”.

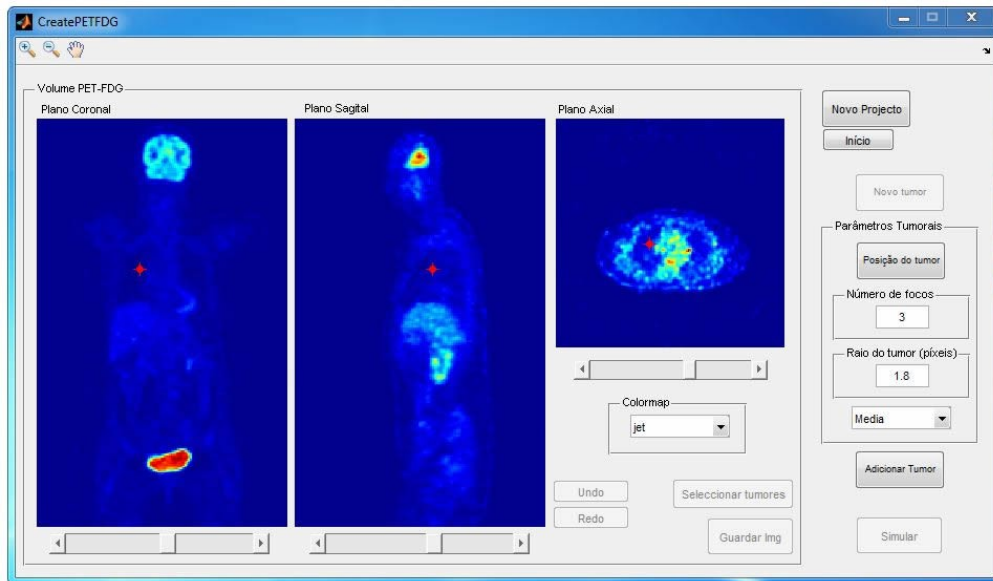


Figura 13. Interface de simulação de lesões tumorais.

Por sua vez, em função dos valores inseridos, o algoritmo irá definir aleatoriamente a distribuição, o raio e a sua variação em cada foco, gerando diferentes elipsóides e estabelecendo a orientação e o raio final do tumor (inserido pelo utilizador). Dependendo do grau de intensidade escolhido, o algoritmo estabelece o mínimo, o máximo e a respectiva variação de intensidade, recorrendo para isso ao valor do percentil 99 de cada volume de imagens utilizado. Evita assim grandes discrepâncias de intensidades entre o tumor gerado e o respectivo volume PET-FDG.

Tendo todos os anteriores parâmetros definidos, a simulação tumoral é obtida gerando círculos em imagens consecutivas do volume PET-FDG escolhido. A cada círculo é adicionado ruído (Poisson) para que os tumores não assumam um contorno linear, de modo a assemelharem-se o mais possível com a realidade. Com a combinação adequada dos círculos, com diferentes raios, intensidades e centros, é definida um elipsóide com uma orientação específica. Isto sucede-se para todos os focos de cada tumor, podendo-se facilmente, e em simultâneo, gerar vários tumores no mesmo volume de imagens. Finalmente, a imagem é submetida a um filtro média tridimensional por forma a que haja continuidade entre os diferentes cortes.

### 4.1.1 Validação

Com o algoritmo terminado e funcional foi elaborado um teste preliminar para a sua validação. Definiram-se dois grupos de imagens: um constituído por 11 volumes PET-FDG, de corpo inteiro, com tumores reais, e o outro por 23 volumes PET-FDG, de corpo inteiro, com tumores simulados. Procurou-se incluir nestes grupos vários tumores representativos de cada grau de heterogeneidade, de modo a obter uma análise mais equilibrada.

Efectuou-se um teste cego com 3 observadores com experiência na área de oncologia, aos quais foi pedido para analisarem as imagens e classificá-las consoante a sua veracidade e grau de heterogeneidade. Para o grau de heterogeneidade foi estabelecida uma escala par de 1 a 4, correspondendo o valor 1 a um tumor homogéneo e o valor 4 a um tumor extremamente heterogéneo. A escala par permite evitar a “escolha fácil” (o valor central da escala) por parte dos observadores, quando se depararem com um caso em que a heterogeneidade observada gere dúvida.

Os resultados relativos à veracidade dos tumores foram avaliados utilizando um índice (IV) definido pela soma dos falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), dividida pelo número total (T) de volumes PET-FDG:

$$IV = \frac{FP + FN}{T}$$

Os valores de heterogeneidade atribuídos foram comparados, definindo-se como graus de heterogeneidade finais as médias de todas as análises efectuadas a cada tumor. Estes valores são de extrema importância para o processo de treino do classificador final, tendo sido relevante a sua determinação por pessoas experientes na visualização deste tipo de imagens.

## 4.2 Classificação da heterogeneidade tumoral e auxílio à tomada de decisão

Uma vez desenvolvida a rotina de simulação tumoral, e devidamente validada, o presente trabalho incidiu no processo de classificação de heterogeneidade. Para isso recorreu-se à "Statistical Pattern Recognition



Toolbox for Matlab” (<http://cmp.felk.cvut.cz/cmp/software/stprtool/>), que fornece diversas técnicas estatísticas de aprendizagem e reconhecimento de padrões, sendo de especial interesse, para este estudo, o Support Vector Machine.

Um processo de aprendizagem supervisionada implica, numa fase inicial, a definição de um conjunto de dados de treino, e deles extrair características suficientemente representativas da totalidade do grupo. Todo esse processo de extracção de características dos volumes PET-FDG foi auxiliado pela interface ilustrada na Figura 14, a qual desempenha o papel final de classificador de heterogeneidade tumoral. Esta interface permite carregar cada volume de imagens, reconstruindo-o e apresentando-o inicialmente segundo o seu plano coronal. Procede-se de seguida à selecção de uma ROI que permita isolar o tumor. Esta ROI irá restringir o volume de imagens apenas às que englobam o tumor, sendo de seguida apresentado o seu plano sagital. Definindo novamente uma ROI em volta do tumor consegue-se um isolamento tridimensional do mesmo. O volume daí resultante é constituído por um número reduzido de imagens e de menor dimensão que as iniciais representando, no entanto, toda a informação relevante e que permite analisar de forma cuidada o tumor em causa.

Ao volume isolado é automaticamente aplicado um filtro passa baixo (Gaussian) de modo a eliminar parte do ruído e suavizar as imagens. É então calculada a média de todos os valores de intensidade do volume que sejam superiores ao seu percentil 85, e todos os pontos das imagens que sejam inferiores a esse valor são colocados a 0, ficando representada apenas a massa tumoral. O percentil 85, determinado empiricamente, é aquele que em média permite isolar a massa tumoral de modo mais eficaz, sem se perder informação relevante.

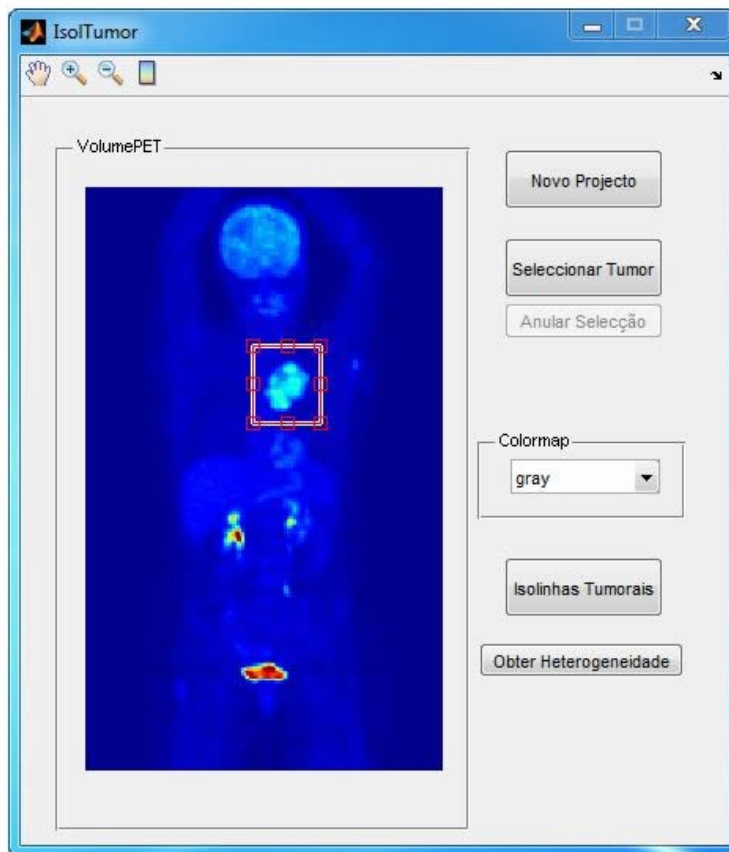


Figura 14. Interface de selecção e classificação da heterogeneidade tumoral.

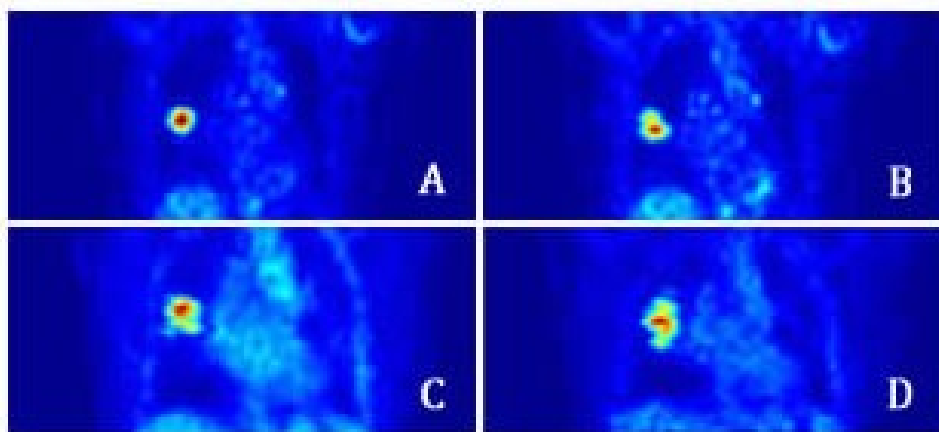
As características do grupo de treino e de teste foram extraídas de imagens assim processadas, a partir das quais se construiu o classificador. O classificador desenvolvido foi incorporado na mesma interface e recebe de imediato todos os dados do tumor, efectuando uma análise e classificação rápidas.

#### 4.2.1 Definição das características de treino

Num primeiro passo, foram calculadas projecções de cada volume, resultantes da soma de todos os valores de intensidade do tumor, segundo os planos coronal, sagital e axial. Em cada uma destas projecções foi determinado o número de máximos regionais. Obtém-se desde logo três parâmetros de treino, uma vez que a heterogeneidade de um tumor varia por norma consoante o seu número e distribuição dos máximos de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG.

Uma vez que um tumor de maior volume tem maior potencial de ser mais heterogéneo, estabeleceu-se também como parâmetro de treino o tamanho, em voxels, de cada tumor isolado.

Por outro lado, para se obter uma classificação mais direccionada, foram gerados 4 tumores (Figura 15), representando cada um deles uma heterogeneidade típica dos diferentes valores da escala definida (valores de 1 a 4).



**Figura 15. Modelos de tumores simulados representativos dos diferentes graus de heterogeneidade. A - Modelo de heterogeneidade de grau 1; B - Modelo de heterogeneidade de grau 2; C - Modelo de heterogeneidade de grau 3; D - Modelo de heterogeneidade de grau 4.**

A cada um destes modelos, após o devido isolamento, foi aplicada uma transformada discreta de Fourier (FFT).

Efectuou-se o mesmo procedimento para os dados de treino obtendo-se, em ambos os casos, matrizes com as mesmas dimensões (128x128x128). De modo a perceber a similitude para cada um dos quatro modelos tumorais calculou-se o coeficiente de correlação (no espaço frequência) entre o tumor em causa e cada um dos modelos criados. Estes valores encontram-se representados na Figura 26.

Resumindo, para caracterizar um dado tumor utilizam-se, então, oito atributos (3 respeitantes ao número de máximos em cada projecção, 4 resultantes da correlação com os modelos tumorais e o volume do tumor) que constituem o vector de propriedades usado no conjunto de treino do classificador final.

### 4.2.2 Construção do classificador

Como conjunto de treino foi definido um grupo de 20 volumes tumorais, alguns simulados e outros reais, dos quais foram extraídos os 8 atributos anteriormente explanados. A classe de cada tumor foi previamente estabelecida aquando da validação do algoritmo de simulação de lesões tumorais. Definiu-se assim um conjunto equilibrado, com tumores de todos os tipos de grau de heterogeneidade.

Uma vez que não se está perante uma simples classificação binária, mas sim uma multi-classe, recorreu-se a uma decomposição *One-Against-All* para SVM (oaasvm). Este método transforma um problema multi-classe numa série de subtarefas que podem ser treinadas por uma SVM binária. Por outro lado, compensa a existência de poucos dados de treino.

Após a construção do classificador, este é testado e validado com 14 volumes tumorais, sendo comparados os resultados com a classificação efectuada pelos observadores. Deste modo, é calculada a especificidade e sensibilidade, parâmetros que definem a qualidade do classificador.

### 4.2.3 Isolinhas Tumorais

Para além do índice de heterogeneidade tumoral fornecido pelo classificador, foi adicionado à interface da Figura 14 uma funcionalidade que pode em muito beneficiar a tomada de decisão de um clínico, quer no planeamento terapêutico quer na avaliação da resposta do tumor a um tratamento. Esta funcionalidade consta na representação de todos os cortes coronais, sagitais e axiais do tumor sob a forma de isolinhas de intensidade. Ou seja, cada isolinha representa valores de intensidade muito próximos, o que permite ao observador ter uma visão mais pormenorizada da constituição de todo o tumor (Figura 34).

# Capítulo 5

## 5. Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos para cada algoritmo desenvolvido, bem como para os respectivos testes de validação.

### 5.1 Algoritmo de simulação dos tumores

Na Figura 16 é possível observar o resultado de uma simulação de lesão tumoral. Na Figura 16 A encontra-se um corte coronal de um volume de imagens PET-FDG real, de uma pessoa sem tumor pulmonar. Neste volume foi gerada uma lesão no pulmão direito (Figura 16 B) definindo como parâmetros de simulação: raio = 2.3; número de focos = 3; intensidade = "Média". Neste exemplo, obteve-se um tumor homogêneo uma vez que se definiu um número de focos relativamente reduzido ficando todos muito próximos. No entanto, é possível observar que o tumor gerado apresenta uma forma e um contorno irregular, típico de um tumor real. A sua localização é uma das frequentes num tumor pulmonar, encontrando-se na região dos brônquios, uma das mais propícias a desenvolver este tipo de patologia.

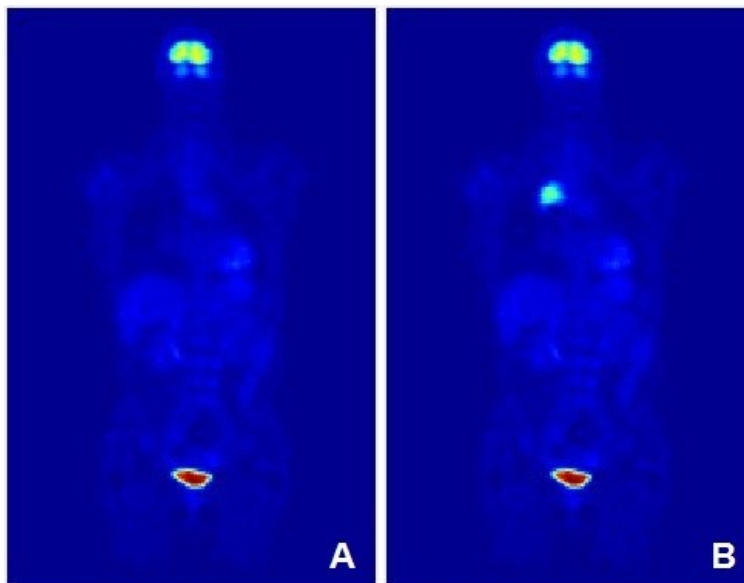


Figura 16. Volume de imagens reais de uma pessoa saudável (A) e respectiva simulação de lesão tumoral (B).

De seguida, são apresentados mais exemplos de tumores simulados, sendo de notar as diversas diferenças entre eles, desde o tamanho, forma, intensidade, localização e grau de heterogeneidade. Em cada um deles é apresentado um corte coronal (à esquerda) e um sagital (à direita) do respectivo tumor.

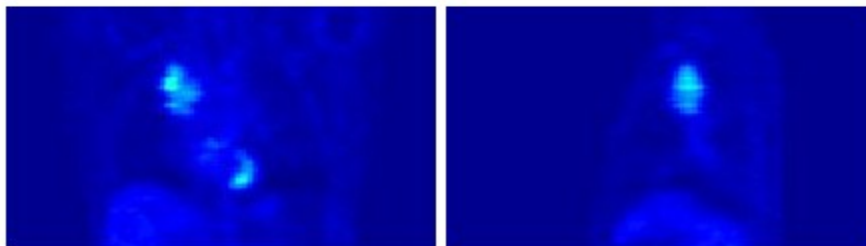


Figura 17. Tumor simulado no pulmão direito, bastante heterogéneo e de baixa intensidade.

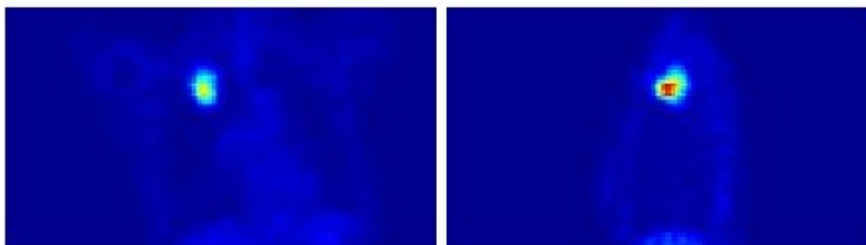


Figura 18. Tumor simulado no pulmão direito, heterogéneo e de elevada intensidade.

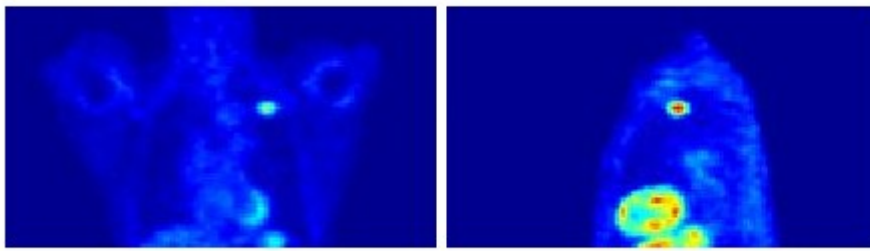


Figura 19. Tumor simulado no pulmão esquerdo, homogéneo e de elevada intensidade.

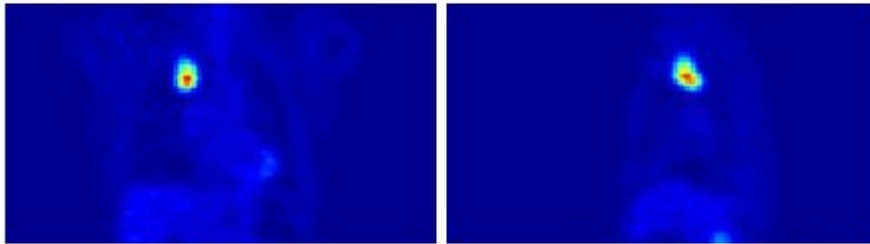


Figura 20. Tumor simulado no pulmão direito, pouco heterogéneo e de elevada intensidade.

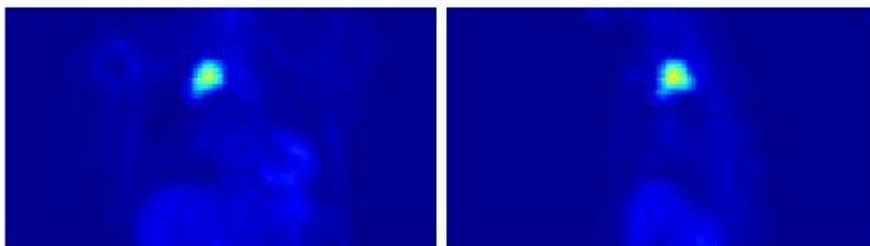


Figura 21. Tumor simulado no pulmão direito, pouco heterogéneo e de intensidade média.



Figura 22. Tumor simulado no pulmão direito, heterogéneo e de baixa intensidade.

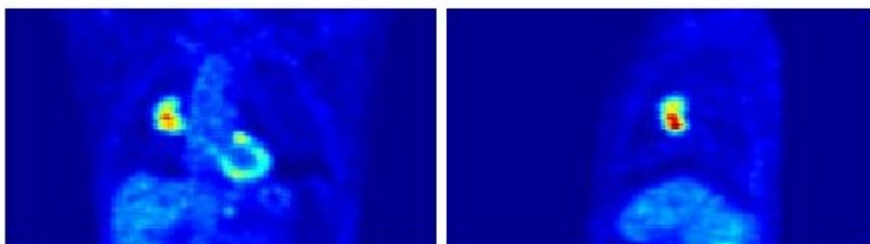


Figura 23. Tumor simulado no pulmão direito, heterogéneo e de elevada intensidade.

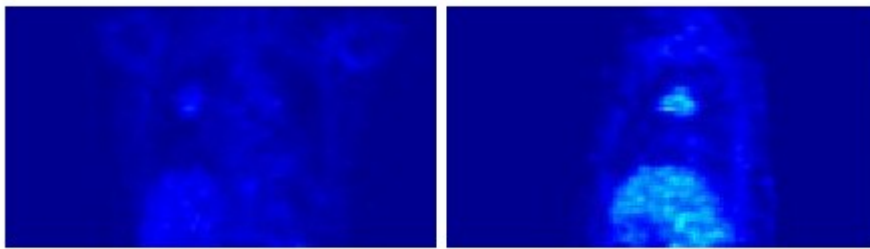


Figura 24. Tumor simulado no pulmão direito, heterogéneo e de baixa intensidade.

Como é possível observar, pelos exemplos anteriores, o algoritmo desenvolvido possibilita a simulação de tumores com características bastante diversificadas, de pequenas a grandes dimensões, de baixa a elevada intensidade, de homogéneos a bastante heterogéneos, de forma regular a disformes e, não menos importante, a suas localizações.

## 5.2 Validação do algoritmo de simulação

Após a definição dos 34 volumes para validação do algoritmo de simulação, foi efectuada a sua análise por 3 observadores previamente treinados na utilização da interface de visualização e familiarizados com o respectivo tipo de imagens. Os valores obtidos em cada exame são representados na Tabela 4. A classificação é feita em escala binária, correspondendo o valor “1” a um tumor real e o valor “0” a um tumor simulado. Assim, a cada exame está atribuída a classificação verdadeira e as respectivas avaliações dos 3 observadores em causa.



Tabela 4. Resultados obtidos da avaliação de veracidade dos tumores presentes em cada volume de imagens de teste, por parte de 3 observadores.

Exame	Real	Observadores			Exame	Real	Observadores		
		1	2	3			1	2	3
<b>1</b>	1	1	1	1	<b>18</b>	0	0	1	0
<b>2</b>	1	0	0	0	<b>19</b>	1	0	1	1
<b>3</b>	1	1	1	1	<b>20</b>	1	0	0	0
<b>4</b>	1	1	1	0	<b>21</b>	0	0	0	0
<b>5</b>	1	0	0	0	<b>22</b>	0	0	1	0
<b>6</b>	0	0	1	0	<b>23</b>	0	1	0	0
<b>7</b>	0	0	1	1	<b>24</b>	0	1	1	0
<b>8</b>	1	1	1	0	<b>25</b>	0	0	1	0
<b>9</b>	0	0	1	0	<b>26</b>	0	0	0	1
<b>10</b>	0	0	0	1	<b>27</b>	0	0	1	0
<b>11</b>	0	0	0	1	<b>28</b>	0	0	0	1
<b>12</b>	1	1	1	1	<b>29</b>	0	0	0	0
<b>13</b>	1	0	1	0	<b>30</b>	0	1	1	0
<b>14</b>	1	0	0	0	<b>31</b>	0	0	0	0
<b>15</b>	0	1	1	0	<b>32</b>	0	1	0	0
<b>16</b>	0	0	0	1	<b>33</b>	0	1	1	1
<b>17</b>	0	0	0	1	<b>34</b>	0	1	1	1

Pelos dados da Tabela 5, observa-se que as avaliações efectuadas variam de observador para observador, havendo sempre a tendência de classificar alguns tumores reais como simulados e vice-versa. A Tabela 4 revela que em poucos dos casos a análise é consensual e feita de modo correcta. Apenas 3 dos tumores reais (tumores 1, 3 e 12) foram classificados correctamente por todos os observadores, assim como 3 simulados (tumores 21, 29 e 31) classificados por todos como tal. Deste modo, a maior parte dos tumores simulados foi avaliada como sendo real por pelo menos um dos observadores do estudo. A proximidade entre os tumores reais e simulados originou hesitações nas decisões, e em alguns dos casos o permanecer da dúvida, quer nos reais, bem como nos simulados.

Para cada um dos observadores é apresentado de seguida o índice IV relativo à classificação dos tumores em “reais” ou “simulados”, assim como a percentagem de tumores reais e simulados classificados erroneamente.

**Tabela 5. IV da avaliação de cada observador e respectivas percentagens de tumores reais e simulados classificados de modo errado.**

	<b>Observador 1</b>	<b>Observador 2</b>	<b>Observador 3</b>
<b>IV</b>	0.38	0.47	0.47
<b>% Reais errados</b>	55	36	64
<b>% Simulados errados</b>	30	52	39

O número de falsos positivos e negativos para cada observador é diferente, mas o índice IV é bastante próximo sugerindo dificuldade na distinção entre tumores simulados e reais.

## **5.3 Classificação da heterogeneidade**

### **5.3.1 Pré-processamento: isolamento e filtragem**

Na análise computacional dos tumores, o pré-processamento de cada volume, realizado na interface da Figura 14, possibilitou uma análise mais simples e rápido dos mesmos, eliminando a maioria do ruído e restringindo as imagens à massa tumoral. Isto é visível na Figura 25, onde o tumor é consideravelmente mais fácil de analisar após o pré-processamento (B). Em A existe ruído e excesso de informação que pode interferir directamente com a extracção das características de entrada do classificador.

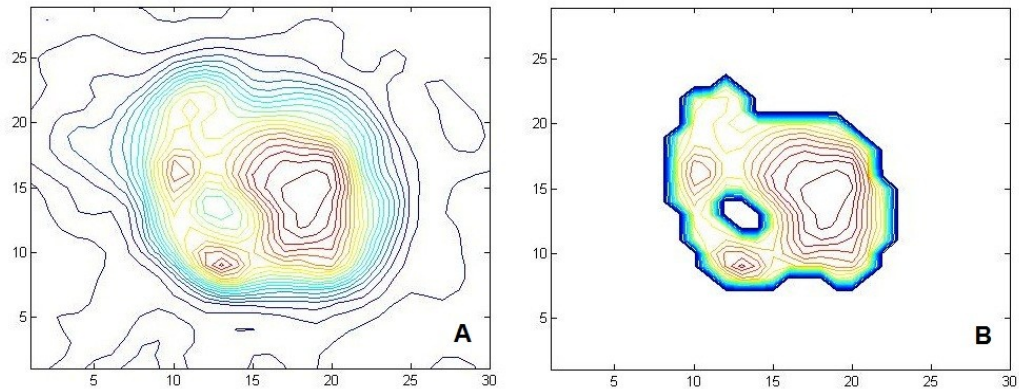


Figura 25. Isolinhas de intensidade de um corte axial de um tumor; A - Sem pré-processamento, B - Com pré-processamento.

### 5.3.2 Correlação entre o tumor e os modelos apropriados

Ao gerar os 4 modelos tumorais procurou-se estabelecer uma hierarquia de correlação entre eles. Com isto pretende-se, por exemplo, que o modelo 1 esteja mais correlacionado com o modelo 2 do que com os restantes, havendo uma maior proximidade entre modelos lado a lado. Na Figura 26 é possível comparar os índices de correlação entre as transformadas de Fourier de todos os modelos.

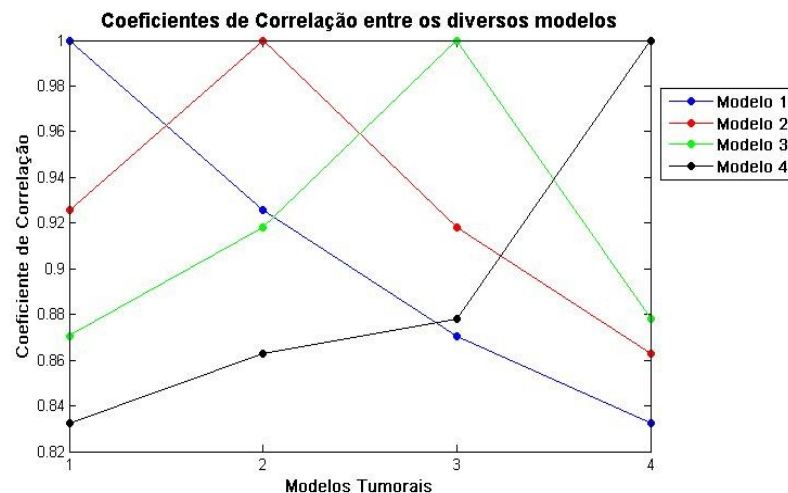


Figura 26. Coeficientes de correlação entre as transformadas de Fourier dos diversos modelos tumorais.

Como é de esperar, o coeficiente de correlação entre cada modelo consigo mesmo é 1. A par disto, observa-se que o modelo 1 revela uma sucessiva diminuição do coeficiente de correlação à medida que se dirige para o

modelo 4, e vice-versa. O modelo 2 apresenta uma maior correlação com o modelo 1 e 3, e o modelo 3 com o 2 e o 4. Em todos os casos os modelos encontram-se bem separados, não havendo nenhum coeficiente de correlação, entre diferentes modelos, demasiado próximo de 1.

### 5.3.3 Vector de atributos e classificação

Estando todo o conjunto de treino e respectivos atributos definidos (por um classificador humano) atribuiu-se a cada um deles, por ordem do exame, um grau de heterogeneidade (de 1 a 4), estabelecendo assim o vector de entrada do classificador.

Procedeu-se do mesmo modo para o conjunto de teste.

Estes vectores são identificados a seguir por “Vector Treino” e “Vector Teste”. Enquanto que o primeiro permite construir o classificador com base nas características extraídas de cada volume, o segundo é utilizado para avaliar a eficácia do classificador, comparando os resultados obtidos pelo classificador computacional no grupo de teste com os definidos pelo classificador humano.

$$\textit{Vector Treino} = [1\ 2\ 4\ 1\ 2\ 1\ 2\ 1\ 4\ 3\ 3\ 4\ 4\ 1\ 3\ 2\ 2\ 4\ 3\ 3]$$

$$\textit{Vector Teste} = [2\ 3\ 4\ 2\ 3\ 1\ 2\ 1\ 1\ 1\ 3\ 1\ 2\ 3]$$

O classificador foi construído recorrendo a uma decomposição *One-Against-All* para SVM, utilizando Kernel RBF (Radial Basis Function) e uma constante de regularização igual a 10. Apesar de outros conjuntos de parâmetros terem sido testados, verificou-se que não eram tão eficazes como os referidos anteriormente.

Após o treino e definição do classificador computacional, procedeu-se ao teste utilizando-se para tal o grupo de teste. Os resultados obtidos encontram-se resumidos no vector “Resultado Teste:”

$$\textit{Resultado Teste} = [2\ 4\ 4\ 1\ 4\ 1\ 2\ 1\ 1\ 1\ 4\ 1\ 2\ 4]$$

Interessa pois comparar os resultados obtidos computacionalmente com os definidos inicialmente pelo classificador humano. A Figura 27 mostra para cada exame a “classificação humana” (barra azul) e a classificação computacional (barra vermelha).

Para além disso, o classificador foi também testado com o próprio conjunto de treino, obtendo-se o vector “Resultado Treino”.

$$\text{Resultado Treino} = [1\ 2\ 4\ 1\ 2\ 1\ 2\ 1\ 4\ 3\ 3\ 4\ 4\ 1\ 3\ 2\ 2\ 4\ 3\ 3]$$

O “Resultado Treino” pode ser comparado com o “Vector Treino” na **Erro!**  
A origem da referência não foi encontrada.

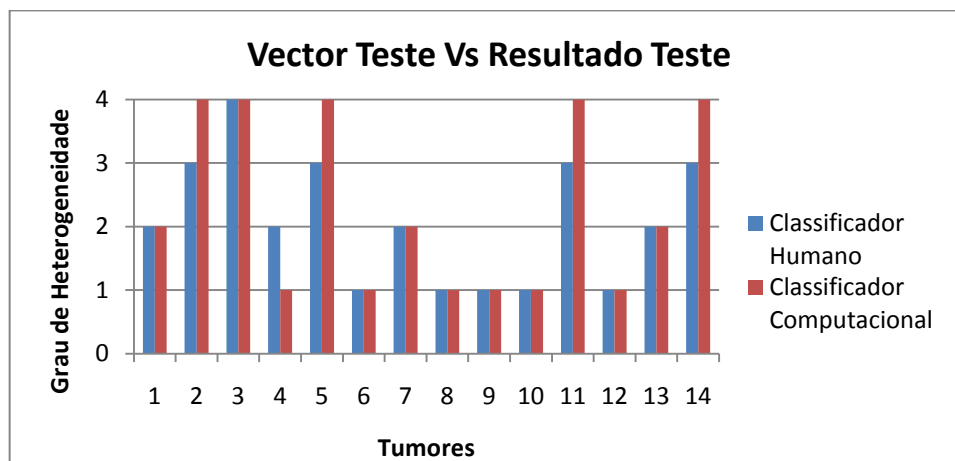


Figura 27. Comparação da classificação definida inicialmente para o grupo de teste (Vector Teste), com os resultados obtidos pelo classificador (Resultado Tese).

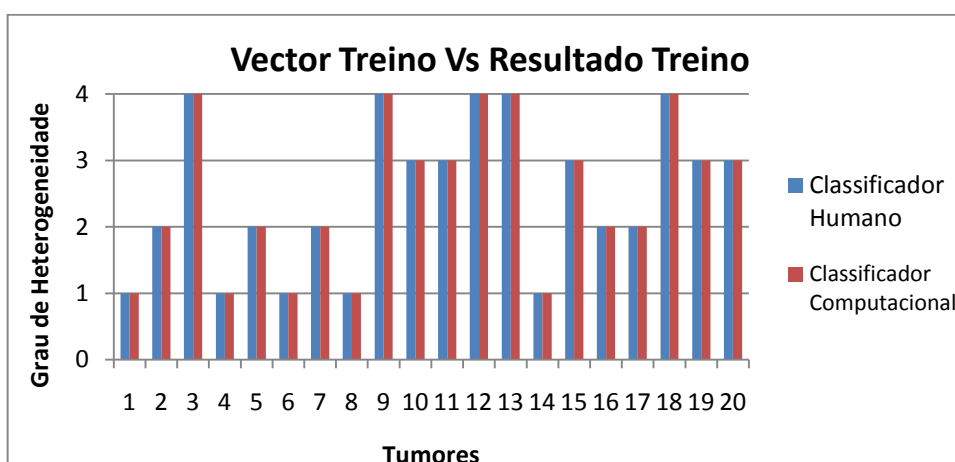


Figura 28. Comparação da classificação definida inicialmente para o grupo de treino (Vector Treino), com os resultados obtidos pelo classificador (Resultado Treino).

A partir destes resultados é possível avaliar a eficácia do classificador e calcular a sua sensibilidade e especificidade. No entanto, o classificador não fica caracterizado de forma definitiva, uma vez que resultam de grupos de treino e teste reduzidos, 20 e 14 exemplos, respectivamente.

Testando o classificador com o conjunto de exames de treino, observa-se que ele classifica correctamente todos os tumores (Figura 28), ou seja, o “Resultado Treino” coincide com o “Vector Treino”. Como tal, considera-se não haver problemas de sub-ajustamento, uma vez que o classificador consegue classificar correctamente os dados de treino. Por outro lado, testando com o grupo de teste, até então desconhecido para o classificador, este avaliou correctamente 9 dos 14 exames em questão, atribuindo um grau de heterogeneidade diferente do esperado apenas nos tumores 2, 4, 5, 11 e 14 (Figura 27). De um modo global, e apesar do reduzido grupo de teste, o classificador atribui correctamente o grau de heterogeneidade a 64% dos exemplos, sendo de realçar que apenas diferiu numa unidade em todos os classificados incorrectamente. Após esta análise é possível, ainda que de modo limitado, avaliar o comportamento do classificador perante cada tipo de tumor, ou seja, para cada grau de heterogeneidade específico. Assim, na Tabela 6 são apresentadas a especificidade e sensibilidade para cada grau de heterogeneidade em concreto. Para cada avaliação assume-me uma classificação binária, atribuindo o valor “1” ao grau de heterogeneidade em estudo e “0” a todos os restantes.

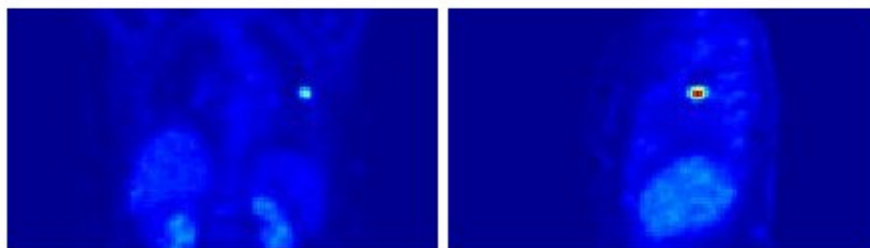
Tabela 6. Valores de especificidade e sensibilidade do classificador para cada grau de heterogeneidade.

<b>Grau de Heterogeneidade</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>
<b>1</b>	89	100
<b>2</b>	100	75
<b>3</b>	100	0
<b>4</b>	69	100

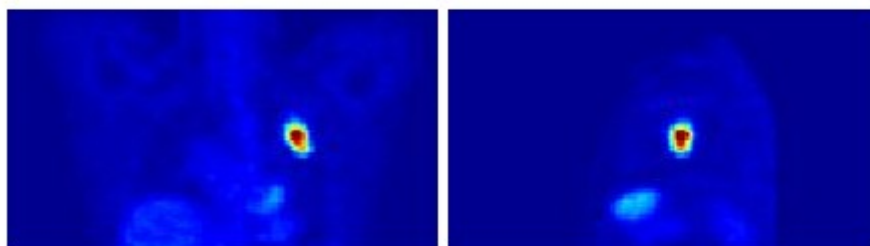
Pelos valores de sensibilidade observa-se que o classificador classificou correctamente todos os tumores de grau 1 e 4, tendo, no entanto, grande dificuldade em classificar os tumores de heterogeneidade 3, já que os assumiu todos como grau 4. Isto conduz de imediato a uma diminuição da especificidade na classificação de tumores de grau 4. É ainda de salientar a elevada especificidade relativa à heterogeneidade 2, não classificando como tal nenhum

dos tumores que na realidade sejam de heterogeneidade 1, 3 ou 4. De um modo geral, o classificador lida melhor com tumores de grau 1 e 2, apresentando uma boa sensibilidade para tumores de grau 4, mas em contrapartida uma menor especificidade. A maior debilidade está presente no reconhecimento de tumores de grau 3. Isto poderá resultar da proximidade dos tumores de grau 3 e 4 utilizados no grupo de treino, havendo dificuldade em distinguir ambos. Este problema poderá ser contornado com o aumento de exemplos de heterogeneidade 3 e 4 no grupo de treino, permitindo assim uma maior especificação das características de cada um. Apesar de toda esta análise, os resultados são preliminares, podendo ser melhorados no futuro, definindo um grupo de treino de maior cardinalidade e representatividade.

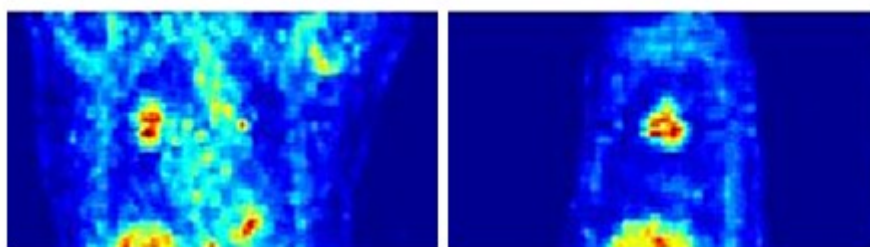
Na Figura 30, Figura 31 e Figura 31 visualizam-se 3 dos tumores de teste bem classificados, correspondendo o lado esquerdo ao plano coronal e o direito ao sagital dos respectivos volumes.



**Figura 29. Tumor homogéneo (grau 1) bem classificado.**



**Figura 30. Tumor heterogéneo, de grau 2, bem classificado.**



**Figura 31. Tumor heterogéneo, de grau 4, bem classificado.**

De seguida são apresentados 2 exemplos dos tumores de teste classificados de modo incorrecto (Figura 32 e Figura 33). Ambos foram classificados como grau 4, sendo na realidade de grau 3. Como referido anteriormente, estes tumores poderão apresentar características relativamente próximas do grau de heterogeneidade superior, induzindo o classificador em erro.

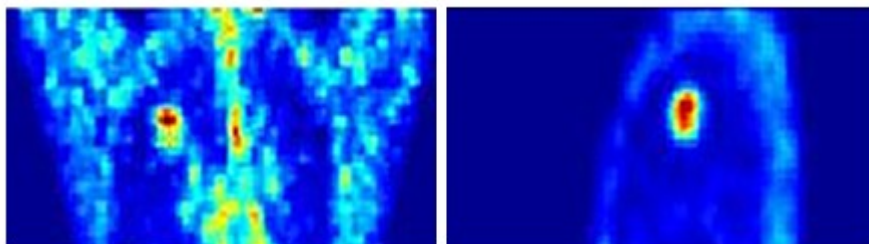


Figura 32. Tumor heterogéneo, de grau 3, classificado como sendo de grau 4.

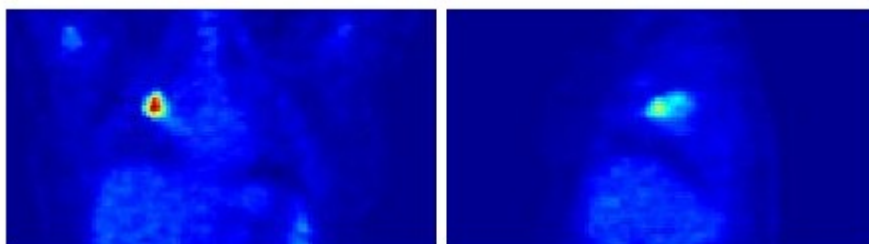
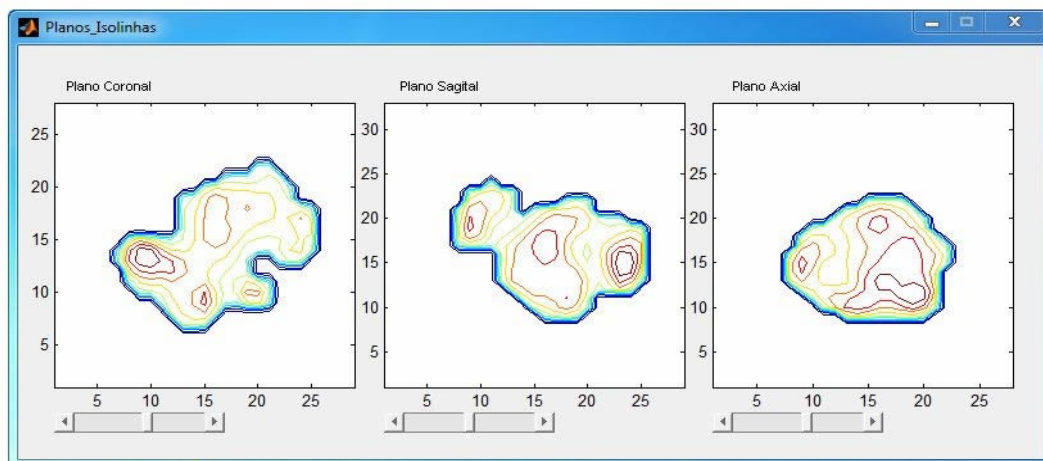


Figura 33. Tumor heterogéneo, de grau 3, classificado como sendo de grau 4.

## 5.4. Avaliação por isolinhas

Como auxílio à análise da heterogeneidade tumoral foi desenvolvido uma pequena rotina que permite visualizar o tumor segundo 3 planos diferentes, coronal, sagital e axial. Essa rotina gera uma janela como a da Figura 34, que possibilita a visualização de todos os cortes tumorais segundo cada plano, apresentando-os na forma de isolinhas de intensidade. As isolinhas simplificam cada imagem e facilitam a sua análise visual, distinguindo-se bem os contornos tumorais e as grandes variações de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Este tipo de dados pode-se revelar bastante útil em radioterapia, na tomada de decisão sobre a terapia e dose a utilizar, bem como na avaliação da resposta do tumor ao tratamento. Assim, permitiria uma terapia mais focada, combinando se necessário várias técnicas, eliminando a totalidade da massa tumoral de modo mais eficaz e num período de tempo mais reduzido.





**Figura 34. Visualizador das isolinhas de intensidade de vários cortes segundo o plano coronal, sagital e axial.**



# Capítulo 6

## 6. Discussão e Conclusões

O algoritmo de simulação tumoral pode evitar a constante cedência de volumes PET-FDG pelas entidades responsáveis e permite reproduzir tumores com características desejadas, principalmente o grau de heterogeneidade, o que por vezes não é fácil de obter na realidade. Ou seja, a constituição de bases de dados de elevado número de exames torna-se simples e acessível, o que é preponderante no teste e validação de classificadores sintéticos. Por outro lado, a possibilidade de controlo na simulação de tumores reais pode ser explorada no treino de observadores humanos (e.g. no ensino médico).

Contudo, a própria simulação apresenta alguns aspectos críticos que devem ser tidos em consideração. É estritamente necessário ter o maior cuidado a seleccionar a localização do tumor simulado para que este se assemelhe o mais possível a um real. Do mesmo modo, a escolha do raio tumoral deve ser bem ponderada. Assim, o bom resultado de uma simulação passará por uma correcta escolha dos parâmetros por parte do utilizador.

Apesar da validação preliminar (própria de um estudo piloto), apresentada no presente trabalho, apontar para o sucesso da rotina, deve ter-se em conta que a mesma deveria ser mais rigorosa para ser cabalmente aceite pela comunidade científica. Por um lado, a validação carece de uma base de dados com um maior conjunto de exames de teste, e por outro, o número de observadores também deveria ser maior, os quais deveriam ser especialistas em tumores pulmonares. Estes teriam de adquirir um treino mais intenso, e se possível, realizar o teste mais que uma vez, de modo a avaliar não só a consistência inter-observadores, bem como a intra-observadores. No entanto, devido a problemas de recursos humanos e essencialmente de calendário, não foi possível realizar a devida validação com a exigência requerida. Apesar disto,

podemos considerar os resultados positivos, uma vez que o grupo de teste causou aos observadores grandes dificuldades na distinção entre tumores reais e simulados, sendo grande parte destes espontaneamente tomados como reais. Estes resultados, apesar de precoces, não irão ter influência directa no classificador de heterogeneidade, uma vez que este, independentemente da entrada, mantém sempre a sua consistência interna. Relembrar que a definição última do classificador é apenas obtida após o treino do mesmo, pelo que depende do vector de entrada. Isto permite-lhe obter resultados apenas em função dos dados fornecidos, assim, esperamos que o classificador esteja de igual modo operacional perante a possibilidade de se realizar uma melhor validação do algoritmo de simulação, e por conseguinte, estabelecer resultados mais fidedignos.

Este classificador irá sempre depender do processo de aquisição das imagens PET-FDG. Se a aquisição não for correcta a captação e distribuição de FDG nas imagens poderão não coincidir com a realidade, levando a um resultado por parte do classificador diferente do esperado, e a uma avaliação errada do estado do doente por parte do observador. Por outro lado, um tumor pode ser funcionalmente homogéneo, e no entanto, apresentar uma morfologia heterogénea, ou mesmo revelar uma região de necrose. Este tipo de tumor irá revelar uma captação e distribuição de FDG heterogénea, mas apenas resultante da sua anatomia, o que não será entendido pelo classificador, que irá desta forma contra o conceito de heterogeneidade estabelecido neste trabalho. Deste modo, para minimizar este possível erro seria interessante adicionar como objecto de análise a informação anatómica proveniente das respectivas imagens de transmissão (CT). Estas permitiriam uma comparação dos resultados e avaliar efectivamente a veracidade da heterogeneidade tumoral revelada nas imagens PET-FDG. Calculando, tal como para as imagens PET-FDG, a distribuição das isolinhas tumorais seria possível confirmar se o tumor é realmente heterogéneo ou homogéneo. Se essa distribuição nas imagens de atenuação coincidir com a dos dados PET-FDG, a classificação da heterogeneidade estaria incorrecta, uma vez que essa heterogeneidade seria anatómica e não funcional como se pretende. Por outro lado, se a distribuição das isolinhas das imagens PET-FDG indicar que estamos perante um tumor heterogéneo, isso seria rapidamente validado se os resultados da atenuação revelassem uma anatomia homogénea, e por conseguinte, uma estrutura funcional heterogénea.

Tal como o processo de validação da rotina de simulação de lesões tumorais, a construção do classificador de heterogeneidade, nomeadamente o conjunto de treino, carece de exemplos uma vez que foram utilizados apenas 20 volumes de imagens. Do mesmo modo, o conjunto de teste, constituído por 14 volumes poderá não caracterizar o classificador da forma mais completa. No entanto, perante os dados existentes, obtiveram-se resultados positivos, uma vez que o classificador avaliou correctamente grande parte dos tumores. Revelou diferentes capacidades para classificar os vários graus de heterogeneidade, apresentando melhores resultados perante tumores de grau 1 e 2, e dificuldades em classificar correctamente tumores de grau 3. O classificador poderá ainda ser melhorado, recorrendo para isso a um maior grupo de volumes de treino, procurando que seja cada vez mais representativo dos diferentes graus de heterogeneidade. Isto irá permitir uma melhor separação entre cada classe, em especial entre as classes 3 e 4, as quais revelam uma maior proximidade entre si. Do mesmo modo, um maior grupo de teste caracterizaria o classificador de forma mais precisa.

As janelas de isolinhas de intensidade poderão demonstrar ser uma importante aplicação no estadiamento e no prognóstico tumoral, com grande potencialidade em radioterapia, permitindo perceber a resposta e evolução do tumor à terapia ao longo das várias sessões de tratamento. Poderia ser um ponto de partida para a combinação de diferentes técnicas e dosagens para o mesmo tumor, promovendo a eliminação de toda a massa tumoral de um modo mais rápido e eficaz, evitando também grande parte das recidivas.



# Referências Bibliográficas

1. Portal da Saúde - O que é o cancro? Como preveni-lo? 2010. Portal da Saúde. 5-4-2010. Online Source
2. Looking ahead in cancer stem cell research : Nature Biotechnology. Nature Biotechnology . 2010. Nature Biotechnology. 13-4-2010. Online Source
3. Kelly M, Noterdaeme O, Brady SM. Relating intra-tumor heterogeneity to morphology and its implications for assessing response to therapy, NEW YORK: IEEE. 2007: 1188-1191
4. Eary JF, O'Sullivan F, O'Sullivan J, Conrad EU. Spatial Heterogeneity in Sarcoma F-18-FDG Uptake as a Predictor of Patient Outcome. Journal of Nuclear Medicine 2008; 49:1973-1979
5. Kuwai T, Nakamura T, Kim SJ, Sasaki T, Kitadai Y, Langley RR, Fan D, Hamilton SR, Fidler IJ. Intratumoral Heterogeneity for Expression of Tyrosine Kinase Growth Factor Receptors in Human Colon Cancer Surgical Specimens and Orthotopic Tumors. Am J Pathol 2008; 172:358-366
6. Shankar Vallabhajosula. Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, 2009: 15
7. Bachtary B, Boutros PC, Pintilie M, Shi W, Bastianutto C, Li JH, Schwock J, Zhang W, Penn LZ, Jurisica I, Fyles A, Liu FF. Gene Expression Profiling in Cervical Cancer: An Exploration of Intratumor Heterogeneity. Clinical Cancer Research 2006; 12:5632-5640
8. Noterdaeme O, Kelly M, Friend P, Soonowalla Z, Steers G, Brady M. Initial assessment of a model relating intratumoral genetic heterogeneity to radiological morphology. Br J Radiol 2010; 83:166-170
9. Gillies RJ, Schornack PA, Secomb TW, Raghunand N. Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. Neoplasia 1999; 1:197-207
10. Zhao SJ, Kuge Y, Mochizuki T, Takahashi T, Nakada K, Sato M, Takei T, Tamaki N. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in F-18-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. Journal of Nuclear Medicine 2005; 46:675-682
11. O'Sullivan F, Roy S, Eary J. A statistical measure of tissue heterogeneity with application to 3D PET sarcoma data. Biostatistics 2003; 4:433-448
12. Kidd EA, Grigsby PW. Intratumoral metabolic heterogeneity of cervical cancer. Clinical Cancer Research 2008; 14:5236-5241

13. Nuclear Medicine, PET. 2010. Radiologyinfo.org. 5-4-2010. Online Source
14. Y.Kim LMBOLSPJPToTKUHV. WILEY ENCYCLOPEDIA OF BIOMEDICAL ENGINEERING, A John Wiley & Sons, Inc. 2006: 2825-2835
15. 2nd Workshop on Biomedical Engineering - Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica - IBEB. 2010. Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica. 10-6-2010. Online Source
16. Positron Emission Tomography. 19-8-2009. Nuclear Medicine, PET & Bone Densitometry, Royal Adelaide Hospital. 5-5-2010. Online Source
17. Antony Gee. Principles of Radiotracer Design for Positron Emission Tomography (PET). 2010. Imperial College. 3-5-2010. Online Source
18. Nuclear Physics & Tomography - Positron Emission Tomography. 2010. 2-4-2010. Online Source
19. Coincidence Detection | UBC-TRIUMF Positron Emission Tomography. 2010. The University of British Columbia. 11-5-2010. Online Source
20. Radioisotopes | UBC-TRIUMF Positron Emission Tomography. 2010. The University of British Columbia. 11-5-2010. Online Source
21. Tracers | UBC-TRIUMF Positron Emission Tomography. 2010. The University of British Columbia. 11-5-2010. Online Source
22. Radioisotopes | UBC-TRIUMF Positron Emission Tomography. 2010. 2010 Positron Emission Tomography Imaging at UBC. 2-4-2010. Online Source
23. Fludeoxyglucose F 18 Injection (FDG) Drug Information: Uses, Side Effects, Drug Interactions and Warnings at RxList. The Internet Drug Index . 15-9-2008. 5-4-2010. Online Source
24. Inoue O, Shukuri M, Hosoi R, Amitani M, Matsuura N, Hatazawa J, Takai N. Distinct different intra-tumor distribution of FDG between early phase and late phase in mouse fibrosarcoma. *Annals of Nuclear Medicine* 2005; 19:655-659
25. CANCRO | sob uma perspectiva Física e Química. 2010. 13-5-2010. Online Source
26. Charnley N, Airley R, Du Plessis D, West C, Brock C, Barnett C, Matthews J, Symonds K, Bottomly M, Swindell R, Price P. No relationship between F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography and expression of Glut-1 and -3 and hexokinase I and II in high-grade glioma. *Oncology Reports* 2008; 20:537-542
27. Omer L.Burnett, Jr. MD. F-18 FDG Positron Emission Tomography in Lung Cancer. 2010. 10-5-2010. Online Source
28. Kwee TC, Kwee RM. Combined FDG-PET/CT for the detection of unknown primary tumors: systematic review and meta-analysis. *European Radiology* 2009; 19:731-744
29. Nakamoto Y, Tatsumi M, Hammoud D, Cohade C, Osman MM, Wahl RL. Normal FDG distribution patterns in the head and neck: PET/CT evaluation. *Radiology* 2005; 234:879-885
30. PET Scan: Radiotracers. 23-2-2009. Emory University. 29-4-2010. Online Source



31. Martin WH, Delbeke D, Patton JA, Hendrix B, Weinfeld Z, Ohana I, Kessler RM, Sandler MP. Fdg-Spect - Correlation with Fdg-Pet. *Journal of Nuclear Medicine* 1995; 36:988-995
32. S Yu\* P. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. *Biomedical Imaging and Intervention Journal* 2006;
33. Table of PET analysis methods. 28-11-2008. 3-5-2010. Online Source
34. Vesa Oikonen. Standardized Uptake Value (SUV). 20-11-2008. 3-5-2010. Online Source
35. Feuardent J, Soret M, de Dreuille O, Foehrenbach H, Buvat I. Reliability of SUV estimates in FDG PET as a function of acquisition and processing protocols, NEW YORK: IEEE. 2004: 2877-2881
36. Benz MR, Evilevitch V, Allen-Auerbach MS, Eilber FC, Phelps ME, Czernin J, Weber WA. Treatment monitoring by F-18-FDG PET/CT in patients with sarcomas: Interobserver variability of quantitative parameters in treatment-induced changes in histopathologically responding and nonresponding tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 2008; 49:1038-1046
37. A.C.Lorena ACPLFC. Uma Introdução às Support Vector Machines. *Revista de Informática Teórica e Aplicada* 2007; XIV, Nº2:43-67
38. A.P.Tchangani. Support Vector Machines: A Tool for Pattern Recognition and Classification. *Studies in Informatics and Control* 2005; 14, No2:99-110
39. Nello Cristianini JS-T. An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel based Learning Methods, Cambridge University Press 2000. 2003
40. Chapelle O, Vapnik V, Bousquet O, Mukherjee S. Choosing multiple parameters for support vector machines. *Machine Learning* 2002; 46:131-159
41. Ovidiu Ivanciuc. SVM - Support Vector Machines. 2005. OIRI Engineering Support Pages. 20-6-2010. Online Source
42. Steve R.Gunn. Support Vector Machines for Classification and Regression. 10-5-1998. Serial (Book, Monograph)
43. Smola AJ, Bartlett PL, Scholkopf B, Schuurmans D. Introduction to large margin classifiers, CAMBRIDGE: M I T PRESS. 2000: 1-29
44. Fu XJ, Ong CJ, Keerthi S, Hung GG, Goh LP. Extracting the knowledge embedded in support vector machines, NEW YORK: IEEE. 2004: 291-296
45. Lee Y. Support vector machines for classification: a statistical portrait. *Methods Mol Biol* 2010; 620:347-368
46. Kumar A, Sminchisescu C. Support kernel machines for object recognition, NEW YORK: IEEE. 2007: 1855-1862