

Detección automática de células con micro núcleos por procesamiento computacional de imágenes microscópicas

Automatic detection of cells with micro nuclei by computational processing of microscopic images

Mario Roberto Monges Olmedo¹

Artículo Recibido: 05/01/2015

Aceptado para Publicación: 15/02/2015

Resumen: Este trabajo presenta una técnica de detección automática de micro núcleos en células por procesamiento computacional de imágenes utilizando la segmentación del núcleo y de micro núcleos. El algoritmo calcula el área de las células identificadas y realiza el proceso de descarte. Con esta metodología de identificación, se producen resultados incluyendo la posición de los micro núcleos. Estas estructuras biológicas son útiles para los biólogos para el manejo de aberraciones cromosómicas estructurales. El método adoptado consiste en una serie de algoritmos de visión por computadora. Se obtienen por este abordaje los siguientes resultados experimentales (media $\pm\alpha$), entre otros, para una base de datos de 75 imágenes: Precisión 92.67% \pm 25.59%; Exactitud: 93,44% \pm 17.35%; Tasa de Error: 2.67% \pm 16.22%. Las métricas indican que a través de este enfoque se logra, de manera eficiente, segmentar los micro núcleos.

Palabra clave: Computación gráfica, células, micronúcleos, segmentación de imágenes

Summary: This paper presents a technique for automatic detection of cell micronuclei by computer processing of images using the segmentation of the nucleus and micronuclei. The algorithm calculates the area of the targeted cells and makes the process of elimination. Several results are obtained through this identification method, including the position of the micronuclei. These biological structures are useful for biologists to manage structural chromosome aberrations. The method adopted is a series of computer vision algorithms. Experimental results obtained throughout this approach, among others, for a base of 75 images are ($\mu\pm\alpha$): Precision 92.67% \pm 25.59%; Accuracy: 93.44% \pm 17.35%; Error Rate: 2.67% \pm 16.22%. These metrics suggest that cell micronuclei can be successfully detected.

Keywords: Computer graphics, cells, micronucleus, image segmentation

Introducción

¹ Master en Ciencias de la Computación por la Facultad Politécnica UNA, Docente Investigador de la Universidad Americana. Email: mario.monges@gmail.com

Dentro del campo del tratamiento de imágenes biológicas es necesario desarrollar métodos automáticos de segmentación, que eviten en lo posible los procedimientos manuales.

Los métodos manuales presentan dos dificultades importantes: el considerable esfuerzo de tiempo que precisan, y el error experimental entre operador inherente. La repetibilidad y rapidez de una segmentación automática es especialmente útil en modalidades médicas y de laboratorio que representen datos en forma gráfica.

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicas. Existen factores capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en una célula (edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc.) [15].

En este artículo se propone un esquema de detección de micronúcleos de forma automática, basado en el procesamiento de imágenes celulares.

La umbralización es un método ampliamente estudiado (J.Kittler y J.Illingsworth [6], N.Otsu [9], K.Wu, D.Gauthier, y M. Levine [13]) para segmentar imágenes. En el caso de células, la umbralización puede parecer un método simple, sin embargo la transición entre el objeto y el fondo puede ser difusa por lo que una forma precisa de la célula es difícil de encontrar, además esta técnica, en varios casos, requiere un procesamiento posterior sustancial. Markiewicz [7], ha utilizado las cuencas hidrográficas para la segmentación de las células de la médula ósea, esto se traduce en más algoritmos de segmentación debido a las variaciones de intensidad tanto en objeto y el fondo. Comaniciu et al [2] propuso un método de cambio promedio para la segmentación de la imagen celular para diagnóstico de patología. Geusebroek et al [4] introdujo un método más cercano sobre la base de gráficos vecinos segmentando las agrupaciones de células. Meas-Yedid et al [8] propuso un método para cuantificar la deformación de las células con las serpientes.

Zimmer et al [16] introdujo un método que utiliza activos contornos, el inconveniente de este método es su incapacidad para hacer frente a la división de células. Kirubarajan et al [5] muestra la segmentación y el algoritmo de seguimiento donde el umbral estándar combinado con los resultados de clustering en la segmentación gruesa, que se perfeccionó con el resultado del algoritmo de asociación y el seguimiento se realiza mediante modificación del filtro. Kalman. Althoff et al [3] utiliza la combinación de vecino más cercano y la coincidencia de correlación técnicas. Amálka Pinidiyaarachchi et al [10] utilizaron algoritmos de subasta. Omar Al-Kofahi et al [1] de seguimiento de las células por juego de objeto múltiple método que utiliza la distribución de Gauss. Tomohiro Yasuda [14] et al utiliza el algoritmo de Euclides para el seguimiento a distancia de la célula.

Métodos y procedimientos

En este capítulo se describe el método que se ha utilizado para realizar la detección de micronúcleos a través de la segmentación y cuantificación de las mismas.

Las imágenes son obtenidas por procedimientos de laboratorio preestablecidos por investigadores del área de biología y no han sufrido tratamientos especiales para inmunofluorescencia. El abordaje para la detección automática de los micronúcleos está esquematizado en la Figura 1. La imagen en color es transformada a escala de grises. Seguidamente se filtra la imagen por el filtro de la mediana. El siguiente paso es la umbralización de la imagen por el método de Otsu [9], el cual presentó mejor resultado entre aquellos probados (Figura 3). A seguir, se realiza la etiquetación de componentes, por vecindad 8 conectados. Como resultado, se calcula el área de cada objeto contabilizando cada pixel dentro de cada objeto etiquetado. Se eliminan por tamaño los objetos más grandes y se contabiliza los restantes considerados micronúcleos

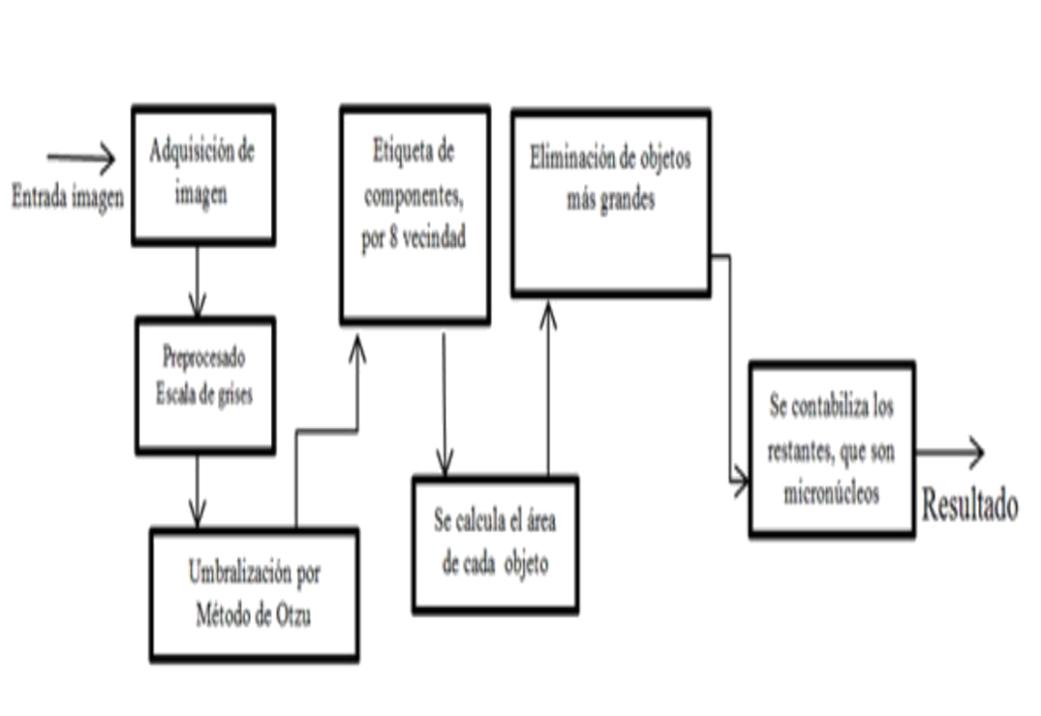


Figura 1: Abordaje para la detección automática de micro núcleos

Resultados experimentales

Para verificar la capacidad de identificar los micronúcleos en diversas situaciones, se han tomado muestras de 25 imágenes en bases de Internet. Ejemplos de las células utilizadas se presenta en la Figura 2.

La validación de los resultados se hizo con una especialista de laboratorio en ciencias veterinarias quien cuantificó los micronúcleos presentes y el resultado se comparó con lo cuantificado por el algoritmo propuesto.

La tasa de error promedio en las pruebas realizadas con nuestro abordaje fue de 25% y una desviación estándar de error $\pm 12\%$

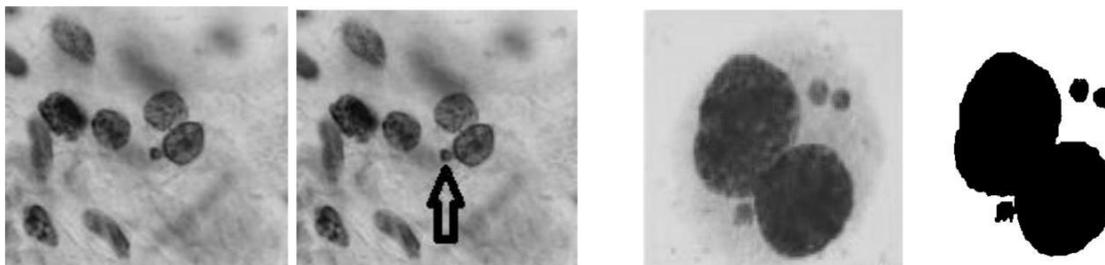


Figura 2: Células con micro núcleos Figura 3: Imagen con micro núcleos umbralizados

Nuevo enfoque propuesto	Otro enfoque
<p>La diferencia en las pruebas realizadas con una muestra de 25 imágenes con nuestro abordaje fue de 25% y una desviación estándar de error $\pm 12\%$. Esta tasa de error se puede bajar si se utiliza una sola base de imágenes, pues las muestras se tomaron de diversos sitios de internet.</p> <p>Formulación simplificada del problema que consiste en detectar y contar aquellos objetos redondos de alto contraste (núcleos celulares) que posean a cierta distancia un "satélite" -otro objeto- de un área no mayor a un tercio del área del primero. Etiquetación de componentes, por vecindad 8 conectados.</p> <p>Permite un análisis mucho más rápido y consistente con una calificación objetiva.</p>	<p>Los resultados indican que en el conjunto del experimento, la diferencia entre el algoritmo propuesto y la contabilidad manual es de un 3%. Se parte de la muestra de un total de 16 imágenes por cada jornada de experimento.</p> <p>Para la contabilidad de los núcleos y superar el inconveniente del solapamiento de éstos, se recurre a la información del contorno celular a través del gradiente morfológico, junto al postprocesado de la etapa de umbralización, lo que produce un esfuerzo computacional mayor. Platero <i>et al</i> [12]</p>

Tabla1: Comparativo de enfoques

Exposición de resultados

Para verificar la capacidad de identificar los micronúcleos en diversas situaciones, se han adquirido muestras de 75 imágenes para validación de los resultados en distintas bases de datos como se observa en el anexo B. La validación de los resultados se hizo con una especialista de laboratorio en Biología quien cuantificó los micronúcleos presentes y el resultado se comparó con lo cuantificado por el algoritmo propuesto.

En el abordaje propuesto no solo se evaluó el porcentaje de verdaderos positivos (VP), sino que también se tuvieron en cuenta las métricas de Precision (P), Accuracy o Exactitud (A), Sensibilidad (S) y la Tasa de Error (TE).

Esto no solo se refleja en los VP sino también en los FN, FP y VN, he aquí la descripción de las métricas:

Un verdadero positivo VP es un MN (micronúcleo) detectado por el sistema a través del proceso de segmentación.

Los falsos negativos FN son MN que no fueron segmentados por el abordaje propuesto.

Los falsos positivos FP se consideran células que fueron segmentadas como MN. Un verdadero negativo VN son células que no fueron segmentadas como MN, es decir, el sistema supo diferenciar entre MN y célula. Precisión o valor predictivo positivo mide la eficacia real de una prueba, son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de que se tenga un MN en la célula, devuelve 1 en caso de segmentación perfecta, posee la siguiente ecuación:

$$\frac{VP}{VP + FP}$$

Accuracy o exactitud retorna el valor 1 en caso de una segmentación perfecta y puede ser descripta por la siguiente ecuación:

$$\frac{VP + VN}{VP + FN + FP + VN}$$

Sensibilidad o razón de verdaderos positivos es la probabilidad de clasificar correctamente un MN, es decir, es la capacidad de segmentar un MN, devuelve un 1 en caso de segmentación perfecta, esta es su ecuación:

$$\frac{FP}{VP + FN}$$

Tasa de error devuelve el valor 0 en caso de segmentación perfecta, se muestra en la siguiente ecuación:

$$\frac{FP}{VP + FN}$$

Tabla 2. Evaluación del abordaje propuesto a partir de las 8 métricas (en porcentaje)

	VP	FP	VN	FN	P	A	S	TE
Micronúcleos	89.43	2.67	97.33	10.57	92.67	93.44	89.43	2.67
Desviación Estándar	27.50	16.22	16.22	27.50	25.59	17.35	27.50	16.22

Conclusiones

En la investigación realizada podemos afirmar que el abordaje propuesto plantea una solución a través de algoritmos para la detección automática de micronúcleos en células, constituye una nueva opción ya que el software producido en el exterior es propietario y con un alto costo para el que quiera implementarlo.

Los resultados experimentales se presentan satisfactorios: Precision $92.67\% \pm 25.59\%$; Exactitud: $93,44\% \pm 17.35\%$; Tasa de Error: $2.67\% \pm 16.22\%$ sientan la base para la implementación de una nueva alternativa de un software sólido y confiable para los profesionales del área.

La pregunta de investigación ¿Es posible desarrollar un proceso eficiente para detectar micronúcleos en células utilizando el procesamiento digital de imágenes?, se logró responder en forma positiva ya que el abordaje propuesto tuvo éxito en la segmentación de micronúcleos sobre la base de imágenes.

La hipótesis, “La detección automática de micronúcleos en células permitirá la cuantificación de las mismas en forma eficiente” es aprobada ya que el enfoque propuesto agiliza el proceso de conteo de micronúcleos de forma eficiente.

El objetivo general y los específicos se lograron ya que el procedimiento está basado en procesamiento digital de imágenes de células con el uso de distintos algoritmos, se logró identificar los micronúcleos a través de su morfología y cuantificar las mismas, los resultados fueron tabulados de acuerdo a técnicas estadísticas.

Como fortaleza se vio la capacidad del algoritmo de adaptarse a una base de datos muy heterogénea, ya que no habían sido tomadas en las mismas condiciones (dispositivos de captura, resolución, tipo de células, distancias, etc.),

Como futuro trabajo se propone implementar algoritmos más robustos, en los cuales se podría incluir el reconocimiento de formas (círculos) utilizando la transformada de Hough para intentar mejorar las métricas obtenidas.

Por otra parte se plantea la división en grupos semejantes (como tamaño, teñido, acercamiento) del total de la base de datos para contrastar con el desempeño de la base de datos de prueba.

También se sugiere ampliar la base datos, pero utilizando imágenes de bases más homogéneas, para poder confrontar con la metodología utilizada en esta investigación.

Referencias

- O. Al-Kofahi, Richard J.Radke, Susan K.Goderie, 2006, Qin Shen, Sally Temple and Badrinath Roysam. Automated cell lineage construction: A Rapid method to Analyze Clonal Development established with Murine Neural Progenitor Cells, Cell Cycle, Vol. 5, No. 3, Feb. 1, 327-33
- D.Comanicu, P.Meer, 2002 Cell image segmentation for Diagnostic Pathology, Advanced Algorithmic approaches to medical image segmentation: State-of-art applications in cardiology, neurology, mammography and pathology, 541-558.
- J.Degerman, J.Fajerson, K.Althoff, T.Thorlin, J.H,Rodriguez, and T.Gustavsson, 2002 A comparative study between Level set and Watershed image segmentation for tracking stem cells in Time-Lapse Microscopy, CiteULike
- J. Geusebroek, A.W.M. Smeulders, and F. Cornelissen, 1997 “Segmentation of vrll clusters by nearest neighbour graphs”, proceedings of the third annual conference of the advanced school of computing and Imaging, , 248-252.
- T.Kirubarajan, Y.Barshalom, and K.Pattipati, 2001 Multi assignment for tracking a number of overlapping objects, IEEE Trans Aerosp. Elect. Syst., 37(1), , 2-21.

- J.Kittler and J.Illingsworth, Minimum Error Thresholding, Pattern Recognition vol. 19, no. 1, 1986, 41-47.
- T.Markiewicz, S.Osowski, L.Moszczyski, and R.Satat, Myelogeneous leukemia cell image preprocessing or feature generation, 5th International Workshop on Computational Methods in Electrical Engineering, 2003, 70-73.
- V.Meas-Yedid, F.Cloppet, A.Roumier, A.Alcover, J.C.Olivo-Marin, and G.Stamon, “Quantitative microscopic image analysis by active contours”, proceedings VI 2001 Vision Interface Annual Conference – Medical Applications, 2001.
- N.Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, vol. 9, no. 1, 1979, 62-66.
- A. Pinidiyaarachchi, C. Wahlby, “Seeded watershed for combined segmentation and tracking of cells”, ICIAP-2005 proceeding, 336-343.
- L. Vincent.; Soille, P., Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Volume 13, Issue 6, Jun 1991 583 – 598.
- C. Platero, A. Trillo, A. Úbeda, 2002. Procesamiento de imágenes biomédicas para el estudio de la influencia de la radiación electromagnética GSM sobre células madre neurales. Madrid,
- K.Wu, D.Gauthier, and M.Levine, Live cell image segmentation, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 42, no .1, 1995, 1-12.
- T. Yasuda, Hideo Bannai, Shuichi Onami, Satoru Miyano, Hiroaki Kitano; Towards Automatic Construction of Cell-Lineage of C. elegans from Nomarski DIC Microscope Images, Genome Informatics 1999, 14-15.
- M. Zalacain, L. Sierrasesúмага, A. Patiño, The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents, Pamplona, 2005.

C.Zimmer, E. Labruere, V.Meas-Yedid, N.Guillen, and J.C.Olivo-Marin, Segmentation and tracking of migrating cells in video microscopy with parametric active contours: a tool for cell based drug testing, IEEE Trans. Med. Imaging., 21(10) 2002, 1212-1221.

