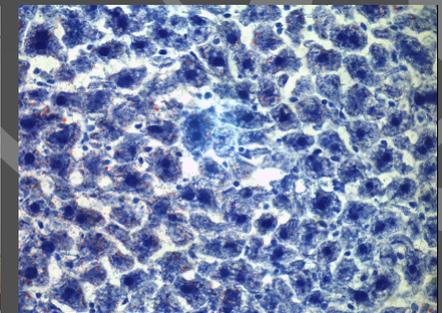
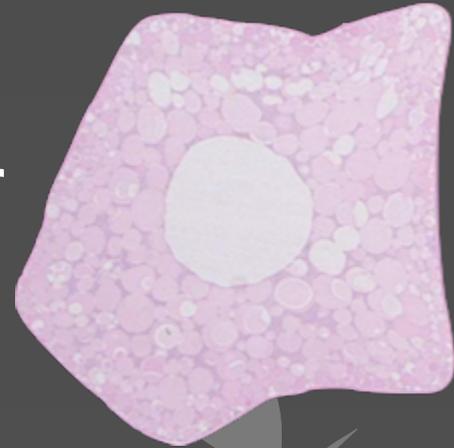


¿Podemos reconocer y medir automáticamente con el ordenador objetos sobre imágenes biológicas de microscopio?



Eva Cernadas
CiTIUS, 2018

Centro Singular de Investigación en Tecnoloxías da
Información

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

citi.usc.es

Equipo

Investigación realizada con el Dr. **Manuel Fernández Delgado** y, parcialmente, con el Laboratorio de Informática Aplicada (**LIA2**)



Índice

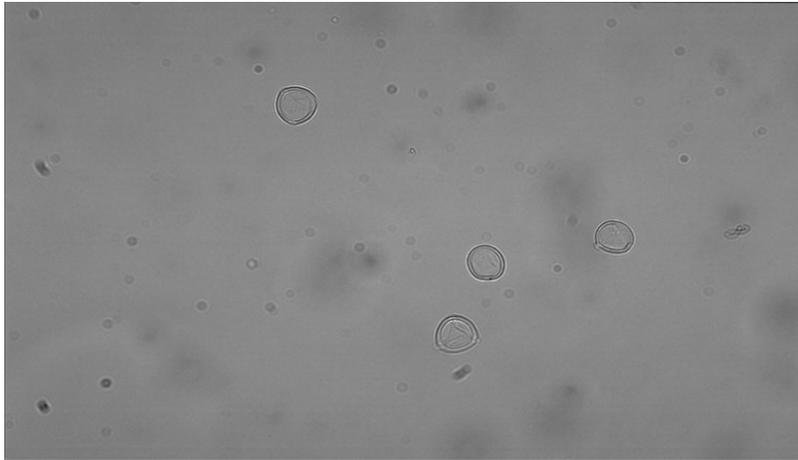
- Comienzos
- Resultados
- Problemáticas en sistemas de cuantificación de imagen microscópica en biomedicina
- Situación actual
 - LiverAnalyser
 - CystAnalyser
 - ki67Analyser
- Conclusión y futuro

Imágenes microscópicas de polen (2001-2006)

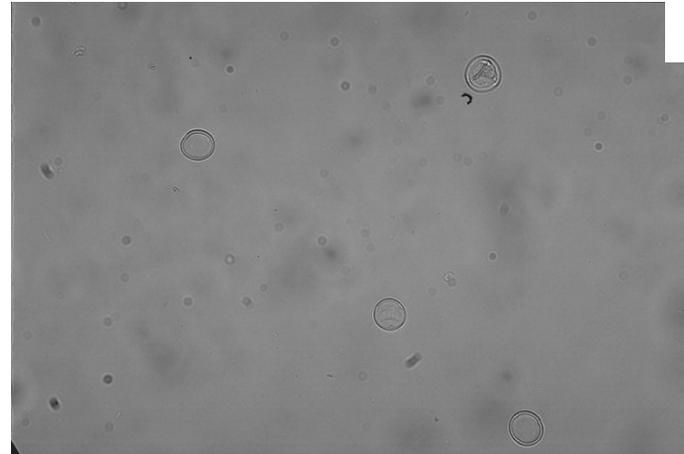


UNIVERSIDADE
DE VIGO

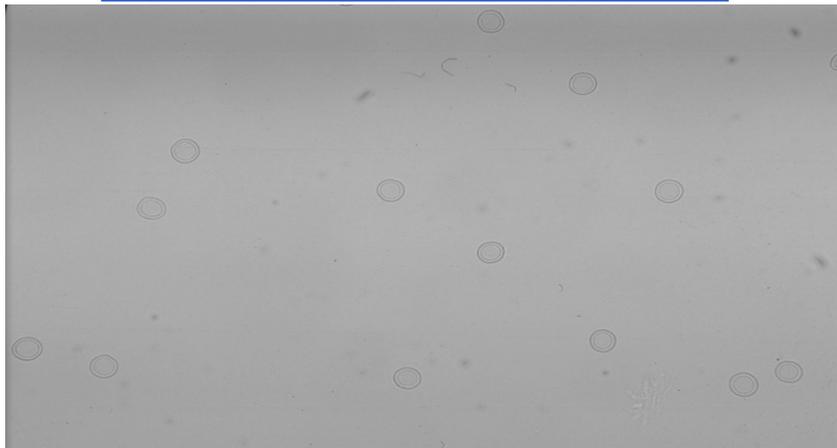
- Laboratorio de Palinología (Ourense).



Urtica urens



Parietaria judaica

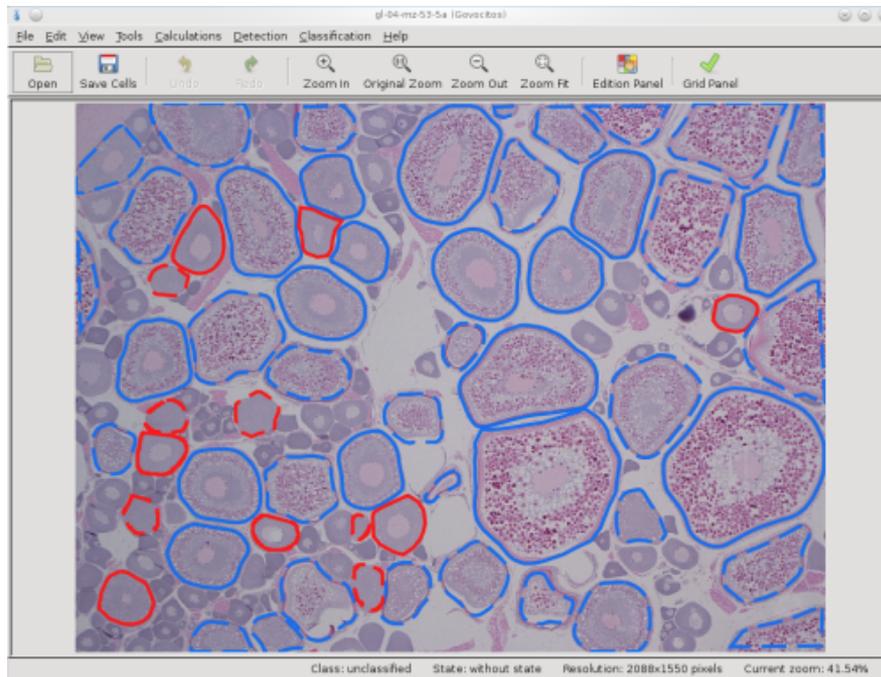


Urtica membranacea

Automatic detection and classification of g
rains of pollen based on shape and texture.
IEEE T SYST MAN CY C,36,2006.

Estimación de la fecundidad en peces (2005-2012)

- Calcular la fecundidad de los peces (la capacidad de producir huevos) a partir de imágenes histológicas de sus gónadas:
 - Medir los ovocitos maduros con núcleo visible.
 - Contar el número de ovocitos en cada estado de desarrollo.



COLABORADORES:

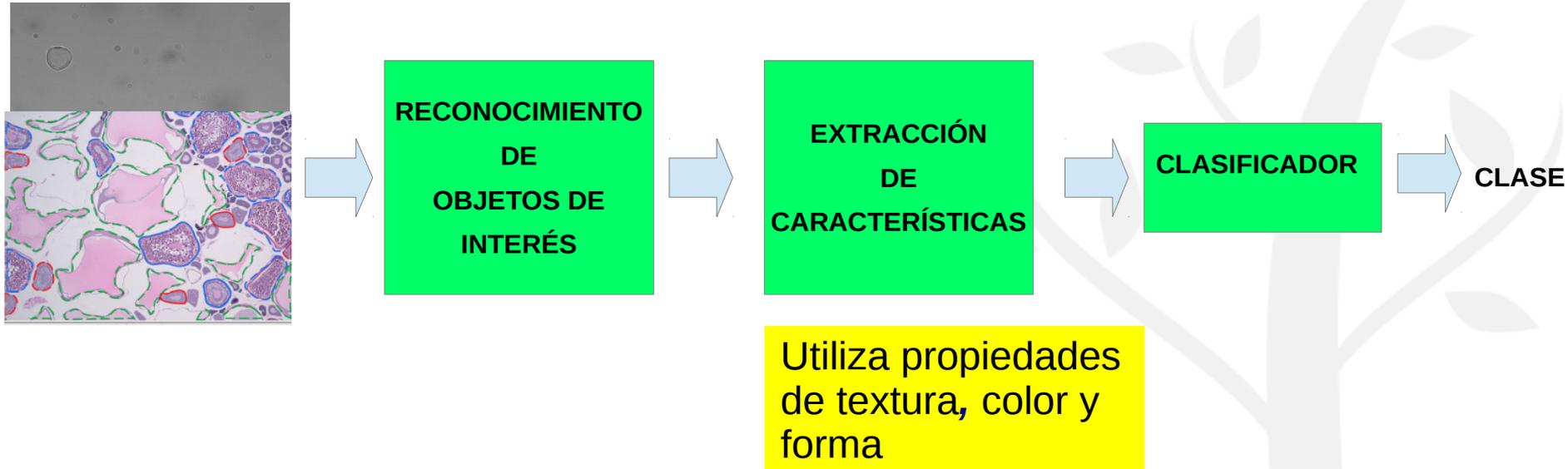


Exhaustive comparison of colour texture features and classification methods to discriminate cells categories in histological images of fish ovary. *Pattern Recognition*. 46, 2013.

Sistema de visión clásico

- Etapas:

- Segmentación o reconocimiento de objetos de interés (técnicas no supervisadas).
- Extracción de características de cada objeto (técnicas directas).
- Clasificación de cada objeto (supervisada).



Sistema de visión clásico

- Etapa de reconocimiento de objetos de interés: muy dependiente del problema.
- Etapa de extracción de características y clasificación: actualmente ya muy estandarizada:
 - Calculo de características:
Influence of normalization and color space to color texture classification . Pattern Recognition, 2017
 - Clasificadores:
Do we need hundreds of classifiers to solve real world classification problems?. Journal of machine learning reserarch, 2014.

Estimación de la fecundidad en peces (2005-2012)

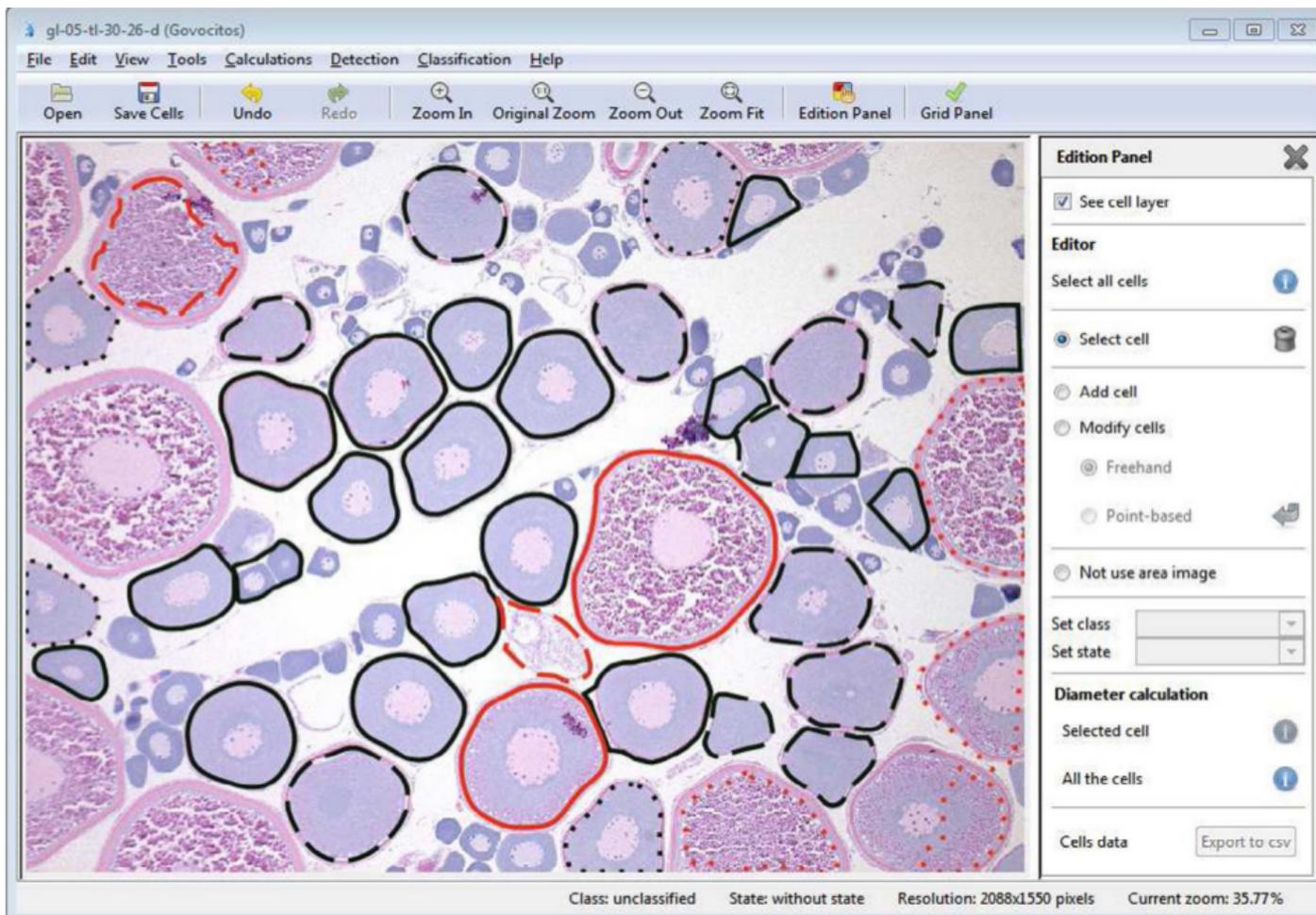
- **GOVOCITOS**: software para la gestión de recursos marinos



- Utilizado en el trabajo diario en el IIM desde 2012
- Registrado como software libre
- Distribuida una versión local

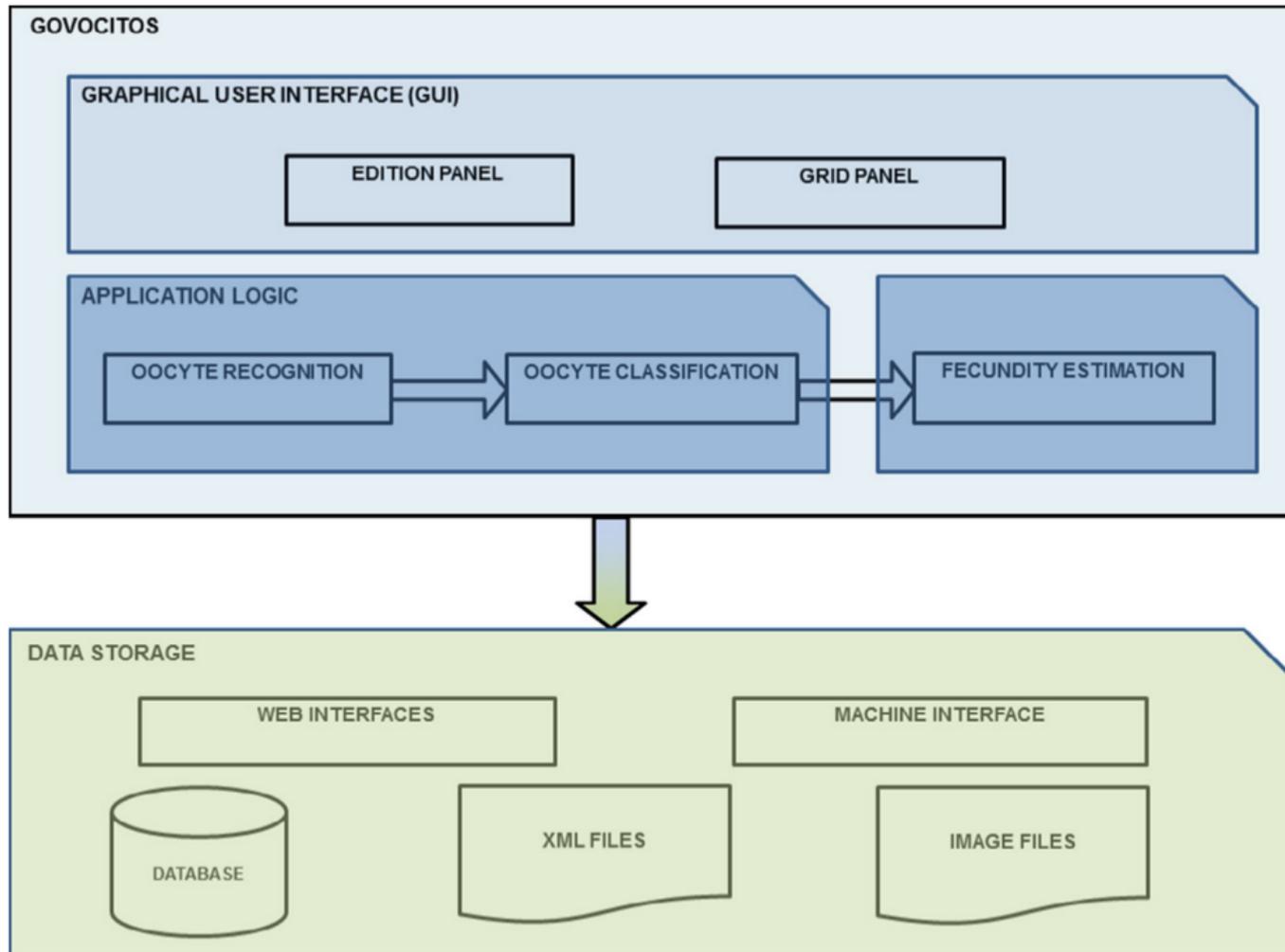
Govocitos: a software tool for estimating fish fecundity based on digital analysis of histological images, *Computers in Electronics and Agriculture*, 125, 2016.

Govocitos: reconocimiento y clasificación automática



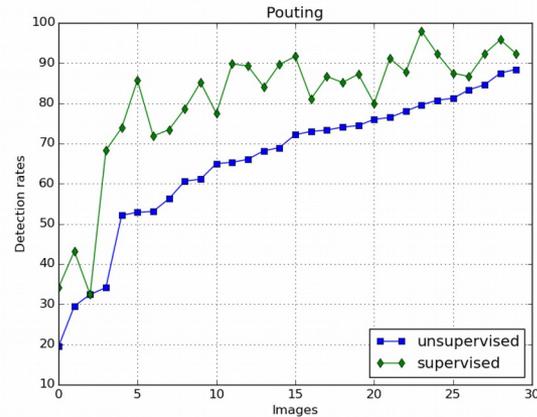
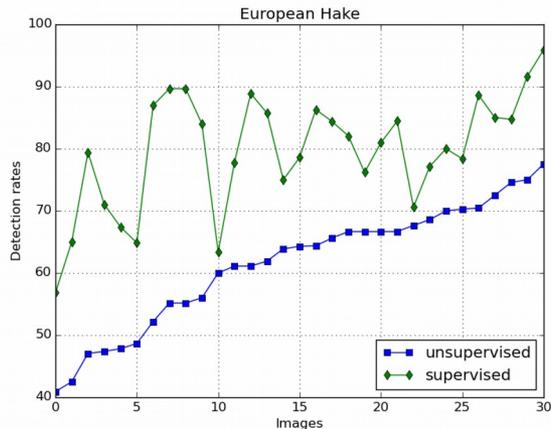
Demostrador en el CiTIUS

Estimación de la fecundidad en peces (2005-2012)



Resultados: Govocitos en un entorno real

- Reconocimiento de células maduras:



- Clasificación de células:

	Merluza (European hake)			Faneca (pouting)		
CLASIFICADORES	A	B	C	A	B	C
Estados de desarrollo	99.6	99.6	89.4	100	--	92.8
Presencia/ausencia de núcleo visible	99	92.6	78.1	99.8	99.8	81.4

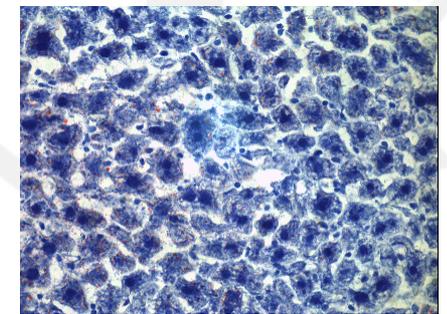
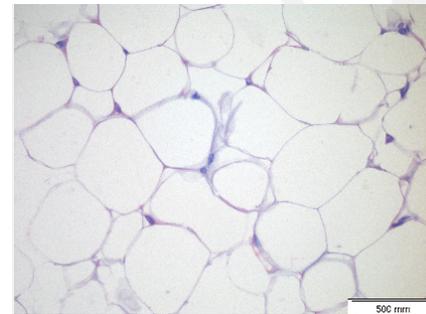
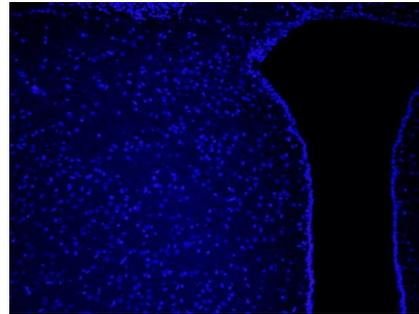
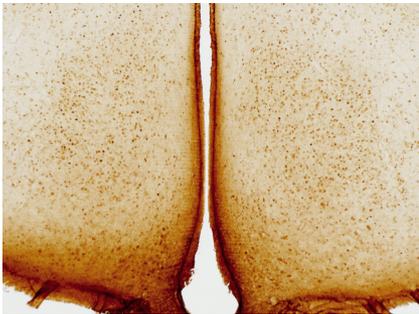
A experimento controlado

B experimento controlado utilizando el algoritmo de Govocitos

C funcionamiento real de Govocitos en el laboratorio del IIM (CSIC)

Sistemas de cuantificación en biomedicina (2014-2015 en adelante)

- Comienza la colaboración con los Drs. Rubén Nogueiras y Carlos Dieguez del grupo de Functional Obesomics and Molecular Metabolism del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) de la USC.



Problemáticas en sistemas de cuantificación de imagen microscópica en biomedicina

- El microscopio es un elemento indispensable en todo laboratorio de biomedicina.
- Tradicionalmente se usa para realizar valoraciones cualitativas y descriptivas del contenido de las preparaciones microscópicas. Poco precisas y subjetivas.
- Crece el interés por realizar análisis cuantitativos de las imágenes: medir y contar los objetos de interés de cada categoría en la imagen.
- Ello permitiría realizar diagnósticos o diseños de medicamentos más precisos.
- Sería un avance científico importante para la medicina personalizada.

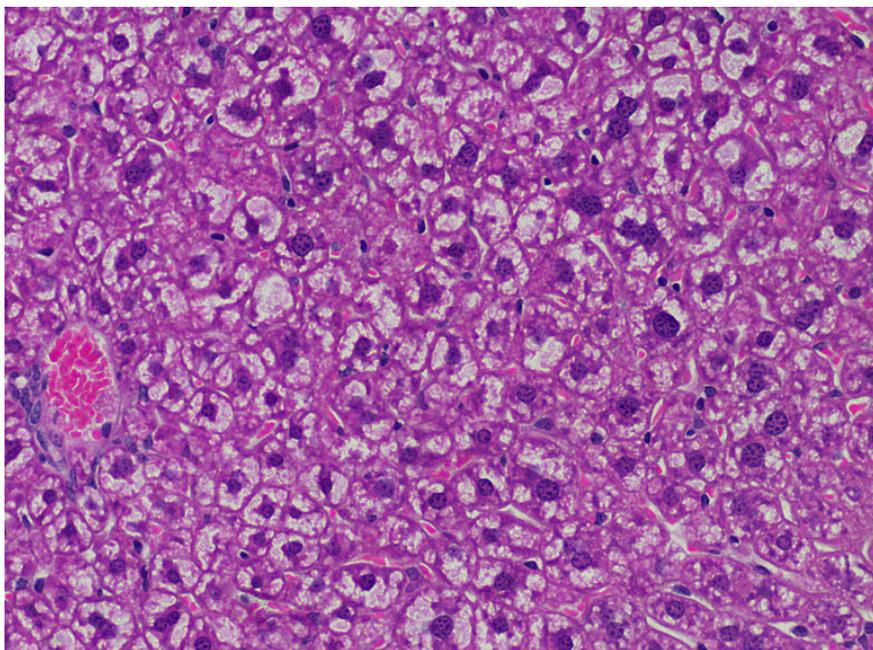
Problemáticas en sistemas de cuantificación de imagen microscópica en biomedicina

- Herramientas informáticas existentes:
 - Herramientas de dibujo manuales que cuantifican (miden y cuentan) los objetos dibujados.
 - Algoritmos de análisis automático que no permiten la corrección antes de la cuantificación.
- Solución propuesta: algoritmos de reconocimiento y clasificación de objetos automáticos combinados con una interfaz de usuario amigable que permita la revisión del personal experto antes de la cuantificación.

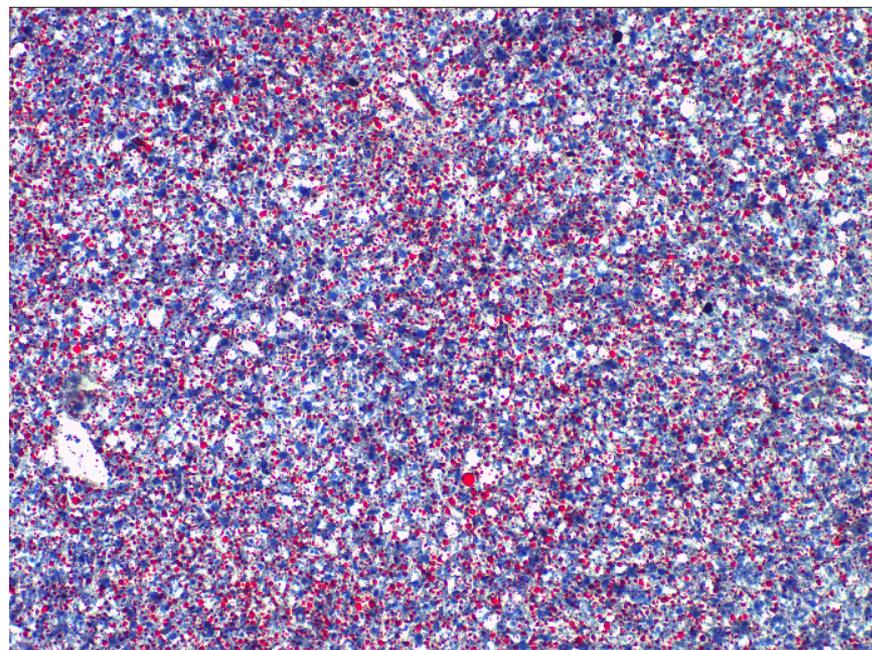
LiverAnalyser

- Imágenes histológicas de hígado. Estudios de obesidad para la determinación de esteatosis / esteatohepatitis hepática.
- Tinciones:

CiMUS



Eosina Hematoxilina (EHE)



Oil Red (OR)

LiverAnalyser: detección automática (EHE)

Reset

Set calibration: Value: 1,0

Set Parametros: pixels

Min. Diameter: 10

Max. Diameter: 400

Image type:

EHE OR

Automatic processing of the image:

Visualization of results

Histogram step: 2

Image: /home/cernadas/proyectos/validation/liverAnalyser/images/p53 DN vehicle 15 20x 1.tif Size: 2576x1932

LiverAnalyser: detección automática (OR)

Reset

Set calibration: Value: 1,0

Set Parametros: pixels

Min. Diameter: 10

Max. Diameter: 400

Image type:

EHE OR

Automatic processing of the image:

Processing with mor regions:

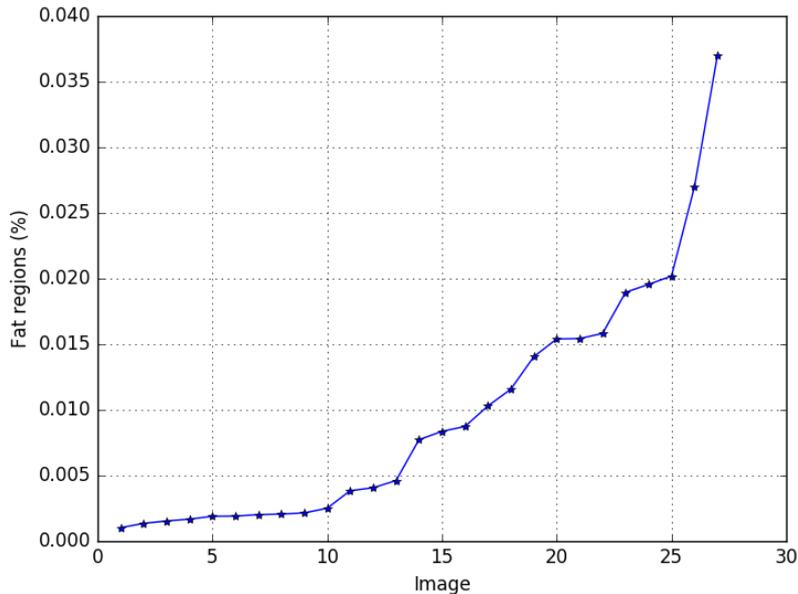
Visualization of results

Histogram step: 2

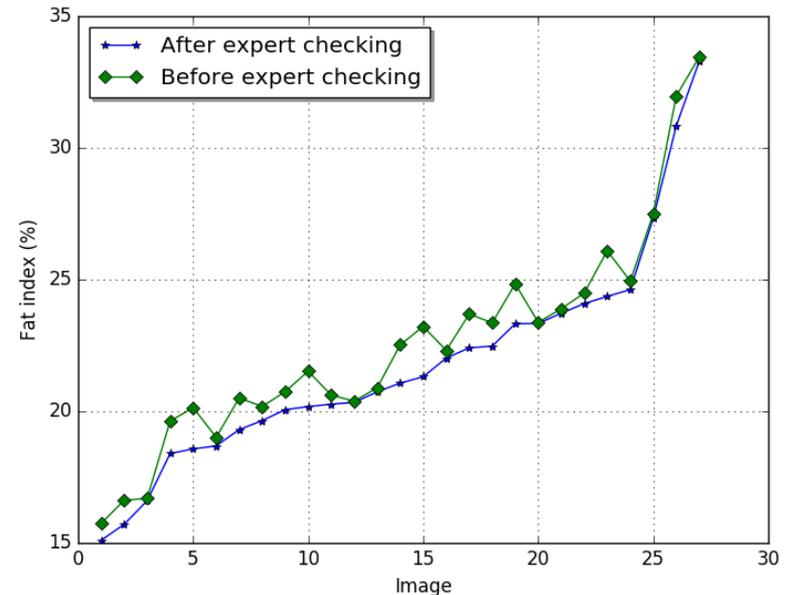
Image: /home/cernadas/proxectos/crujeiras/cimus/SALINO 1 20X.tif Size: 2576x1932

LiverAnalyser: resultados

- Con imágenes EHE (instalado en CIMUS desde mayo de 2017)



Porcentaje de regiones borradas por [I@s expert@s](#)

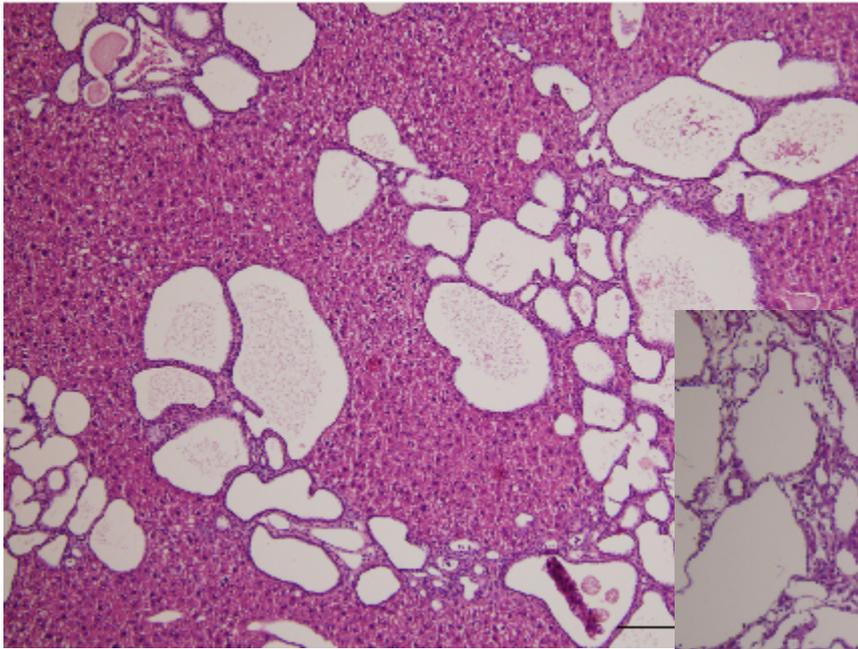


Porcentaje de grasa en la imagen

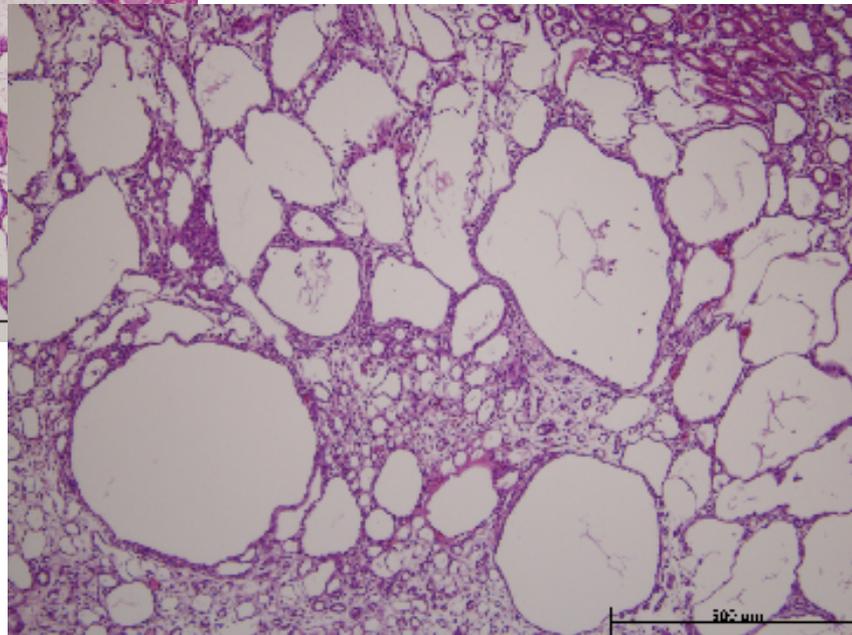
- Con imágenes de Oil Red (instalado en CIMUS desde junio de 2018)
 - en proceso de evaluación

CystAnalyser

- Imágenes histológicas de hígado y riñón. Estudios de la enfermedad genética PKD (Poliquistosis Renal).



Hígado



Riñón

NefroCHUS



*Laboratorio de Genética de
las Enfermedades Renales*

CystAnalyser: objetivos

- Calcular el índice quístico (porcentaje de área ocupada por los quistes en la imagen).
- Calcular el número de quistes por imagen.
- Realizar un perfil de los quistes (histograma de los tamaños de los quistes de varias imágenes conjuntas).
- Software utilizado hasta ahora: ImageJ que realiza una segmentación por umbral, con un umbral proporcionado por el usuario. Proporciona una estimación del índice quístico excesiva, ya que contabiliza como quistes otro tipo de tejidos.

CystAnalyser: detección automática

CystAnalyser

Reset         

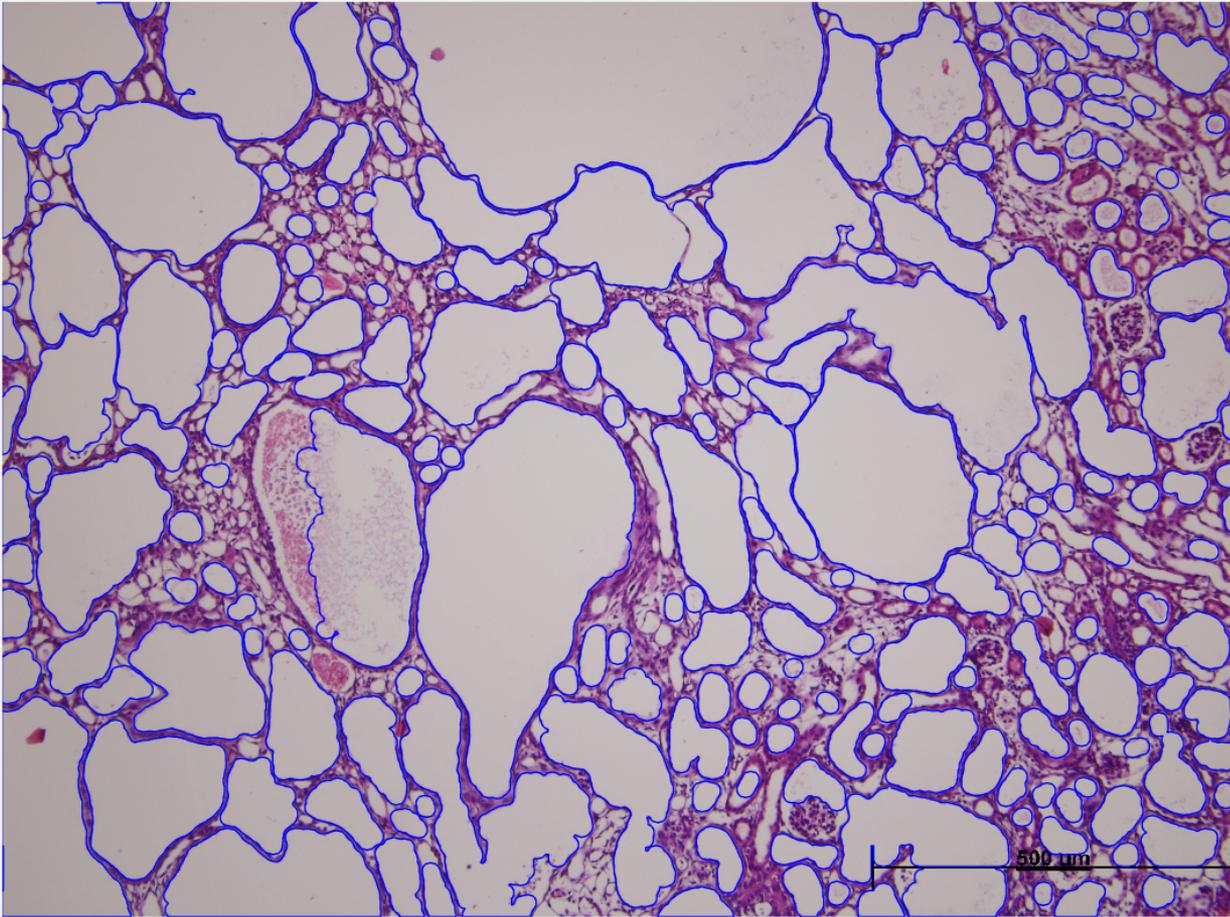


Image type:
 liver kidney

Automatic cyst recognition:

Supervised post-processing

Remove inner cyst:

Remove false positives:

Add smaller cysts:

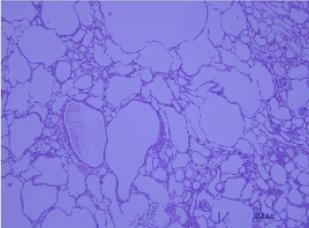
Selected cyst:

Visualization of results:

Cystic index: 0.672733

Cyst number: 214

Step to histogram in CSV file:



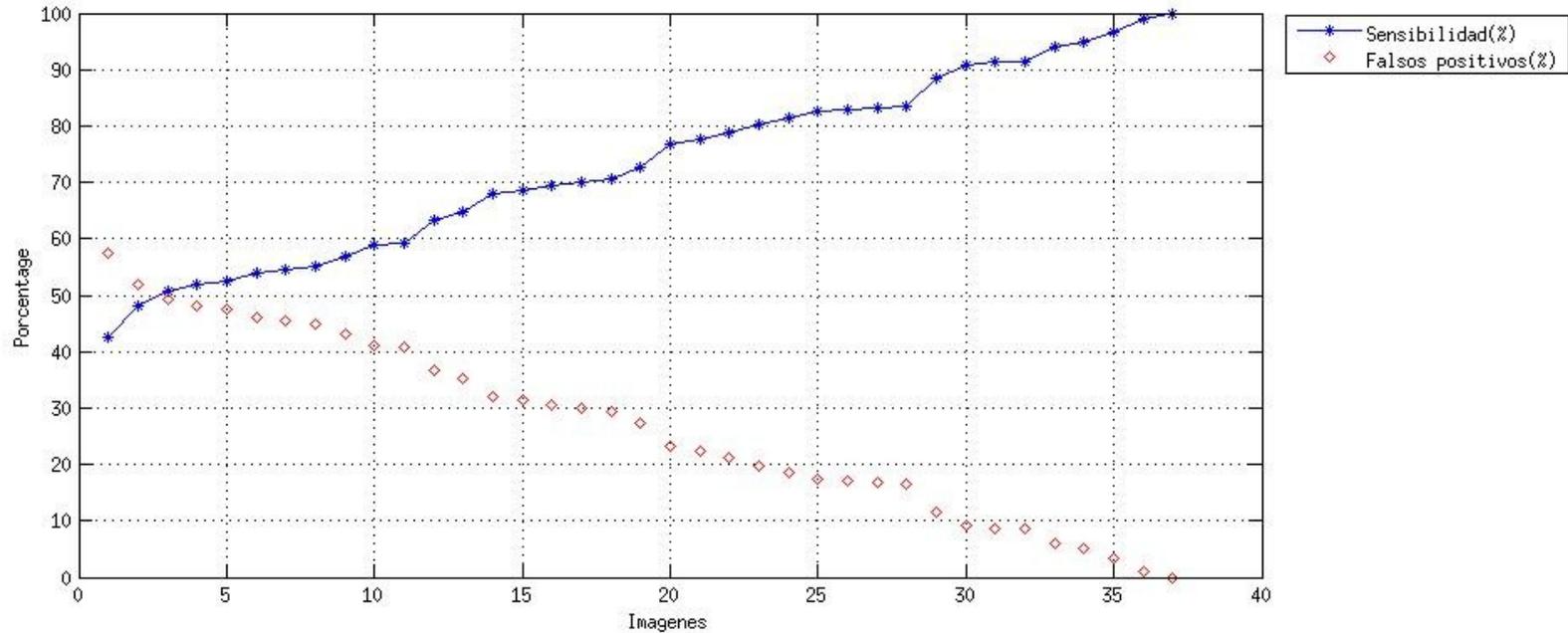
CystAnalyser: resultados

- Con imágenes de riñón
 - Quistes por imagen: 200

Versión	No. imágenes	Sensibilidad (%)	Falsos Positivos (%)	Índice Quístico (real)	Índice Quístico (automático)
1 (Feb. 2018)	25	70.9	29	56.3	48.2
2 (Mayo 2018)	37	73.1	26.7	52.32	50.64

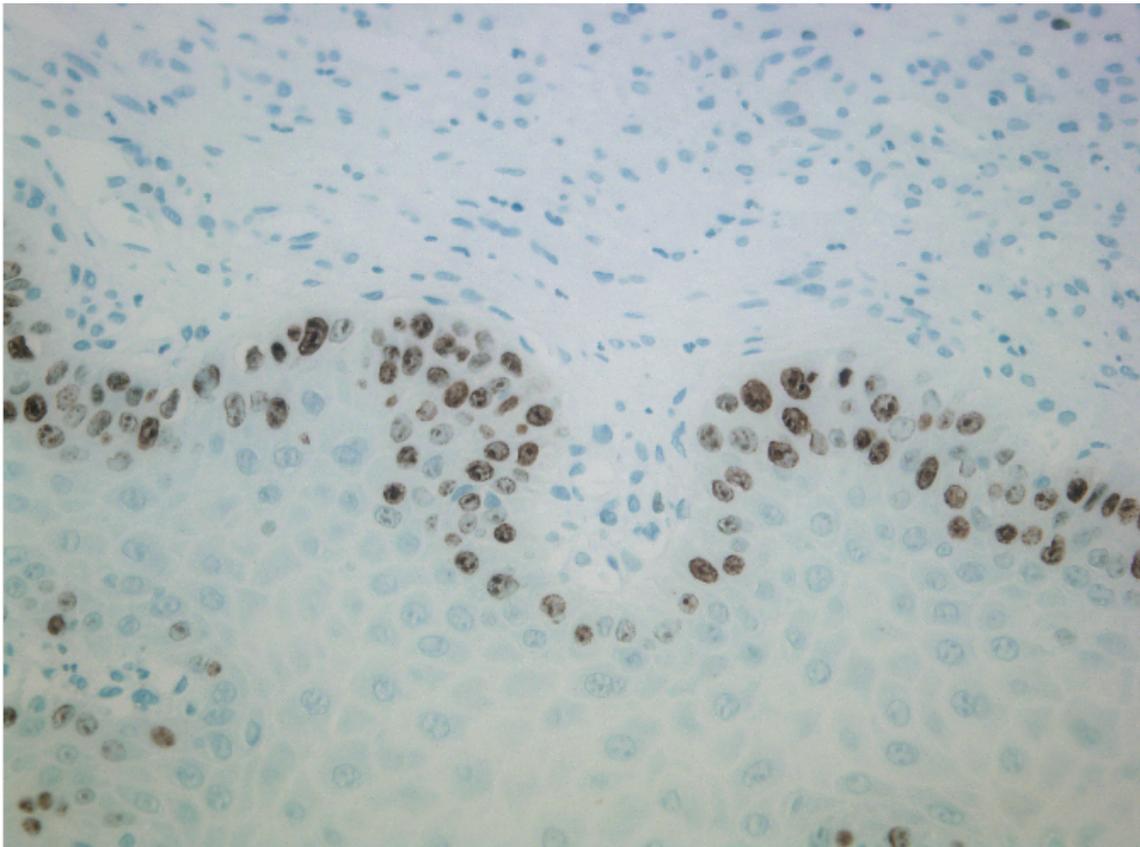
- Con imágenes de hígado
 - Sólo evaluación visual.

CystAnalyser: resultados



ki67Analyser

- Imágenes de inmunohistoquímica con el marcador ki67 de tejido bucal para detectar estadios de pre-cáncer.



Ki67Analyser: procesamiento automático

Image: /home/cernadas/proyectos/validation/ki67Analyser/images/40x2.tif Size: 4080x3072

Ki67Analyser: supervisado por I@s expert@s

The screenshot displays the Ki67Analyser software interface. The main window shows a histological image of a tissue section with a red outline indicating a region of interest. Numerous cells are detected and marked with colored circles: blue for normal cells, yellow, pink, and black for Ki67-positive cells. The interface includes a toolbar with icons for Reset, file operations, zoom, pan, and selection. On the right, there are control panels for calibration (Set calibration: Value: 1,0), parameters (Set Parametros: pixels), and detection methods (Detect cells: Method 1, Method 2, Classifier). The manual type is set to HIGH, and the type of cells to manual draw is set to without. A small inset image at the bottom right shows a zoomed-in view of the detected cells.

Image: /home/cernadas/proxectos/validation/ki67Analyser/images/20x/07B11533 MIB1.tif Size: 4080x3072

ki67Analyser: resultados

- **OBJETIVO:** Recuento de células de cada tipo: fuertemente teñidas, poco teñidas y sin tinción.
- Instalado en la Facultad de Odontología en marzo de 2018.
- Clasificación de las células prácticamente correcta.
- Detección de células:

Resolución imagen	Nº. imágenes	No. células por imagen	Sensibilidad (%)
40x	4	273	48.7
20x	15	806	41.3

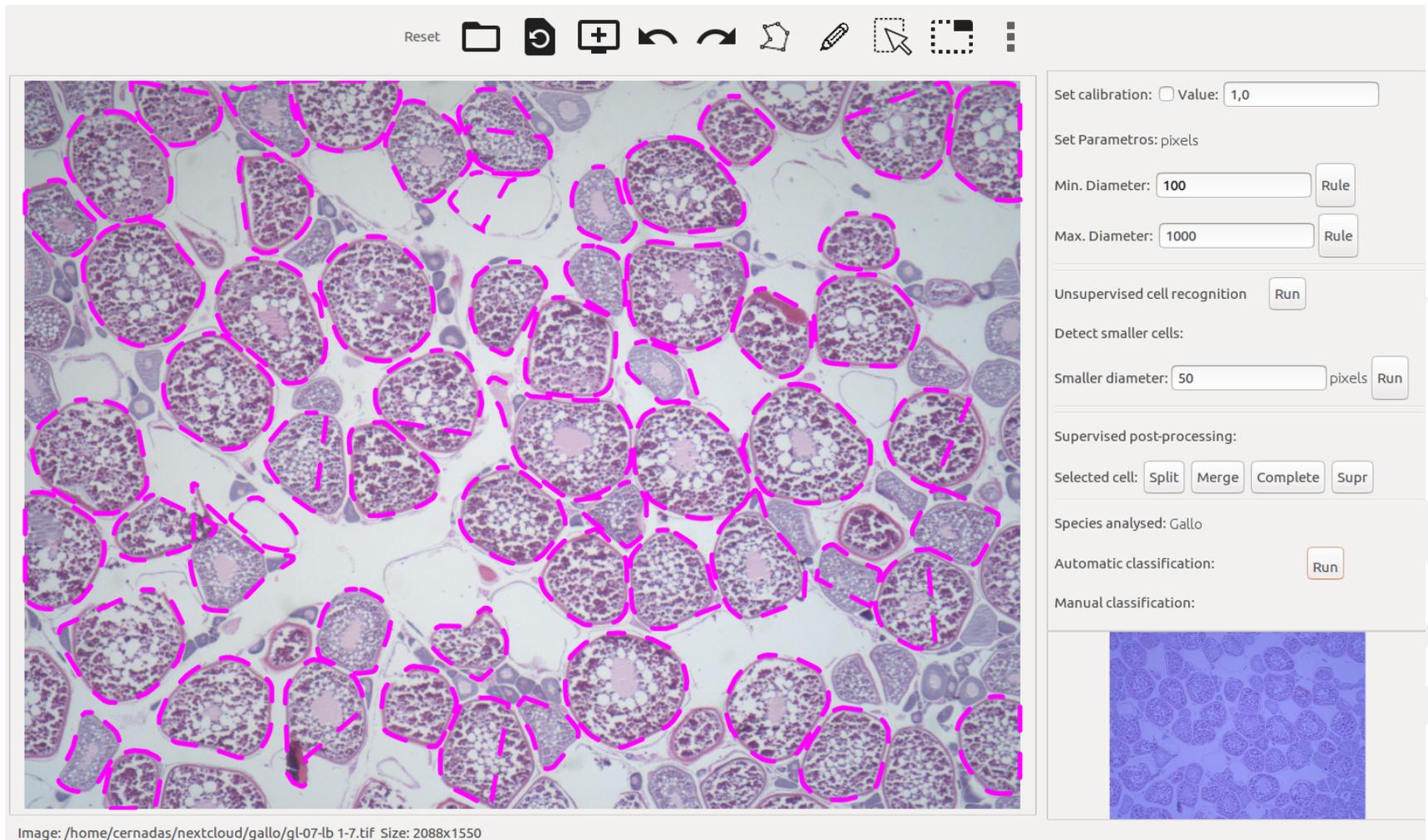
Nueva versión de Govocitos



**INSTITUTO ESPAÑOL DE
OCEANOGRAFÍA DE
CORUÑA E VIGO**

- No depende de una base de datos
- Detecta células inmaduras
- Permite definir categorías de célula.
- Permite incorporar el análisis de nuevas especies

Nueva versión de Govocitos: procesado automático



The screenshot displays the Govocitos software interface. On the left, a histological image of cells is shown with pink outlines indicating automatic segmentation. Above the image is a toolbar with icons for 'Reset', file operations, zoom, pan, and other functions. On the right, a control panel contains the following settings:

- Set calibration: Value: 1,0
- Set Parametros: pixels
- Min. Diameter: 100
- Max. Diameter: 1000
- Unsupervised cell recognition
- Detect smaller cells:
- Smaller diameter: 50 pixels
- Supervised post-processing:
- Selected cell:
- Species analysed: Gallo
- Automatic classification:
- Manual classification:

At the bottom of the image area, the text reads: "Image: /home/cernadas/nextcloud/gallo/gl-07-lb 1-7.tif Size: 2088x1550". At the bottom right of the control panel, there is a small thumbnail image of the processed cells in blue.

Nueva versión de Govocitos

- Instalada en el IIM y IOE desde julio de 2018.
- Especies y número de imágenes analizadas:
 - Gallo (26 imágenes)
 - Maragota (48 imágenes)
 - Gallineta (21 imágenes)
- No se han realizado estadísticas del funcionamiento del sistema en el laboratorio porque parte de las imágenes han sido analizadas durante la fase de pruebas de Govocitos.

Etapa de reconocimiento de los objetos de interés

- Hay técnicas de segmentación que buscan discontinuidades y homogeneidades en alguna propiedad física de la imagen.
- Normalmente son no supervisadas, aunque se utilice conocimiento descriptivo del problema a resolver.
- Muchas son muy costosas computacionalmente y, por tanto, no adecuadas para un análisis interactivo en tiempo real.
- Necesitan configurar parámetros, cuyo significado muchas veces no es explícito.

Técnicas utilizadas

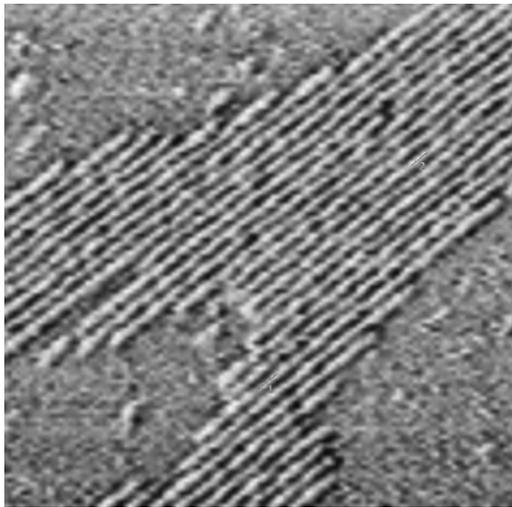
- Discontinuidades o bordes: una aproximación basada en filtro de Canny.
- Homogeneidad: técnicas de clustering con matemática morfológica.
- Técnicas basadas en modelos: transformada de Hough.
- CLAVE: parametrizar dinámicamente las técnicas con datos extraídos de cada imagen.

Futuro: polymerAnalyser

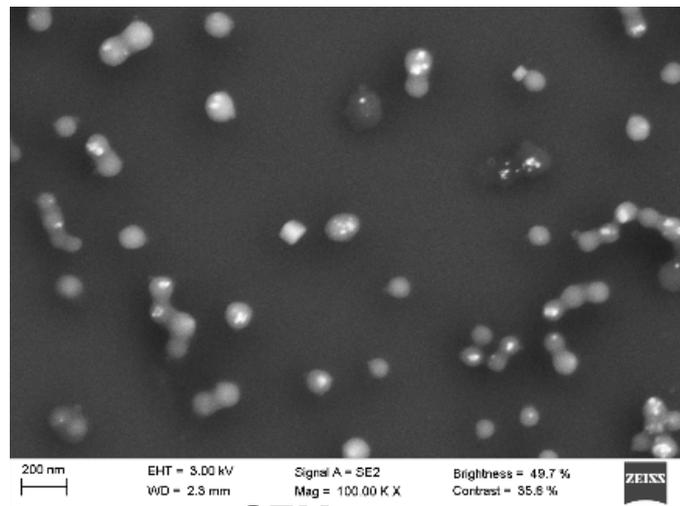


Centro Singular de Investigación
en Química Biolóxica e
Materiais Moleculares

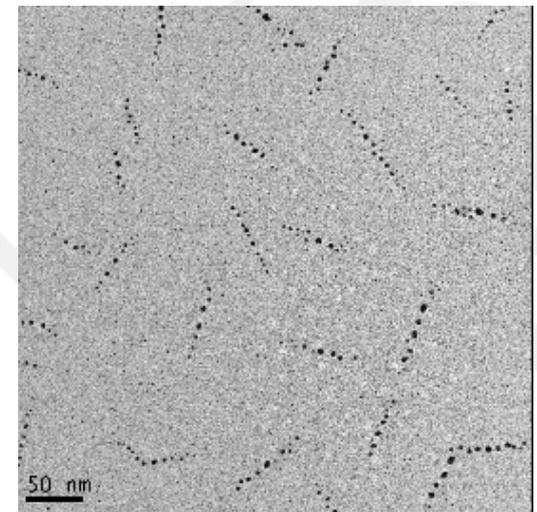
- Analizar automáticamente imágenes de microscopio de polímeros. Tipos de imágenes:
 - AFM: Atomic Force Microscopy
 - SEM: Scanning Electronic Microscopy
 - TEM: Transmition Electronic Microscopy



AFM



SEM



TEM

PolymerAnalyser: detección automática

Helical Polymer Analyser

Reset [Folder] [Refresh] [Zoom In] [Zoom Out] [Reset] [Erase] [Draw] [Select]

Set Parametros: pixels

Min. Diameter: 5 [Rule]

Max. Diameter: 30 [Rule]

Image type:

TEM SD TEM A

SEM AFM

Automatic processing of the image: [Run]

Max. helical pitch: 60 pixels

Compute automatic alignments: [Run2] [Run3]

Draw manually alignments: [Draw lines]

Visualization of results

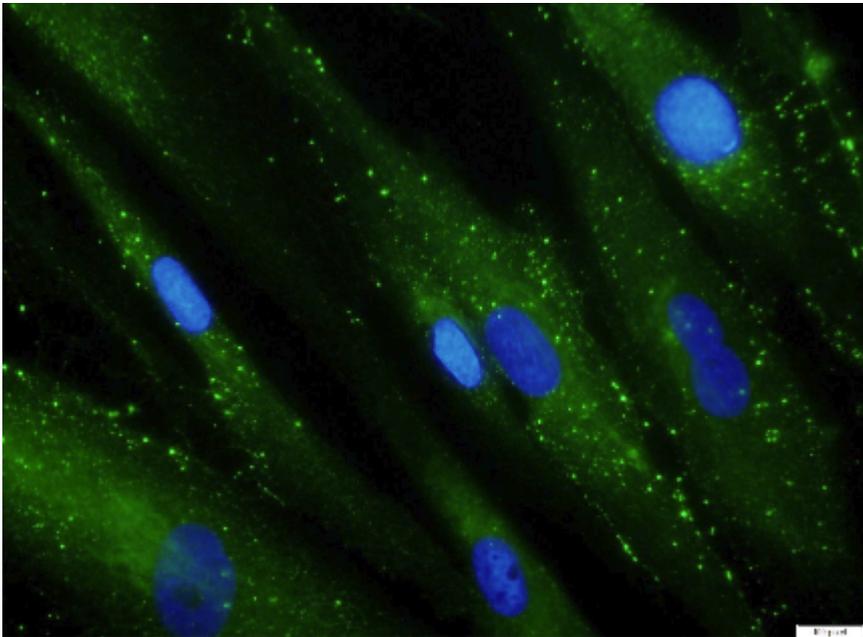
Histogram step 4

[SHOW TABLE]

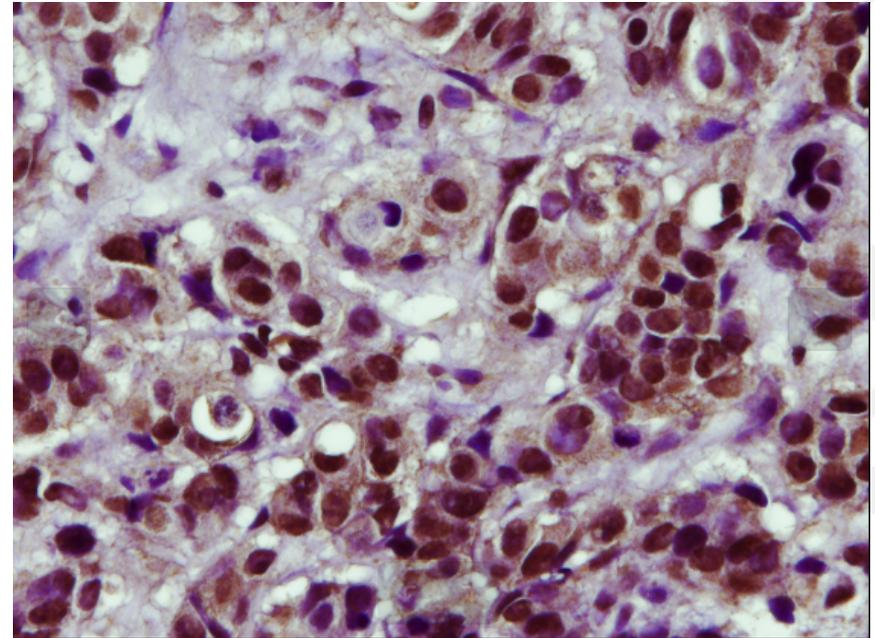
Image: /home/cernadas/proyectos/ciqus/images/TEM/A/20.tif Size: 2048x2048

Futuro: breastAnalyser

Se trata de analizar imágenes histológicas y de fluorescencia de tejido de mama para la caracterización del cáncer de mama.



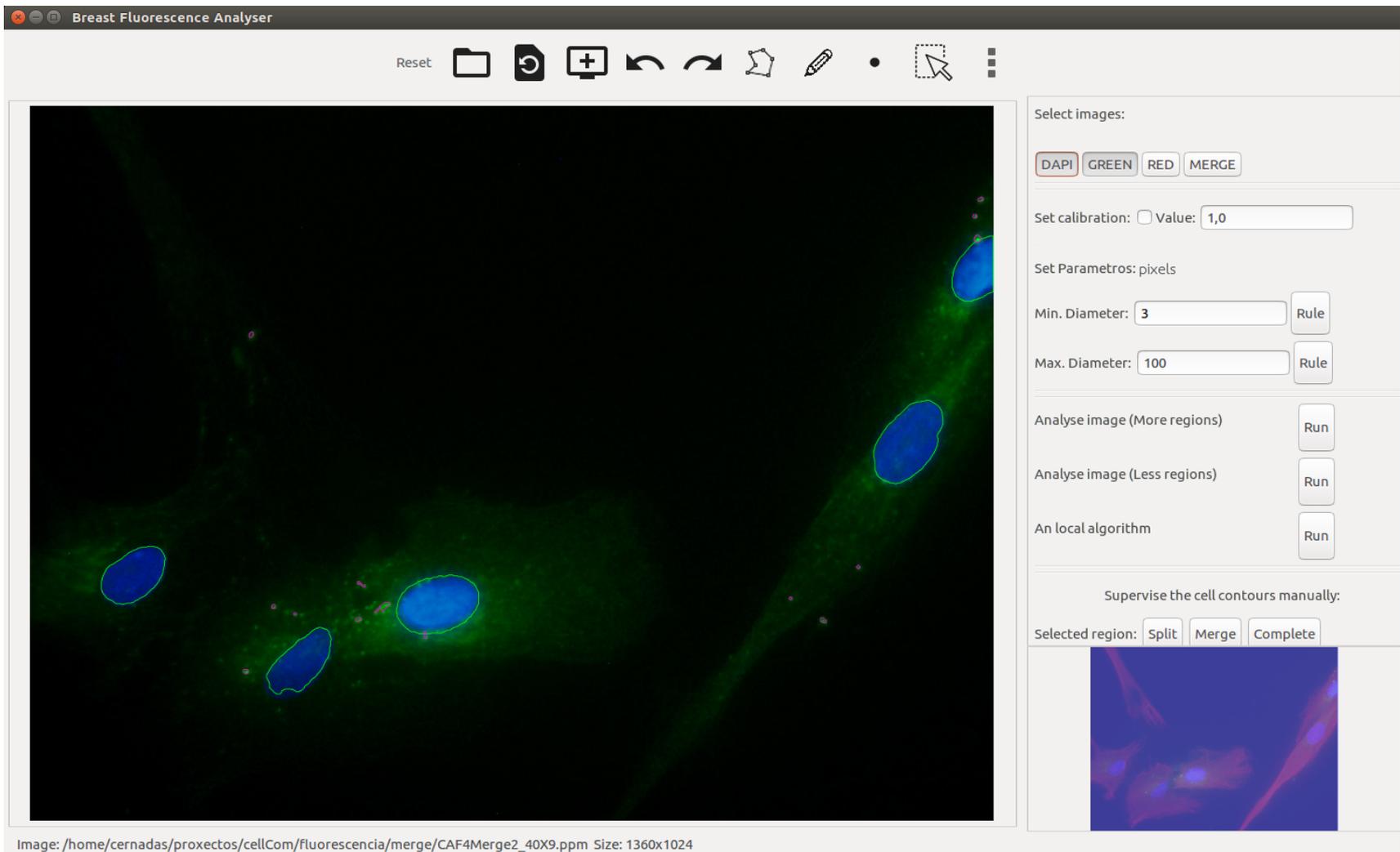
Fluorescencia



Histológica

Eva Cernadas

BreastAnalyser: detección automática



Futuro: pollenAnalyser



FACULTAD DE FARMACIA

- **Realizar un sistema de visión por computador que realice el recuento automático de polen en suspensión.**
- El polen es una partícula reproductora que emiten los órganos florales masculinos para fecundar a las flores femeninas.
- El recuento se realiza manualmente en todas las estaciones aerobiológicas de España.
- Esta información se usa para ver la calidad ambiental y proporcionar recomendaciones médicas a las personas alérgicas al polen.
- La red gallega de aerobiología identifica 78 tipos de polen.

PollenAnalyser

PollenAnalyser

Reset

Max. Diameter: 300 Rule

Automatic processing: Detect cells Classify

Pollen selected: WITHOUT TYPE

Ab Ac Ace Aes Ail Al
 Api Art Be Bra Bux Camp
 Can Cary Cast Cas Ce Cel
 Ci Comp Cor Cu Cy Che
 Dia Ech Eri Fab Fa Fr
 Ge Jug Jun Lab Lau Li
 Lon Ma Me Mon Mor k
 Ol Ole Ox Pal Pap Phy
 Pi Pl Pt Poa Pol Pop
 Pri Q Ro Ru Sa Sam
 Scr Se Ta Ti Til Ts
 Ul Urg Urp Vi Of WT

Show results: SHOW TABLE

Respuesta:

PODEMOS, reconocer y medir automáticamente con el ordenador objetos sobre imágenes biológicas de microscopio?



Gracias por vuestra atención

Eva Cernadas García: eva.cernadas@usc.es

citus.usc.es