

## DETERMINACION AUTOMATICA DEL INDICE MITOTICO CON METODOS DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES.

María Garza - IIMAS, UNAM.

Ricardo Toledo - CIUNAM.

### RESUMEN

Se propone un sistema para identificar y contabilizar núcleos de linfocitos y linfocitos en proceso de división celular (mitosis) para posteriormente calcular el índice mitótico. Las imágenes se obtienen de un microscopio óptico con una amplificación lateral de 20X x 3.3X (66X). Se digitalizan en un espacio de 512 x 480 x 8 bits. Inicialmente se procesan con un filtro de ruido de baja frecuencia y una segmentación. La segmentación produce una serie de objetos que son clasificados según ciertos criterios establecidos en un entrenamiento previo, para luego tomar una decisión sobre su naturaleza.

### INTRODUCCION.

El término mitosis se refiere al proceso de división celular que incluye varias etapas. La tasa a la cual ocurre la mitosis en cada tejido está controlada de manera muy precisa, siendo muy alta en ciertas células mientras que en otras es cero. Durante la regeneración de un tejido, la tasa aumenta controladamente; durante un cancer, ésta crece sin control. Una proliferación celular normal puede ser alterada si el tejido entra en contacto con ciertos agentes físicos, químicos o biológicos conducentes a la citotoxicidad, resultando en un decaimiento de la proliferación celular. Esta tasa es, por lo tanto, útil para la evaluación de la seguridad de nuevos productos y sustancias destinadas a entrar en contacto con algún tejido.

Dado que las sustancias que aumentan la proliferación celular se consideran como potenciales promotores de tumores, se ha propuesto que la tasa mitótica puede

ser un dato útil para la detección de sustancias cancerígenas. De igual manera, es un dato útil para la evaluación de nuevas drogas anticancerígenas, ya que el objetivo de estas últimas es de disminuir dicha tasa.

La tasa mitótica se calcula con la fracción de células que se encuentran en el proceso de mitosis. Este porcentaje de mitosis se conoce como el índice mitótico y es un método confiable y sencillo de evaluación de la proliferación celular. Sin embargo, para obtener este índice, tradicionalmente se recurre a una observación visual de las preparaciones al microscopio, lo cual es una tarea larga y tediosa propensa a errores subjetivos. De aquí que un método para efectuar estas evaluaciones de forma automática sería un objetivo muy deseable en el área.

#### OBJETIVO.

El objetivo de este sistema es suplantar, hasta donde sea posible, al observador humano por un sistema de análisis automático de las preparaciones. El procedimiento para el análisis de las laminillas es contar del orden de 2000 núcleos, en diferentes campos de una sola laminilla, y contar las mitosis que se encuentren en este proceso - que pueden variar desde unas cuantas hasta un 5% del total de núcleos. Para esto, el sistema contará eventualmente con un subsistema de platinas motorizadas para seleccionar los campos a analizar de forma aleatoria y automática. Dado que son muchos más núcleos que mitosis, el sistema guardará las coordenadas de los campos en donde se detectan las mitosis para una verificación humana posterior, ya que un error en el número de mitosis es mucho más grave que uno en el conteo de núcleos.

#### DIGITALIZACION.

La digitalización se hace de un microscopio óptico a través de una cámara tipo CCD en una tarjeta digitalizadora de video estandar NTSC. El microscopio es ajustado inicialmente para obtener una 'buena' imagen en el ocular en términos de iluminación y foco. Una vez logrado esto, se procede a fijar los niveles de 'offset' y ganancia de entrada a la tarjeta digitalizadora de tal forma que la imagen digitalizada caiga dentro de un rango previamente establecido. Para esto conviene utilizar una pseudocoloración de la imagen que permita obtener esto de manera interactiva. Una vez establecidos el objetivo, la iluminación y el foco del microscopio, se procurará mantener estos parámetros lo más estables posible.

#### SEGMENTACION.

Para eliminar variaciones en la iluminación (ruido de baja frecuencia) se efectúa un filtrado 'pasa-altas' sobre la imagen entera y se multiplica por una constante para realzar la información. Posteriormente la imagen es invertida, para obtener el negativo de ella. La segmentación presupone que los objetos de interés tienen valores de intensidad promedio menores al valor promedio del fondo y que ocupan un porcentaje de la imagen digitalizada que será estadísticamente constante en toda la preparación.

Así, se hace una búsqueda en el histograma de la imagen para encontrar el primer mínimo después del porcentaje que se presupone pertenece al fondo. Este mínimo también está sujeto a un criterio: debe ser un mínimo absoluto dentro de una vecindad de dimensión  $n$  (ver Figura 1).

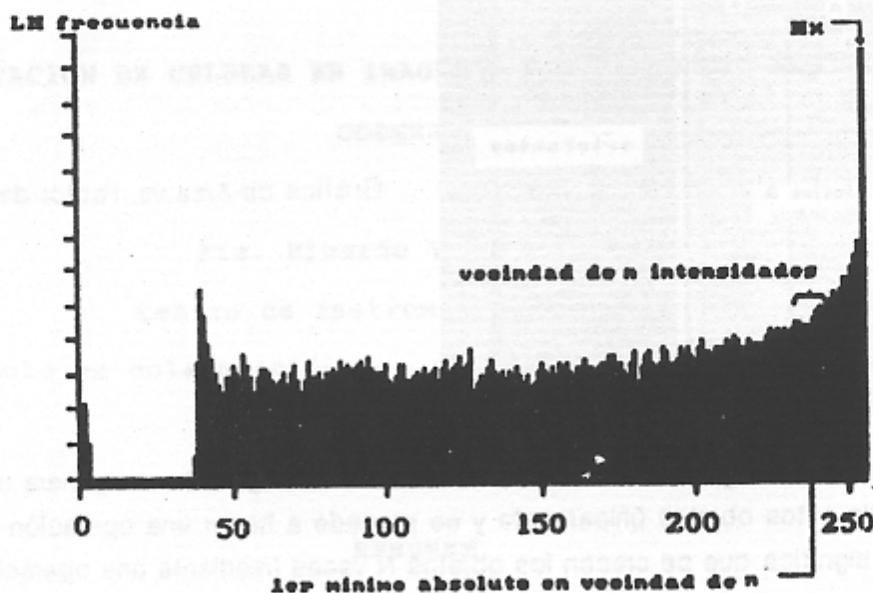


Fig. 1 Histograma de la Imagen

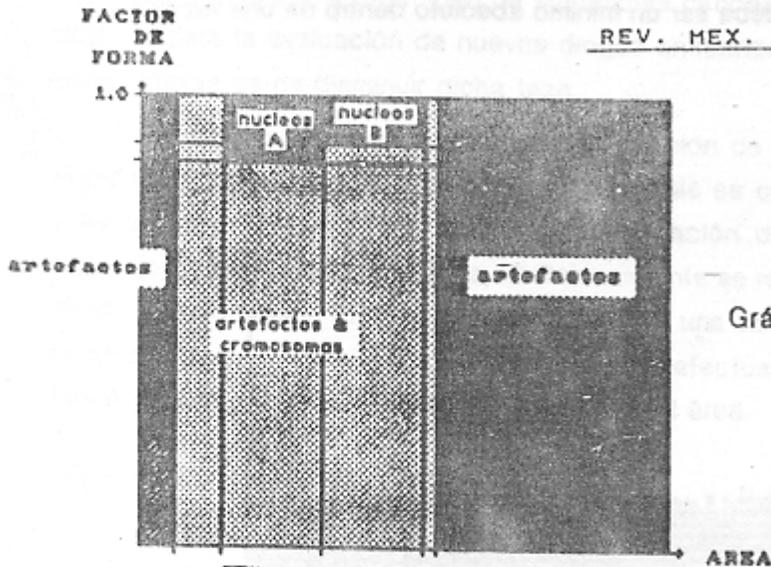
Por lo general, el mínimo encontrado no es excesivamente sensible a estos dos parámetros y el método es robusto en la mayoría de los casos. Una vez encontrado el nivel de segmentación, se procede a generar en memoria una estructura que contiene todos los objetos resultado de la segmentación.

#### CLASIFICACION E IDENTIFICACION DE OBJETOS.

La clasificación se efectúa utilizando criterios de tamaño y circularidad. Inicialmente se entrena el sistema para obtener las estadísticas que se utilizan para obtener estos criterios. Se alimenta con una muestra considerable de objetos (del orden de 20 nucleos y 10 mitosis), y se obtiene area y factor de forma ( $Perimetro^2/4\pi Area$ ) promedio de cada clase a clasificar. Es factible clasificar los nucleos en varias clases, así como las mitosis. La Tabla 1 muestra una gráfica de Area contra Factor de Forma, donde el espacio ha sido dividido en varias clases. Los objetos de area muy pequeña y los de area muy grande se clasifican como artefactos, independientemente de su factor de forma. De los objetos restantes, los de factor de forma semejante a un círculo se clasifican en dos clases dependiendo de su area, si ésta es pequeña se clasifican como nucleos tipo A, y si es mayor, como nucleos tipo B.

#### DETECCION DE CUMULOS DE CROMOSOMAS.

Los objetos restantes se consideran como una mezcla de artefactos y posibles cúmulos de cromosomas. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se aprovecha el hecho de que un cúmulo de cromosomas está caracterizado por ser un grupo de objetos de aproximadamente el mismo tamaño y que se encuentran cercanos entre sí.



Gráfica de Área vs. Factor de Forma.

El procedimiento que se sigue para hacer la detección es el siguiente: se genera una imagen binaria de estos objetos únicamente y se procede a hacer una operación de cerradura. Esto significa que se crecen los objetos  $N$  veces (mediante una operación de dilatación) y se decrecen (mediante una erosión) un número igual de veces de tal forma que objetos que se encuentran cercanos entre sí se unen para formar un solo objeto con área equivalente a la suma de sus partes, mientras que objetos aislados - artefactos en este caso - se mantienen como objetos separados con área igual a la original.

Después de estas operaciones, se segmenta la imagen final y los objetos con área mayor grande se seleccionan como cúmulos de cromosomas o mitosis y son contabilizados como tales. De esta forma queda la imagen separada en cuatro categorías: artefactos, núcleos A, núcleos B, y cúmulos de cromosomas.

#### LIMITACIONES.

El procedimiento aquí propuesto ha mostrado tener una efectividad de 90%. En muchos casos, ciertos artefactos que muestran una distribución espacial similar a la de un cúmulo de cromosomas quedarán contabilizados como mitosis. Esto no es del todo grave ya que el sistema guardará las coordenadas del campo donde se encuentran las mitosis para su posterior verificación humana. Sin embargo, una limitación más grave se encuentran en la falta de detección de mitosis muy compactas o muy dispersas, ya que en el primer caso, la segmentación produce un objeto que queda clasificado como artefacto, mientras que en el segundo caso, los cromosomas no llegan a unirse en un solo objeto con la operación de cerradura. Es mucho más grave la falta de detección de una mitosis que la detección falsa de una mitosis ya que el primer caso no puede ser resuelto mediante verificación como en el último. Otro problema que ha presentado este sistema ha sido la contabilización de ciertos artefactos como núcleos por su área y factor de forma.

Estos dos problemas podrán ser atacados haciendo un análisis multiespectral de la imagen; trabajando en color. Esto aprovecharía una característica empleada por el observador humano al hacer el análisis de una laminilla: una detección asistida por