

Desarrollo de un algoritmo de segmentación para la detección de diferentes componentes tisulares para la valoración de daño hepático.

A. Rodríguez Ortega¹, A. Ten Esteve¹, J. Pérez Rojas², Á. Alberich-Bayarri^{1,3}, L. Martí-Bonmati^{1,4}

¹ Grupo de Investigación Biomédica en Imagen (GIBI2³⁰), Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España.

² Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, España.

³ Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine, Quibim SL, Valencia, España.

⁴ Servicio de Radiología, Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, España.

Resumen

Introducción: Los últimos avances tecnológicos en el campo de la anatomía patológica (aparición de escáneres más potentes que digitalizan con una gran resolución tejidos patológicos) junto con los avances en el procesamiento digital de imagen, ofrecen la posibilidad de implementar nuevas herramientas de procesamiento de imagen que permitan a los patólogos obtener diagnósticos más objetivos, precisos y fiables. Objetivos: Desarrollar una herramienta capaz de segmentar imágenes patológicas de tejido hepático a fin de detectar la cantidad de fibrosis, hierro e inflamación de una muestra escaneada. Metodología: Tras la tinción de las muestras de parénquima hepático y su adecuado escaneo, se procesaron mediante la aplicación de un algoritmo de segmentación basado en color, haciendo uso del método de agrupación K-means. Resultados: Los resultados obtenidos fueron muy favorables, ya que se consiguió segmentar de forma fidedigna la fibrosis y la inflamación del tejido hepático, según validación por el experto anatomopatólogo. Conclusiones: Estos resultados sientan las bases para la creación de una herramienta más potente de análisis de imágenes histológicas, la cual ofrezca información más objetiva y, de este modo, ayude a la obtención de diagnósticos más precisos.

1. Introducción

Las enfermedades difusas hepáticas, cualquiera que sea la causa del debut en la alteración de los hepatocitos (infecciones virales, alcohol, trastornos del metabolismo, autoinmunidad o drogas), cursan con un proceso inflamatorio mantenido en el tiempo. Los depósitos asociados de grasa intracelular y de hierro favorecen este proceso inflamatorio. Con el tiempo se produce, a través de una cascada de respuesta celular y molecular, una acumulación progresiva de colágeno en el espacio intersticial como expresión de la fibrosis. Estos cambios tisulares deben analizarse y seguirse de forma adecuada y precisa, dado que están muy relacionados con el futuro desarrollo de cicatrices hepáticas, la progresión de fibrosis a cirrosis, incrementando significativamente la probabilidad de desarrollo de un hepatocarcinoma. Por lo

tanto, el grado de fibrosis y la severidad de la lesión hepatocitaria se ha de medir de la manera más exacta y precisa posible para establecer el pronóstico de cada paciente y evaluar las posibilidades terapéuticas.

Tradicionalmente, el daño hepatocitario se evalúa mediante anatomía patológica a través de información histológica semicuantitativa, obtenidas mediante el uso de escalas como, por ejemplo, el ISHAK y METAVIR [1, 2] para valorar el grado de fibrosis, cuantificación de microgramos de hierro e índice de hierro hepático (IHH) y porcentaje de esteatosis (puntuación histológica NASH CRN) [3]. El especialista realiza el análisis cualitativo de imágenes de corte muy fino del tejido hepático a través de un microscopio óptico. El tejido se prepara previamente con una tinción específica.

Actualmente, los avances tecnológicos en el campo de la digitalización de imágenes médicas, junto con el alto incremento de la capacidad de computación de los nuevos sistemas informáticos, permiten salvar muchas limitaciones de los métodos tradicionales obteniendo, de este modo, mediciones más objetivas que ayuden a los patólogos a complementar los resultados obtenidos con las metodologías tradicionales [4]. Esta digitalización en el campo de la anatomía patológica es lo que se conoce a día de hoy como patología digital (PD).

La patología digital consiste en convertir la luz de una imagen, obtenida a través de un microscopio, en un archivo digitalizado que permita su reproducción en un ordenador [5]. PD facilita además la manipulación, el procesamiento, el análisis y la compartición de las imágenes para, de este modo, aportar nueva información que pueda ser útil para el diagnóstico y que mediante los métodos de análisis tradicionales podría no ser posible su uso [6,7].

A pesar del gran potencial que tiene la PD, su uso en el diagnóstico clínico es reciente gracias, en parte, al desarrollo también de nuevos sistemas de escáneres de gran capacidad que permiten trabajar con un gran volumen de cortes patológicos. Estos nuevos dispositivos permiten además trabajar remotamente permitiendo un uso más eficiente del patólogo, así como automatizar algunos aspectos de la carga del trabajo del clínico.

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar una nueva herramienta que permita cuantificar, mediante procesamiento de imágenes patológicas, la cantidad de fibrosis, hierro e inflamación del tejido hepático, buscando así obtener unos resultados objetivos y precisos de los valores patológicos que se encuentran en una hepatopatía crónica difusa, y de esta forma poder complementar los diagnósticos que los patólogos hagan en sus análisis.

3. Materiales y Métodos

El proyecto se realizó en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (HUPLF) en colaboración con el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV).

3.1. Instrumentación

Las imágenes utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a partir muestras de tejido hepático, previamente teñidas, mediante el escáner VENTANA iScan HT, Roche (Roche, Basel, Switzerland) (Figura 1) situado en HCUV [8]. Este instrumento ofrece al servicio de anatomía patológica imágenes digitales de alta calidad con aumentos de hasta 40x aumentos.



Figura 1. VENTANA iScan HT de Roche

3.2. Protocolo

Las imágenes patológicas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante la realización de una biopsia hepática percutánea guiada por imagen para la obtención de 2-3 cm de material que incluía al menos 11 espacios portaes con una aguja del calibre 16.

Después de recoger las muestras, éstas fueron teñidas con diferentes tinciones a fin de poder destacar los diferentes componentes tisulares que queremos evaluar. Para este estudio se utilizaron las tinciones Perls (o azul de Prusia) para destacar el hierro, el tricrómico de Masson para evaluar la cantidad de fibrosis y el CD45 para detectar la inflamación hepática.

Después de realizar las diferentes tinciones en diferentes cortes de un mismo tejido hepático, éstas fueron colocadas en diferentes laminillas de vidrio para su conservación y su uso en el escáner.

Por último, una vez escaneadas todas las laminillas las imágenes fueron exportadas en un formato TIF multi-páginas para realizar el procesamiento digital de las imágenes.

3.3. Procesado digital de imágenes

El procesamiento de las imágenes y el desarrollo de los algoritmos se realizó con el programa Matlab 2015b (Mathworks Inc, Natick, MA, USA) [9].

Para la lectura de las imágenes se implementó una función que permitiera extraer la imagen del fichero multipáginas a una resolución deseada. Para este trabajo se utilizaron imágenes con la máxima resolución posible (25120 x 25728 píxeles).

El siguiente paso fue realizar una segmentación basada en color, utilizando el método de agrupamiento K-means.

Para ello, se transformó la imagen bajo análisis de un espacio RGB a un espacio de color CIE L^*a^*b (CIELAB). El espacio CIELAB es un modelo cromático donde se agrupan todos los colores que puede ver el ojo humano [10]. Este espacio está representado por tres parámetros que son la luminosidad del color (L), la posición entre rojo y verde (a^* , valores negativos tienden al verde) y su posición entre el amarillo y el azul (b^* , valores positivos tienden al amarillo).

A continuación, se utilizaron las componentes a^* y b^* para realizar el agrupamiento mediante el método K-means. Este método permite agrupar cada pixel en diferentes clúster y crear, de este modo, máscaras para poder seleccionar los píxeles de interés que determinen las diferentes componentes tisulares que conforman el tejido histológico.

Una vez seleccionado el clúster donde se agrupaban los píxeles con la información de la componente tisular a estudiar, se pasó a ajustar más la segmentación mediante una umbralización del histograma de la componente L. De este modo se podía segmentar la imagen dependiendo de si esta contenía una mayor o menor luminosidad del color seleccionado, según el caso que procediera.

La metodología desarrollada permite el análisis de tres componentes tisulares que coexisten en el parénquima hepático en las enfermedades difusas (fibrosis, hierro e inflamación). A continuación se muestran los resultados obtenidos:

- **Fibrosis:** para la detección de la fibrosis de una muestra se utilizó la tinción de tricrómico de Masson, una sustancia que destaca el colágeno de la muestra tiñéndolo de un color azul oscuro. Por lo tanto el objetivo de esta segmentación fue detectar los píxeles cuyo color fuera un azul oscuro,
- **Inflamación:** la inflamación del tejido hepático fue detectada mediante una tinción denominada CD45. Esta tinción reacciona con la inflamación mostrando un color marrón oscuro,
- **Hierro:** la detección del hierro se realiza mediante la tinción Perls, una sustancia que evidencia la presencia de muestras de hierro en

la biopsia y reacciona destacando gránulos de color azul verdoso.

4. Resultados

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, y validados por un especialista en anatomía patológica. Las componentes de fibrosis e inflamación extrajeron de forma fidedigna. En el caso de la cuantificación del hierro, una vez aplicada la tinción Perls el patólogo comprobó que no existía ninguna acumulación de hierro en el tejido analizado. Aun así recomendó probar el algoritmo para detectar las áreas de los hepatocitos encontrados en la muestra. Estas áreas reaccionan al Perls mostrándose con un color rosa oscuro.

Dado que la evaluación de estos componentes es frecuentemente cualitativa, no existe un *ground truth* contra el que se pueda comparar nuestra segmentación.

De forma visual, el resultado de aplicar el algoritmo de segmentación se puede comprobar en las Figuras 2 a 4 para la fibrosis, inflamación y hierro, respectivamente.

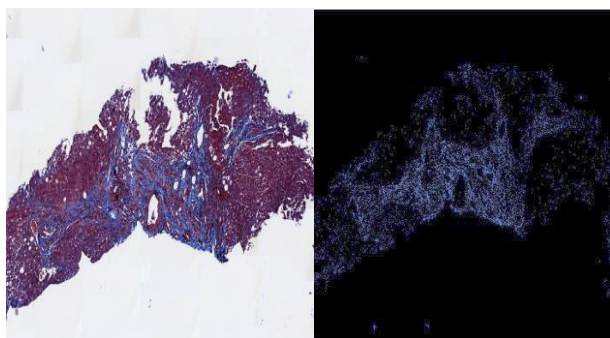


Figura 2. Tejido hepático teñido con tricrómico de Masson e imagen segmentada para la cuantificación de la fibrosis.

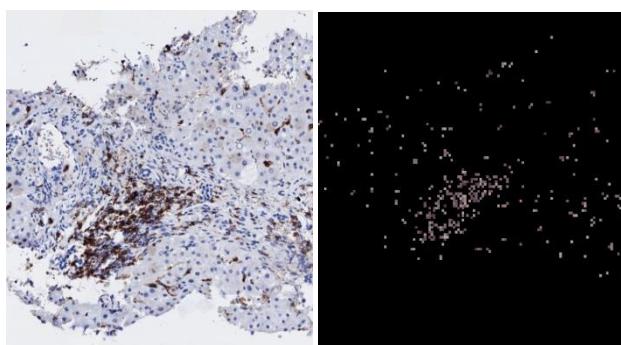


Figura 3. Tejido hepático teñido con CD45 e imagen segmentada para la cuantificación de la inflamación.

5. Discusión

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar, en una fase inicial, una herramienta que sirviera de apoyo a los patólogos a la hora de analizar muestras de tejido hepático afecto, ofreciendo información objetiva mediante un procesamiento digital de imagen.

Esta metodología consiste en una segmentación basada en color, de una muestra obtenida de una biopsia hepática previamente teñida. Esta segmentación dio como resultado una separación muy específica de las componentes (fibrosis, hierro e inflamación) que se puede encontrar en una muestra de tejido hepático alterado.

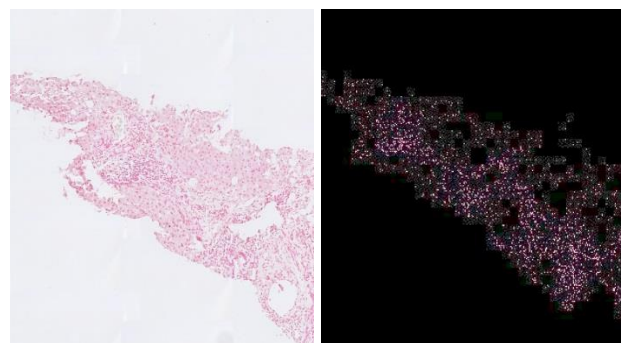


Figura 4. Tejido hepático teñido con Perls e imagen segmentada para la cuantificación de los hepatocitos.

Los resultados preliminares obtenidos muestran el camino para la implementación de una herramienta de análisis de imágenes patológicas de alta resolución que detecte y cuantifique, de una forma más automática y precisa, posibles daños patológicos en las muestras de tejido a analizar.

Por lo tanto, las líneas de desarrollo futuro del proyecto serán dirigidas en tres caminos. El primero será complementar el estudio con más casos de biopsias hepáticas, en donde se pretende poner a prueba la metodología descrita para, de este modo, detectar posibles errores y mejoras del algoritmo y así facilitar su uso a los patólogos. El segundo camino va dirigido a adaptar nuestra metodología a otros estudios de anatomía patológica, diferentes a la biopsia hepática, para intentar ampliar el espectro de análisis de la herramienta. Y por último, la herramienta será validada por experimentados patólogos, quienes valorarán la información ofrecida, comparándola con la obtenida mediante las técnicas tradicionales.

Referencias

- [1] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al: Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol. 1995, 22: 696-699. 10.1016/0168-8278(95)80226-6.
- [2] Bedossa, P., & Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. Hepatology, 24(2), 289-293.
- [3] Speliotes, E. K., Yerges-Armstrong, L. M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L. J., Palmer, C. D. & Nalls, M. A. (2011). Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. PLoS genetics, 7(3), e1001324.
- [4] Bhargava, R., & Madabhushi, A. (2016). Emerging themes in image informatics and molecular analysis for digital pathology. Annual review of biomedical engineering, 18, 387-412.
- [5] Snead, D. R., Tsang, Y. W., Meskiri, A., Kimani, P. K., Crossman, R., Rajpoot, N. M., ... & Momtahan, N. (2016).

Validation of digital pathology imaging for primary histopathological diagnosis. *Histopathology*, 68(7), 1063-1072.

- [6] Furness, P. N. (1997). The use of digital images in pathology. *The Journal of pathology*, 183(3), 253-263.
- [7] Gurcan, M. N., Boucheron, L. E., Can, A., Madabhushi, A., Rajpoot, N. M., & Yener, B. (2009). Histopathological image analysis: A review. *IEEE reviews in biomedical engineering*, 2, 147-171.
- [8] VENTANA iScan HT, Roche-Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA.
- [9] MATLAB and Image Processing Toolbox Release 2015b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.
- [10] Weatherall, I. L., & Coombs, B. D. (1992). Skin color measurements in terms of CIELAB color space values. *Journal of investigative dermatology*, 99(4), 468-473.