



Segmentação de Árvore de Componentes por Valores de Extinção: Aplicação na Detecção Automática de Núcleos Celulares

Component Tree Segmentation by Extinction Values: Application in the Automatic Detection of Cell Nuclei

Segmentación del Árbol de Componentes por Valores de Extincción: Aplicación en la Detección Automática de Núcleos Celulares

Alexandre Gonçalves Silva¹

RESUMO

Descritores: Valores de Extinção; Árvore de Componentes; Segmentação de Núcleos Celulares

Objetivo: Este trabalho propõe um algoritmo não paramétrico para a segmentação da árvore de componentes por valores de extinção. Esta abordagem se mostrou adaptada para a caracterização de núcleos celulares, importante na mensuração e compreensão de processos biológicos. **Métodos:** O método consiste na rotulação de máximos regionais com valores de extinção estaticamente relevantes e particionamento da árvore de componentes, dado o caminho de influência de cada rótulo. Esta ideia foi validada na identificação de núcleos celulares, em um dataset de 664 imagens, com ground truth das segmentações. **Resultados:** A correlação da contagem de núcleos foi de 0,95 ($p < 0,05$). As imagens binárias foram geradas com acurácia de $0,92 \pm 0,08$, sensibilidade de $0,62 \pm 0,19$, especificidade de $0,99 \pm 0,02$ e IoU de $0,57 \pm 0,16$. **Conclusão:** Apesar da simplicidade de não exigir parâmetros ou ser treinado, o método é robusto para separar regiões de interesse relativamente mais brilhantes em imagens, como no caso dos núcleos celulares.

ABSTRACT

Keywords: Extinction Values; Component Tree; Segmentation of Cell Nuclei

Objective: This work proposes a non-parametric algorithm for segmentation of the component tree by extinction values. This approach proved to be adapted for the characterization of cell nuclei, important in the measurement and understanding of biological processes. **Methods:** The method consists of labeling regional maximums with statically relevant extinction values and partitioning the component tree, given the influence path of each label. This idea was validated in the identification of cell nuclei, in a dataset of 664 images, with ground truth of the segmentations. **Results:** The correlation of nucleus count was 0.95 ($p < 0.05$). Binary images were generated with accuracy of 0.92 ± 0.08 , sensitivity of 0.62 ± 0.19 , specificity of 0.99 ± 0.02 and IoU of 0.57 ± 0.16 . **Conclusion:** Despite the simplicity of not requiring parameters or being trained, the method is robust for separating regions of interest relatively brighter in images, as in the case of cell nuclei.

RESUMEN

Descriptorios: Valores de Extincción; Árbol de Componentes; Segmentación de Núcleos Celulares

Objetivo: Este trabajo propone un algoritmo no paramétrico para la segmentación del árbol de componentes por valores de extinción. Este enfoque demostró ser adaptado para la caracterización de núcleos celulares, importante en la medición y comprensión de procesos biológicos. **Métodos:** El método consiste en etiquetar máximos regionales con valores de extinción estadísticamente relevantes y dividir el árbol de componentes, dada la trayectoria de influencia de cada etiqueta. Esta idea fue validada en la identificación del núcleos celulares, en un dataset de 664 imágenes, con ground truth de las segmentaciones. **Resultados:** La correlación del recuento de núcleos fue del 0,95 ($p < 0,05$). Las imágenes binarias se generaron con una precisión del $0,92 \pm 0,08$, sensibilidad del $0,62 \pm 0,19$, especificidad del $0,99 \pm 0,02$ e IoU del $0,57 \pm 0,16$. **Conclusión:** A pesar de la simplicidad de no requerir parámetros o ser entrenado, el método es robusto para separar regiones de interés relativamente más brillantes en imágenes, como en el caso de núcleos celulares.

¹ Professor do Departamento de Informática e Estatística e do Programa de Pós-Graduação em Informática em Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

INTRODUÇÃO

Uma imagem em níveis de cinza pode ser visualizada como uma superfície topográfica, na qual as intensidades correspondem a altitudes⁽¹⁾. Máximos regionais, portanto, consistem em regiões mais claras envolvidas totalmente por pixels relativamente mais escuros. Esta interpretação é interessante para o processamento de imagens de células, como as da figura 1 (supõe-se o negativo ou complemento da amostra mais à direita).

Considerando que cada célula contém, em geral, múltiplos máximos regionais, é preciso selecionar apenas um deles que seja mais representativo. Para isto, o conceito de valores de extinção pode ser aplicado. A extinção de um máximo regional consiste na mínima filtragem por atributo⁽²⁾ para que tal máximo deixe de existir na imagem. Se o atributo for a altura, o valor de extinção de um máximo M é conhecido como “dinâmica” e pode ser interpretado como a mínima queda de altitude entre todos os caminhos, a partir de M , até um máximo em maior altitude. A figura 2 exemplifica o cálculo do valor de extinção de altura (dinâmica) de M_2 . Em relação a M_2 , há apenas dois máximos em maior altitude, M_1 e M_5 . No caminho de M_2 até M_1 , a maior queda de altitude (em relação à altitude de M_2) é de h_1 e, de M_2 até M_5 , a maior queda é h_2 (figura 2 à esquerda). Como h_2 é menor que h_1 , então a filtragem por altura h_2 é suficiente para extinguir o máximo M_2 na imagem, ou seja, naquele espaço, deixa de existir um máximo regional (figura 2 à direita).

Valores de extinção podem ser eficientemente

calculados a partir de árvore de componentes⁽²⁾. Essa árvore consiste nas relações de inclusão de componentes conexos geradas pela decomposição por limiares da imagem. Há um algoritmo eficiente, de tempo linear para imagens com intensidades inteiras dentro de um intervalo conhecido, baseado em inundação por crescimento hierárquico de regiões, que descreve esta representação concisamente em uma estrutura de dados denominada max-tree⁽³⁾. Neste processo de construção da max-tree, pode-se associar atributos crescentes a cada nodo da árvore, de modo a calcular extinções de altura, de área, de volume, dentre outras, utilizando um mesmo algoritmo⁽²⁾. Neste contexto, destacam-se aplicações com a detecção de navios em SAR⁽⁴⁾, a classificação de vegetação em agricultura de precisão⁽⁵⁾ ou a avaliação de qualidade de imagens de fundo de olho⁽⁶⁾.

Núcleos celulares

A maioria dos 30 trilhões de células do corpo humano contém um núcleo cheio de DNA, o código genético que programa cada célula. A identificação de núcleos é essencial para grande parte das análises clínicas, permitindo individualizar cada célula em uma amostra, mensurar como as células reagem a diferentes tratamentos, e compreender processos biológicos. A automatização da detecção dos núcleos permitiria testes mais dinâmicos de medicamentos, encurtando o prazo (por volta de 10 anos) para sua chegada ao mercado e, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida a pacientes. Entre as estratégias mais comuns para a segmentação de núcleos

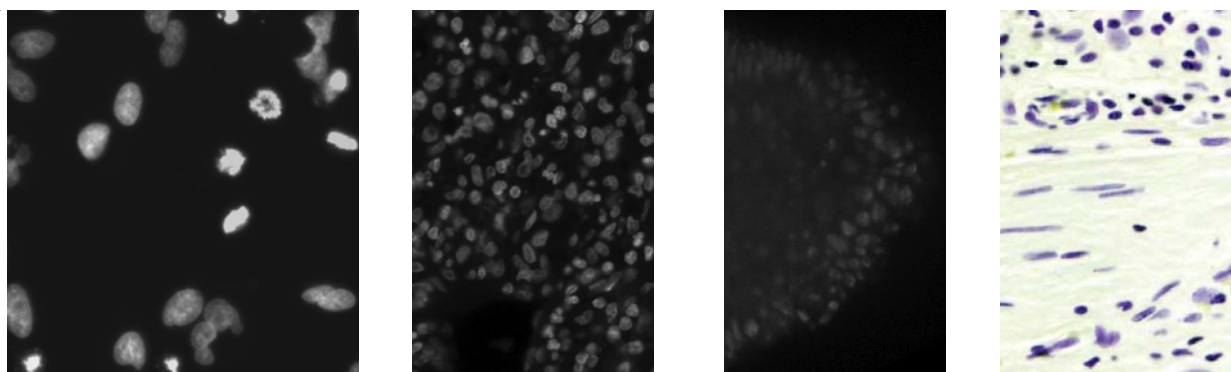


Figura 1 – Exemplos de imagens de células com diferentes ampliações e iluminações¹

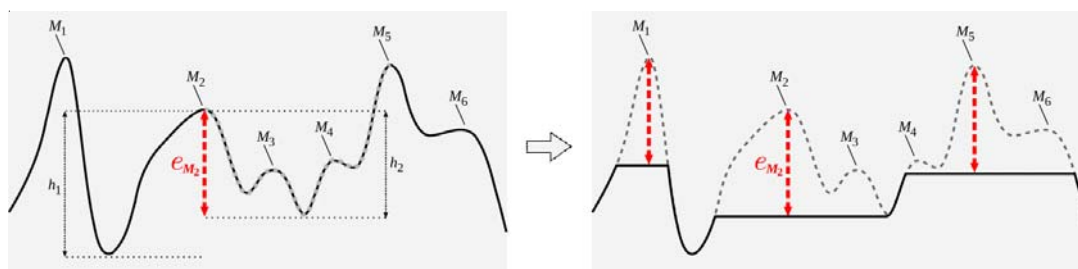


Figura 2 – À esquerda, o valor de extinção de altura (dinâmica), $e_{M_2} = \min(h_1, h_2) = h_2$, do máximo regional M_2 , sendo a altura mínima a descer (entre h_1 e h_2) para atingir outro máximo regional mais alto (M_1 ou M_5); à direita, o resultado da filtragem por altura e_{M_2} , eliminando, entre outros, o máximo regional M_2 ; máximos regionais nas posições M_1 e M_5 continuam existindo

¹ Imagens extraídas do dataset “2018 Data Science Bowl[®]” disponível em: <https://www.kaggle.com/c/data-science-bowl-2018/data>

estão o processamento morfológico baseado em *watershed*⁽⁷⁻⁸⁾, métodos baseados em aprendizagem de máquina⁽⁹⁻¹⁰⁾, e mistos⁽¹¹⁾. Soluções que utilizam algoritmos tradicionais de processamento de imagens, por exemplo, para detecção de contornos⁽¹²⁻¹³⁾ ou limiarizações⁽¹⁴⁾ também são comuns na literatura, mas as redes neurais convolucionais, por exemplo, a arquitetura U-Net⁽¹⁵⁾, têm se posicionado entre os melhores resultados para segmentação de imagens biomédicas⁽¹⁰⁾. O trabalho proposto neste artigo se posiciona como um método de programação tradicional (sem aspectos de aprendizagem de máquina), mas ainda assim comparável ao estado da arte de segmentação de núcleos celulares.

Base de imagens

O “2018 Data Science Bowl[®]” consiste em um conjunto de dados com 37.333 núcleos anotados manualmente em 841 imagens de mais de 30 experimentos em diferentes amostras, linhas de células, instrumentos de microscopia, condições de imagem, operadores, instalações de pesquisa e protocolos de coloração. As segmentações de *ground truth* foram feitas manualmente por uma equipe de biólogos especialistas que seguiram um fluxo de trabalho colaborativo^{II} e com licença CC0 de domínio público⁽¹⁶⁾. Este trabalho utiliza as 670 imagens de treinamento e 65 imagens de teste do primeiro estágio^{III} de uma competição para fomentar o desenvolvimento de novos métodos por cientistas de dados de todo o mundo.

MÉTODO PROPOSTO

Para a segmentação das imagens, parte-se da premissa de que os núcleos celulares se assemelham a pequenos picos em um relevo. No entanto, de modo a destacar apenas os máximos regiões relevantes em cada região, evitando a influência de ruídos, utilizam-se valores de extinção, determinados a partir da construção da max-tree com cálculo incremental de atributos crescentes⁽²⁾.

Um exemplo de extinção de altura é apresentado na figura 3. Em (a), uma imagem sintética, com indicação das intensidades (apenas para tornar o exemplo didático), é visualizada. Em (b), sua max-tree com a cálculo de extinção de cada máximo regional (folha) destacada em vermelho (neste ponto, pode-se optar em considerar apenas as folhas com extinções acima de um certo limiar). Em (c), o resultado da segmentação rotulada (com pseudocoloração apenas para facilitar a identificação). De (d) a (g), o processamento da árvore para resultar nesta segmentação, conforme o seguinte algoritmo:

1. Considerando a maior extinção de altura existente (e_{max}) e a média entre as 500 maiores extinções de altura (e_{med}), é feita a seleção de uma folha se sua extinção (e_x) obedecer à regra da equação 1. A quantidade de 500 e o divisor 7 foram escolhidos com base em experimentação, sem qualquer mecanismo de otimização. A ideia é encontrar um limiar e_x para uma qualidade de segmentação satisfatória.

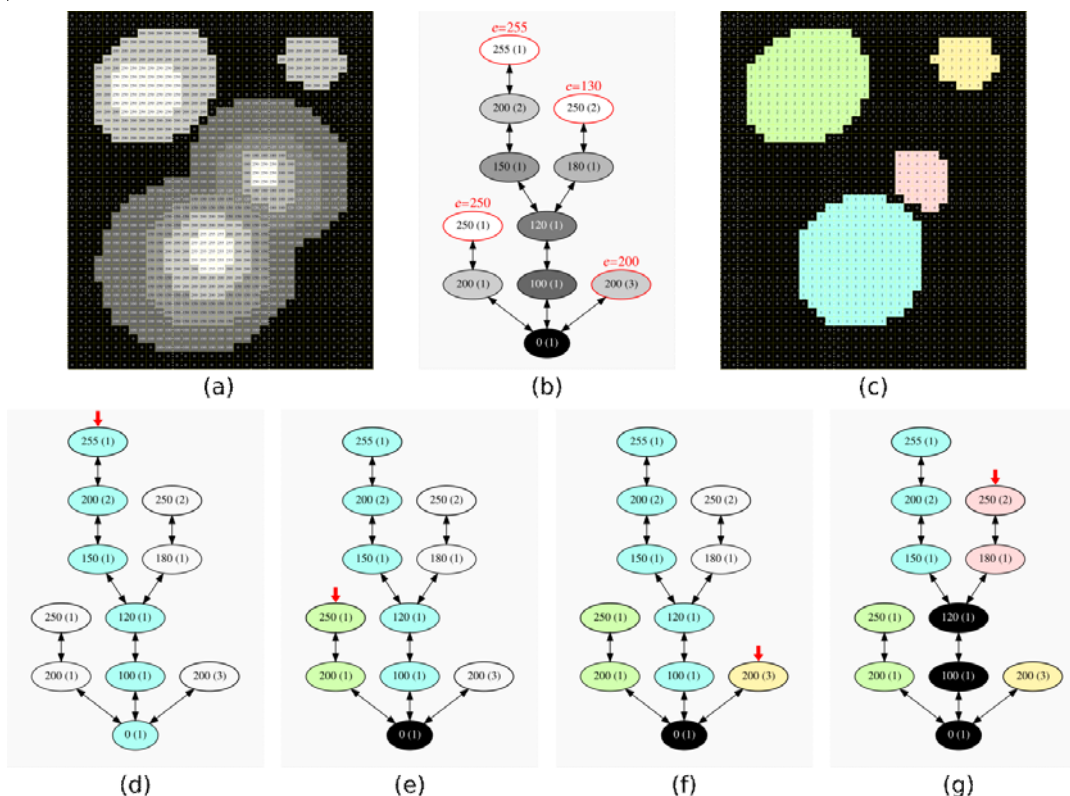


Figura 3 – Método proposto: (a) imagem original, (b) max-tree com extinções anotadas em cada máximo regional (folha da árvore), (c) resultado rotulado da segmentação, (d)-(g) caminhos rotulados de cada folha à raiz com preenchimento em preto para trechos em comum

^{II} Embora neste trabalho as segmentações manuais sejam denominadas de ground truth, o termo mais preciso seria “máscaras-alvo” (target masks), visto que foram criadas por um único especialista e revisada pelos demais
^{III} <https://bbbc.broadinstitute.org/BBBC038>

$$e_x \geq \frac{e_{med} + e_{max}}{7} \quad (1)$$

2. A partir de cada folha selecionada e não visitada, é feito um percurso em direção à raiz, com atribuição de um novo rótulo (representado por uma nova cor na figura).

2.1. Se um nó de árvore já estiver sido rotulado neste percurso, seu rótulo torna-se zero (representado pela cor preta), indicando que se trata de uma região comum a mais de um máximo regional e deve ser interpretada como fundo (pixels em preto na figura 3c).

No fim do processo, cada nó é reconstruído em um componente conexo e atribuição de seu respectivo rótulo para formar a imagem resultante (figura 3c). As cores finais de rótulos dos nós de árvore (figura 3g) e da imagem resultante (figura 3c) são correspondentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que, mesmo que haja interseção de regiões, ocorrência comum em imagens de núcleos celulares, cada máximo regional relevante resultará em um único componente conexo rotulado (vide regiões em azul e vermelho na figura 3). Por outro lado, as partes sobrepostas não são consideradas na segmentação por representarem percursos em comum nos caminhos das folhas em direção à raiz da árvore, reduzindo eventualmente o tamanho da região ocupada por uma célula em particular (por exemplo, componente conexo em vermelho da figura 3c). Esta limitação pode ser superada por algoritmos de pós-processamento (por exemplo, usando o *watershed* com marcadores) para delimitar melhor os limites de cada célula. Este trabalho, no entanto, se concentra em avaliar a aplicabilidade do método de segmentação proposto para núcleos celulares. E, mesmo sem os devidos refinamentos, apresenta resultados compatíveis com as técnicas atuais para esta aplicação.

A figura 4 apresenta duas amostras (coluna à esquerda) e os resultados obtidos para cada segmentação e contagem

de componentes (coluna à direita), em comparação com o *ground truth* produzido manualmente (coluna central). As pseudocores diferem por estarem relacionadas aos rótulos de cada componente conexo. No entanto, as áreas de cada célula se apresentam visualmente similares ao esperado, assim como as quantidades calculadas (32 núcleos quando deveriam ser 29 no primeiro caso, e 78 quando deveriam ser 76 no segundo caso).

Para a avaliação de qualidade dos resultados, três grupos de imagens do primeiro estágio do conjunto de dados foram utilizados: 670 imagens de treinamento; 65 imagens de teste; e a soma destas (670+65). Embora a base de imagens seja publicamente disponibilizada com esta divisão pré-estabelecida, ressalta-se que o algoritmo proposto no presente trabalho faz uso de programação tradicional e não é baseado em aprendizagem de máquina (validações cruzadas não são aplicadas). Os processos manuais e automáticos são comparados e dois aspectos são analisados: a contagem de células e a qualidade da segmentação.

Contagem de células

A primeira avaliação de qualidade adotada foi a contagem de células e comparação entre o método proposto e o *ground truth*. A tabela 1 apresenta a correlação de Pearson acima de 89%, e valor *p* abaixo de 5% para os três grupos de imagens do primeiro estágio da base de dados, demonstrando alta correlação e distribuições provavelmente semelhantes.

Tabela 1 – Resultados da contagem de núcleos celulares a partir da rotulação da segmentação por extinção proposto para as imagens do primeiro estágio

	Correlação de Pearson	Valor <i>p</i>
670 imagens de treinamento	0,897	0,002
65 imagens de teste	0,950	0,009
735 imagens Totais	0,905	0,000

No gráfico 1, os resultados do grupo com 65 imagens de teste são destacados. À esquerda, a relação direta entre

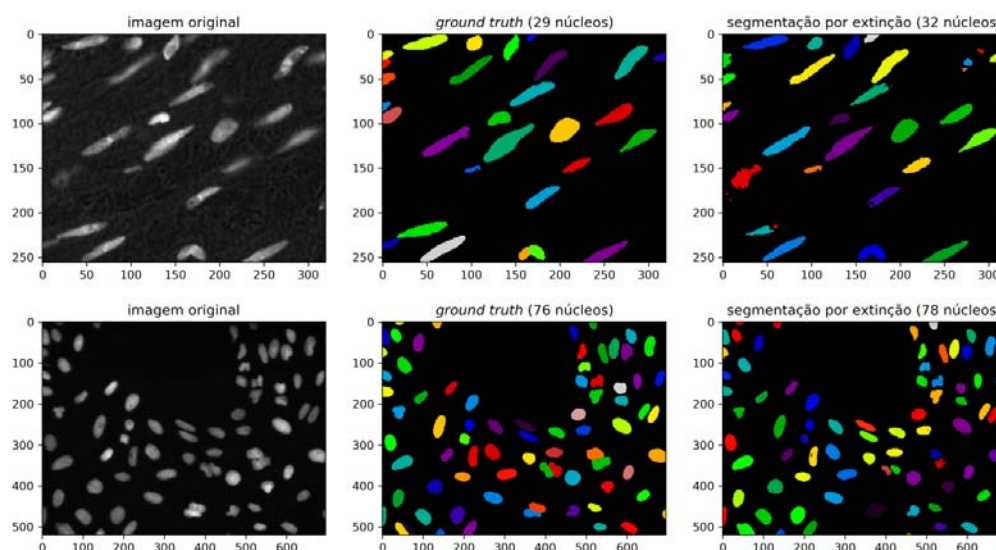


Figura 4 – À esquerda, exemplos de imagens do *dataset*; no centro, rótulos pseudocoloridos de *ground truth*; à direita, resultados da segmentação por extinção proposta

as contagens e indicação de regressão linear (em laranja). À direita, a análise de concordância entre os dois ensaios para uma observação da diferença (ordenada) em relação à média (abscissa), para cada amostra, entre os resultados manuais e automáticos, usando “Bland-Altman Plot”. Quanto maior o número de células em uma amostra, maior o erro entre o método proposto e o *ground truth*.

Qualidade da segmentação

A média IoU (*Intersection over Union*) é uma métrica de similaridade entre dois conjuntos, A e B , definido como o tamanho da interseção dividido pelo tamanho da união dos dois conjuntos, conforme equação 2. Neste trabalho, A é o *ground truth* (manual) e B , o resultado da segmentação (algoritmo proposto).

$$\text{IoU} = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \quad (2)$$

Considerando verdadeiros positivos (TP), verdadeiros negativos (TN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), a Acurácia (equação 3) é a proporção de previsões corretas (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos) entre o número total de casos examinados. A Sensibilidade (equação 4) mede a proporção de positivos que são identificados corretamente. A Especificidade (equação 5) mede a proporção de negativos que são identificados corretamente.

$$\text{Acurácia} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad (3)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (4)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{TN}{TN + FP} \quad (5)$$

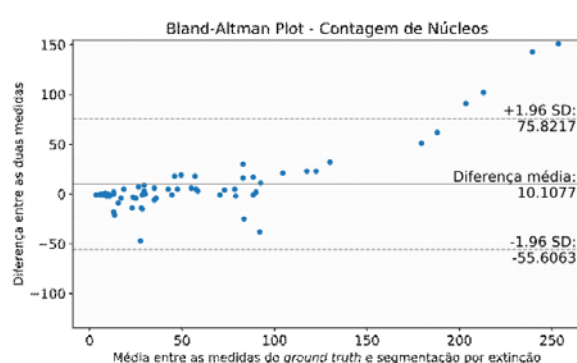
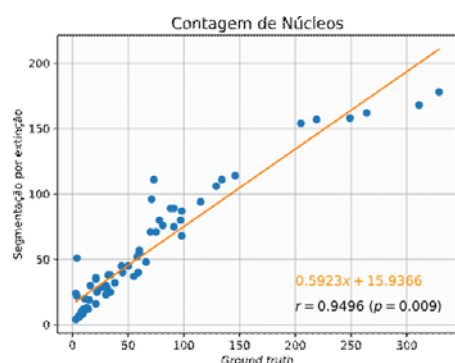


Gráfico 1 – Comparação entre as contagens do número de núcleos do *ground truth* e da segmentação por extinção para as 65 imagens de teste do primeiro estágio

Tabela 2 – Resultados do método de segmentação por extinção proposto para as imagens do primeiro estágio

	Média IoU	Acurácia	Sensibilidade	Especificidade
670 imagens de treinamento ^V	0,709±0,189	0,952±0,054	0,768±0,166	0,989±0,025
65 imagens de teste	0,573±0,164	0,921±0,079	0,615±0,187	0,991±0,017
735 imagens totais	0,697±0,191	0,949±0,058	0,755±0,174	0,989±0,024

^{IV} <https://www.kaggle.com/c/data-science-bowl-2018/leaderboard>

^V No método de segmentação por extinção proposto, não é aplicado nenhum algoritmo de aprendizado e, deste modo, as imagens de treinamento, no contexto deste trabalho, são consideradas desconhecidas

Tabela 3 – Comparação de resultados para as 65 imagens de teste do primeiro estágio, considerando as três melhores variações de algoritmos propostas por Long (2020)

Método	Segmentação por U-Net ⁺ (10)			Segmentação por extinção proposta
	Varição 1: T.C., B=16	Varição 2: U.S., B=8	Varição 3: T.C., B=8	
Média IoU	0,566±0,178	0,567±0,177	0,572±0,179	0,573±0,164

mais recentes da literatura. Considerando imagens inteiras sem sinal (*unsigned*), o algoritmo apresenta tempo linear para construção e segmentação da árvore⁽²⁾ e não exige grandes recursos computacionais (por exemplo, pode ser executado em CPU e memória de até 4 GB). O método se adapta ao problema tratado neste artigo, pois cada núcleo celular consiste em uma pequena região com proeminentes intensidades.

Há, no entanto, uma perda de qualidade dos resultados proporcional à quantidade de células presentes. Imagens com centenas de núcleos apresentam uma morfologia diferenciada e deveriam ser pré-processadas (filtradas). Outro problema é o delineamento mais preciso de células maiores que poderiam ser feitos com pós-processamento (por exemplo, com uso de *watershed* por marcadores), proporcionando um valor IoU médio final maior.

Acredita-se que tais resoluções anteriores e posteriores à aplicação da segmentação da max-tree poderiam melhorar significativamente os resultados. O método manteria a abordagem especialista (não paramétrica) mas com resultados comparáveis a soluções baseadas em *deep learning* (hiperparamétrica). As principais vantagens estariam em dispensar etapas de treinamento em imensas bases de imagens e não necessidade de amplos recursos computacionais, além da modelagem ser completamente interpretada e compreensível.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UFSC pelo suporte à pesquisa e ao “Data Science Bowl[®]” pela disponibilização do *dataset* de núcleos celulares.

REFERÊNCIA

- Lou S, Pagani L, Zeng W, Jiang X, Scott PJ. Watershed segmentation of topographical features on freeform surfaces and its application to additively manufactured surfaces. *Precision Engineering*. 2020 may; 63, 177–186, doi 10.1016/j.precisioneng.2020.02.005
- Silva AG, Lotufo RA. Efficient computation of new extinction values from extended component tree. *Pattern Recognition Letters*. 2011 jan., 32(1) doi: 10.1016/j.patrec.2010.07.019
- Salembier P, Oliveras A, Garrido, L. Antiextensive connected operators for image and sequence processing. *IEEE Transactions on Image Processing*. 1998 apr., 7(4), 555–570, doi: 10.1109/83.663500
- Salembier P, Liesegang S, López-Martínez C. Ship Detection in SAR Images based on maxtree representation and graph signal processing. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*. 2019 may; 57(5), 2709–2724, doi: 10.1109/TGRS.2018.2876603
- Bosilj P, Duckett T, Cielniak G. Connected attribute morphology for unified vegetation segmentation and classification in precision agriculture. *Computers in Industry*. 2018 jun.; 98, 226–240, 10.1016/j.compind.2018.02.003
- Silva AG, Fouto MS, Arthur R, Arthur AM, Iano Y, De Faria JML. Fundus photography quality assessment based on topological extinction values. *International Journal of Computer Applications in Technology*. 2019 jan.; 59(3), 224–235, doi: 10.1504/IJCAT.2019.098588
- Wählby C, Sintorn IM, Erlandsson F, Borgefors G, Bengtsson E. Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections. *Journal of Microscopy*, 2004 jul.; 215, 67–76. doi:10.1111/j.0022-2720.2004.01338.x
- Abdolhoseini M, Kluge MG, Walker FR, Johnson SJ. Segmentation of heavily clustered nuclei from histopathological images. *Scientific Reports*. 2019 mar.; 9, 4551, doi 10.1038/s41598-019-38813-2
- Caicedo JC, Roth J, Goodman A, Becker T, Karhohs KW, Broisin M, Molnar C, McQuin C, Singh S, Theis FJ, Carpenter AE. Evaluation of deep learning strategies for nucleus segmentation in fluorescence images. *Cytometry*. 2019 jul.; 95, 952–965. doi:10.1002/cyto.a.23863
- Long F. Microscopy cell nuclei segmentation with enhanced U-Net. *BMC Bioinformatics*. 2020 jan.; 21(8), doi: 10.1186/s12859-019-3332-1
- Kowal M, Ejmo M, Skobel M, Korbicz J, Monczak R. Cell nuclei segmentation in cytological images using Convolutional Neural Network and seeded Watershed algorithm. *Journal of Digital Imaging*. 2020 feb.; 33, 231–242, doi: 10.1007/s10278-019-00200-8
- Wienert S, Heim D, Saeger K, Stenzinger A, Beil M, Hufnagl P, Dietel M, Denkert C, Klauschen F. Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. *Scientific Reports*. 201 jul.; 503(2), 1-7, doi: 10.1038/srep00503
- Liu C, Shang F, Ozolek JA, Rohde GK. Detecting and segmenting cell nuclei in two-dimensional microscopy images. *Journal of Pathology Informatics*. 2016 oct.; 7:42, doi: 10.4103/2153-3539.192810
- Win KY, Choomchuay S, Hamamoto K, Raveesunthornkiat M. Comparative study on automated cell nuclei segmentation methods for cytology pleural effusion images. *Journal of Healthcare Engineering*. 2018 sep.; 2040–2295, doi: 10.1155/2018/9240389
- Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-Net: convolutional networks for biomedical image segmentation. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI 2015)*. 2015 nov; Part III, LNCS 9351, 234–241, doi: 10.1007/978-3-319-24574-4_28
- Caicedo JC, Goodman A, Karhohs KW, Cimini BA, Ackerman J, Haghighi M, Heng C, Becker T, Doan M, McQuin C, Rohban M, Singh S, Carpenter AE. Nucleus segmentation across imaging experiments: the 2018 Data Science Bowl. *Nature Methods*. 2019 oct.; 16, 1247–1253. doi: 10.1038/s41592-019-0612-7