

AMBIENTE WEB PARA CITOMORFOMETRIA USANDO IMAGENS 3D

Eduardo Henrique Silva¹, Marcelo Emílio Beletti², Jefferson Rodrigo de Souza³ e Bruno Augusto Nassif Travençolo³

¹Faculdade de Computação, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia (MG), Brasil e Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas (MG), Brasil

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia (MG), Brasil

³Faculdade de Computação, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia (MG), Brasil

Resumo: Softwares de *bioimage* são utilizados para a análise de imagens microscópicas e auxiliam os usuários em suas tomadas de decisões, a usabilidade pode limitar o seu uso. **Objetivos:** Desenvolver um software de *bioimage* que pode ser acessado em um navegador web. Auxiliar patologistas e outros usuários na tomada de decisão, minimizando a subjetividade de suas avaliações. **Métodos:** Foram realizados estudos nos softwares de *bioimage open sources*, o qual foram identificadas as características positivas e negativas, permitindo a escolha das tecnologias apropriadas para desenvolver o ambiente. **Resultados:** O trabalho proveu um software de *bioimage* para análise citomorfométrica usando imagens tridimensionais que pode ser acessado por meio de um navegador web. **Conclusão:** O ambiente proposto é capaz de subsidiar os usuários com informações sobre as estruturas das células para tomada de decisão, fornecendo dados quantitativos e permitindo a exploração por meio de uma cena tridimensional.

Palavras-chave: Biologia Computacional; Imagem Tridimensional; Patologia.

Abstract: *Bioimage softwares are used for the analysis of microscopic images and assist users in their decision making, usability can limit its use. Purposes:* Develop a *bioimage* software that can be accessed through a web browser. Assist pathologists and other users in decision making, minimizing the subjectivity of its evaluations. **Methods:** Studies were carried out in the *bioimage open sources* softwares, which have been identified the positive and negative characteristics, allowing the choice of the appropriate technologies to developing the environment. **Results:** The work provided a *bioimage* software for histomorphometric analysis using three-dimensional images that can be accessed through a web browser. **Conclusion:** The proposed environment can subsidize the users with information on the structures of cells to decision making, providing quantitative data and allowing the exploration of a three-dimensional scene.

Keywords: Computational Biology; Three-dimensional image; Pathology.

Introdução

O termo “*software de bioimage*” surgiu para categorizar as aplicações que manipulam imagens microscópicas. Os métodos computacionais disponibilizados pelos softwares de *bioimage* se tornam uma importante ferramenta para diminuir a subjetividade, e auxiliar por exemplo, na avaliação de gradações de tumores por meio da análise de células cancerígenas¹.

O profissional da área da saúde deve ser capaz de manusear sem muitos esforços um software para auxiliá-lo em suas tarefas cotidianas, atualmente a maioria dos softwares de *bioimage* são aplicações

locais, que requerem a instalação e configuração no sistema operacional do usuário. Com os avanços da internet as Tecnologias da Informação e Comunicação (TIC) estão sendo utilizadas de forma crescente na área da saúde para auxiliar a tomada de decisões².

Um estudo publicado por Cardona e Tomancak³ apresentou que a usabilidade nos softwares de *bioimage* tem sido um desafio e também pode ser um fator limitante para o seu uso, pois os usuários com conhecimento básico em computação devem ser capazes de realizarem os seus experimentos no software disponibilizado. Características como a facilidade na instalação, suporte a várias plataformas, atualização automática e integração com outros softwares podem contribuir com a usabilidade. Além disso, o estudo ainda ressalta que a disponibilização do software na nuvem evita muitos problemas de instalação e possibilita sua utilização remota, além de permitir o compartilhamento dos resultados com outros usuários espalhados pelo mundo, quebrando assim barreiras geográficas.

Segundo Eliceiri et al.⁴, disponibilizar um software em uma arquitetura na nuvem permite aproveitar a escalabilidade, ou seja, o aumento do poder computacional de forma simplificada, fornecida por esse estilo arquitetural.

Desta forma, o trabalho proposto tem como objetivo o desenvolvimento de um ambiente para análise citomorfométrica em imagens extraídas de microscópicos por meio da reconstrução tridimensional (3D), possibilitando a exploração das informações no navegador web. O ambiente proposto fornece técnicas de visualização científica, como algoritmos de renderização de volume e reconstrução por isosuperfícies, algoritmos para segmentação e por fim a extração de informações quantitativas baseadas em citomorfometria.

Trabalhos Relacionados

Visualização Científica (ViSC) - ViSC é uma disciplina da visualização da informação a fim de aplicar técnicas para permitir a transformação de dados abstratos de observações em modelos que podem ser facilmente compreensíveis para a exploração científica⁵. Os algoritmos de visualização volumétricos são capazes de criar uma projeção tridimensional em um plano de imagens bidimensionais (e.g. Figura 1 (a)) para compreensão e exploração dos dados volumétricos, eles estão divididos nas categorias: renderização volumétrica direta e ajuste de superfície⁶.

Renderização Volumétrica Direta (RVD) é capaz de criar imagens de um conjunto de dados que não apresentam uma forma geométrica definida. Assim, ela desempenha um mapeamento dos elementos diretamente no plano sem utilizar a geometria primitiva para criar a representação (e.g. Figura 1 (b))⁶. Para extrair a representação volumétrica apresentada na Figura 1 (b) foi utilizado o software BioImageXD⁷ com o algoritmo *Volume Ray-casting*.

Ajuste de Superfície (AS) é útil para extrair uma superfície em um volume por meio do ajuste de primitivas geométricas, como polígonos, é criado uma malha de triangulações que representam uma isosuperfície (e.g. Figura 1 (c))⁸. Para extrair a superfície apresentada na Figura 1 (c) foi utilizado o software BioImageXD⁷ com o algoritmo *Marching Cubes*.

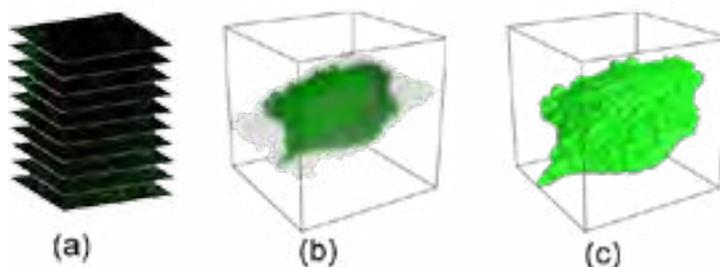


Figura 1: Reconstrução tridimensional utilizando o software BioImageXD. (a) Imagens fatiadas. (b) Visualização de volume. (c) Isosuperfície

O método de *Marching Cubes* possui um desempenho melhor em relação ao método de *Volume Ray-casting*, pois ele não percorre todo o conjunto de dados a cada vez que a imagem é renderizada. Entretanto, o método *Marching Cubes* pode apresentar isosuperfícies não tão representativas de acordo com o modelo real, devido a reconstrução com falsos pedaços negativos e positivos de superfícies⁶.

Análise Citomorfométrica - A morfometria é um conjunto de técnicas que permite quantificar características estruturais por meio da extração das informações, como por exemplo, a área da superfície, volume, circularidade e curvatura⁹. Na área da patologia, alterações morfológicas nas estruturas celulares são importantes no auxílio dos métodos de diagnósticos. A morfometria citológica ou citomorfometria é um conjunto de técnicas de morfometria para descrever características dos componentes celulares¹.

Para a análise citomorfométrica, os atributos de área da superfície, volume, esfericidade, diâmetro esférico equivalente, coeficientes de curvatura e convexidade podem ser extraídos de uma isosuperfície, assim permitindo quantificar os objetos de interesses.

Métodos

Inicialmente, foi realizado uma análise nos ambientes correlatos buscando identificar as principais características no modelo de visualização e na extração de informações quantitativas. Nessa fase, foram analisados softwares de *bioimage open sources* disponibilizados como sistemas locais e também na web, com o objetivo de extrair características satisfatórias e insatisfatórias.

Em seguida, um estudo foi desempenhado para definir as tecnologias para apoiar o desenvolvimento do ambiente. A Tabela 1 apresenta as tecnologias utilizadas no desenvolvimento do ambiente proposto.

Tabela 1: Tecnologias utilizadas no desenvolvimento do ambiente.

NOME	DESCRIÇÃO
Python	Linguagem de programação do lado do servidor.
VTK	Biblioteca para processamento e visualização 3D.
SimpleITK	Biblioteca para processamento das imagens.
WebGL	Tecnologia que permite apresentação de objetos 3D no navegador web.
JavaScript	Linguagem de programação do lado do cliente.

Algumas aplicações de visualização na web fazem a renderização dos objetos no lado do cliente e se tornam ineficientes quando grandes conjuntos de dados são renderizados¹⁰.

A arquitetura do ambiente é composta por três aplicações: Cliente, *VTKServer* e *APPServer*, conforme apresenta a Figura 2. O cliente é qualquer dispositivo com acesso ao navegador web. O *APPServer* é uma aplicação que gerencia os conjuntos de dados e os usuários do ambiente.

O *VTKServer* é a aplicação responsável por realizar a análise citomorfométrica, a segmentação e a reconstrução 3D, ou seja, todos os algoritmos são executados no servidor. A comunicação entre o Cliente e o *VTKServer* é realizada por meio do protocolo *WebSocket*. O *WebSocket* é um protocolo para a comunicação bidirecional, em que as mensagens podem ser trocadas entre clientes e servidores reduzindo a complexidade sobre a comunicação em tempo real¹¹.



Figura 2: Arquitetura do ambiente proposto.

Com o *WebSocket* é utilizada a estratégia de carregamento progressivo, ou seja, quando um cliente solicita um objeto tridimensional, o *VTKServer* envia as primitivas em pequenos blocos, então o cliente recebe os blocos e apresenta para o usuário. Isso evita que a biblioteca *JavaScript* no lado do cliente possa sobrecarregar e não apresentar corretamente ao usuário o modelo 3D.

Por fim, foi definido o fluxo de processamento para a obtenção das informações quantitativas de uma amostra, conforme apresenta a Figura 3.

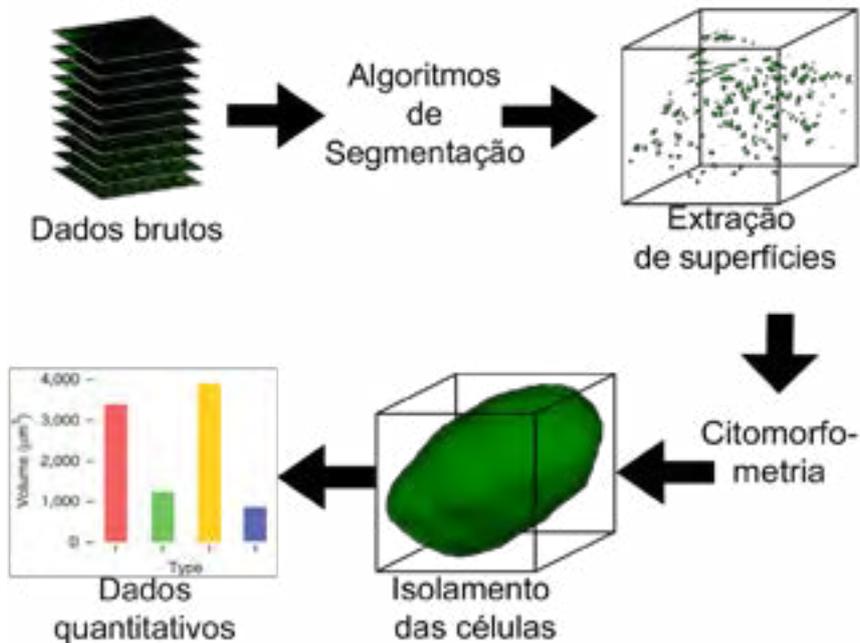


Figura 3: Fluxo de atividades para obter os dados quantitativos.

Primeiramente, o usuário realiza o *upload* dos dados brutos, que são amostras digitalizadas em um microscópio confocal. O ambiente utiliza o *BioFormats* proposto por Allan et.al.¹², que permite o suporte a diversos formatos de arquivos.

Em seguida, o usuário poderá aplicar filtros para segmentação, a fim de separar os objetos de interesse do restante da imagem. Na reconstrução tridimensional é possível utilizar os algoritmos

Marching Cubes e *Volume Ray-casting*. O *Volume Ray-casting* fornece um modelo mais representativo com o mundo real, porém, para extrair dados quantitativos é necessária a extração da superfície da amostra, assim o algoritmo *Marching Cubes* cria uma malha de triangulações que possibilita a realização de cálculos sobre a estrutura em análise.

Ao solicitar a análise citomorfométrica em uma superfície é realizado o isolamento das células, pois uma amostra pode conter várias células. Para a separação é usado o filtro de conectividade, em que os voxels apenas pertencem a uma célula se todos estiverem conectados. Um voxel é a representação de um valor em um espaço tridimensional, seria equivalente a um pixel em um espaço bidimensional⁶. Assim sendo, cada célula é submetida à extração de atributos, sendo eles: área da superfície, volume, esfericidade, coeficientes de circularidade, convexidade e diâmetro esférico equivalente.

Ao final do fluxo são gerados os dados quantitativos de cada célula e a média dos atributos da amostra. Os usuários podem exportar os dados obtidos para alguma ferramenta de análise estatística com o objetivo de interpretar o comportamento das amostras.

Resultados e Discussão

O ambiente proposto pode ser executado em qualquer dispositivo que possui um navegador atualizado, seja um computador de mesa, um *tablet* ou um *smartphone*. O maior espaço da página principal é destinado a visualização, permitindo uma maior liberdade ao usuário para interagir com a amostra em análise. As páginas são adaptáveis a diferentes tamanhos de tela. A Figura 4 apresenta a página de visualização 3D, e os menus de interação, análise e segmentação.



Figura 4: Visão geral do ambiente proposto

O ambiente reconhece mais de 100 formatos de imagem. Após realizar o upload, as imagens ficam disponíveis para visualização ou exclusão (Figura 5(d)). Ao selecionar uma amostra para visualização é desempenhado uma solicitação de reconstrução tridimensional ao servidor. Na reconstrução tridimensional podem-se utilizar os algoritmos *Volume Ray-casting* e *Marching Cubes* (e.g. Figura 5(a)).

Alguns microscópicos fornecem imagens com múltiplos canais, o ambiente permite a visualização de cada canal separadamente e também permite ao usuário selecionar os canais desejados para gerar a visualização 3D (e.g. Figura 5(e)). A segmentação e análise citomorfométrica é realizada em cada canal separadamente.

O *smoothing* é um filtro Gaussiano utilizado para suavizar as imagens, reduzindo os possíveis ruídos (e.g. Figura 5(a)). Esses ruídos podem interferir nos resultados, pois pequenas triangulações serão consideradas como objetos e suas medidas serão extraídas. Para segmentação é fornecido três

métodos: Limiar fixo, *Otsu* e *Watershed*, o usuário pode escolher quais e a ordem de execução desses algoritmos (e.g. Figura 5(f)). O ambiente proposto realiza a extração de dados quantitativos utilizando a superfície obtida com o algoritmo *Marching Cubes* (e.g. Figura 5(b)). Os resultados obtidos podem ser armazenados, exportados para um arquivo do tipo *Comma-separated values* (CSV) ou visualizados no próprio ambiente (Figura 5(c)).



Figura 5: Funcionalidades para ViSC e Citomorfometria. (a) Seleção e configuração dos algoritmos de ViSC. (b) Extração das medidas utilizando métodos de citomorfometria. (c) Medidas extraídas. (d) Seleção do conjunto de dados. (e) Escolha dos canais. (f) Segmentação

As interações com a cena são realizadas por meio da barra de ferramentas superior ou por meio do mouse. Na barra de ferramentas é possível aumentar e diminuir o *zoom* e também reiniciar a câmera da cena em seu estado original. O visualizador 3D também permite por meio do mouse visualizar a cena em diferentes perspectivas, aumentar e diminuir o *zoom* e selecionar um objeto.

Ao visualizar uma superfície é possível selecionar um objeto de interesse de duas formas: pelas coordenadas x e y obtidas por um clique duplo ou pela extração das medidas de citomorfometria. Ao realizar um clique duplo na cena as coordenadas x e y referente a localização do clique são enviadas para o *VTKServer*, de acordo com o posicionamento da câmera o servidor encontra o ponto S referente as coordenadas x , y , e z . Todas as superfícies conectadas a partir do ponto S são consideradas partes do objeto de interesse. O algoritmo de extração de medidas baseia-se na conectividade para a separação dos objetos, cada objeto extraído recebe um identificador que pode ser utilizado para visualizar o objeto de interesse posteriormente.

Após encontrar o objeto de interesse, o ambiente proposto redireciona o usuário para uma nova página, conforme a Figura 6.

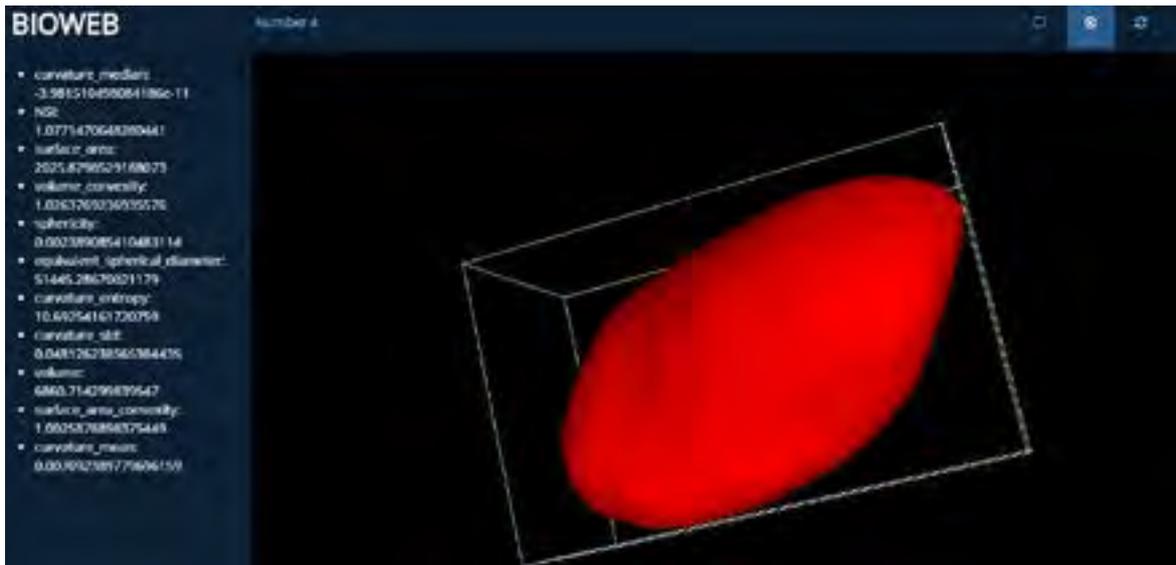


Figura 6: Visualização de um objeto de interesse

Na visualização do objeto de interesse todas as medidas são apresentadas na barra lateral, além das interações com o objeto é possível adicionar um delimitador de fronteira e um indicador do centro de massa. Uma amostra geralmente é composta por diversas células, a visualização de um objeto de interesse permite ao usuário explorar a estrutura de uma célula, possibilitando analisar as deformações e as medidas fornecidas pelo ambiente.

O ambiente proposto pode ser comparado com os trabalhos relacionados: Bisque¹³, Omero¹², BioIMAX¹⁴ e Slicer Drop¹⁵.

O Bisque é um ambiente web para gestão, compartilhamento, análise e extração de dados quantitativos em imagens multidimensionais. Ele fornece algoritmos para segmentação e detecção de centroides em imagens 3D. No ambiente web ele permite a visualização tridimensional utilizando fatias ortogonais, para fornecer uma visualização volumétrica mais detalhada o objeto em análise deve ser exportado para uma aplicação externa denominada BioView3D, executada como um sistema local.

O Omero é uma plataforma para gerenciar experimentos biológicos, ele disponibiliza um cliente web para visualização das imagens no servidor, permitindo que o cientista visualize imagens tridimensionais utilizando fatias ortogonais. O objetivo do Omero não é fornecer métodos de análise e visualização, uma vez que possui outras ferramentas com esse propósito.

O BioIMAX é um ambiente web desenvolvido em Adobe Flex voltado para exploração e mineração de dados, necessitando do *plug-in* do Adobe Flash instalado no navegador. Ele permite visualizar imagens em planos bidimensionais e gráficos de histograma.

O Slicer Drop é um software web com foco para as imagens médicas, e possui algoritmos de visualização 3D que podem ser aplicados em imagens biológicas.

A Tabela 2 apresenta uma comparação das características do o trabalho proposto com os trabalhos relacionados citados anteriormente.

Tabela 2: Comparação do ambiente proposto com outros trabalhos.

Função	Ambiente Proposto	Bisque	Omero	BioIMAX	Slicer Drop
Tecnologia web de visualização	WebGL	WebGL	JavaScript	Adobe Flex	WebGL
Formatos de imagens suportadas	+ de 100	+ de 100	+ de 100	3	+ de 10
Integração com outros ambientes	Não	Sim	Sim	Não	Não
Segmentação 3D	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Separação de objetos 3D	Sim	Não	Não	Não	Não
Redução de ruídos	Sim	Não	Não	Não	Não
Renderização volumétrica	Sim,	Sim*	Não	Não	Sim*
Extração de isosuperfície	Sim	Não	Não	Não	Não
Multicanais	Sim	Sim	Não	Não	Não
Interação com o usuário	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Suporte a <i>tablet</i> e <i>smartphone</i>	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Métodos de análise citomorfometria	14	2	0	0	0

Atualmente, a tecnologia *WebGL* para visualização 3D no navegador é mais aconselhável, pois essa tecnologia é nativa no navegador com suporte ao HTML 5, não necessitando de instalação de *plug-ins*. As aplicações Bisque e SlicerDrop emitem erros ao realizar a renderização volumétrica de grandes conjuntos de dados, devido ao processamento dos algoritmos serem executados no lado do cliente.

O ambiente proposto está bem posicionado em relação aos trabalhos relacionados comparados na Tabela 2. Os métodos fornecidos permitem os usuários explorarem as amostras, executarem algoritmos para segmentar uma região de interesse e extraírem dados quantitativos para a análise de uma amostra. A visualização volumétrica e extração de atributos em um objeto 3D possibilitam ao usuário identificar fenômenos que diversas vezes não é possível em um modelo 2D.

Conclusão

Na maioria dos *softwares de bioimage* é disponibilizada como aplicação local, com a evolução das tecnologias da internet foi possível desenvolver um *software de bioimage* na web com características presentes nesses softwares locais, e ainda acrescentar recursos que não estão presentes nos trabalhos relacionados disponibilizados na web, tal como, a renderização de grandes conjuntos de dados.

A usabilidade foi um fator relevante ao propor o ambiente, a disponibilização dos dados na nuvem contribuirá com a usabilidade do software proposto, evitando a instalação e configuração. Além disso, o ambiente fornece um repositório para o usuário armazenar seus resultados e amostras. O ambiente suporta vários formatos, pois fornecedores de microscópicos disponibilizam as imagens

digitalizadas em formatos abertos, porém outras já disponibilizam em formatos proprietários. A restrição de formatos pode ser um fator que limite o uso do ambiente proposto.

O trabalho proposto contribui com avanços nos softwares de *bioimage* baseados na web, pois a arquitetura cliente/servidor ressaltada nesse artigo possui características singulares em relação aos softwares de *bioimage* na web.

Por meio das medidas extraídas de objetos 3D, os usuários podem caracterizar deformações nas amostras analisadas, podendo auxiliar um patologista na análise de tumores. O ambiente proposto é capaz de fornecer informações relevantes ao usuário na tomada de decisões, ele não substitui um profissional da saúde.

Para trabalhos futuros, pretende-se analisar um conjunto de amostras de células cancerígenas e utilizar o ambiente proposto para inferir a graduação dos tumores nas células analisadas. Para isso, os atributos extraídos pela análise citomorfométrica serão submetidos a medidas estatísticas e classificadores.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo auxílio financeiro (REONCO - Processo 52-11).

Referências

- [1] Waldemarin KCA, Beletti ME, Costa LF. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. *Real-Time Imaging*. 2004; 10(4): 197-204.
- [2] Camargo AL, Ito M. Utilização das tecnologias de informação e comunicação na área da saúde: uso das redes sociais pelos médicos. *J Health Inform*. 2012; 4(4): 164-9.
- [3] Cardona A, Tomancak P. Current challenges in open-source bioimage informatics. *Nat Methods*. 2012; 9(7): 661-665.
- [4] Eliceiri KW, Berthold MR, Goldberg IG, Ibanez L, Manjunath BS, Martone ME, et al. Biological imaging software tools. *Nat Methods*. 2012; 9(7): 697-710.
- [5] Hansen CD, Chen M, Johnson CR, Kaufman AE, Hagen H. *Scientific visualization: uncertainty, multifield, biomedical, and scalable visualization*: Springer London; 2014.
- [6] Elvins TT. A survey of algorithms for volume visualization. *Comput Graph (ACM)*. 1992; 26(3): 194-201.
- [7] Kankaanpää, Pasi, et al. BioImageXD: an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nat methods*. 2012. 9(7): 683-689.
- [8] Lorensen WE, Cline HE. Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm. *Comput Graph (ACM)*. 1987; 21(4): 163-169.
- [9] Weibel ER. *Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology*. International review of cytology. 1969; 26: 235-302.
- [10] Jourdain S, Ayachit U, Geveci B. ParaViewWeb: A web framework for 3D visualization and data processing. *International Journal of Computer Information Systems and Industrial Management Applications*. 2011; 3: 870-877.
- [11] Fette I, Melnikov A. The WebSocket Protocol. 2011. [citado em 22 de Junho de 2016]. Disponível em: <https://tools.ietf.org/html/rfc6455>.

- [12] Allan C, Burel JM, Moore J, Blackburn C, Linkert M, Loynton S, et al. OMERO: flexible, model-driven data management for experimental biology. *Nat Methods*. 2012; 9(3):. 245-253. [13] Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *International review of cytology*. 1969; 26: 235-302.
- [14] Loyek C, Rajpoot NM, Khan M, Nattkemper TW. BioIMAX: A Web 2.0 approach for easy exploratory and collaborative access to multivariate bioimage data. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12(1): 297-309.
- [15] Haehn D, Rannou N, Ahtam B, Grant E, Pienaar R. Neuroimaging in the browser using the X Toolkit. In 5th INCF Congress of Neuroinformatics. 2014 Oct; Munich.

Contato

Bruno Augusto Nassif Travençolo
E-mail: travencolo@gmail.com
Telefone: (34) 3239-4576
Endereço: Universidade Federal de Uberlândia
- Campus Santa Mônica - Bloco 1B - Sala
1B131 - Av. João Naves de Ávila, 2.121 Bairro
Santa Mônica