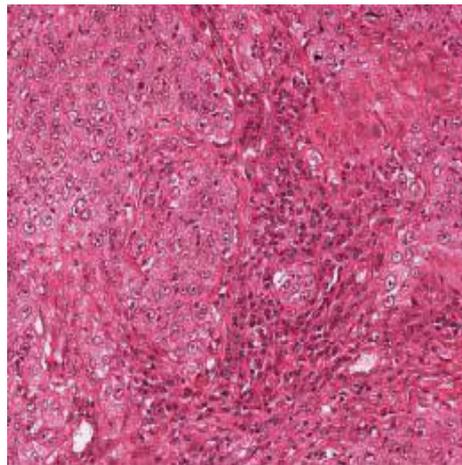


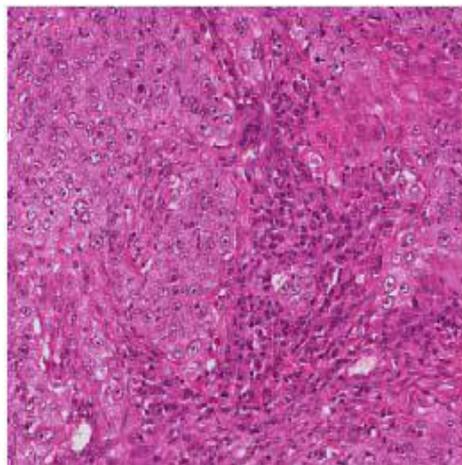
Normalização de imagens histológicas com preservação de estruturas

Justificativa

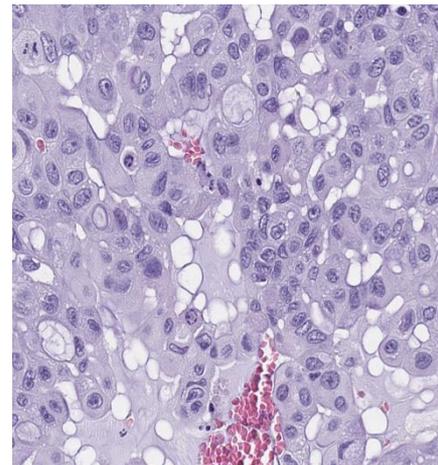
A aparência de amostras de tecidos podem sofrer variações de cores por suas etapas de preparação ou digitalização [\[1, 2\]](#).



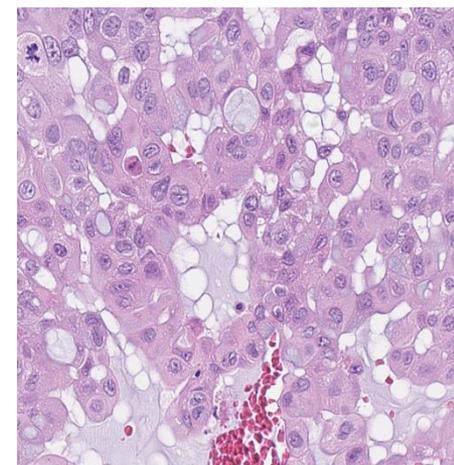
(a)
Scanner AperioXT



(b)
Scanner Hamamatsu



(c)
 $\uparrow H \uparrow E$

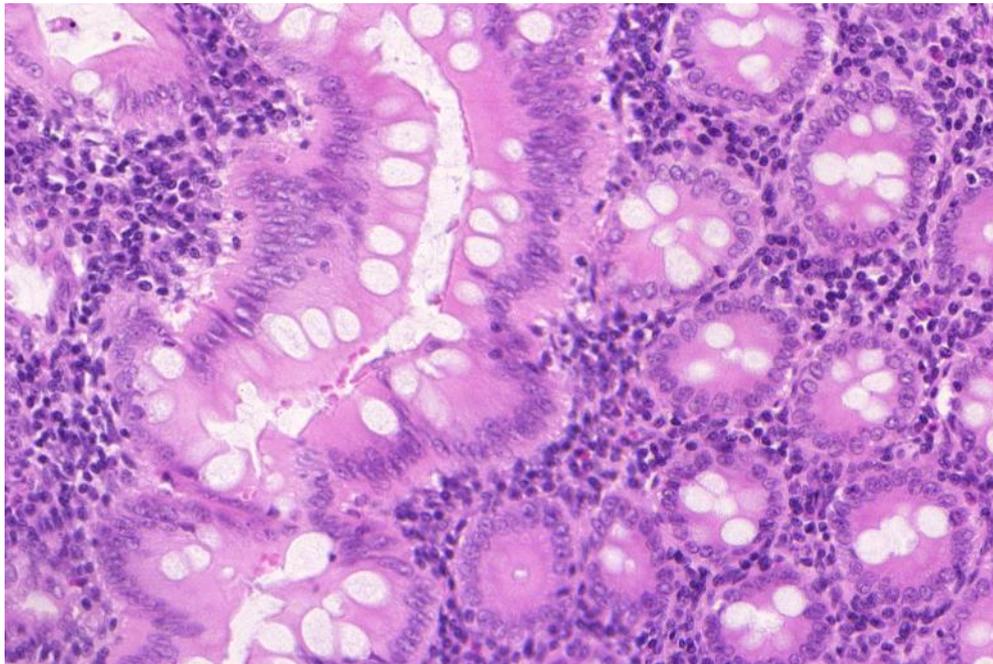


(d)
 $\downarrow H \downarrow E$

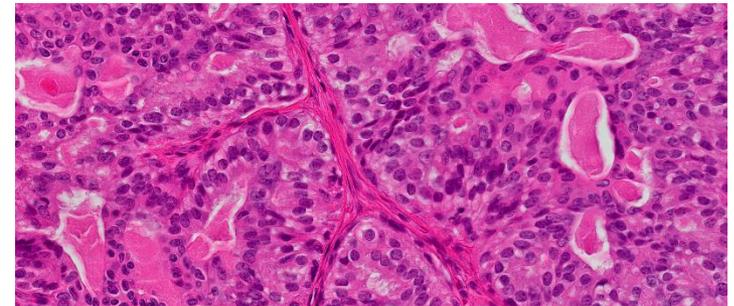
Figura 1. Amostras histológicas digitalizadas por diferentes *scanners* [\[3\]](#) em (a) e (b), e preparadas sob diferentes concentrações de corantes [\[4\]](#) em (c) e (d).

Justificativa

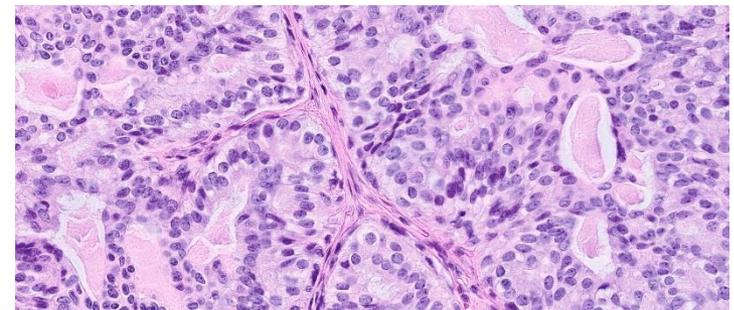
Métodos de normalização ajustam as cores das imagens para correção dessas variações [\[5\]](#).



(a)



(b)

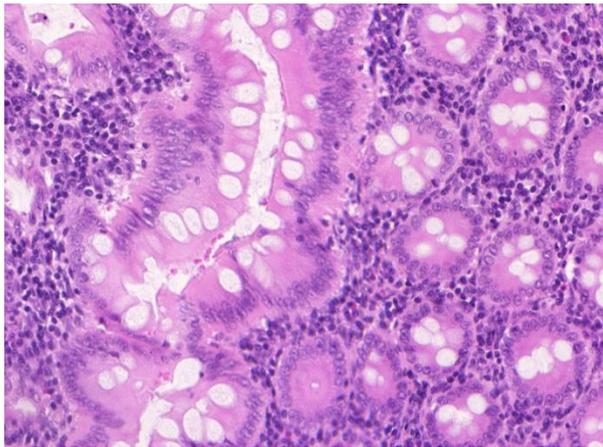


(c)

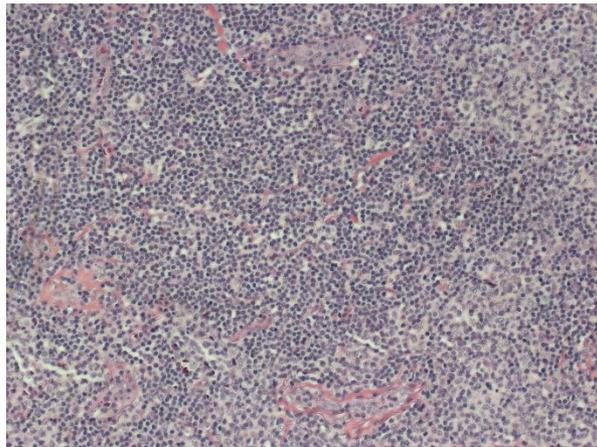
Figura 2. Exemplo de normalização de imagens histológicas H&E: (a) imagem de referência, (b) imagem original e (c) imagem normalizada.

Justificativa

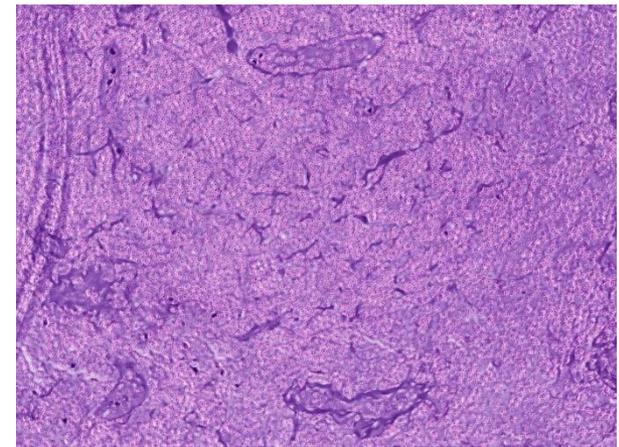
Para a proposta de um método de normalização eficiente, é necessário que ele **preserve informações histológicas**, não introduza artefatos aos resultados e reproduza o contraste entre os corantes H&E [\[6\]](#).



(a)
Imagem de referência



(b)
Imagem original

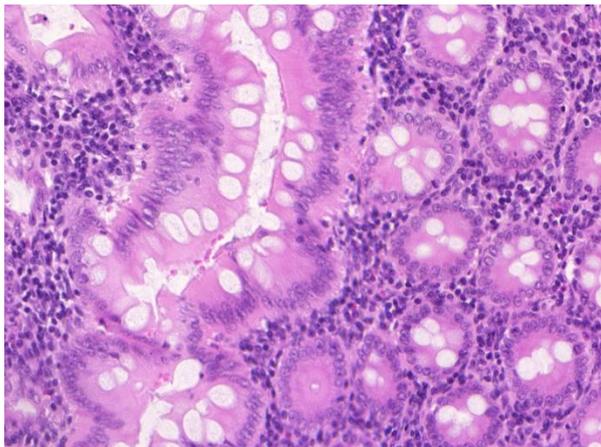


(c)
Imagem normalizada

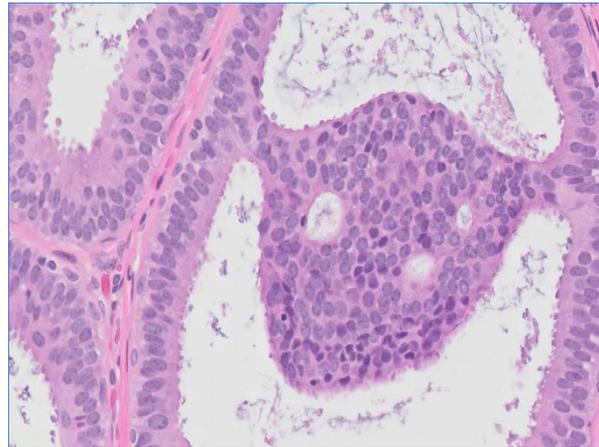
Figura 3. Exemplo de normalização de imagem considerando a preservação de estruturas do método de [\[7\]](#).

Justificativa

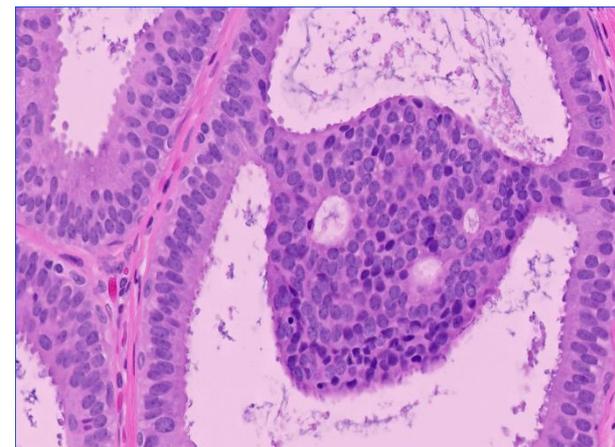
Para a proposta de um método de normalização eficiente, é necessário que ele preserve informações histológicas, **não introduza artefatos aos resultados** e reproduza o contraste entre os corantes H&E [\[6\]](#).



(a)
Imagem de referência



(b)
Imagem original

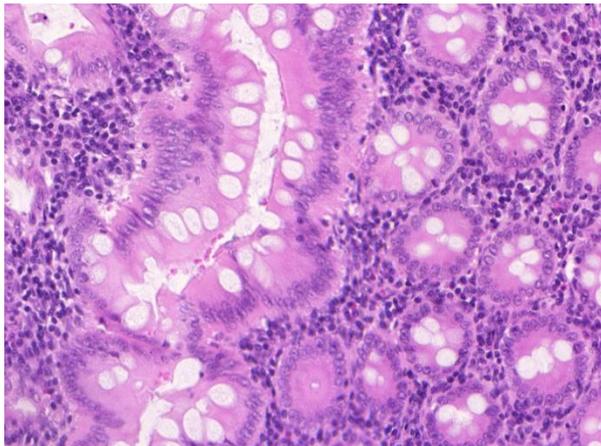


(c)
Imagem normalizada

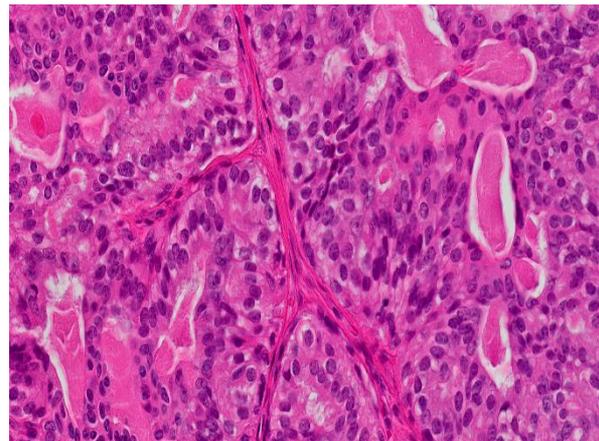
Figura 4. Exemplo de normalização de imagem considerando a preservação de estruturas do método de [\[8\]](#).

Justificativa

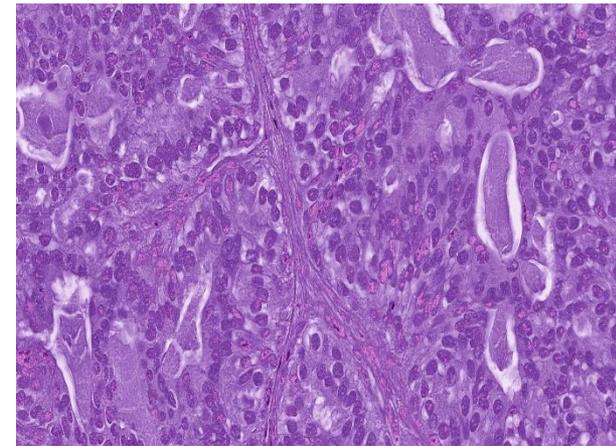
Para a proposta de um método de normalização eficiente, é necessário que ele preserve informações histológicas, não introduza artefatos aos resultados e **reproduza o contraste entre os corantes H&E** [\[6\]](#).



(a)
Imagem de referência



(b)
Imagem original



(c)
Imagem normalizada

Figura 5. Exemplo de normalização de imagem considerando a preservação de estruturas do método de [\[7\]](#).

Justificativa

- Por sua proposta de **normalização de imagens histológicas com preservação de estruturas**, o trabalho de [\[9\]](#) foi escolhido para aprimoramentos;
- O método de [\[9\]](#) é uma extensão de [\[7\]](#), considerado estado-da-arte por [\[10\]](#).

This paper extends our earlier work [13] with more thorough quantitative evaluation as well as proposal and validation of the acceleration scheme for WSI. Rest of this paper is organized as

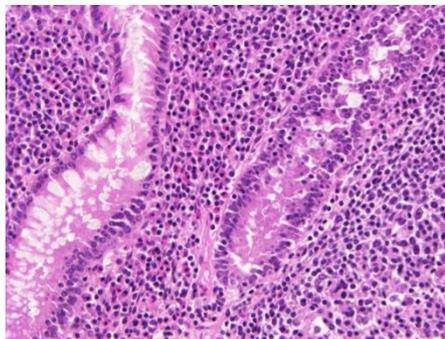
[13] A. Vahadane *et al.*, “Structure-preserved color normalization for histological images,” in *Proc. IEEE 12th Int. Symp. Biomed. Imag.*, Apr. 2015, pp. 1012–1015.

Contextualização

A lei de Beer-Lambert estabelece a relação entre as cores RGB e os corantes H&E [9]:

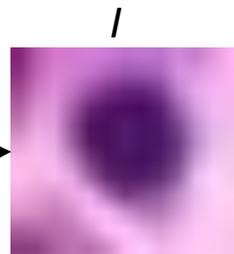
$$I = I_0 \exp(-WH) \quad (1)$$

$$V = WH \quad (2)$$



W

	Hematoxilina	Eosina
R	0,4287	0,1803
G	0,8521	0,9254
B	0,3002	0,3334



I

	1	2	3	4	5	6	7	...	156
R	118	127	146	174	205	232	251		242
G	44	54	72	101	131	160	181		205
B	139	146	159	174	184	200	218		239

H

	1	2	3	4	5	6	7	...	156
Hematoxilina	1,578	1,442	1,120	0,696	0,255	0	0		0
Eosina	0,338	0,255	0,250	0,289	0,428	0,441	0,285		0,1462

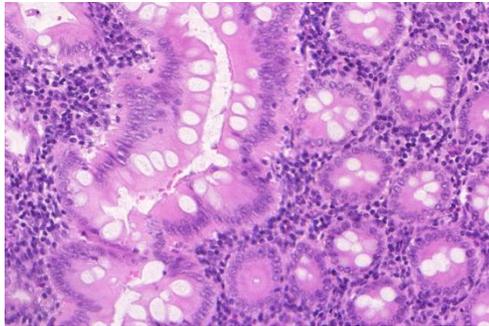
Contextualização

- A restrição de não negatividade do método *Non-negative Matrix Factorization* (NMF) corresponde à propriedade de não emissão de luz pelos corantes;
- Além disso, a adição de uma restrição de dispersão foi realizada ao considerar que a maioria das estruturas histológicas em uma imagem são coradas por uma mistura dos corantes H&E [\[9\]](#).

$$\min_{W, H} \frac{1}{2} \|V - WH\|_F^2 + \lambda \sum_{j=1}^r \|H(j, :)\|_1, \quad \begin{array}{l} W, H \geq 0, \\ \|W(:, j)\|_2^2 = 1, \end{array} \quad (3)$$

Contextualização

Imagem de referência



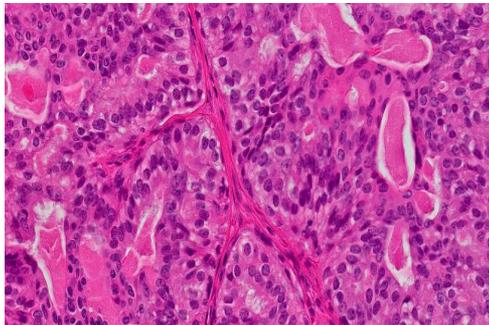
W_{ref}

	Hematoxilina	Eosina
<i>R</i>	0,9888	0,0003
<i>G</i>	0,0642	0,9686
<i>B</i>	0,1344	0,2488

H_{ref}

	1	2	...	<i>N</i>
Hematoxilina	0	0,107		0,063
Eosina	0,437	0,593		0,356

Imagem original



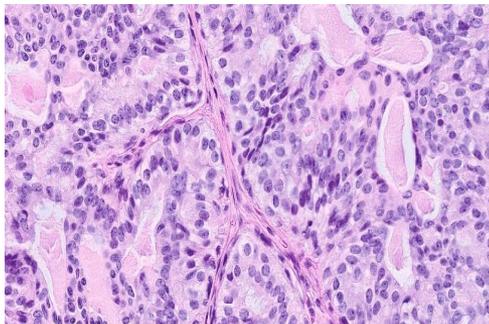
W_{org}

	Hematoxilina	Eosina
<i>R</i>	0,9843	0,0003
<i>G</i>	0,1763	0,9456
<i>B</i>	0,0002	0,3252

H_{org}

	1	2	...	<i>N</i>
Hematoxilina	0,357	0,158		0,269
Eosina	1,911	1,325		1,049

Imagem normalizada



W_{ref}

	Hematoxilina	Eosina
<i>R</i>	0,9888	0,0003
<i>G</i>	0,0642	0,9686
<i>B</i>	0,1344	0,2488

H_{org}

	1	2	...	<i>N</i>
Hematoxilina	0,357	0,158		0,269
Eosina	1,911	1,325		1,049

Materiais e métodos

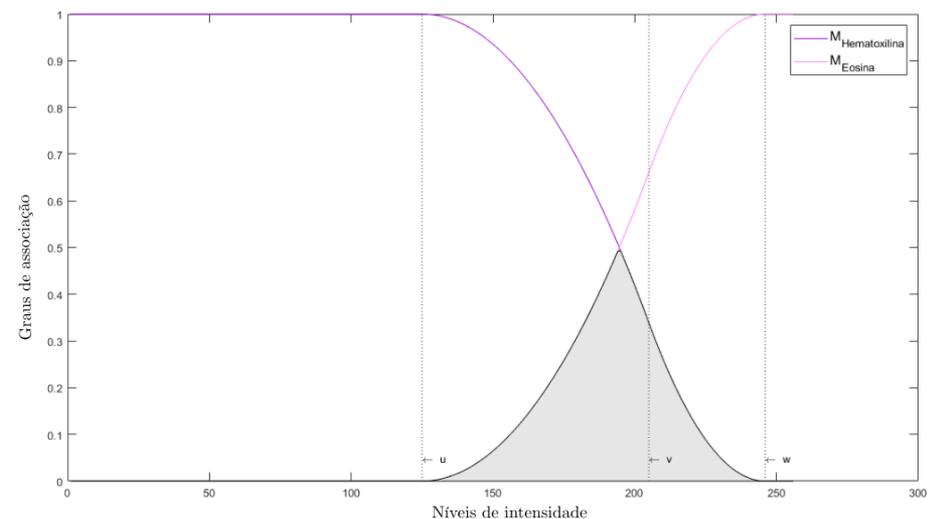
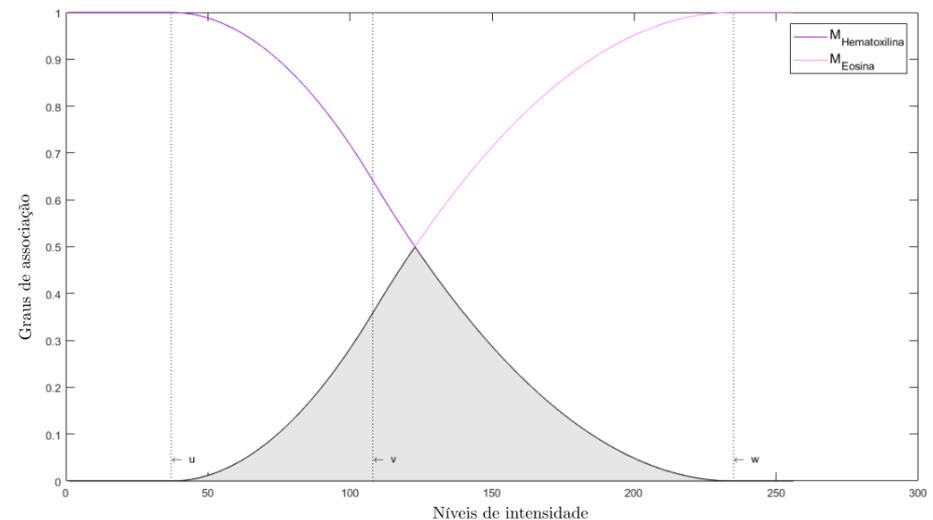
- Bases de imagens:
 - Câncer colorretal: **165** imagens digitalização por um scanner *Zeiss MIRAX MIDI Slide* com magnificação de 20x;
 - Câncer de mama: **343** imagens obtidas por scanners *Philips Ultra Fast 1.6* com magnificação de 40x;
 - Linfomas: **375** imagens divididas em: 122 de Linfoma de Células do Manto (LCM), 139 de Linfoma Folicular (LF) e 113 de Leucemia Linfóide Crônica (LLC) obtidas por uma câmera colorida *AxioCam MR5* com magnificação de 20x;
 - Base MITOS: **35** imagens dos scanners *AperioXT* e *Hamamatsu* com magnificação de 40x;
 - Base UCBS: **58** imagens normais e de câncer de mama, disponibilizadas pela *University of California Santa Barbara (UCSB)*.

Materiais e métodos

- Estimativa não supervisionada de λ
 - Em [9], o parâmetro λ foi empiricamente atribuído ao valor 0,1;
 - Para automatização dessa atribuição, a teoria *fuzzy* foi utilizada [11].

$$M_{HEMATOXILINA} = S(k, u, v, w),$$

$$M_{EOSINA} = 1 - S(k, u, v, w).$$



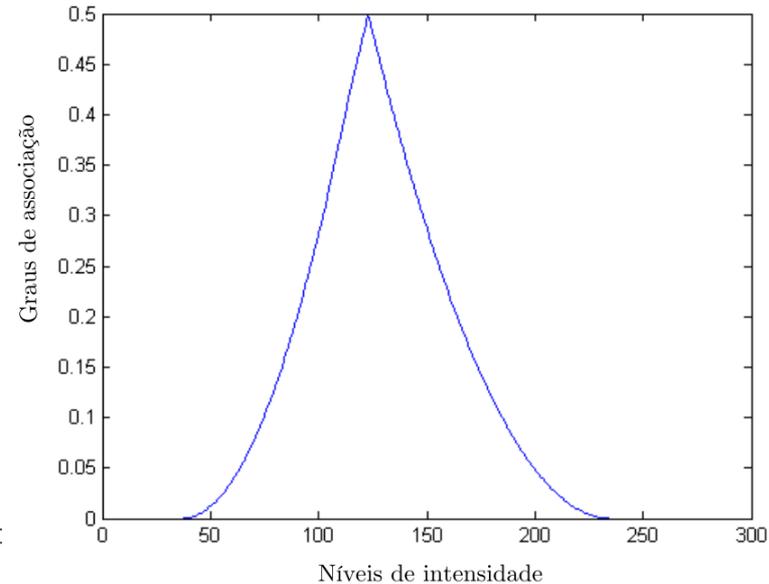
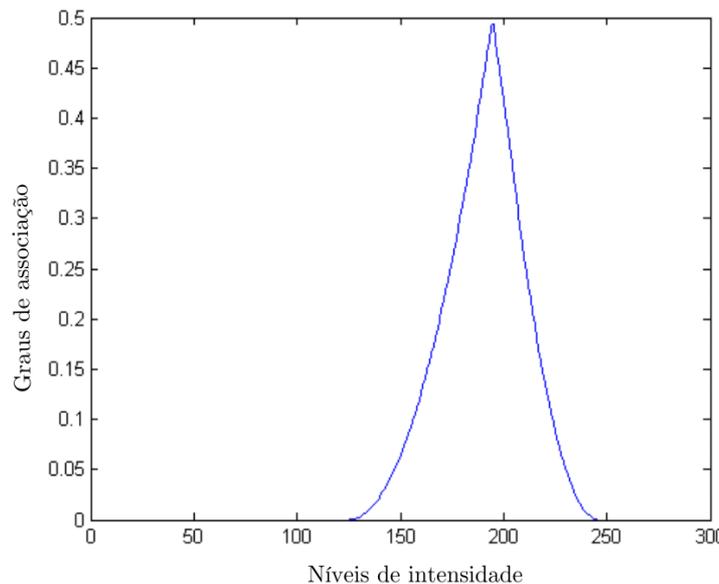
Materiais e métodos

- Estimativa não supervisionada de λ
 - A estimativa da tupla (u, v, w) foi realizada pelo método de evolução diferencial [\[12\]](#), que busca pela maximização da medida de entropia [\[13\]](#).

$$(u, v, w) = (125, 205, 246)$$
$$\text{Entropia} = 0,1602$$

$$(u, v, w) = (37, 108, 235)$$
$$\text{Entropia} = 0,6835$$

$$\lambda = \frac{\sqrt{\sum_i h_i^2}}{\sum_i h_i}$$



Materiais e métodos

- Inicialização da matriz W
 - Para garantir a convergência da estimativa de W para ótimos globais e a estabilidade dessa estimativa, sua inicialização foi realizada por um histograma de matiz com saturação ponderada com posterior aplicação do método *K-means* [6].

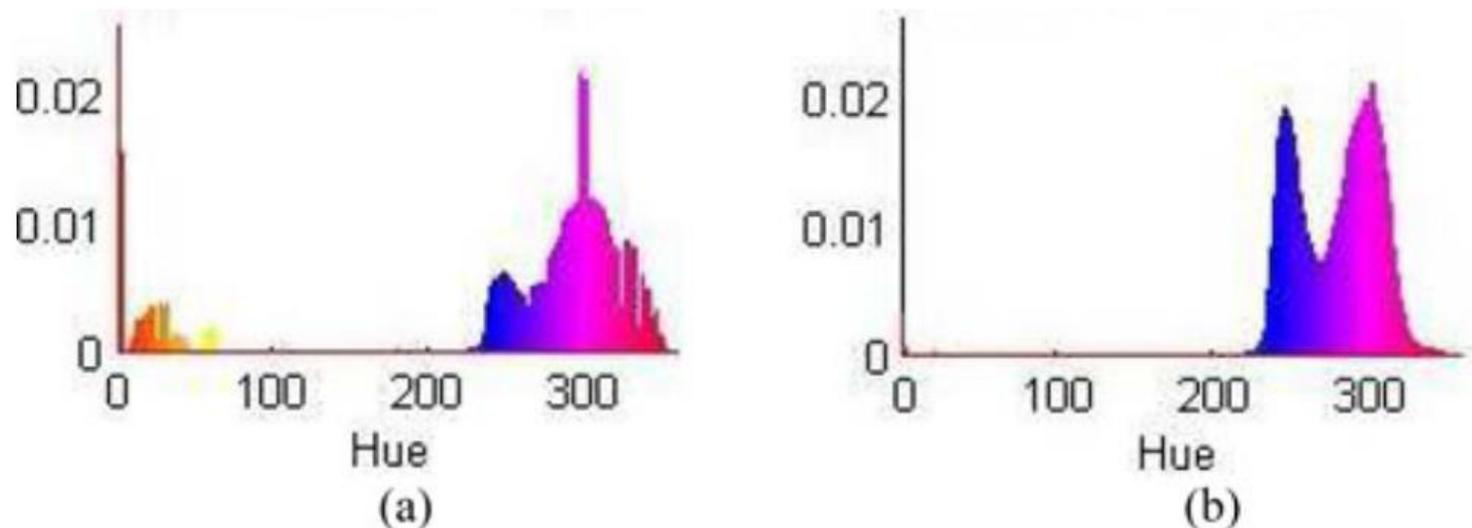


Figura 6. (a) Histograma de matiz padrão de uma imagem histológica e (b) histograma de matiz com saturação ponderada (Figura extraída de [6] 2015 © IEEE).

Materiais e métodos

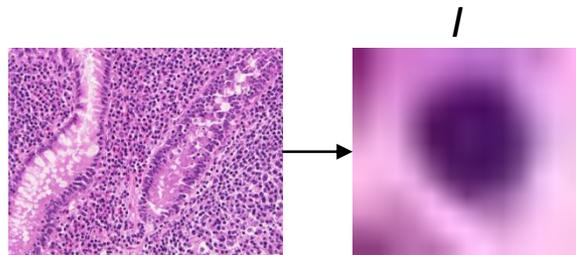
- Estimativa não supervisionada de W
 - A nova estimativa de W foi dada pelo método de [\[14\]](#), pela sua comparação de desempenho com a técnica utilizada por [\[9\]](#);
 - Nessa proposta, a NMF foi definida por:

$$\min_{W, H} \frac{1}{2} \|V - WH\|_1 + \lambda \sum_{j=1}^r \|H(j, :)\|_1, \quad \begin{array}{l} W, H \geq 0, \\ \|W(:, j)\|_2^2 = 1, \end{array} \quad (4)$$

o que a torna menos vulneráveis a *outliers* [\[14\]](#).

Materiais e métodos

- Estimativa não supervisionada de W
 - Para que W fosse estimada iterativamente, o tamanho h de mini-lotes foram definidos;



	1	2	3	4	5	6	7	...	156
R	118	127	146	174	205	232	251		242
G	44	54	72	101	131	160	181		205
B	139	146	159	174	184	200	218		239

- Assim, a cada mini-lote, um mapa H foi estimado pelo método de mínimos quadrados ponderados, o que permitiu a estimativa iterativa da matriz W pela técnica de gradientes conjugados [\[14\]](#).

Materiais e métodos

- As medidas *Structural-SIMilarity index (SSIM)* e *Feature SIMilarity index (FSIM)* foram utilizadas para avaliação dos resultados, que indicam bons resultados pela sua maximização [\[15\]](#);
- A primeira avalia a degradação de estruturas da imagem normalizada em relação à original;
- A segunda quantifica a similaridade dos atributos das estruturas entre as imagens originais e suas respectivas versões normalizadas.

Resultados e discussão

- Avaliação do método de inicialização de W

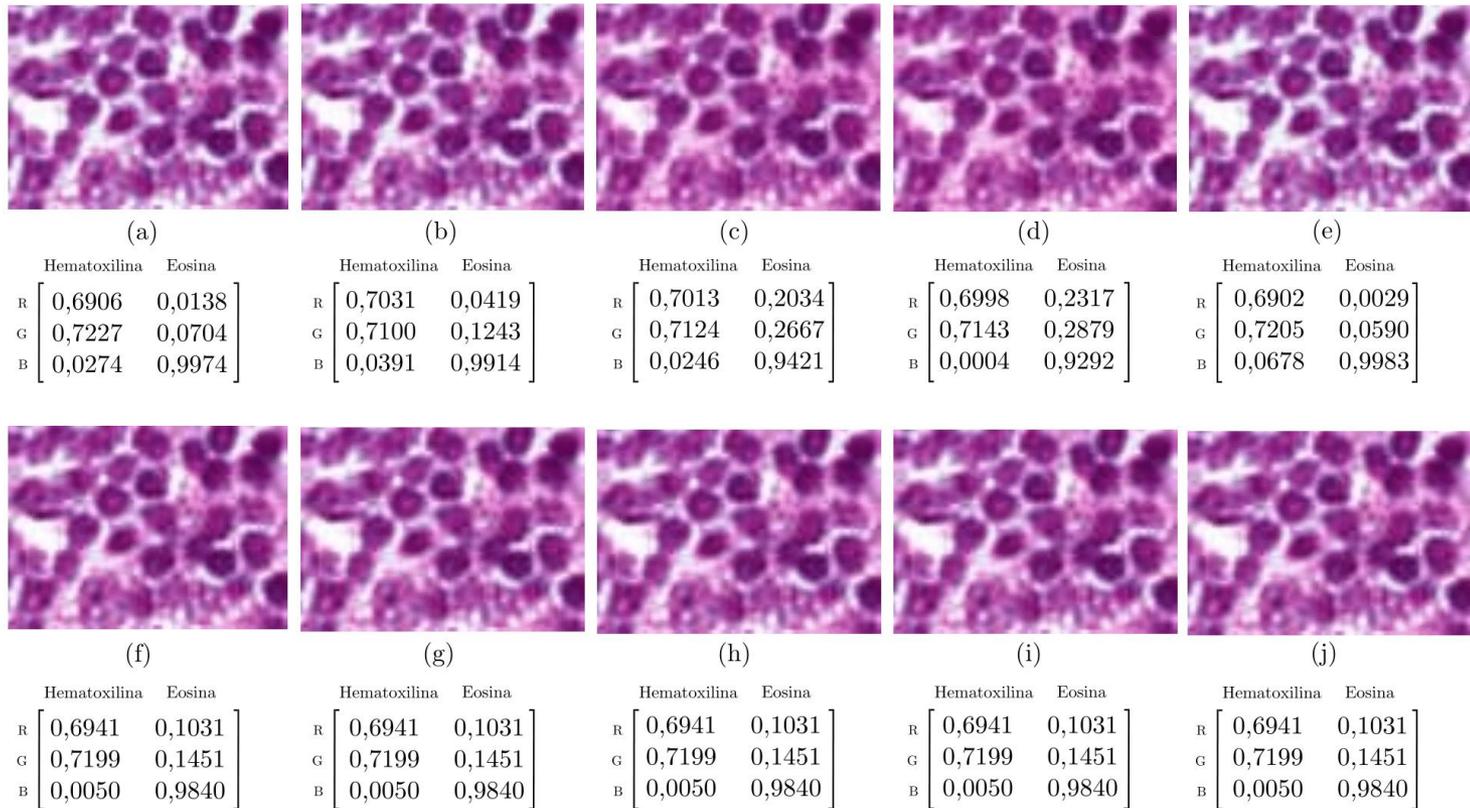


Figura 7: Resultados da normalização utilizando coeficientes aleatórios para a inicialização de W em cinco execuções (a)-(e) e coeficientes obtidos pelo método descrito, também em cinco execuções (f)-(j). As linhas das matrizes W correspondentes aos canais RGB são indicadas, bem como as colunas dos componentes H&E.

Resultados e discussão

- Análise comparativa de resultados

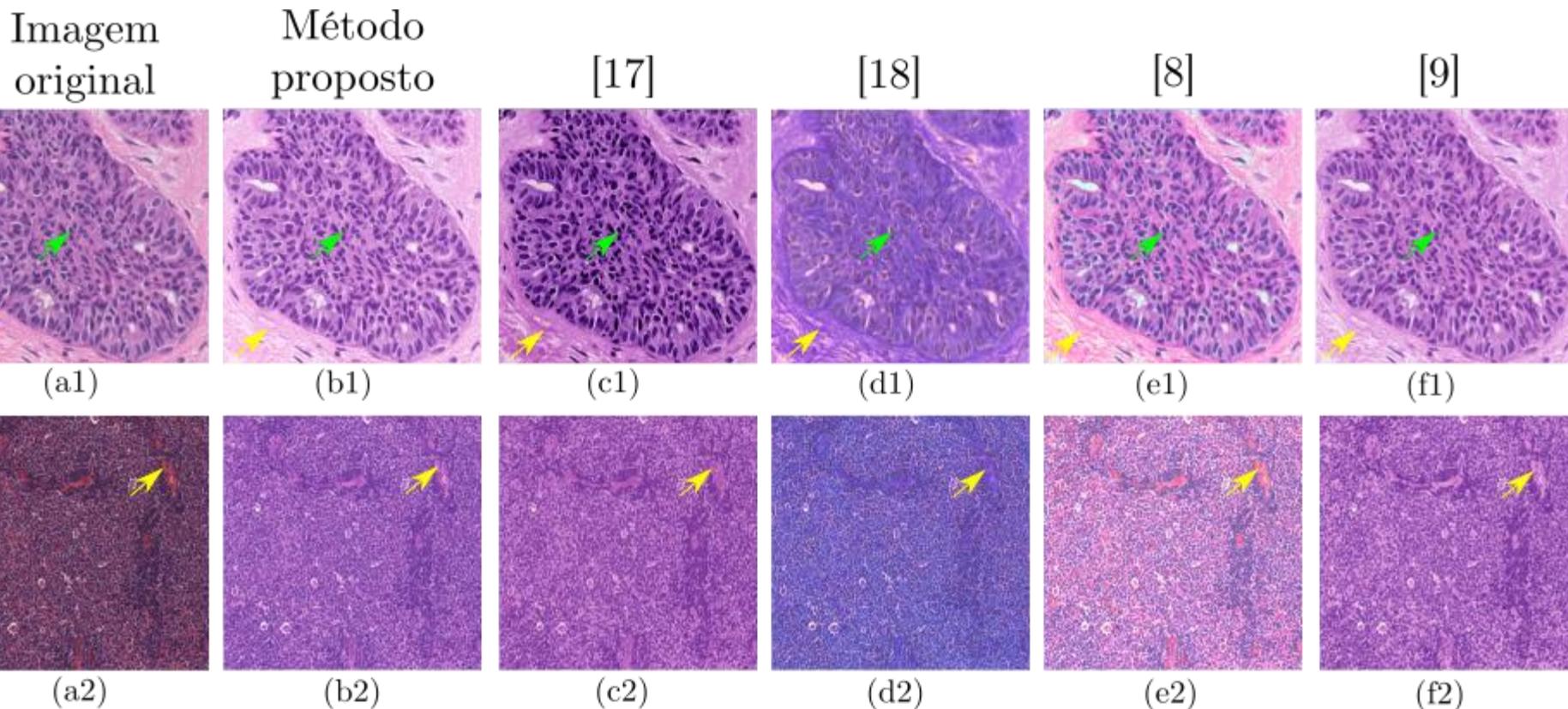


Figura 8: Resultados da normalização dos métodos proposto (b1,b2) e de [17] (c1,c2), [18] (d1,d2), [8] (e1,e2) e [9] (f1,f2) sobre imagens originais das bases de câncer de mama (a1) e LF (a2), dos casos intitulados S13-92 A1-11 A e sj-05-5311-R1_009, respectivamente.

Resultados e discussão

- Análise comparativa de resultados

Tabela 1: Resultados das medidas SSIM e FSIM pelo cálculo de suas médias e desvios padrão sobre os resultados dos algoritmos de normalização aplicados sobre as imagens de câncer colorretal, câncer de mama, LCM, LF e LLC.

Métodos de normalização	Bases de imagens									
	Câncer colorretal		Câncer de mama		Linfomas					
					LCM		LF		LLC	
	SSIM	FSIM	SSIM	FSIM	SSIM	FSIM	SSIM	FSIM	SSIM	FSIM
Método proposto	0,9444	0,9672	0,9372	0,9548	0,9454	0,9928	0,9083	0,9873	0,9607	0,9943
	(0,0275)	(0,0166)	(0,0356)	(0,0254)	(0,0564)	(0,0057)	(0,0419)	(0,0058)	(0,0600)	(0,0054)
[17]	0,8011	0,9299	0,7073	0,8767	0,7241	0,9140	0,7075	0,9165	0,7374	0,9111
	(0,0610)	(0,0247)	(0,1053)	(0,0465)	(0,0879)	(0,0303)	(0,1158)	(0,0341)	(0,0965)	(0,0359)
[18]	0,8132	0,8880	0,9261	0,9322	0,8192	0,9227	0,8282	0,9382	0,9013	0,9580
	(0,1898)	(0,1394)	(0,0492)	(0,0496)	(0,1628)	(0,0713)	(0,0520)	(0,0237)	(0,0552)	(0,0231)
[8]	0,0024	0,2405	0,0038	0,3461	0,0034	0,1302	0,0040	0,1145	0,0032	0,1289
	(0,00076)	(0,0488)	(0,00093)	(0,0929)	(0,0013)	(0,0221)	(0,0014)	(0,0202)	(0,0014)	(0,0212)
[9]	0,9387	0,9669	0,8984	0,9136	0,7227	0,9228	0,8235	0,9518	0,7162	0,9156
	(0,0702)	(0,0243)	(0,0717)	(0,0564)	(0,3015)	(0,0754)	(0,0716)	(0,0233)	(0,2965)	(0,0715)

Resultados e discussão

- Análise comparativa de resultados

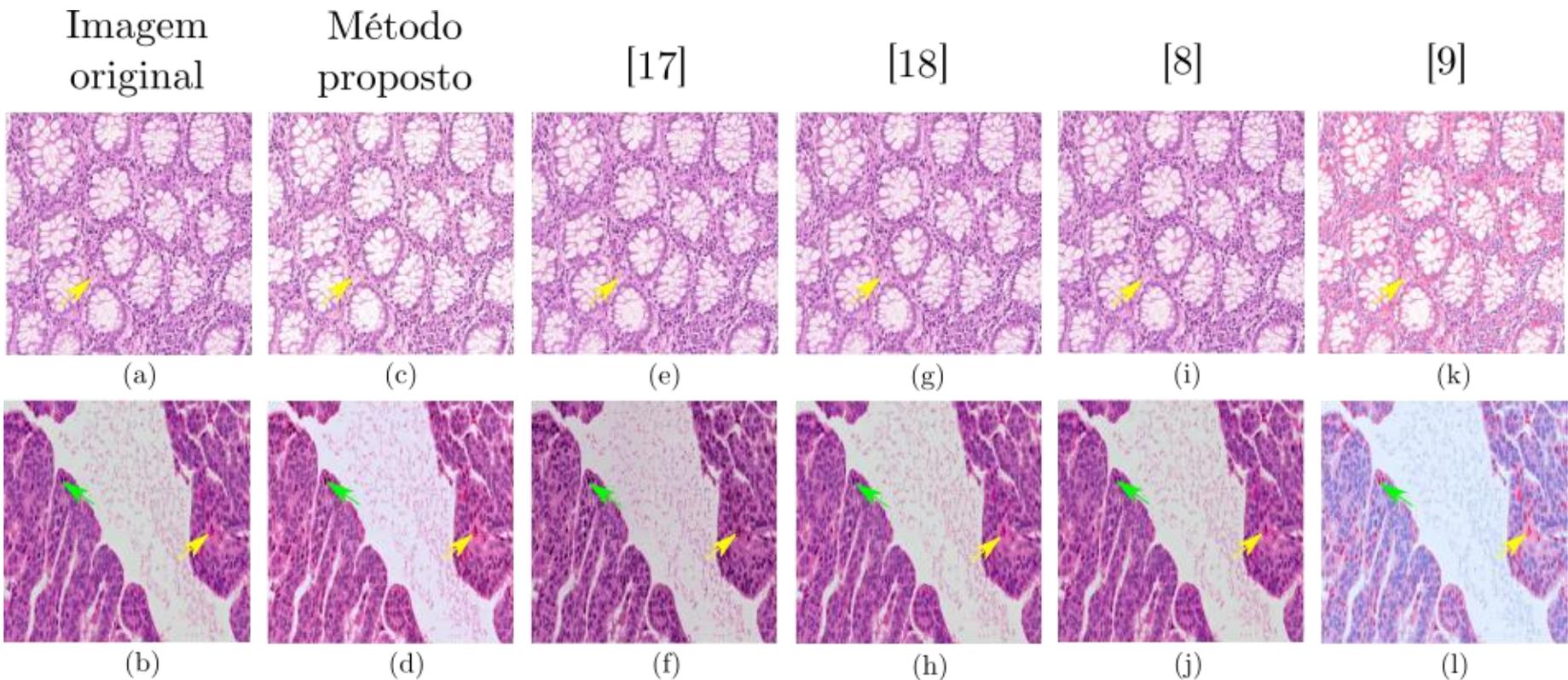


Figura 9. Resultados da normalização proposta ((c) e (d)), e das técnicas de [17] ((e) e (f)), [18] ((g) e (h)), [8] ((i) e (j)) e [9] ((k) e (l)) na condição em que as imagens originais ((a) e (b)) são utilizadas como imagens de referência.

Resultados e discussão

- Avaliação de desempenho sobre diferentes digitalizações de amostras histológicas

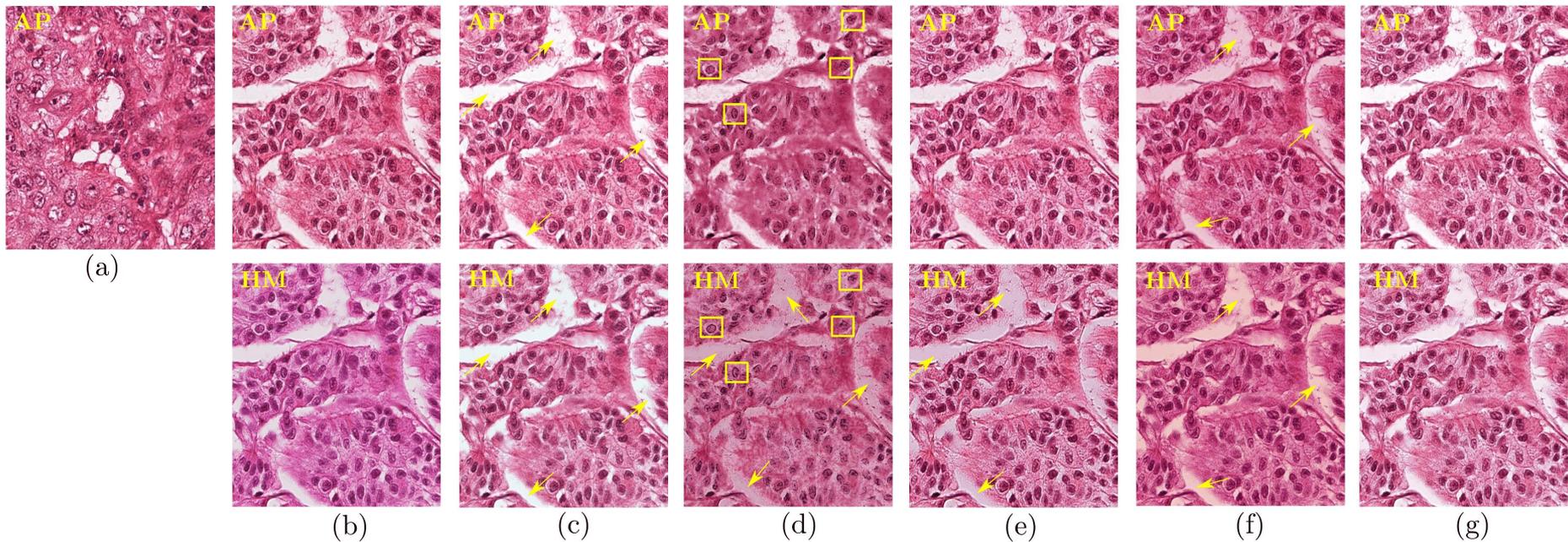


Figura 10: Resultados das normalizações proposta (c) e de [17] (d), [18] (e), [8] (f) e [9] (g) pela imagem de referência (a) sobre as imagens originais dos scanners AperioXT (AP) e Hamamatsu (HM) (b).

Resultados e discussão

- Comparação qualitativa por avaliação de especialistas

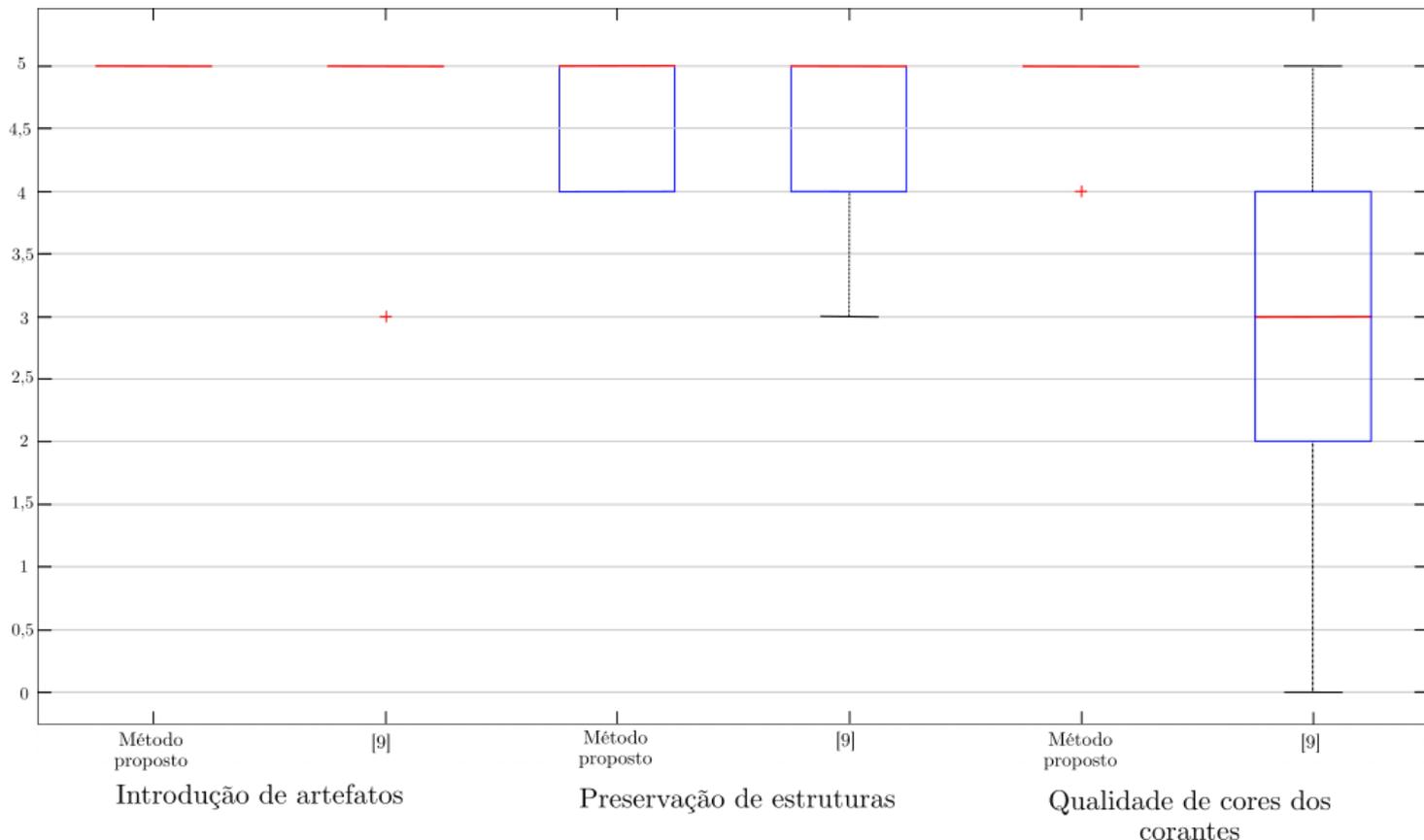


Figura 11: *Boxplot* da atribuição de notas realizada pela análise visual de dois patologistas para avaliação da normalização proposta e da técnica de [9] pelos critérios de introdução de artefatos, preservação de estruturas e qualidade de cores dos corantes.

Resultados e discussão

- Comparação qualitativa por avaliação de especialistas

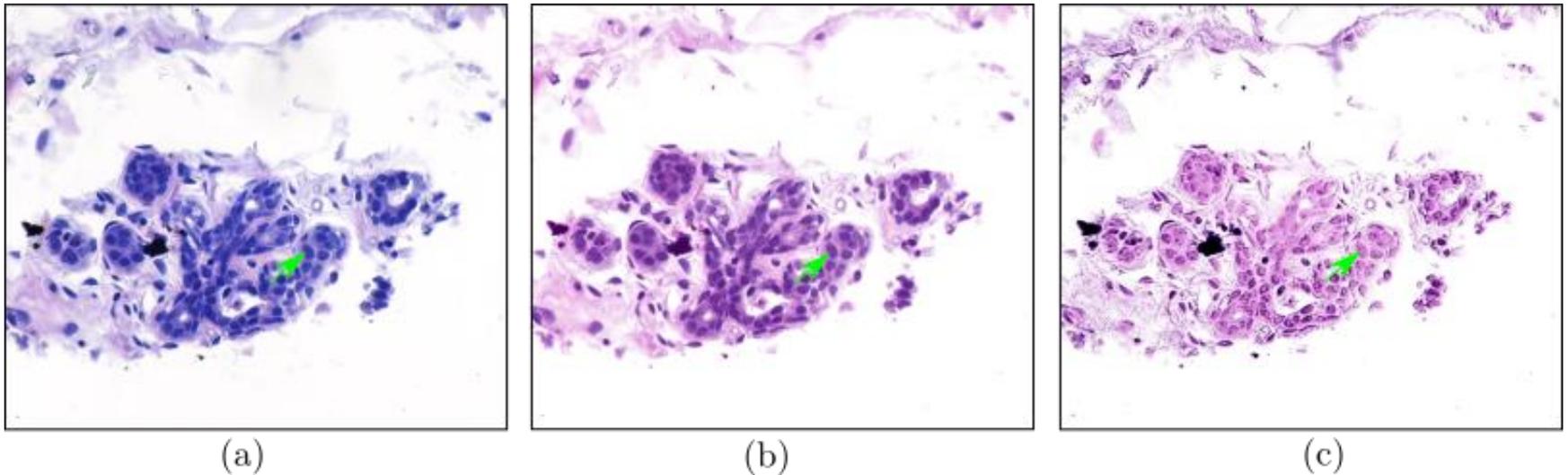


Figura 12: Normalização da imagem original da base UCSB (caso *ytma49_111003_benign1_ccd*) (a) que apresentou atribuição máxima na avaliação visual de dois patologistas pelo resultado do método proposto (b) e atribuição mínima ao resultado de [9] (c) pelo critério de qualidade de cores dos corantes.

Conclusão

- Pelos resultados experimentais, esta proposta de normalização apresenta relevante desempenho para aplicação sobre imagens de diferentes bases de imagens públicas;
- Em comparação a trabalhos da literatura, o método proposto alcança resultados promissores pelas avaliações realizadas;
- A limitação do método proposto foi observada pela influência da representação de estruturas histológicas altamente coradas sobre a estimativa da matriz de aparência de cores.

Referências

- [1] Bejnordi, B. E., Litjens, G., Timofeeva, N., Otte-Höller, I., Homeyer, A., Karssemeijer, N., & van der Laak, J. A. (2016). Stain specific standardization of whole-slide histopathological images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 35(2), 404-415.
- [2] Janowczyk, A., Basavanthally, A., & Madabhushi, A. (2016). Stain Normalization using Sparse AutoEncoders (StaNOSA): Application to digital pathology. *Computerized Medical Imaging and Graphics*.
- [3] Celis, R., & Romero, E. (2015). Unsupervised color normalisation for H and E stained histopathology image analysis. *International Symposium on Medical Information Processing and Analysis* (pp. 968104-968104). International Society for Optics and Photonics.
- [4] Bug, D., Schneider, S., Grote, A., Oswald, E., Feuerhake, F., Schüler, J., & Merhof, D. (2017). Context-based Normalization of Histological Stains using Deep Convolutional Features. In *Deep Learning in Medical Image Analysis and Multimodal Learning for Clinical Decision Support* (pp. 135-142). Springer, Cham.
- [5] Hoffman, R. A., Kothari, S., & Wang, M. D. (2014). Comparison of normalization algorithms for cross-batch color segmentation of histopathological images. *Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society IEEE* (pp. 194-197). IEEE.
- [6] Li, X., & Plataniotis, K. N. (2015). A complete color normalization approach to histopathology images using color cues computed from saturation-weighted statistics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 62(7), 1862-1873.
- [7] Vahadane, A., Peng, T., Albarqouni, S., Baust, M., Steiger, K., Schlitter, A. M., ... & Navab, N. (2015). Structure-preserved color normalization for histological images. *International Symposium on Biomedical Imaging* (pp. 1012-1015). IEEE.
- [8] Reinhard, E., Adhikhmin, M., Gooch, B., & Shirley, P. (2001). Color transfer between images. *IEEE Computer graphics and applications*, 21(5), 34-41.
- [9] Vahadane, A., Peng, T., Sethi, A., Albarqouni, S., Wang, L., Baust, M., ... & Navab, N. (2016). Structure-preserving color normalization and sparse stain separation for histological images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 35(8), 1962-1971.

Referências

- [10] Sethi, A., Sha, L., Vahadane, A. R., Deaton, R. J., Kumar, N., Macias, V., & Gann, P. H. (2016). Empirical comparison of color normalization methods for epithelial-stromal classification in H and E images. *Journal of pathology informatics*, 7.
- [11] Tang, Y., Mu, W., Zhang, Y., & Zhang, X. (2011). A fast recursive algorithm based on fuzzy 2-partition entropy approach for threshold selection. *Neurocomputing*, 74(17), 3072-3078.
- [12] Cuevas, E., Zaldívar, D., & Perez-Cisneros, M. (2016). Image segmentation based on differential evolution optimization. In *Applications of evolutionary computation in image processing and pattern recognition* (pp. 9-22). Springer, Cham.
- [13] Walkowski, S., & Szymas, J. (2011, December). Quality evaluation of virtual slides using methods based on comparing common image areas. In *Diagnostic pathology* (Vol. 6, No. 1, p. S14). BioMed Central.
- [14] Lu, C., Shi, J., & Jia, J. (2013, June). Online robust dictionary learning. In *Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 2013 IEEE Conference on* (pp. 415-422). IEEE.
- [15] Bhandari, A. K., Kumar, A., & Singh, G. K. (2015). Tsallis entropy based multilevel thresholding for colored satellite image segmentation using evolutionary algorithms. *Expert Systems with Applications*, 42(22), 8707-8730.
- [16] Mukhopadhyaya, S. (2016). Exploring measures of similarity and dissimilarity for fuzzy classifier: from data quality to distance quality.
- [17] Khan, A. M., Rajpoot, N., Treanor, D., & Magee, D. (2014). A nonlinear mapping approach to stain normalization in digital histopathology images using image-specific color deconvolution. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 61(6), 1729-1738.
- [18] Macenko, M., Niethammer, M., Marron, J. S., Borland, D., Woosley, J. T., Guan, X., ... & Thomas, N. E. (2009, June). A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. In *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on* (pp. 1107-1110). IEEE.