

## **ALIAS II: MICROSCOPIO AUTOMATICO DEL SIGLO XXI**

Copyright LifeSpan BioSciences Inc., 2005

**LifeSpan BioSciences Inc.**

**2401 Fourth Ave.**

**Seattle, WA 98121**

**206-3464-1554**

[www.lsbio.com](http://www.lsbio.com)

**Mariano Alvira, MD**

**Patólogo y Neuropatólogo**

**206-374-1180**

[Marianoa@lsbio.com](mailto:Marianoa@lsbio.com)

### **Introducción:**

La llegada de las matrices de tejidos “Tissue Micro Arrays”, (TMA) de alta densidad con muestras de varios cientos de cilindros por bloque de parafina ha creado un dilema y una dificultad al patólogo que tiene que interpretar los resultados con un sistema manual y con un microscopio óptico clásico.

El sistema manual no solo es tedioso y de poca eficiencia sino que también es muy fácil equivocarse en la interpretación y localización de los cilindros de tejido.

El avance de investigación con TMA de alta densidad para el estudio de cientos de anticuerpos ha obligado a buscar soluciones que permitan implementar instrumentos capaces de procesar y analizar cientos de muestras de una forma automática. A su vez, el análisis humano o automático de muchas muestras de tejidos teñidas con marcadores requiere imágenes de alta calidad para ser interpretadas por patólogos con experiencia o con algoritmos de imágenes.

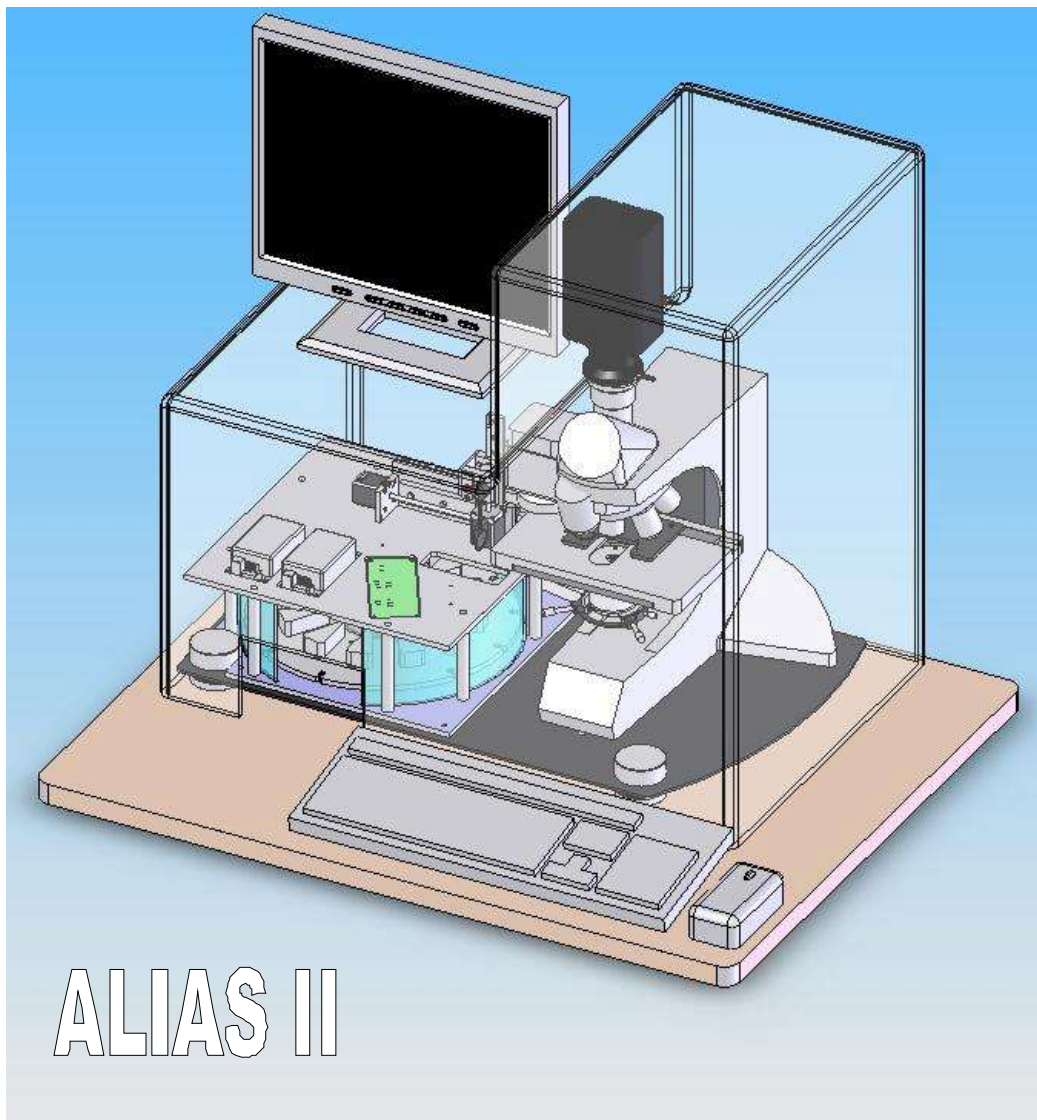
El diseño de un microscopio automático para el análisis de muestras requiere modificaciones drásticas en la iluminación de la muestra, la óptica del microscopio y la cámara digital. La identificación de las preparaciones, el reconociendo de tejidos normales y anormales y la localización y cuantificación de las proteínas teñidas por anticuerpos requiere soluciones avanzadas de algoritmos de programación.

ALIAS II fue desarrollado con la idea de implementar un sistema de gran flexibilidad capaz de ayudar al investigador y al patólogo en proyectos de

investigación con muchas muestra de tejidos y exigencias de imágenes de alta calidad.

En un periodo de cinco años, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA 98121, USA, ha superado barreras técnicas de gran dificultad que limitan la calidad de otros sistemas de visualización y análisis.

El microscopio automático robotizado ALIAS II en combinación con los algoritmos de análisis de imagen promete un sistema robusto y avanzado en el estudio y análisis automático de cortes de tejido y TMA.



### **Calidad de Imagen:**

El análisis exacto de imágenes en Patología requiere resoluciones máximas y el máximo color espectral posible. ALIAS II fue diseñado para obtener imágenes de alta calidad para este análisis. La fuente de iluminación (Light Emisión Diode, LED) está patentada por LifeSpan, y permite luz estable de gran intensidad. Produce luz de varios espectros sin contaminación con luz infrarroja. Este sistema no requiere un condensador óptico, lo cual facilita la iluminación directa de los objetivos y de la lente de proyección y de la cámara digital.

Las lentes de los objetivos y de proyección están fabricadas por Leica y producen campos planos uniformes de iluminación a magnificaciones desde 1.5 x - 40 x, un requisito para hacer análisis de imágenes automáticamente. Un programa de ordenador propietario de LifeSpan asegura enfoque óptimo a lo largo del área de toda la preparación, incluso a magnificaciones altas. Un cámara monocromática de 2048 x 2048 píxeles en combinación con la iluminación multiespectral asegura que la resolución espacial del sistema se duplique en comparación con otros sistemas que usan cámaras convencionales: Bayer mask, en las cuales los píxeles detectan luz roja, o verde o azul, con una imagen degradada como resultado final.

### **Sistema abierto de gran flexibilidad:**

El objetivo es producir un sistema capaz de resolver los múltiples problemas que se presentan en un laboratorio para la investigación y el análisis de imagen. Desde el punto de vista de programación, ALIAS II tiene una arquitectura abierta para permitir la integración de aplicaciones o módulos desarrollado por el usuario, o por LifeSpan o otros grupos o vendedores. Los modules que LifeSpan ha desarrollado son: toxicología, reconocimiento de estructura normal de tejidos, detección de cáncer y cuantificación de la señal en inmunohistoquímica (IHC)

### **Características:**

Una cámara externa captura la etiqueta de la preparación y el código de barra y lo archiva en la base de datos.

Un carrusel capaz de almacenar 300 preparaciones coloca las preparaciones automáticamente en la plataforma del microscopio. Cassettes de 25 preparaciones facilitan el procedimiento de **\*batch\*** o procedimientos de **\*stat\***

Un diseño único de la plataforma del microscopio permite digitar toda la preparación con visualización completa hasta el borde físico de la preparación. Este diseño permite la utilización de preparaciones de varias formas o tamaños.

Los objetivos tienen los siguientes aumentos: 1.5x, 2.5x, 10x, 20x y 40x. Las lentes de los objetivos están fabricadas por la casa Leica de acuerdo con las especificaciones de LifeSpan BioSciences.

La cámara digital contiene un CCD con resolución de 2048 x 2048 píxeles, es monocromática y “non-masked”

La fuente de iluminación consiste en un diseño único de LED's garantizando iluminación instantánea 100%. El campo de iluminación es extenso y permite iluminación constante y uniforme y adecuada para todo rango de (magnificaciones) aumentos. No tiene contaminación con luz infrarroja y permite seleccionar varios colores de luz con espectros definidos.

La posición de la platina, selección de los objetivos, selección de la onda espectral de iluminación y la captación de imágenes es programable y automática o manual.

Existe flexibilidad completa para incluir varias redes con varios tipos de servidores y CPUs de alta velocidad para el análisis de imágenes basados en conectividades dobles a Ethernet 10/100/1000 y con seguridad de “firewall”.

El archivo standard consiste en 4 terabites con capacidad expansiva. Standard JPEG 2000 compresión y DICOM 3.0 definición de objetos de imagen.

La velocidad de captación de imagen de 1 cm<sup>2</sup> con un objetivo de 10x es menos de 3 minutos. Con un objetivo de 20x es menos de 20 minutos.

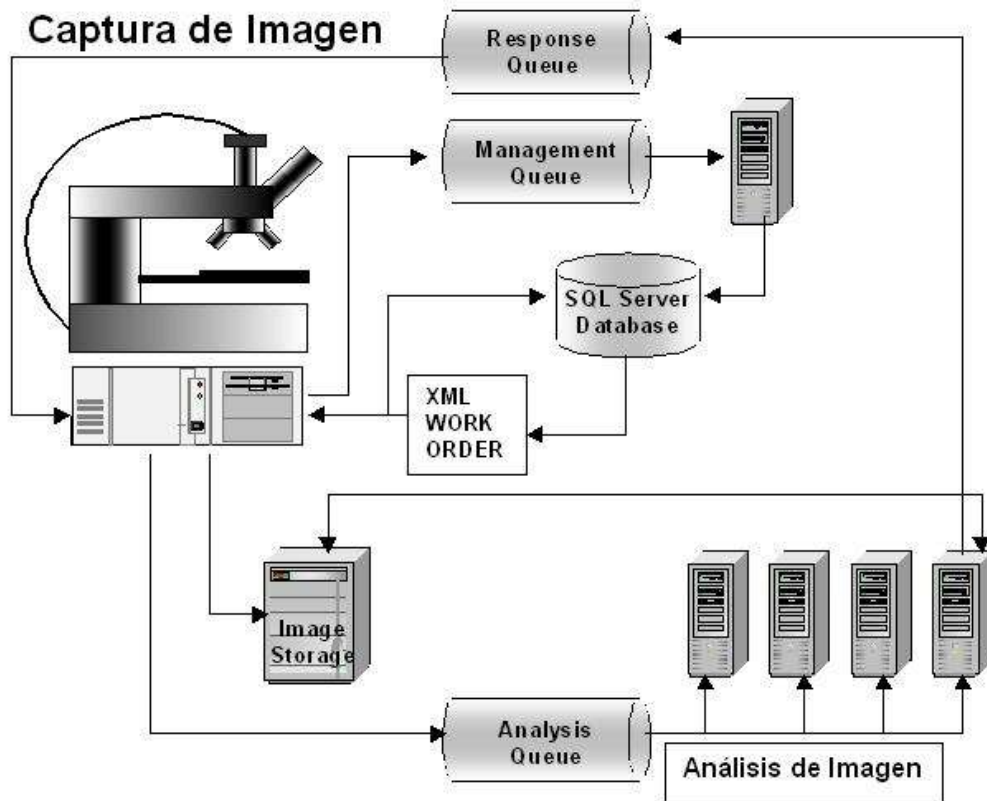
La función automática proporciona la capacidad de cartografiar una preparación completa o TMA de alta densidad evitando los espacios vacíos para concentrar el análisis en las zonas con tejido evitando la captación, archivo y análisis de zonas vacías.

### **Algoritmos para el análisis de imagen:**

1 - Separación cuantitativa de los colores espectrales de la tinción con H&E.

2 – Medidas de barril, efecto de “pin-cushion” y aberración esférica con plantillas standards.

- 3 – Medida del espectro dinámico con calibración de plantilla.
- 4 – Medidas de resolución basadas en “modulation transfer factor (MTF)”
- 5 – Medidas de las distorsiones del espacio blanco (vacío)
- 6 – Identificación de estructuras y células en 19 tipos de tejidos normales humanos.
- 7 – Identificación morfológica de las características del núcleo en células malignas en seis tipos de cáncer mas frecuente (mama, colon, pulmón, páncreas, ovario y próstata)
- 8 – Cuantificación de marcadores (anticuerpos) en tejidos cancerigenos y no cancerigenos con segregación del núcleo y del citoplasma.



## **Detección Automática de Cáncer:**

Los algoritmos desarrollados hasta la fecha detectan cáncer de mama, colon, pulmón (de células pequeñas y no-células pequeñas), páncreas, ovario y próstata, usan las siguientes indicaciones:

- Información obtenida a aumentos 1.5x, 5x, 10x, 20x y 40x
- Discrimina núcleos conjuntamente agrupados
- Se adapta a variaciones con la tinción de H&E
- Se adapta a la orientación de cualquier sección de tejido
- Estas funciones son completamente automáticas
- Estos análisis están basados en un complejo tridimensional donde el “volumen” de la H&E conjuntamente con las características del espacio X e Y del núcleo y citoplasma son independientes del tamaño, orientación y localización de las características celulares.
- En el caso de lesiones de mama el algoritmo es capaz de:
  - identificar tejido normal (atrofia, unidad del termino lobular)
  - lesiones benignas (hiperplasia epitelial, hiperplasia florida)
  - Carcinoma infiltrativo ductal y carcinoma “in-situ” (de grado bajo, intermedio y alto)
  - Artefactos del tejido (arrugas en el tejido, variaciones de tinción, fragmentos de tejido, burbujas, etc)

## **Estudios de Toxicología:**

### **Resultados del Proyecto de Toxicología en hígado de rata:**

En un estudio ciego en un grupo de 100 preparaciones de hígado de rata al algoritmo de LifeSpan tuvo un 87% de éxito en reconocer el grupo de preparaciones que pertenecía al grupo normal de control.

Una vez que el grupo de control fue determinado el éxito aumentó al 99%.

### **Algoritmos en proceso de desarrollo:**

- **Identificador de artefactos y la presencia de tejido**
  - identifica la presencia de tejido viable en la preparación y compara esta información con la información archivada en el código de barra de la preparación.

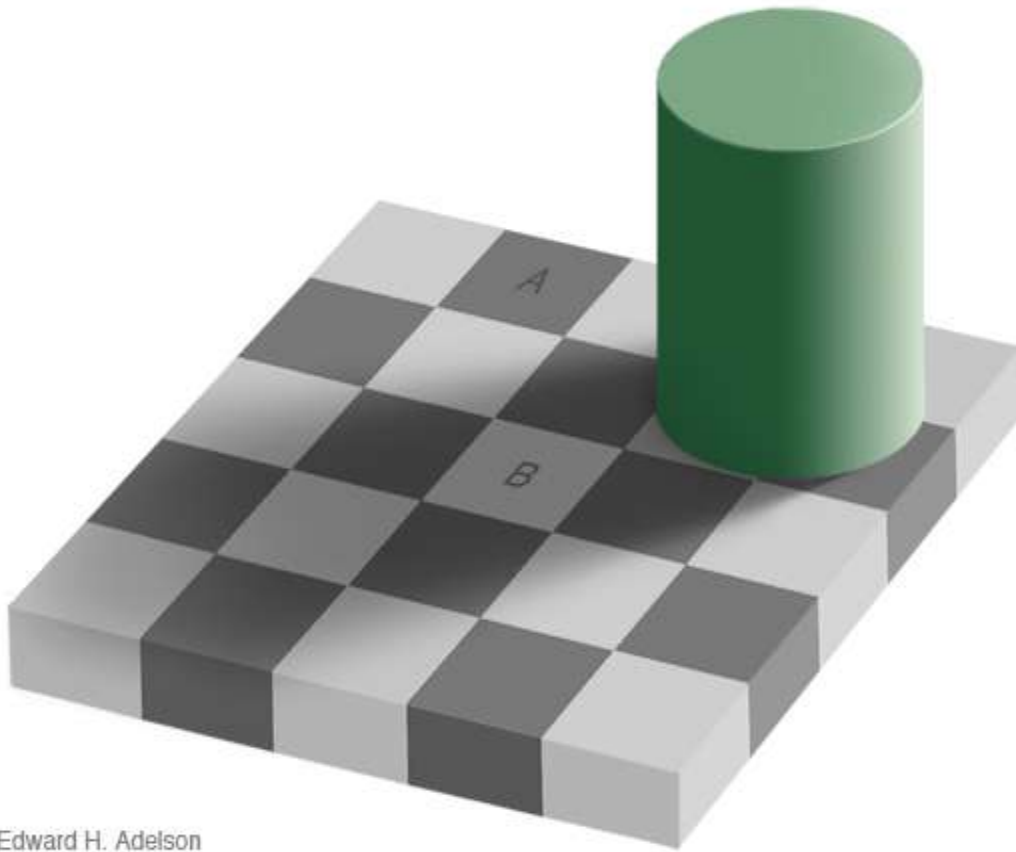
- **Evaluación de la calidad de la tinción**
  - compara una preparación control de H&E y con unos parámetros mínimos y decide si la preparación contiene los requisitos mínimos para el análisis de imagen.
- **Identificador del grado de tumor**
  - cuantifica pleoformismo nuclear, desarrollo de túbulos, recuento de mitosis y otros parámetros para ayudar al diagnóstico.
- **Cuantificador de la señal de IHC**
  - cuantifica la intensidad del marcador en el citoplasma, núcleo, membrana nuclear y membrana celular a través en una variedad de tejidos y células.
- **Identificación de características novedades que se podrían comparar con estudios sobre respuesta al tratamiento y supervivencia.**

**Problemas inherentes subjetivos al análisis de imágenes:**

Numerosos estudios en Patología diagnóstica han demostrado que la concordancia diagnóstica entre varios patólogos varía entre el 60 - 80% dependiendo del estudio y de la dificultad del diagnóstico. La reproducibilidad entre el mismo patólogo o grupo de patólogos es muy baja y depende muchísimo de circunstancias personales. Por ejemplo, la percepción del color es también muy subjetiva. El daltonismo tiene una incidencia del 5% de la población normal en algunos grupos étnicos.

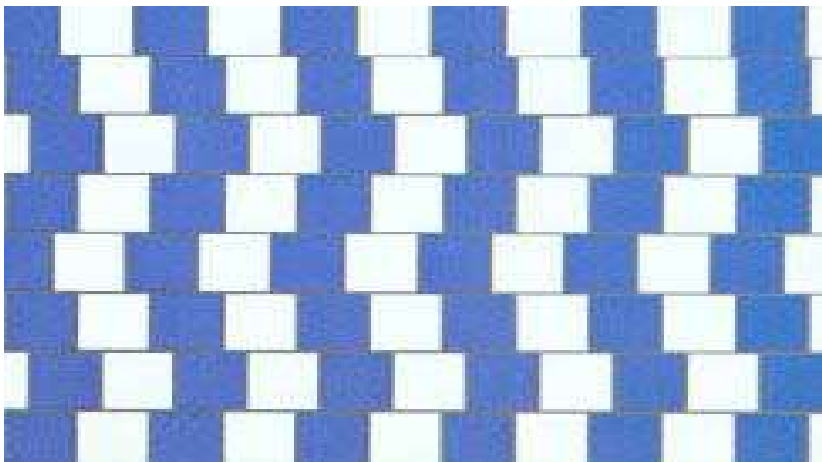
La vista humana es sensitiva a las ilusiones ópticas como se demuestra en algunos estudios y ejemplos del departamento de Ciencias Cognitivas e Inteligencia Artificial del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT):

<http://web.mit.edu/persci/people/adelson/index.html>



Edward H. Adelson

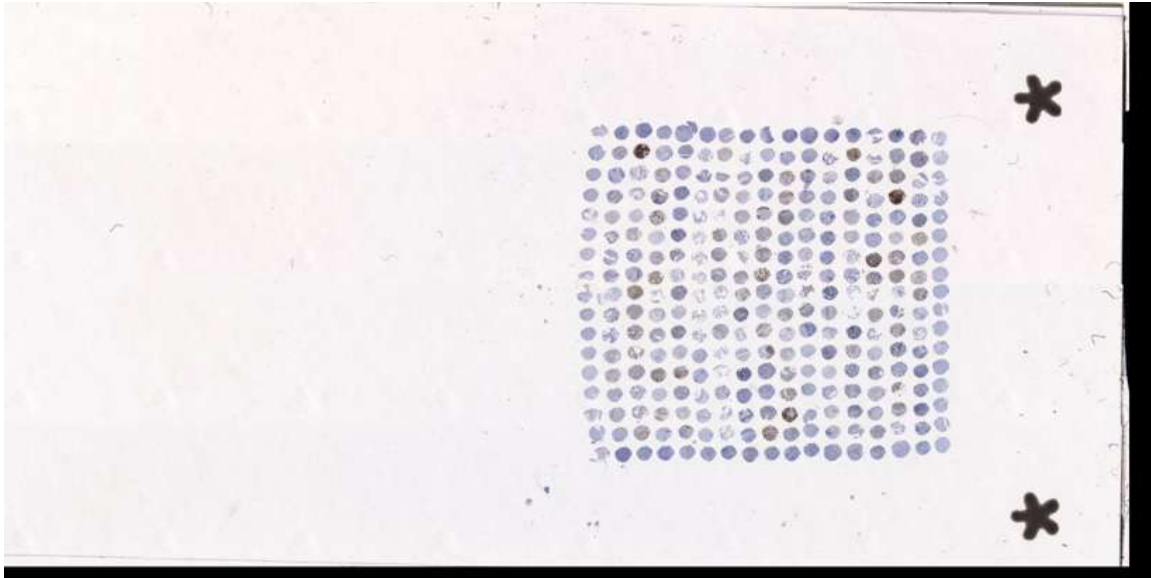
Los cuadrados marcados A y B son del mismo tono de gris



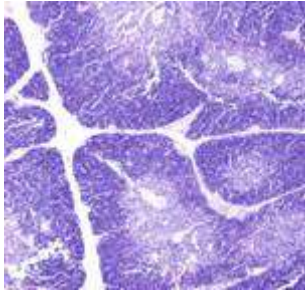
¿Son las líneas horizontales paralelas?  
Si lo dudas puedes medir la anchura con una regla.



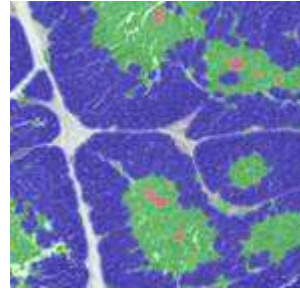
Ejemplo de matriz de tejidos (TMA) de alta densidad  
(cortesía del Dr. Santiago Ramón y Cajal)



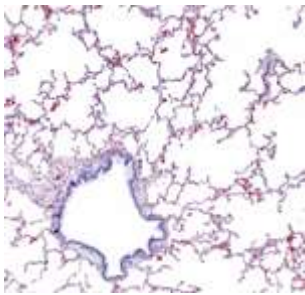
Ejemplos de Identificación de estructuras y células en 19 tipos de tejidos normales humanos:



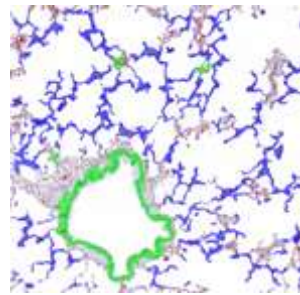
**TIMO**



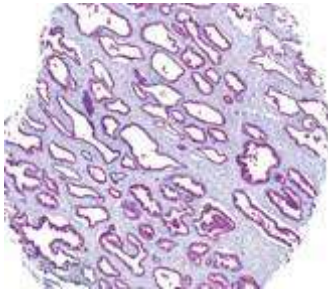
Medula Vasos Corteza



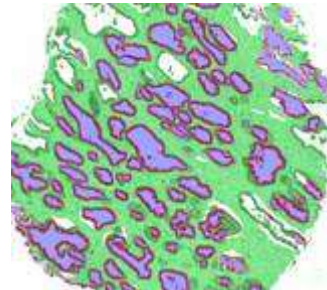
**PULMON**



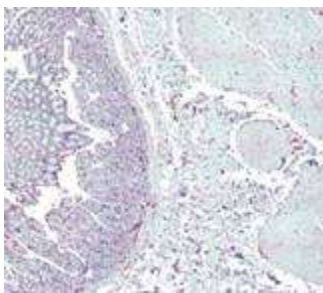
Alvéolos Bronquiólos



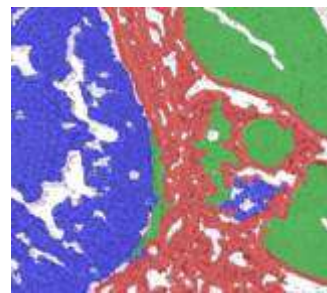
**PRÓSTATA**



Estroma Glándulas



**ESTOMAGO**



Mucosa Submucosa Músculo