

## ARTÍCULOS ORIGINALES

# SISTEMA ASISTIDO DE VISIÓN ARTIFICIAL PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE BIOPSIAS RENALES MEDIANTE MICROSCOPÍA ÓPTICA

Manuel José Castrillón Fernández,\* Harold J. Bolaños,\*\*  
Jaime E. Enríquez,\*\*\* Leonairo Pencue-Fierro\*\*\*\*.

## RESUMEN

**Objetivo:** Desarrollar un sistema de visión artificial para el estudio de las biopsias de riñón mediante microscopía óptica. **Diseño del estudio:** Las biopsias de riñón fueron procesadas mediante bloques de parafina y coloreadas con hematoxilina eosina en el Departamento de Patología, Universidad del Cauca. Las imágenes de los 108 glomérulos analizados, fueron adquiridas mediante una cámara CCD acoplada a un microscopio óptico. El algoritmo de segmentación de las imágenes fue desarrollado con base en técnicas de procesamiento y análisis digital de imágenes. **Resultados:** Mediante el procesamiento digital de imágenes se puede extraer la información cuantitativa de los diferentes tipos de células que conforman el penacho glomerular como son las células endoteliales, mesangiales y podocitos, así como también obtener información sobre el tamaño del penacho glomerular y su relación con el espacio de Bowman. Lo anterior permitirá a futuro la utilización de este sistema para el estudio de las glomerulopatías proliferativas.

**Palabras clave:** Algoritmo de k-means, análisis de imágenes renales, glomérulo, procesamiento digital de imágenes.

Recibido para evaluación: Enero 14 de 2007. Aprobado para publicación: Febrero 18 de 2007.

\* Grupo de Óptica Láser, Departamento de Física, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

\*\* Médico Patólogo. Jefe Departamento De Patología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca

\*\*\* Especialista en Nefrología. Grupo de Enfermedades Renales, Departamento de Medicina Interna, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

\*\*\*\* Grupo de Óptica Láser, Departamento de Física, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

**Correspondencia:** Manuel José Castrillón Fernández. Calle 2N 12-09 Los Rosales, Popayán, Cauca. Teléfono: 8239068, celular: 300-7918958. E mail: mcastrillon@unicauca.edu.co, mjcafe7@hotmail.com

## ABSTRACT

**Objective:** To develop a system of artificial vision for the study of the kidney biopsies by means of optic microscopy. **Design of the study:** The kidney biopsies were processed by means of blocks of paraffin and colored with hematoxylineosin stain in the Department of Pathology, University of the Cauca. The images of the 108 analyzed glomerulus were acquired by means of a camera CCD coupled to an optic microscope. The algorithm of segmentation of the images was developed with base in techniques of processing and digital analysis of images. **Results:** By means of the digital processing of images you can extract the quantitative information of the different types of cells that conform the glomerular tuft such as the endothelial, mesangial and podocytes cells, as to obtain information about the size of the glomerular tuft and its relation with the space of Bowman. The above mentioned will allow us to future the use of this system for the study of the proliferative glomerulonephritis.

**Key Words:** K-means algorithm, analysis of renal images, glomerulus, digital processing of images.

## INTRODUCCIÓN

La nefrología corresponde al estudio de los riñones, sus componentes y sus patologías. La unidad funcional renal es el nefrón, el cual está constituido por: el corpúsculo renal o malpighiano (glomérulo y cápsula de Bowman) y los túbulos proximal y distal. El corpúsculo renal está compuesto, como se muestra en la figura 1, de un sistema capilar lineado por una capa delgada de células endoteliales; una región central de células mesangiales; las células epiteliales viscerales (podocitos) y la membrana basal asociada; y las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman.

El glomérulo tiene entre sus funciones el proceso de ultrafiltrado de la sangre desde los capilares glomerulares y los podocitos hacia el espacio de Bowman. Existen dos tipos de nefrones reconocibles dentro del riñón: los corticales, que se encuentran en la superficie, y los yuxtamedulares, que se encuentran en la médula o parte interna del riñón. El diámetro promedio de un glomérulo es de aproximadamente 200  $\mu$ m. El diámetro de los glomérulos yuxtamedulares es un 20% más grande que los glomérulos de la zona superficial. (1)

El desarrollo de la Nefropatología en los últimos 20 años ha sido vertiginoso, especialmente en lo referente a los trastornos glomerulares. En éste periodo se consolidó la expresión de glomerulopatías para incluir las enfermedades con signos morfológicos inflamatorios llamadas glomerulonefritis (GMN), y aquellas que carecen de ellas. Las GMN se caracterizan también por la proliferación celular en el glomérulo. La importancia de una biopsia renal radica en que posibilita el diagnóstico morfológico, establece el pronóstico del paciente y plantea el tratamiento a seguir, además facilita el conocimiento de la historia natural de la enfermedad. (2)

En general, la inspección visual mediante el microscopio óptico realizada por el patólogo para determinar una patología renal, específicamente una glomerulonefritis, depende de la exhaustiva tarea de observar la aparente proliferación celular del glomérulo y consecuente disminución del espacio de Bowman de una forma subjetiva, para así establecer un diagnóstico. Aunque la primera forma de diagnosticar una enfermedad renal es mediante el microscopio óptico, existen otras técnicas para establecer una glomerulopatía como la microscopia electrónica de transmisión, la inmunofluorescencia, y la microscopia óptica de alta resolución. Estos equipos y técnicas son altamente costosos y la preparación de las muestras requiere de un cuidado especial.

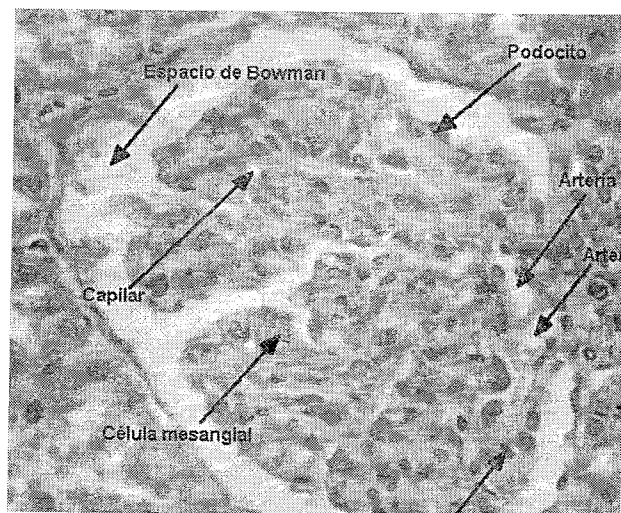
Como clasificador se utilizó el algoritmo de k-means que tiene como idea central minimizar la distancia de todos los objetos segmentados a los centroides agrupándolos dentro de un cluster o clase. Un mínimo local de todas las distancias dentro del cluster es buscado interactivamente ajustando los k centroides del cluster  $m_j$ , y asignando cada objeto al centroide más cercano. (3)

La técnica presentada en este trabajo posee la ventaja de almacenar la imagen, sus datos y presenta un primer diagnóstico de la biopsia renal analizada, teniendo la posibilidad de constituir un archivo para posteriores revisiones de dicho paciente.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### A. Colección de muestras

Las biopsias renales utilizadas para estandarizar los patrones morfológicos normales del glomérulo fueron extraídas

**Figura 1.** Glomérulo y sus componentes.

de autopsias de 10 individuos con edades comprendidas entre los 15 y 40 años que no presentaban patologías que comprometieran el riñón, y fueron realizadas en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses seccional Cauca. Se realizó un estudio retrospectivo de los pacientes a los que se les había practicado biopsia renal percutánea, realizadas en el Departamento de Patología del Hospital Universitario San José de Popayán, Colombia, y cuyo diagnóstico clínico demostraba la presencia de lesiones histopatológicas compatibles con enfermedad glomerular, específicamente glomerulonefritis proliferativa y mesangio-proliferativa. El diagnóstico de estos pacientes fue realizado mediante microscopia óptica y confirmado mediante microscopia electrónica de transmisión. El tejido fue procesado en todos los casos por el equipo de técnicos del mismo hospital. Todas las muestras fueron fijadas en parafina; se practicaron cortes de alrededor de 3 micras con un micrótopo vertical y se colorearon con tinción hematoxilina eosina. (4)

### B. Descripción del sistema

El sistema implementado está constituido por un microscopio óptico marca Nikon que tiene acoplada una cámara CCD marca JVC de 640x480 pixeles, la señal analógica de salida de la cámara es digitalizada mediante una tarjeta de adquisición conectada al computador, obteniendo de esta forma las imágenes digitales para el estudio. El computador utilizado es una estación de procesamiento y análisis de imágenes LEICA Q550IW. El software se desarrolló en QUIPS y QWIN, los cuales son macroprogramas interactivos ejecutados en una plataforma PC.

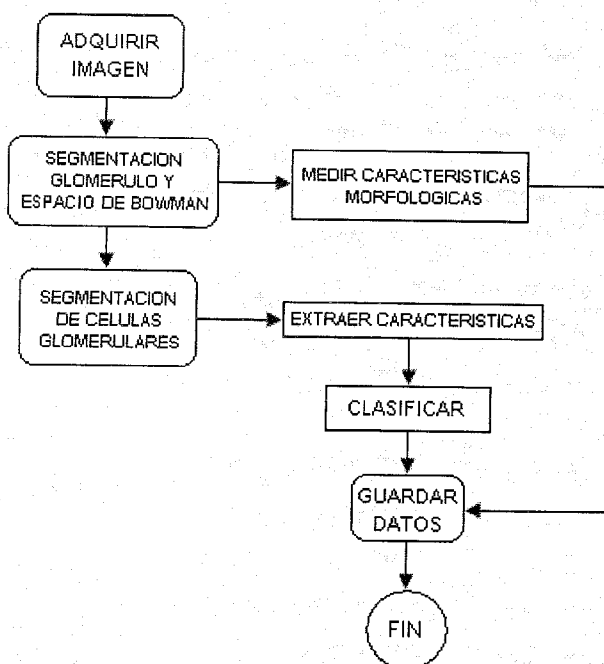
La figura 2 muestra el diagrama de flujo de la información en este sistema de visión artificial, que es alimentado por una

imagen digital del glomérulo, esta imagen es segmentada para separar las regiones correspondientes al espacio de Bowman, el penacho glomerular y el glomérulo, y posteriormente realizar las mediciones morfológicas de cada uno de estos objetos de la imagen.

El siguiente paso es nuevamente segmentar la imagen para separar los núcleos correspondientes a las células glomerulares que interesan analizar y etiquetar cada una como un objeto, extrayendo de estos las características más relevantes que servirán para clasificarlas utilizando el algoritmo de k-means, mostrando el resultado del análisis diagnóstico y con la posibilidad de imprimirlo o almacenarlo. En las siguientes secciones se profundizan con mayor detalle las técnicas de procesamiento y análisis digital de imágenes utilizadas por la aplicación software para llevar a cabo esta tarea.

### C. Segmentación

La segmentación consiste en dividir la imagen en regiones que son de interés, denominadas objetos, y el fondo, constituido como la región que no presenta interés particular. Dentro de las segmentaciones realizadas: la primera separa el espacio de Bowman del resto del glomérulo, mientras que la segunda aísla las células glomerulares para su posterior clasificación.

**Figura 2.** Diagrama de flujo del sistema implementado.

*Segmentación del glomérulo, espacio de Bowman y células glomerulares:* Esta es una de la etapas más críticas del sistema, debido a que se debe segmentar el espacio de Bowman, teniendo en cuenta que también se pueden segmentar los túbulos que se observen en la imagen alrededor del glomérulo y los capilares que se presentan a la luz del microscopio, objetos que no son de interés en este trabajo. La imagen a color original es descompuesta en sus tres planos RGB, se realiza una reconstrucción entre el plano verde y su laplaciano, con el fin de obtener una imagen en gris sin la presencia de bordes. Posteriormente se obtiene la imagen invertida de la sustracción entre el plano verde y la reconstrucción de bordes, operación comúnmente definida como filtrado *high boost* o enmascaramiento difuminado.

Esta imagen muestra el espacio de Bowman bien definido, y algunos capilares y túbulos difusos, ocultando el fondo. Utilizando una dilatación en nivel de gris se eliminan los elementos difusos de la imagen.(5) La imagen resultante muestra el espacio de Bowman sin defectos y, en algunos casos, muestra algunos túbulos que por su tamaño no son eliminados durante el proceso; finalmente la imagen es umbralizada (figura 3). La siguiente etapa es la parte de la asistencia del usuario al sistema para cerrar los dos extremos del espacio de Bowman correspondiente a la figura 3.

Debido a que el tejido adyacente al túbulo distal es similar al tejido del glomérulo, es necesario hacer uso del cursor como si fuera un lápiz para trazar una trayectoria adecuada que una los dos extremos del espacio de Bowman, obteniendo por ende el glomérulo.(6) En la figura 4 se observa el borde que encierra el área del glomérulo.

Utilizando algunas herramientas de la morfología matemática binaria, se mejora la apariencia del espacio de Bowman, el penacho glomerular (figura 5) y el glomérulo, para así realizar las mediciones morfológicas de cada uno de estos objetos.

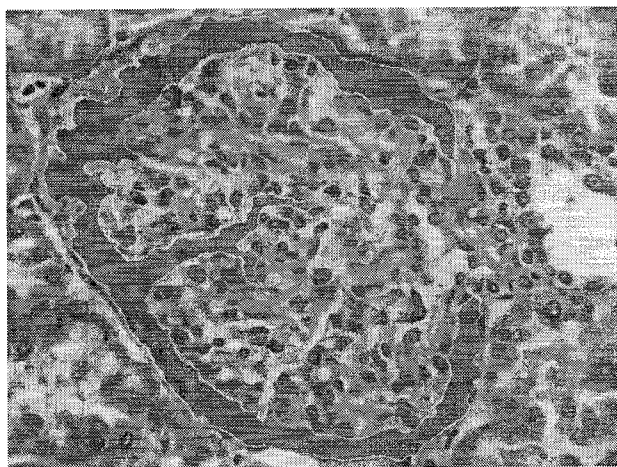
Para separar las células glomerulares se realizó una segmentación por color, aprovechando que el color del núcleo es diferente al del citoplasma y al del tejido del penacho glomerular.

#### D. Extracción de características

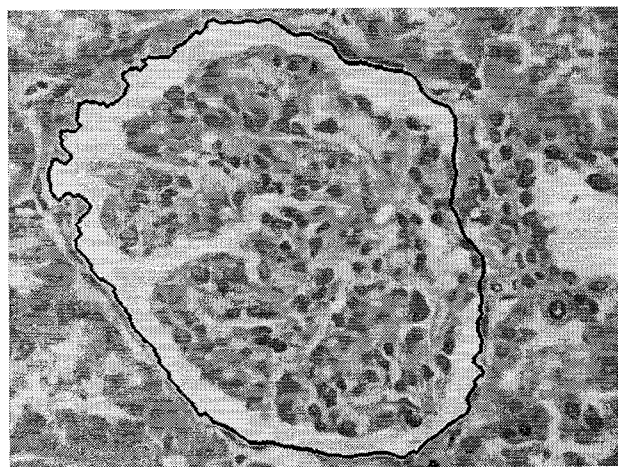
Con las imágenes segmentadas se realiza la medición de las características de cada uno de los objetos. Se mide el área, perímetro, largo y ancho del glomérulo, el área del penacho glomerular y el área del espacio de Bowman, además se utilizan los descriptores de área, redondez, factor de forma y nivel de gris promedio, medidos a cada uno de los núcleos celulares. A continuación se describe cada uno de los descriptores con mayor detalle. (7)

- El área del núcleo está definida como la cantidad de píxeles en total que corresponden al núcleo.
- La redondez es un factor de forma cuyo mínimo valor es la unidad correspondiente a un círculo. Esta calculada por la relación  $R = \frac{\text{Perímetro}^2}{(4 \times \pi \times \text{Área} \times 1.064)}$  donde el factor de ajuste 1.064 corrige el perímetro debido al efecto de bordes producido por la digitalización de la imagen.
- El factor de forma está definido como la razón entre la longitud y el ancho.

**Figura. 3.** Ejemplo de segmentación. Espacio de Bowman.



**Figura. 4.** Ejemplo de segmentación. Glomérulo



## REFERENCIAS

1. **Brenner BM.** The Kidney. Volume I, W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1996, pp. 9–60.
2. **Carpio-Paniagua J.D.** “La biopsia renal: importancia clínica”, Sociedad médica de Valdivia, Vol. 17-2003, pp. 112-114.
3. **Marques de Sá J.P.** Pattern Recognition, concepts, methods and applications, Springer, pp. 70-76.
4. **Ruiz-Méndez A.S.** “Caracterización histopatológica de 306 biopsias renales con enfermedad glomerular. Su evolución a Insuficiencia renal crónica”, VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. 2005.
5. **Facon J.** Morfología Matemática: teoría e ejemplos, Curitiba, 1996, pp. 101-171.
6. **Masseroli M.** “Fibrosis HR®, una nueva aplicación de análisis digital de imagen para la cuantificación automática de la fibrosis intersticial y morfología glomerular. Diseño y validación”, Departamento de anatomía patológica, Universidad de Granada, España, 1996.
7. **Leica Imaging Systems.** Leica QWIN Reference Guide and Leica QUIPS Reference Guide. Cambridge, England, 1996.