# CARACTERIZACIÓN DE CARDIOMIOCITOS MEDIANTE EL EMPLEO DE VISIÓN ARTIFICIAL

# Ricardo Cortés Calderón\*

## Enrique González Guerrero\*\*

**Resumen:** este artículo presenta el proceso de análisis de imágenes desarrollado para estudiar el comportamiento de cardiomiocitos en experimentos en los cuales se adiciona una sustancia que induce cambios en las células cardiacas analizadas. El objetivo es observar y medir estos cambios, para lo cual se debe adquirir y analizar, como un todo, un conjunto ordenado de imágenes. El sistema desarrollado pretende automatizar el trabajo de investigación del Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Las principales características a observar en las células son los cambios morfológicos y cromáticos en el tiempo. El tratamiento de imágenes realiza la segmentación y la caracterización de cada célula y efectúa la construcción de la historia de cada célula en las diferentes etapas del proceso. Para cada imagen individual, el proceso incluve la eliminación del fondo, la segmentación de las células, la determinación de características y la selección de las células de interés. Para el conjunto de imágenes se realiza el apareamiento de células, la construcción de la historia y el análisis global. El artículo explica brevemente el proceso y hace énfasis en la presentación y el análisis de los resultados experimentales.

**Abstract:** This paper presents the process of image analysis developed to study the behavior of myocardium cells in experiments, where a substance is added to induce changes on observed cells; the idea is to observe and measure these changes. To achieve this objective, an ordered collection of images must be acquired and analyzed as a whole. This work aims to automate the research work in the Cell Physiology Laboratory of the Colombian National Health Institute. The main characteristics to observe are the cell morphological and chromatic changes over time. The image processing performs the segmentation and characterization of each cell to build a cell history at different points during the process. For an individual

<sup>\*</sup> Ingeniero de sistemas, Pontificia Universidad Javeriana.

Ingeniero eléctrico y magíster en ingeniería eléctrica, Universidad de los Andes; D.E.A. en Robotique, Université París 6; doctor en informática, Université d'Evry. Profesor asociado del Departamento de Ingeniería de Sistemas, Pontificia Universidad Javeriana.

*image, this process includes background segmentation, cell segmentation, feature extraction and cell filtering. For the set of images the process includes cell matching, cell history construction and global analysis. This paper explains briefly the whole process; we focus the discussion in the presentation and analysis of the experimental results.* 

# 1. INTRODUCCIÓN

Este artículo presenta una investigación desarrollada en la Pontificia Universidad Javeriana en cooperación con el Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia. El INS requería una herramienta que permitiera observar en forma fácil y automatizada los cambios celulares en cardiomiocitos; esta observación es una de las bases experimentales para la investigación de este tipo de tejidos. Se requería información acerca de los cambios morfológicos y cromáticos de unas muestras de células cardiacas observadas por medio de un microscopio; la cantidad de fotos a analizar era bastante elevada y, por ende, era deseable una herramienta automática para este fin.

El proyecto incluyó la creación de una herramienta de ayuda en la automatización del análisis de la evolución de procesos celulares en cardiomiocitos, proporcionando una captura automática de las imágenes, un procesamiento de imagen, una extracción de las características de las células identificadas y un análisis de las tendencias de cambio observadas para las características extraídas. La Figura 1 ilustra el tipo de imágenes procesadas; en la parte a) se observa una de las primeras imágenes del proceso, y en la b) una de las últimas; en éstas se pueden apreciar claramente los cambios en las células, así como también la dificultad del procesamiento requerido para extraer información relevante.

Figura 1. Imágenes típicas adquiridas durante las fases inicial y final del proceso



20



b)

Fuente: el autor.

El análisis de cambio de los objetos observados en el tiempo es la principal innovación efectuada durante el desarrollo del provecto. Algunos trabajos de aplicación biológica se han interesado en el análisis visual automático de grupos de imágenes que cambian; por ejemplo, en el trabajo desarrollado por Gee [1997], la información que se trataba de registrar correspondía exclusivamente a los cambios entre los diferentes cerebros de los pacientes. Gee buscaba relaciones y patrones en las imágenes capturadas, para lo cual utilizó métodos estadísticos. El trabajo de segmentación automática del colon, para una colonoscopia virtual, realizado por Wake Forest University School of Medicine [1999], advierte de los inconvenientes y errores que ocurren en la segmentación cuando ésta se realiza automáticamente. La solución fue usar información previa de la forma del colon. El presente proyecto toma esta idea y usa información previa de la forma de las células para identificarlas y separarlas de otros objetos sin interés, como se explicará más adelante.

En el ámbito mundial existen diversos trabajos de biomedicina [Wake, 1999]; en la mayoría de ellos es constante la captura de una imagen para compararla con un patrón; sin embargo, prácticamente ningún estudio toma una serie de imágenes para analizar un proceso biológico en el tiempo, como es este caso. En este artículo se hará una descripción del proceso realizado para segmentar y caracterizar las células, así como también su caracterización en el tiempo, es decir, en diferentes imágenes. Además, se realizará una presentación y análisis detallado de los resultados obtenidos experimentalmente.

21

# 2. El procesamiento de imágenes

El proceso de cambio que se estudió con los cardiomiocitos es inducido por la interacción de éstos a través del tiempo con una sustancia empleada en el INS. Al estar en contacto con los cardiomiocitos, dicha sustancia desencadena en ellos una serie de cambios relacionados con su color y su forma, transformándolos de formas alargadas y colores claros a formas redondeadas de colores oscuros.

En el proceso se captura una serie de imágenes en diferentes instantes y se identifican las células en cada una de ellas. El procesamiento de una imagen individual está enfocado a la segmentación y a la caracterización de cada una de las células presentes en la misma; para cada imagen el proceso está constituido por segmentación de fondo, segmentación de células, extracción de características y filtraje para cada una de las células. La información de cada imagen es recolectada para crear una historia de cada célula. Para el conjunto de imágenes el proceso incluye la captura automática, el seguimiento de cada célula, la construcción de la historia de cada célula y el análisis global de tendencia.

La captura automática se basa en el uso de la librería de las tarjetas de adquisición *Matrox* y de sus componentes *ActiveX*. El sistema, en modo de captura automática, permite la definición de etapas de captura; para cada etapa se puede especificar la cantidad de imágenes a capturar y el intervalo de tiempo entre cada una de ellas.

La segmentación de fondo busca separar el fondo de los objetos; éstos incluyen tanto a las células de interés como a los detritos. Para identificar los pixeles que corresponden al fondo se analiza el histograma de cada canal de color (RGB). En cada uno de estos histogramas se identifica el intervalo con la concentración más elevada de color; esta identificación del modo principal del histograma permite delimitar un intervalo asociado. La Figura 2 muestra el intervalo identificado en un histograma representativo de las imágenes procesadas. El pico de mayor concentración corresponde al fondo de la imagen. La segmentación de fondo concluye con una binarización de la imagen. Los pixeles dentro del intervalo de color detectado son tomados como fondo: los demás pixeles se toman como objetos y son candidatos a formar parte de alguna célula. El intervalo varía de acuerdo con cada imagen y se halla por medio de un algoritmo que busca en el histograma el máximo valor y crece a partir de este punto en ambas direcciones del histograma hasta que los valores dejan de decrecer.





Niveles de color

Fuente: el autor.

Con el fin de separar y etiquetar cada uno de los objetos presentes en la imagen binaria, se aplica un algoritmo convencional de segmentación por crecimiento de regiones [González y Woods, 1992]. Por tratarse de la segmentación de una imagen binaria, los parámetros del algoritmo de segmentación son vecindad 8 y delta igual a 1. Simultáneamente a la segmentación, y por razones de eficiencia, se calcula una serie de descriptores; el resultado final de esta etapa es una lista de células con sus respectivos valores para descriptores calculados. La Figura 3 a) y b) ilustra los resultados obtenidos durante la etapa de segmentación, los colores permiten apreciar los valores diferentes asignados a las etiquetas de cada célula.

Figura 3. Segmentación de una imagen



a)

Ing. univ. Bogotá (Colombia), 6 (1): 19-31 enero-junio de 2002



b)

Fuente: el autor.

En el reconocimiento de patrones, las dimensiones de las entradas pueden ser muy grandes (en el orden de cientos) y las funciones de discriminación son aproximadas, no lineales y complejas [Leondes, 1998]. Considerando esta observación, el reconocimiento de los cardiomiocitos se realizó a través de una serie de descriptores seleccionados y unos filtros de selección sintonizados por métodos de prueba y error. Un descriptor es una cualidad de un objeto en la imagen que se puede medir [Russ, 1995]. Los descriptores seleccionados tienen dos funciones: la primera es la de servir como criterios de selección de las células de interés; la segunda es proporcionar información acerca de las características morfológicas y cromáticas. Se efectuaron pruebas con diferentes descriptores y se analizó su desempeño, evaluando su capacidad de caracterización de los diferentes tipos de células observadas. Los descriptores seleccionados para caracterizar la morfología de las células fueron el área, el perímetro y el factor de forma [Russ, 1995]. El factor de forma, F, se define como la relación del área con respecto a la segunda potencia del perímetro.

Para la caracterización del color, el descriptor más sencillo y de mejor desempeño en tiempo de ejecución fue el promedio de color, el cual es calculado sobre el histograma de todos los puntos constituyentes del objeto. Gracias a la relativa homogeneidad de las regiones correspondientes a las células en la imagen, este descriptor produce resultados bastante adecuados. Los resultados de los tres canales (rojo, verde y azul) son muy similares y la información proporcionada por ellos es redundante; se optó por elegir como descriptor de los cambios de color el canal rojo, aunque se podría elegir cualquiera de los otros restantes y obtener resultados similares con respecto al oscurecimiento de las células a lo largo del tiempo.

La etapa final de procesamiento de una imagen individual es la selección de las células de interés; ésta se efectúa mediante un filtraje basado en los resultados obtenidos en la etapa de descripción. Los objetos pueden ser detectados por su tamaño, factor de forma, primer momento invariante o la posición del centro de masa. La sintonización de los filtros, es decir, la fijación de umbrales adecuados, permite obtener diferentes resultados en el filtraje; en este caso el principio seguido fue el de "mejor la calidad que la cantidad"; debido a esto los umbrales son muy estrictos para permitir únicamente el paso a través de los filtros de los objetos que corresponden a células. La Figura 4 muestra, en la parte a) una imagen con los objetos detectados antes del filtraje, y en la parte b) la misma imagen después de aplicar todos los filtros.

Una vez obtenidos los resultados de una imagen, es decir, los objetos de interés con sus respectivos descriptores, se realiza una comparación de sus resultados con respecto a los de las imágenes anteriores. El objetivo de esta comparación es identificar cuáles células de la imagen corresponden a las células detectadas previamente en otras imágenes. La identificación de una misma célula en dos imágenes diferentes se basa en la información de su posición. Cabe aclarar que debido al cambio de las imágenes y al filtraje realizado, una célula no aparece necesariamente en todas las tomas. Una vez efectuada la correspondencia entre células, se procede a la construcción de un historial de cada una de ellas; a partir de este historial se realizan análisis de tendencia de cambio de los diferentes descriptores a través del tiempo.

a)

Figura 4. Filtraje y selección de células de interés

#### Fuente: el autor.

Ing. univ. Bogotá (Colombia), 6 (1): 19-31 enero-junio de 2002

# 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó una captura para un tejido de células cardiacas tomando imágenes en diferentes instantes; después, el experto seleccionó una serie de nueve imágenes con una separación temporal aproximadamente uniforme, entre las cuales se podían apreciar los cambios de las células y era posible realizar un seguimiento de los cambios ocurridos. Los instantes temporales fueron asignados consecutivamente, el tiempo que aparece en las tablas corresponde al número de secuencia de la imagen en el proceso y no tiene una correspondencia temporal que se pueda traducir directamente a minutos o segundos.

Los resultados para el proceso aplicado a la serie de nueve imágenes se resumen a continuación. Se incluyen datos de la segmentación y datos de algunos de los descriptores y algunas gráficas que sintetizan parte de la información contenida en las tablas del cambio de los distintos descriptores en el tiempo para algunas de las células identificadas. Los resultados completos para todas las células pueden ser consultados en el informe original de este proyecto [Cortés, 2001].

# 3.1. ANÁLISIS DE LA SEGMENTACIÓN Y FILTRAJE

El mayor número de cuerpos en las imágenes corresponde a los detritos. Los detritos —o desechos celulares— son de menor tamaño que las células de interés. Por las anteriores razones es tan elevado el número de objetos captados y el número de objetos descartados por tamaño. Los objetos descartados por el factor de forma tienen una tendencia a aumentar a lo largo del tiempo, debido al cambio de las células tendiendo cada vez más hacia un objeto redondo. Los objetos descartados por el momento invariante corresponden a las células con detritos superpuestos, lo que explica su variabilidad. La Tabla 1 muestra los resultados del número de células encontradas durante la segmentación y la cantidad de células desechadas por los distintos filtros.

Se detectan en promedio 16 células de interés por imagen y se captaron 39 células diferentes en toda la serie. Debe tenerse en cuenta que hay células que desaparecen o son filtradas en diferentes momentos de la serie por el decremento de su factor de forma o por adherencias a detritos o a otras células.

En las pruebas de segmentación aplicadas se identificaron distintas cantidades de células en cada una de las imágenes de la secuencia. Esto es explicable por las dificultades en la segmentación ocasionadas por el bajo contraste en las imágenes, en especial en aquéllas correspondientes a los primeros instantes de tiempo. También se pudo comprobar que el orden en que se aplican los filtros no afecta el número de células encontradas o el de los cuerpos descartados.

Tiempo	No. de objetos encontrados	No. de objetos descartados por tamaño	No. de objetos descartados por factor de forma	No. de objetos descartados por momento invariante	No. de objetos descartados por centro de masa	Total objetos de interés
2	5	5	0	0	0	0
15	1167	1149	3	2	3	10
30	998	969	6	3	4	16
45	1020	986	7	4	5	18
60	1024	995	7	3	4	15
90	960	928	7	2	3	20
120	966	938	12	1	1	14
150	1064	1036	10	3	0	15
180	911	876	12	3	4	16

Tabla 1. Resultados de la segmentación

3.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS DESCRIPTORES

Las pruebas realizadas por el experto en el microscopio han mostrado que las células decrecen de tamaño y cambian de color tornándose más oscuras y redondas; los resultados obtenidos con la herramienta desarrollada apoyan dicha conclusión del cambio de color y del cambio de forma. Los resultados experimentales confirmaron la decisión de no incluir como descriptor adecuado el área de las células, por ser muy sensibles al ruido propio de la captura y por las dificultades inherentes para obtener una segmentación automática suficientemente correcta. La tendencia hallada de incremento del área obedeció a que las células cada vez eran más oscuras y por lo tanto era más fácil separarlas del fondo durante el proceso. Se concluyó que los datos referentes al área de la célula no eran fiables y sólo representan la marcada tendencia a una segmentación más fácil entre más avanzado sea el proceso en el tiempo.

El área de las células presenta tendencias de crecimiento y en ocasiones tiene oscilaciones bastante fuertes como se puede ver en la gráfica de tendencia de la Figura 5, la cual representa las distintas áreas encontradas para una célula específica a lo largo del tiempo. La línea de tendencia que más se ajustó fue una polinómica de segundo grado, que arrojó factores cercanos al 0,9 para la mayoría de las células del estudio. Los demás intentos de linelizaciones o ajustes, u otro tipo de curvas, fueron inferiores al 0,6 en su factor R<sup>2</sup>. La Tabla 2 contiene los valores de los diferentes factores de ajuste R<sup>2</sup> para la línea de tendencia de tipo polinomial de segundo orden para el descriptor área en cada una de las células con su respectivo promedio y desviación estándar; estas medidas corresponden a las células detectadas en una imagen en particular.



Figura 5. Ajuste de curva y tendencia para el área de la célula 174

Fuente: el autor.

Las observaciones del experto frente a las tendencias de las gráficas indican que el comportamiento de estas medidas no es lógico, que se interpretarían textualmente como aumento en el área de la célula seguida por un decremento de la misma. Las observaciones humanas indican que las células disminuyen su tamaño a lo largo del proceso. La explicación encontrada a este fenómeno es la presencia de cuerpos que se adhieren a las células y hacen variar su área, al igual que los problemas en la segmentación de las primeras imágenes. En resumen, la tendencia inicial al crecimiento del área se explica por el incremento en el contraste de las células y el fondo, lo que permite identificar mejor la totalidad del cuerpo de la célula; el posterior decremento se explica por la tendencia natural observada y comprobada de las células a disminuir su tamaño a lo largo del tiempo.

Célula	174	644	743	316	43	409	430	44	77
R2	0,8639	0,9267	0,9496	0,9959	0,845	0,9029	0,3095	0,3	0,62
Célula	101	486	711	409	710	Trippe			
R2	0.9	0,4	0,8	0,94	1	i entre			

0,252948

Tabla 2. Promedio de R <sup>e</sup> y desviación estan	ndar para el ar	ea
--	-----------------	----

Desviación

3.3. TENDENCIA DEL FACTOR DE FORMA

El factor de forma presenta claras tendencias a la disminución, indicando el acercamiento a las formas redondeadas. La Figura 6 muestra la gráfica de tendencia encontrada del factor de forma para una célula específica. Para la tendencia monótona decreciente del factor de forma se tomó una tendencia logarítmica como la mejor opción de ajuste. La Tabla 3 contiene los valores de los diferentes factores de ajuste R<sup>2</sup> para la línea de tendencia de tipo logarítmico para el factor de forma. En ocasiones el ajuste logarítmico arroja un factor R<sup>2</sup> no tan alto como para las demás; sin embargo, si se observa con atención, dicha caída se da por algún valor aislado, fácilmente detectable para ser filtrado, que se sale de la tendencia.



Figura 6. Ajuste logarítmico para el factor de forma de la célula 174

Fuente: el autor.

Tabla 3. Promedio y desviación de R2 para el factor de forma

Célula	174	316	43	101	743	44	430	711	727	477	486
R2	0,769	0,99	0,28	0,99	0,8	0,5	0,2	0,6	0,53	0,75	0,57

Promedio	0,634455
Desviación	0,256983

El descriptor de color —el promedio de color sobre el histograma del canal rojo— presenta los mejores resultados; siempre se observa una clara tendencia al oscurecimiento, es decir, todos sus valores van descendiendo. El descriptor de color es el más confiable de acuerdo con los resultados obtenidos y da una excelente valoración cuantitativa del oscurecimiento global de la muestra en cada una de las células. La Tabla 4 contiene los valores de los diferentes factores de ajuste R<sup>2</sup> para la línea de tendencia de tipo lineal para el promedio del descriptor de color del canal rojo, para cada una de las distintas células de interés identificadas. La Figura 7 muestra la gráfica de tendencia para una célula típica.

Tabla 4. Promedio y desviación del Factor R<sup>2</sup> para el descriptor de color del canal rojo

Célula	174	316	743	644	43	101	407	477	486	430
R2	0,959	0,837	0,909	0,889	0,95	0,95	0,95	0,82	0,85	0,78
Célula	711	44	710	100						

Célula	711	44	710		
R2	0,94	0,84	0,97		

 Promedio
 0,895692

 Desviación
 0,060961

Ing. univ. Bogotá (Colombia), 6 (1): 19-31 enero-junio de 2002

Por el valor de la desviación estándar se puede apreciar una tendencia muy marcada a la homogeneidad del grupo y, en su promedio, la elevada aproximación al ajuste propuesto para este descriptor. Nótese que los valores para R<sup>2</sup> mostrados en la Tabla 4 no son inferiores en ningún caso a 0,78. Las claras tendencias a la reducción, es decir, al oscurecimiento, pudieron ser aproximadas mediante una aproximación lineal con muy buenos resultados pues la totalidad de las células tratadas presentó por lo menos un R<sup>2</sup> de 0,78 y el promedio fue de 0,89 con una desviación de tan sólo 0,06.



Figura 7. Promedio del campo rojo para los pixeles de la célula 174

Fuente: el autor.

#### 4. CONCLUSIONES

Los descriptores seleccionados en este trabajo presentaron diferentes resultados y se les ha otorgado una calificación de acuerdo con su confiabilidad, medida en términos de concordancia entre las observaciones del experto y los resultados y las tendencias encontrados para la descripción de los cambios morfológicos y cromáticos de la muestra de cardiomiocitos. De acuerdo con los resultados obtenidos, el descriptor más confiable, por sus tendencias uniformes y la relación de su interpretación con las observaciones del experto, es el descriptor de color. Las gráficas de tendencia de este descriptor aportan una medida cuantitativa del oscurecimiento de cada una de las células y, por supuesto, del oscurecimiento general de la muestra; esta medida cuantitativa, es decir, las pendientes de las rectas de ajuste, puede ser usada para caracterizar el proceso de cambio y por tanto servir como medida del efecto causado por la sustancia adicionada sobre el tejido cardiaco.

El factor de forma tuvo un éxito medio, medido por la homogeneidad de su tendencia y la relación de lo descrito en el decrecimiento de sus valores con las observaciones del experto. Tanto los valores como las observaciones directas de las imágenes por parte del experto apuntan a un aumento de la redondez de las formas de la células a medida que transcurre el tiempo. El área es el descriptor menos confiable, lo cual puede deducirse de la no uniformidad de sus tendencias, de sus variaciones elevadas y de las contradicciones que presentan sus valores con respecto a las observaciones del experto.

Dentro de las perspectivas de trabajo futuras se encuentra el estudio de las apariciones de cuerpos identificados como células de interés en un subconjunto de imágenes de la secuencia. Dichas apariciones ocurren en las imágenes correspondientes al final de la secuencia y son explicadas por la separación de los grupos de células superpuestas por reducción general de tamaño de los cardiomiocitos. Otra perspectiva de trabajo futuro es la configuración inteligente de todos los parámetros numéricos usados en los filtros de selección de objetos y el tratamiento automático inteligente usando la información disponible de todas las imágenes para lograr filtrar y clasificar de manera más precisa las células encontradas.

El proceso de captura automática de imágenes relaciona los cambios ocurridos con su instante de aparición en el tiempo, lo que permite interpretar los resultados de manera dinámica observando la serie de imágenes como un proceso de cambio ubicado en un espacio y un tiempo con características ambientales determinadas durante su ejecución. Uno de los aspectos distintivos de este trabajo es el aplicar un procesamiento a un conjunto ordenado de imágenes con el objetivo de observar la dinámica de fenómenos biológicos.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración y el interés del doctor Luis Alberto Gómez y de su equipo de colaboradores en el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto Nacional de Salud de Colombia; sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

# REFERENCIAS

- Cortés, R. (2001), "Análisis visual automático de células miocárdicas". Trabajo de grado en ingeniería de sistemas, Pontificia Universidad Javeriana.
- Gee, A. J. (1997), An empirical Model of Brain, Department of Neurology, University of Pennsylvania.
- González, R. y R. Woods (1992), *Digital Image Processing*, Reading, Mass, Addison Wesley.
- Leondes, C. (1998), *Image processing and pattern recognition*, San Diego, California Academic.

Russ, J. (1995), The Image Processing Handbook, Boca Raton, CRC.

Wake Forest University School of Medicine (1999), Imágenes médicas computarizadas, en http://www.elsevier.com