

IDENTIFICACIÓN DE EQUINOCITOS POR ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS: OPTIMIZACIÓN MEDIANTE TRANSFORMADA WAVELET

M. Mancilla Canales^{a,b,*}, C. Londero^{a,c}, B. Riquelme^{a,b}, A. Korol^{a,b}.

^a Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Suipacha 531. 20000 - Rosario, Santa Fe, Argentina.

^b Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física Rosario (IFIR CONICET-UNR).

Boulevard 27 de Febrero 210 bis. 20000 - Rosario, Santa Fe, Argentina.

^c Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina.

*Autor de correspondencia, E-mail: mmancill@fbioyf.unr.edu.ar, Phone: +54 (0341) 4853222, Fax: +54 (0341) 4808584.

Recibido: Febrero 2017. Aprobado: Marzo 2018.

Publicado : Julio 2018.

RESUMEN

Los equinocitos constituyen una variación morfológica de los glóbulos rojos (GR) donde el eritrocito luce de menor tamaño con prolongaciones distribuidas regularmente en su superficie. Se pueden evidenciar equinocitos bajo ciertas condiciones experimentales, como ocurre por ejemplo en GR que se crenan por efecto vidrio al ser colocados en un portaobjetos para su observación al microscopio. El procedimiento para eliminar el ruido de una imagen se basa en la descomposición de la señal observada en Wavelets y a continuación tomando valores de corte (*threshold*) para seleccionar los coeficientes adecuados por medio de los cuales la señal puede ser reconstruida. En el presente trabajo se propuso identificar distintas alteraciones en la morfología de los GR humanos frescos en suspensión a través del empleo de descriptores de forma incorporando la eliminación de ruido por transformada wavelet. Se utilizaron suspensiones de eritrocitos en medios consistentes en solución fisiológica con diferentes concentraciones de albúmina sérica humana. Se empleó el wavelet de Haar para eliminar el ruido de las imágenes digitales obtenidas. Los resultados son de utilidad para la cuantificación de GR crenados por efecto vidrio. La técnica de análisis de imágenes aquí presentada tiene potencial aplicación en la automatización del conteo y clasificación de GR con diferentes morfologías para poder correlacionarlos con patologías hematológicas.

Palabras claves: equinocitos, glóbulos rojos, microscopía, transformada wavelet, análisis digital.

IDENTIFICATION OF ECHINOCYTES BY DIGITAL ANALYSIS OF MICROSCOPIC IMAGES: OPTIMIZATION THROUGH WAVELET TRANSFORM

ABSTRACT

Echinocytes are a morphological variation of red blood cells (RBC) where the erythrocyte appears smaller with spicules regularly distributed on its surface. This alteration can be seen under certain experimental conditions, as it happens when RBCs are placed on a slide for observation under a microscope and thus crenate due to glass effect. The procedure to remove noise from an image is based in the decomposition of the observed signal in Wavelets and taking threshold values to select the appropriate coefficients through which the signal can be then reconstructed. The purpose of this paper is to classify different alterations in the morphology of suspended fresh human RBC by utilizing shape descriptors and adding noise elimination by Wavelet Transform. RBCs were suspended in media consisting of physiological solution and human serum albumin at different concentrations, and the Haar wavelet was used to eliminate noise of the digital images obtained. The results are useful for the quantification of RBCs crenated due to glass effect, and the image analysis technique presented here has potential application to automatize the countdown and classification of RBCs with different morphologies, to be able to correlate them with haematological pathologies.

Keywords: echinocyte, red blood cells, microscopy, Wavelet Transform, digital analysis.

INTRODUCCIÓN

Los equinocitos son una variación morfológica de los glóbulos rojos (GR) siendo los mismos de menor tamaño, con prolongaciones distribuidas regularmente en su superficie. *In vitro* se pueden evidenciar equinocitos bajo ciertas condiciones experimentales, como ocurre en GR que se crenan al ser colocados en un portaobjetos de vidrio para su observación con microscopio. Esto sucede porque los eritrocitos que se encuentran en ausencia de las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, además de adherirse al vidrio se crenan, lo que se denomina efecto vidrio (*glass effect*) [1-4]. Adicionalmente se observa la presencia de equinocitos en ciertos estados patológicos (enfermedades hepáticas, úlcera péptica, insuficiencia renal, cáncer gástrico) [5].

En trabajos previos [6], se estudiaron las condiciones bajo las cuales los GR humanos frescos pueden ser observados por microscopía convencional sin que se altere su morfología por el efecto vidrio. Para ello se obtuvo el porcentaje de crenación tomando fotografías de las muestras en un microscopio óptico invertido a intervalos de tres minutos y luego realizando el conteo manual de la proporción de eritrocitos crenados. Dicho análisis resulta laborioso y conlleva una importante inversión de tiempo, además de depender de la subjetividad del observador.

El reconocimiento de objetos es uno de los objetivos básicos en el análisis digital de imágenes. Este reconocimiento usualmente se basa en los valores de escala de grises de la imagen y en características asociadas con la forma de los objetos de interés, existiendo muchos métodos para tal propósito [7]. Para la caracterización de objetos reconocidos se pueden emplear descriptores de forma simples con la ventaja de que sólo requieren de un rápido cálculo computacional y poseen aplicabilidad más general [8-9]. Debido a que las variables descriptores de forma se encuentran vinculadas entre sí, fue de interés el considerar en forma global al

conjunto de las mediciones para las distintas formas obtenidas en el contexto de un enfoque multidimensional.

Por otro lado la eficiencia de los algoritmos empleados depende en gran medida de la calidad de la imagen procesada, siendo la presencia de ruido uno de los factores a corregir. La reducción o eliminación de ruido no es una tarea simple debido a la naturaleza del mismo, ya que muchas veces es imposible discriminar qué es ruido dentro de la propia imagen. Las Wavelets proporcionan un conjunto de herramientas disponibles para problemas prácticos en ciencia e ingeniería. La elección de la transformada wavelet (TW) a emplear depende de la modelización del problema y de un análisis del tipo de imagen tratada y del objetivo buscado [10].

El objetivo del presente trabajo fue identificar equinocitos en una muestra a partir de la clasificación de las distintas morfologías de los GR humanos frescos en suspensión mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía convencional utilizando descriptores, de forma previa incorporación de la eliminación de ruido por TW en las imágenes obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensión de eritrocitos

Como se describió en trabajos previos [6], se utilizaron muestras de sangre humana obtenidas por punción venosa y anticoaguladas con EDTA de individuos sanos siguiendo los protocolos del Comité de Bioética de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), con la firma del correspondiente consentimiento informado previa la extracción de la muestra. Se centrifugó la muestra de sangre durante 5 minutos a 461 g y se descartó la capa leucoplaquetaria. El plasma y el paquete globular fueron almacenados para su posterior utilización de acuerdo con las recomendaciones internacionales para hemorreología y hemodinámica [11].

Se prepararon soluciones de albúmina sérica humana (HSA) (20% v/v de Laboratorio de Hemoderivados UNC) en solución fisiológica (SF) (pH de 7,4 y osmolaridad de 308 mOsm/L de Laboratorios Roux-Ocefa S.A.). Se trabajó con concentraciones finales de 0,002; 0,01; 0,02; 0,1 y 1% v/v. Se prepararon suspensiones de eritrocitos en estos medios colocando 30 μ l de cada suspensión en portaobjetos de vidrio mezclando con el tip para homogeneizar. Como control se realizó el mismo procedimiento en una gota de 30 μ l de GR suspendidos en plasma autólogo.

Obtención de las imágenes digitales

Se observó cada muestra en un microscopio óptico invertido (Union Optical) utilizando un objetivo 40x y una cámara Canon Power Shot A640 colocada en uno sus oculares mediante un adaptador de 52 mm.

Se registró la evolución en el tiempo de las alteraciones en la morfología de los GR tomando cuatro fotografías en distintos campos de cada muestra para diferentes tiempos (3, 6, 9,12 y 15 minutos), almacenando las imágenes en formato TIFF (1600x1200 píxeles) para su posterior procesamiento.

Eliminación de ruido por transformada wavelet

Para la eliminación de ruido en las imágenes mediante el uso de TW, las imágenes a color fueron convertidas a escala de grises. Para poder operar en las imágenes con las TW se trabajó con una región central de las mismas de dimensión 1024x1024. El procedimiento para eliminar el ruido de una imagen se basó en la descomposición de la señal observada en wavelets y a continuación tomando valores de corte (*threshold*) para seleccionar los coeficientes adecuados por medio de los cuales la señal puede ser reconstruida. Se empleó el wavelet de Haar para eliminar el ruido de las imágenes digitales.

Segmentación

Las imágenes digitales fueron binarizadas aplicando *Trainable Weka Segmentation* del software libre FIJI [12].

Se obtuvieron imágenes en las que se representan los bordes de los GR, los cuales fueron rellenados (utilizando el mismo software) para luego determinar los descriptores de forma en los objetos obtenidos.

Descriptores de Forma

Se utilizaron los siguientes descriptores de forma para caracterizar los objetos obtenidos: Área, Perímetro, Circularidad, Proporción de Aspecto, Redondez, Proporción de Área-Área Convexa, Diámetro de Ferret y Diámetro de Ferret Mínimo [12-13]. La Circularidad se define de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Circularidad} = 4 \times \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2} \quad (1)$$

donde un valor de 1 indica un círculo perfecto y, a medida que un objeto incrementa su forma elongada, dicho valor tiende a cero.

Por otro lado, la Proporción de Aspecto se obtuvo como la razón entre el eje mayor y el eje menor resultante de ajustar el objeto con una elipse. Esta proporción da una idea del alargamiento del objeto.

La Redondez aporta una medida de qué tanto se asemeja la forma del objeto a aquella de un círculo y está definida por:

$$\text{Redondez} = 4 \frac{\text{área}}{\pi} \quad (2)$$

La proporción de Área-Área convexa se definió como la razón entre el área del objeto y su área convexa. A su vez, el Diámetro de Ferret se determinó como la mayor distancia entre dos puntos pertenecientes al contorno del objeto. De la misma manera, el Diámetro de Ferret Mínimo se definió como la menor distancia entre dos puntos pertenecientes al contorno del objeto.

Con el propósito de identificar distintos estados morfológicos de los GR, las diversas formas de objetos obtenidas y los valores de sus descriptores de forma fueron analizados simultáneamente mediante las técnicas

estadísticas de Análisis de Componentes Principales (PCA) [14] y agrupamiento o *clustering* [15].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la aplicación de la TW para eliminar ruido de las imágenes digitales se ensayaron distintos valores de corte (T) para seleccionar aquel que no distorsiona significativamente la imagen luego de su reconstrucción.

Para ilustrar el procedimiento empleado se presentan en las figuras 1, 2 y 3 las imágenes reconstruidas y luego tratadas con *Trainable Weka Segmentation*.

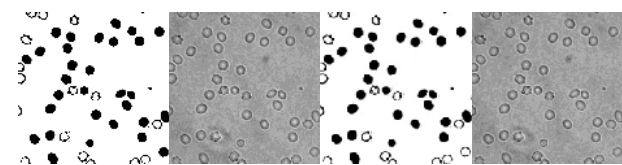


Fig. 1. Objetos obtenidos de una imagen reconstruida para $T = 0,25$ y $T=0,7$.

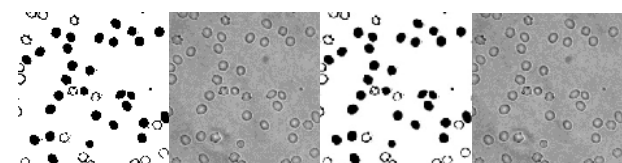


Fig. 2. Objetos obtenidos de una imagen reconstruida para $T = 1,5$ y $T=2$.

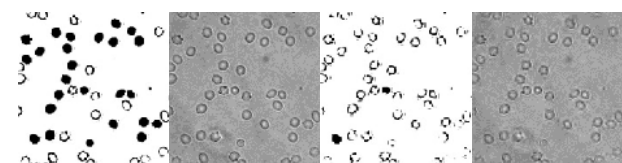


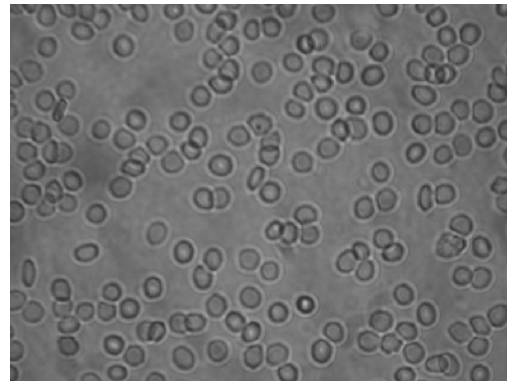
Fig. 3. Objetos obtenidos de una imagen reconstruida para $T = 4$ y $T=10$.

Se optó por continuar los análisis con valores de corte de 0,25 para eliminar el ruido y no alterar significativamente la morfología de los objetos obtenidos.

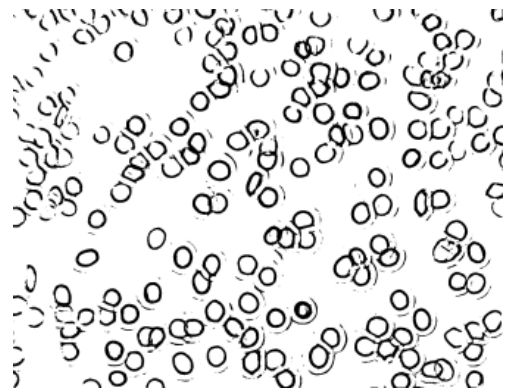
A continuación se procedió a la segmentación de las imágenes. En la fig. 4 se muestran a modo de ejemplo las imágenes de GR en solución fisiológica en presencia de concentración de 0,002% de HSA a los 3 min. En ella se observan imágenes obtenidas con el microscopio óptico invertido y procesadas: en escala de grises (a), luego de la

binarización (b) y las imágenes finales con los objetos resultantes con su interior relleno (c).

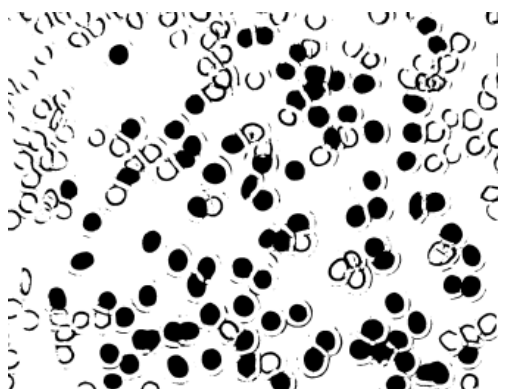
Para todas las concentraciones de HSA y tiempos ensayados se obtuvo una adecuada separación entre el fondo y los GR. En las mismas se pudieron reconstruir GR y se obtuvieron imágenes de GR incompletos, agregados y restos celulares.



(a)



(b)



(c)

Fig. 4. GR suspendidos en HSA en SF a 0,002% v/v: (a) en escala de grises, (b) luego de la binarización, y (c) imágenes finales con los objetos rellenos.

Inicialmente sobre todos los objetos de las imágenes analizadas se realizó un PCA seguido de un algoritmo de agrupamiento para poder identificar y separar las distintas formas en distintos grupos. En la figura 5 se muestra como para la imagen obtenida de la muestra de GR en SF a 0,1% HSA el análisis de componentes principales y el algoritmo de agrupamiento utilizado puede separar los GR con las distintas formas. De esta manera se pudieron identificar los GR en la colección de objetos obtenidos para todas las imágenes analizadas.

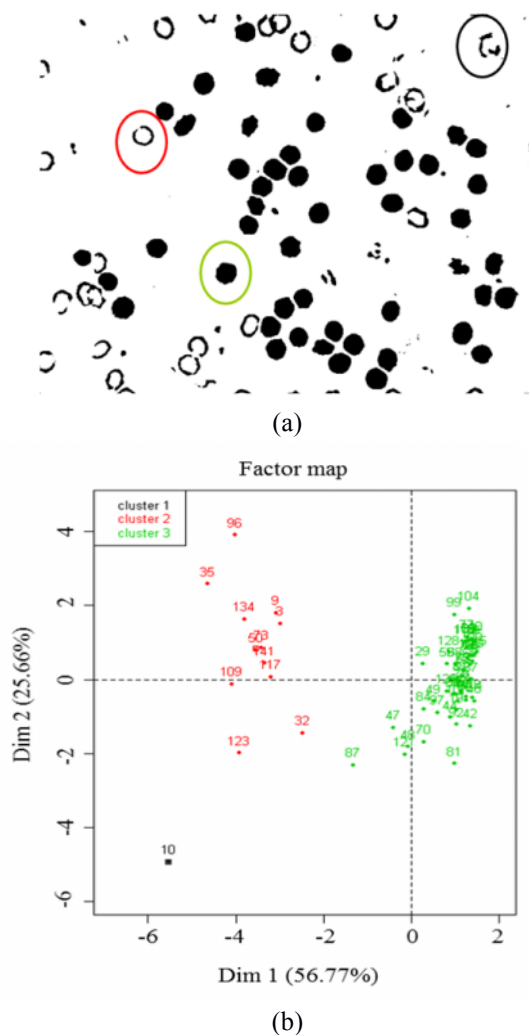


Fig. 5. a) Imagen binarizada de GR en solución fisiológica, pH de 7,4, osmolaridad de 308mOsm/L y 0,1% de HSA obtenida a los 6 min. b) Grupos obtenidos luego de PCA y clustering a los objetos de la imagen. Color negro: objeto aislado. Color rojo: formas incompletas. Color verde: GR.

Sobre los GR identificados se realizó un segundo PCA seguido de un algoritmo de agrupamiento para poder identificar y separar las distintas formas de GR en distintos grupos (figura 6).

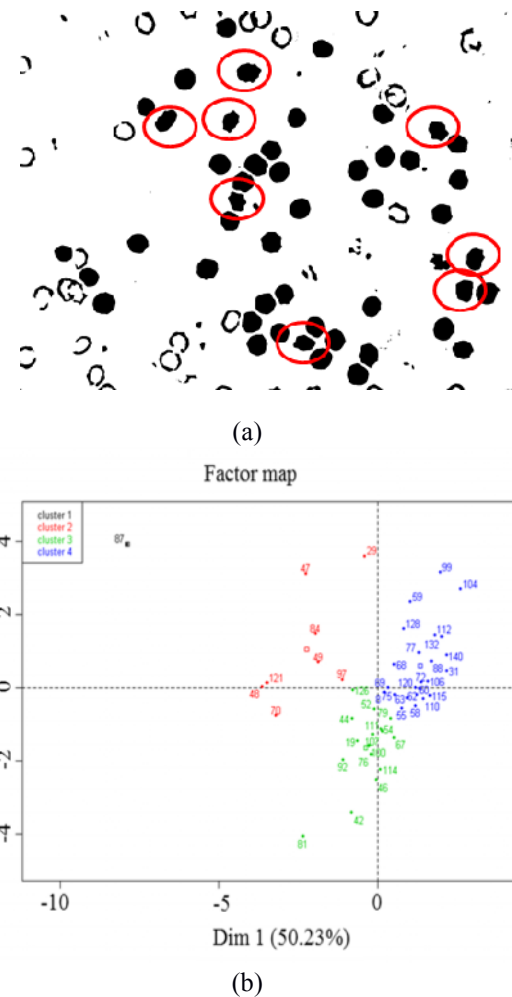


Fig. 6. a) Imagen binarizada de GR en solución fisiológica, pH de 7,4, osmolaridad de 308 mOsm/L y 0,1% de HSA obtenida a los 6 min. b) Grupos obtenidos luego de PCA y clustering a los GR de la imagen. Color rojo: equinocitos.

De esta manera se pudo identificar dentro del grupo de los GR a los equinocitos para todas las imágenes analizadas. En la figura 7, se muestran los porcentajes determinados de equinocitos sobre el número total de GR identificados. Para las concentraciones de HSA de 0,002%, 0,01% y 0,02% se evidenció un efecto protector de la HSA durante aproximadamente 12 min, observándose luego un incremento en el porcentaje de equinocitos determinados

llegando aproximadamente a un 80% para las concentraciones más bajas de HSA (0,002% y 0,01%).

Para concentraciones mayores de HSA (0,1%) se observaron porcentajes de equinocitos menores al 60%. En el caso de la concentración de HSA de 1% el porcentaje de equinocitos fue cero para todos los tiempos ensayados. La disminución en el porcentaje de equinocitos encontrados para estas concentraciones puede deberse al efecto protector que la HSA produce sobre los GR frente a la crenación por efecto vidrio.

Estos resultados son comparables con aquellos obtenidos en trabajos anteriores, en los que se realizó el cálculo de forma manual [6].

En el presente trabajo el efecto protector de la HSA aumenta a medida que su concentración aumenta para el rango de concentraciones ensayadas (0,01% v/v a 1%), es decir hay una disminución del porcentaje de equinocitos. Si bien en ensayos anteriores se evaluó un mayor rango de concentración de HSA, se observa el mismo efecto protector para concentraciones del mismo orden de magnitud (0,2 % v/v a 1% v/v).

CONCLUSIONES

La incorporación de la TW con la elección de un adecuado valor de corte o *threshold* y la utilización del algoritmo de segmentación en conjunto con el empleo de PCA sobre los descriptores de forma para los GR seguido de un algoritmo de agrupamiento, permitió separar e identificar diversos estados morfológicos de los GR. La implementación de la TW junto con los mencionados algoritmos de análisis permitió obtener resultados precisos de una manera rápida e independiente del operador. Adicionalmente los resultados son de utilidad para la identificación y cuantificación de equinocitos y tienen potencial aplicación en la automatización del conteo de GR con distintas morfologías para poder correlacionarlos con patologías que involucren cambios de forma y tamaño de los eritrocitos en Hematología y Bioquímica Clínica.

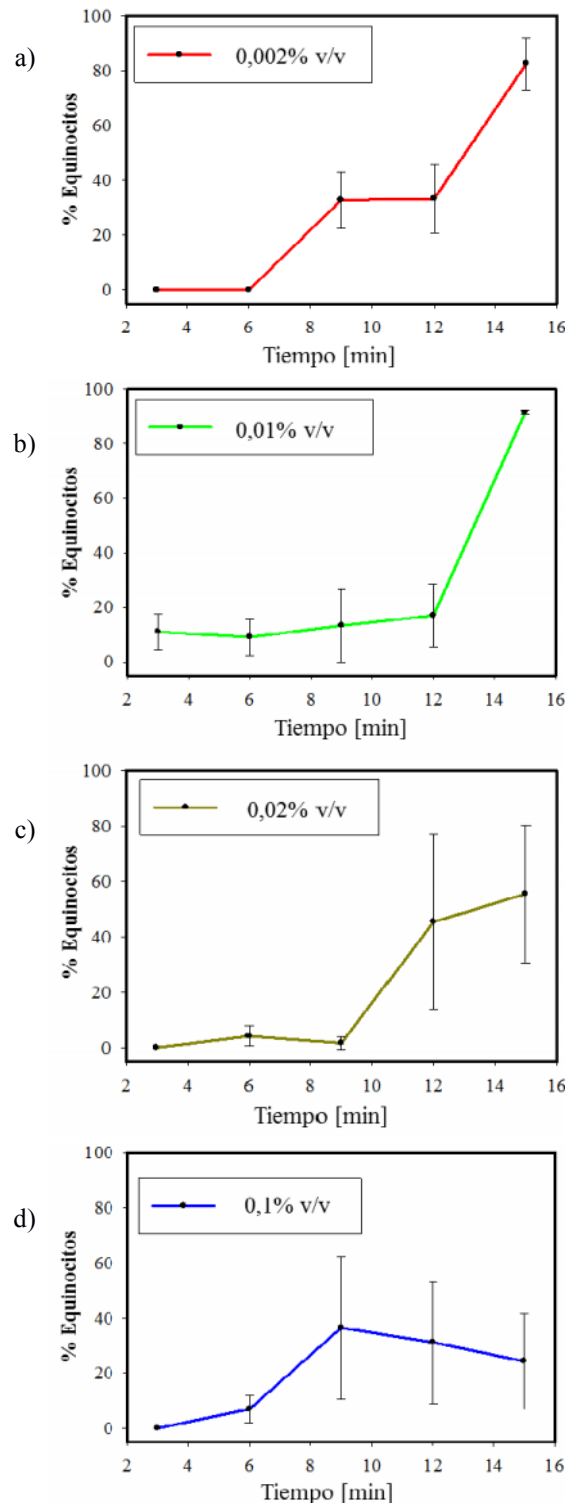


Fig. 7. Valores promedios de los porcentajes de equinocitos, con su error estándar vs el tiempo para las muestras de GR en solución fisiológica (pH de 7,4, osmolaridad de 308 mOsm/L) a distintas concentraciones de HSA: a) 0,002, b) 0,01, c) 0,02 y d) 0,1% v/v.

REFERENCIAS

- [1] Eriksson L.E. (1990). "On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces - the 'glass effect'" *Biochim Biophys Acta* 1036:193-201.
- [2] Wu Y., Hu Y., Cai J., Ma S., Wang X., Chen Y., Pan Y., (2009) "Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM" *Micron* 40:359-364.
- [3] P. Wong (2005) "A hypothesis of the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations" *J Theor Biol* 223:127-135.
- [4] Knauf, P.A., Law, F.-Y., Leung, T.-W.V., Gehret, A.U., Perez, M.L. (2002) "Substrate-dependent reversal of anion transport site orientation in the human red blood cell anion-exchange protein" *Proc Nat Acad Sci. USA*, pp. 10861–10864.
- [5] Gómez A.R.M. (2003) "*Atlas de morfología celular; alteraciones y enfermedades relacionadas*", Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, pp. 59.
- [6] Londero C, D'Arrigo M, Riquelme, B.D (2016) "Optimización del medio de suspensión para la observación de glóbulos rojos humanos frescos con microscopios ópticos", *Acta Microscopica*, 25 (4), pp. 158-163.
- [7] Pal, N.R, Pal, S.K. (1993) "*A review on image segmentation techniques*" *Pattern Recognition*, 26, pp. 1277-1294.
- [8] Iivarinen J., Peura M., Särelä J., Visa A. (1997) "Comparison of Combined Shape Descriptors for Irregular Objects." *Conference: Proceedings of the BMVC*.
- [9] Peura M., Iivarinen J. (1997) "Efficiency of simple shape descriptors", *Proceedings of the Third International Workshop on Visual Form*, pp. 443-451.
- [10] Barbedo, J. G. A. (2012). "A review on methods for automatic counting of objects in digital images" *IEEE Latin America Transactions*, 10(5), pp. 2112-2124.
- [11] Baskurt O.K., Hardeman M.R., Rampling M.W., Meiselman H.J. (2007) "*Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*", IOSPress, Ámsterdam.
- [12] Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): pp. 676-682, PMID 22743772.
- [13] Russ J.C. (1999) "*The image processing handbook*", Florida, CRC Press.
- [14] Jolliffe, I. (2002). "*Principal component analysis*" John Wiley & Sons, Ltd.
- [15] Jain, A. K. (2010). "*Data clustering: 50 years beyond K-means*". *Pattern Recognition Letters*, 31, pp. 651-666.