

# Detecção e Contagem Automática de Podócitos por Segmentação de Cor em Imagens Microscópicas

Laís da Silva Farias<sup>1</sup>, Fabiane da Silva Queiroz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Ciências Exatas (NCEEx) – Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

lais.farias@arapiraca.ufal.br, fabiane.queiroz@ceca.ufal.br

**Resumo.** *Os podócitos são um tipo de célula localizada nos rins, que atuam como um ponto crucial no processo de filtragem de substâncias realizado pelo sistema renal. De acordo com relatos de medidas morfológicas em rins de pacientes com hipertensão ou com diabetes tipo 1 ou 2, biópsias renais sustentam o conceito de que o número reduzido de podócitos está associado ao desenvolvimento de glomerulosclerose, então a detecção e a estimativa automática do número de podócitos poderia auxiliar no processo de tomada de decisão clínica. Este trabalho apresenta um método de detecção e contagem automática de podócitos com base em informações de cor em imagens de microscopia ótica geradas pela análise de sessões de tecidos renais.*

## 1. Introdução

Podócitos, também conhecidos como células epiteliais glomerulares, são células localizadas nos rins que tem papel de fundamental importância no processo de filtragem de substâncias executadas pelo sistema renal dos seres humanos [Sanden SK 2003]. Segundo relatórios de pesquisas morfológicas nos rins de pacientes hipertensos ou com diabetes, as biópsias renais sustentam o conceito de que o número reduzido de podócitos está associado ao desenvolvimento de glomerulosclerose, uma doença renal caracterizada pela esclerose e endurecimento de um segmento de glomérulos renais. Desta forma, o desenvolvimento de um método automático de detecção e estimativa do número de podócitos, e em sua decorrência, da densidade e o volume destes mesmos podócitos, poderia auxiliar na tomada de decisão clínica [Puelles Rodrigues 2015].

A ciência médica estuda variadas formas de realizar a seção histológica, que trata-se de cortes muito finos feito em tecidos ou células, e que passam por processo de fixação e coloração, para fins de estudo. A obtenção dessa seção é conduzida modo que a contagem celular possa ser feita e a avaliação realizada. Esse, no entanto, é um processo complexo e conseqüentemente demorado uma vez que é manual. De modo geral, as imagens de microscópio obtidas são analisadas de forma individual e os podócitos detectados manualmente um a um, para que então o cálculo de variantes como a densidade e o volume destes mesmo podócitos sejam também fixados.

Levando em consideração a dificuldade em se realizar o cálculo de densidade de podócitos manualmente, e considerando que a detecção do podócito em imagens é parte do processo de contagem, o objetivo do método aqui proposto é empregar técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI) para realizar o processo de detecção automática das regiões de podócitos em imagens microscópicas obtidas de uma seção de tecido renal.

## 2. Fundamentação Teórica

A progressão da doença renal crônica tende a seguir um curso estereotipado em muitos casos. Segundo [Kriz W 1998] há um declínio constante na taxa de filtração glomerular associada a uma perda progressiva de néfrons viáveis. O néfron, também denominado nefrônio, é a menor unidade renal responsável pela filtração e formação da urina. Uma vez que o podócito é o componente mais vulnerável do tufo glomerular, na maioria dos casos, é a lesão do podócito que induz a glomeruloesclerose.

Sendo isso verdade, é significativamente útil quantificar rotineiramente o número de podócitos no material da biópsia renal e em modelos experimentais para prever a suscetibilidade ao desenvolvimento da glomeruloesclerose, e a eficácia do tratamento. A medição do número de podócitos revelou-se bastante difícil devido à complexidade tanto do podócito quanto da estrutura glomerular [Sanden SK 2003]. Além disso, ficou claro que o dano aos podócitos é considerado um dos principais contribuintes para a doença renal do diabetes ou nefropatia diabética, pois sua perda causa proteinúria e glomeruloesclerose progressiva.

Em seus estudos, [White K.E. 2002] afirmou que a obtenção do número de células com glomeruloesclerose dependia necessariamente da contagem dos podócitos para que então, usando microscopia eletrônica, houvesse a possibilidade de estimar a área superficial da membrana basal glomerular subjacente aos podócitos.

Há ainda muitas discussões sobre qual método é capaz de proporcionar resultados mais precisos na estimativa do número, da densidade e do volume de podócitos. A partir de então, muitos métodos de obtenção de seções histológicas foram desenvolvidos e amplamente estudados, no entanto todos estes associados a contagem manual ou semi-manual dos núcleos de podócitos das células glomerulares.

Segundo [Rodrigues D.S 2006] o avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento de técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI), tornando possível a automação de tarefas como a detecção e a contagem de objetos em imagens de microscopia óptica. A análise quantitativa de imagens é capaz de detectar e trazer informações que não são facilmente visualizadas pelo observador humano. A contagem e detecção de objetos celulares em imagens digitais é muito menos trabalhosa e de maior rendimento. Dessa forma, [Anne Carpenter 2006] afirma que o Processamento Digital de Imagens produz resultados confiáveis a partir de um experimento em larga escala em horas, em comparação com meses de inspeção visual tediosa. Essa melhoria é mais do que um avanço técnico incremental, porque alivia o obstáculo restante para conduzir rotineiramente esses experimentos.

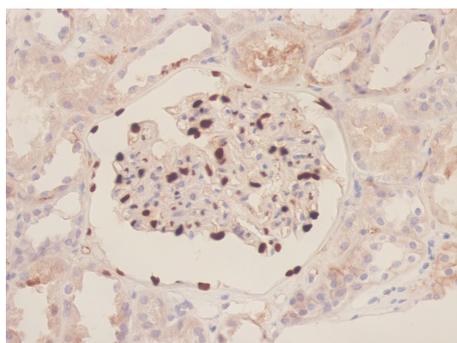
O estado da arte em PDI apresenta diversos métodos de contagem automática de objetos em imagens microscópicas, no entanto, nenhum específico para a contagem de podócitos. Como referência, foram utilizados trabalhos correlatos, como o Sistema Autônomo de Reconhecimento e Contagem de Ovos - SARCO, que foi desenvolvido por [Andre Tiba 2011] para realizar a contagem automática de ovos do mosquito *Aedes aegypti*. Redes neurais artificiais combinadas com técnicas de processamento de imagem e de estatística, foram aplicadas em imagens digitalizadas de armadilhas de captura de ovos. A segmentação das imagens utilizou as informações de cor para então a quantificar os ovos. Já [Predro Paiva 2016] desenvolveu um método de contagem automática de ovos

de carrapatos em imagens capturadas com microscópio, que combina técnicas de detecção de bordas e operações morfológicas para identificar as regiões com ovos.

O uso de técnicas de processamento e análise de imagens digitais permitiu que [Filipe Peixoto 2015] desenvolvesse um software para determinar o número de nódulos de grafita em amostra de ferro fundido nodular, com o objetivo de reduzir o tempo de contagem da quantidade de nódulos e eliminar o máximo possível de erros na contagem, pois esta contagem é feita, tradicionalmente, de forma visual por um operador através do auxílio de um microscópio óptico. Como resultado, foi observada uma diminuição de 107s/imagem para 1s/imagem no tempo de contagem automática se comparado a contagem manual, demonstrando assim a eficiência do método.

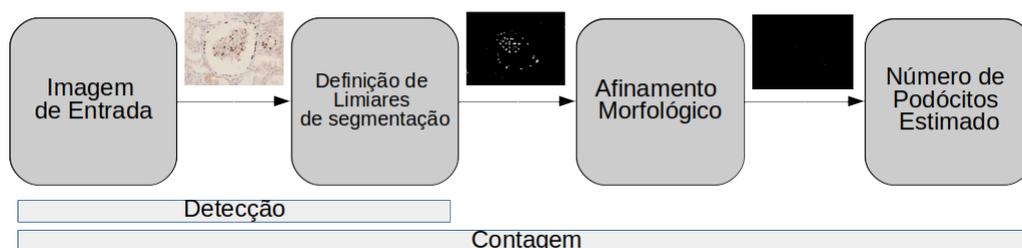
### 3. Método Proposto

As imagens de seções histológicas utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário da UFMA. Estas imagens seguem o mesmo molde da Figura 1 e estas tiveram suas cores categorizadas e padronizadas manualmente.



**Figura 1. Seção histológica de biópsia renal. Os podócitos são os pontos escuros no núcleo da imagem**

O método aqui proposto pode ser visto na Figura 2. Neste método, a segmentação de cor é realizada com base em uma coleta de informação de cor manual prévia em imagens de seções histopatológicas, na definição de intervalos de segurança para a segmentação de objetos de uma dada categoria, na geração de uma máscara binária com os objetos de interesse segmentados (que constitui a etapa de segmentação) e por fim, na aplicação de uma operação morfológica de afinamento sobre a imagem para realizar a contagem dos objetos.



**Figura 2. Esquema metodológico**

### 3.1. Coleta de Informações para a Segmentação por Cor

Para a fase de coleta de informações, foram escolhidos pontos aleatórios nas imagens da base e foram coletadas informações referentes ao valor de intensidade luminosa em tons de cinza em cada um dos canais do modelo de cor RGB da imagem. Isto possibilitou a categorização das imagens em função de valores de intensidade predominantes. De maneira experimental, cores das imagens foram divididas em cinco categorias respectivamente: (1) roxo - estrutura sem interesse para este método, (2) marrom escuro - podócitos, (3) marrom claro - estrutura sem interesse para este método, (4) rosa claro - fundo e (5) Rosa escuro - fundo. Para cada imagem, em cada categoria, foi identificado o padrão de cor RGB, ou seja, os valores de intensidade luminosa nesses três canais. Embora haja apenas uma categoria de interesse - categoria (2) marrom escuro, referente aos podócitos - levou-se em consideração que a segmentação foi realizada com base em intervalos de cor, de modo que demais categorias foram criadas com o propósito de garantir que nenhum podócito estivesse descrito em um intervalo de cor diferente.

### 3.2. Definição dos Limiares de Segmentação - Método de Detecção dos Podócitos

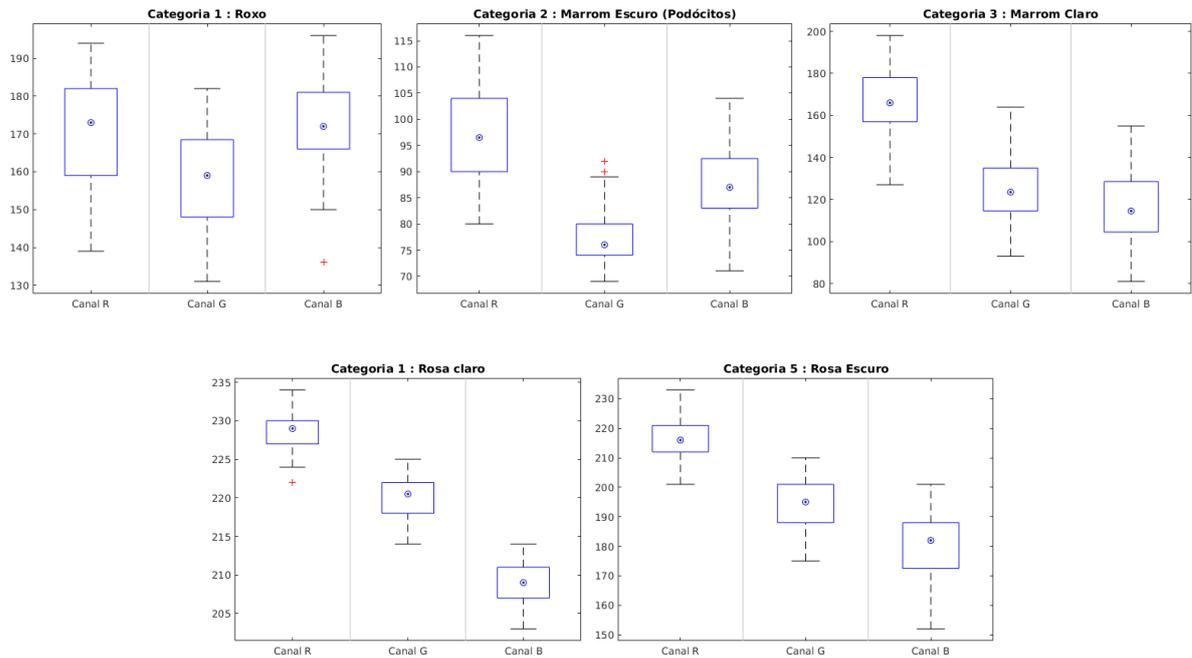
Além de sobrepujar a categorização, os valores obtidos serviram como base para que fossem calculados valores de média  $\mu$  e desvio padrão  $\sigma$  para cada categoria, na amostra de imagens utilizada. O desvio padrão, sendo um indicativo de medida de dispersão dos dados em torno de média das amostras, fornece uma visão de como os dados estão distribuídos e é parte integrante na obtenção dos intervalos de cor de segurança para as categorias, definidos por limiares superior ( $L_s$ ) e inferior ( $L_i$ ). A Figura 3 mostra, para cada categoria analisada, *boxplots*, que indicam valores de média e variância em cada um dos canais das imagens. Os valores correspondentes a  $L_s$  e  $L_i$ , encontrados para cada canal e para cada uma das categorias foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2. Sendo assim, no total, foram computados 15 valores para  $L_s$  e  $L_i$ .

$$L_s = \mu + 2\sigma \quad (1)$$

$$L_i = \mu - 2\sigma \quad (2)$$

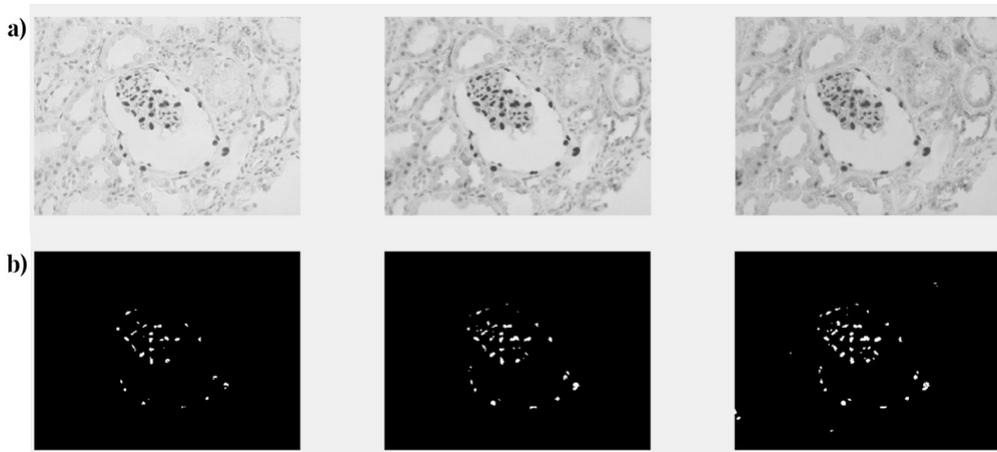
Posteriormente, terminada a fase de categorização e definidos intervalos seguros (limitados por  $L_s$  e  $L_i$ ) para cada categoria, foi realizada a aplicação de métodos de processamento de imagens digitais para segmentação por cor para que células podócitas possam ser identificadas separadamente dos demais elementos celulares presentes no glomérulo, considerando que os podócitos pertençam à Categoria 2. O objetivo é estabelecer que todas as reações da imagem dentro do intervalo seguro limitado pelos limiares  $L_s$  e  $L_i$  estabelecidos para cada categoria sejam seguidas na imagem original, gerando uma máscara binária. A Figura 4 ilustra um exemplo desse processo na Categoria 2, onde três máscaras binárias são geradas, uma para cada canal, com os objetos de interesse segmentados.

Este processo é repetido para cada uma das categorias em cada uma das imagens. Como resultado, obtêm-se máscaras limiarizadas por valores dentro dos intervalos de segurança definidos. É possível então identificar os pontos de interesse de cada série de coloração, ou seja, imagens binárias onde todos os valores para os canais RGB são um



**Figura 3. Para categoria analisada, *boxplots*, que indicam valores de média e variância em cada um dos canais das imagens.**

ou zero, sendo o fundo preto, e os pontos de interesse em branco. Uma máscara final é gerada para representar cada categoria, sendo esta máscara final definida como a união das três máscaras geradas nesta etapa.



**Figura 4. a)Canais R, G e B, respectivamente; b)Máscaras binárias para cada canal**

### 3.3. Operador Morfológico de Afinamento - Método de Contagem dos Podócitos

Detectadas as regiões da imagens convenientes, é possível então realizar a contagem das células correspondentes aos podócitos através de um algoritmo de identificação de regiões e contagem das mesmas.

O algoritmo utilizado no presente trabalho foi um operador morfológico de afinamento (*thinning*) [Rafael C. Gonzalez 2011] cujo objetivo é o de reduzir objetos a pontos.

Dessa forma, na máscara binária resultante do processo anterior, este operador remove pixels para que as regiões detectadas encolham até um único ponto. O resultado da operação de afinamento pode ser visto na Figura 5. Após as regiões serem reduzidas a um pixel, a contagem é realizada utilizando-se um método de contagem de regiões conectas em imagens binárias, utilizando-se vizinhança-8 (oito pixels vizinhos imediatos a um dado pixel).



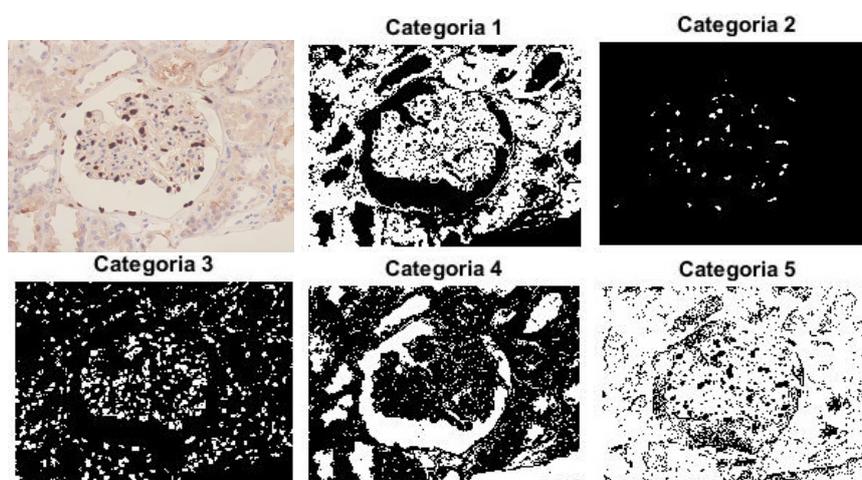
**Figura 5.** Resultado da operação de afinamento sobre a máscara binária resultante do processo de detecção de podócitos.

#### 4. Resultados

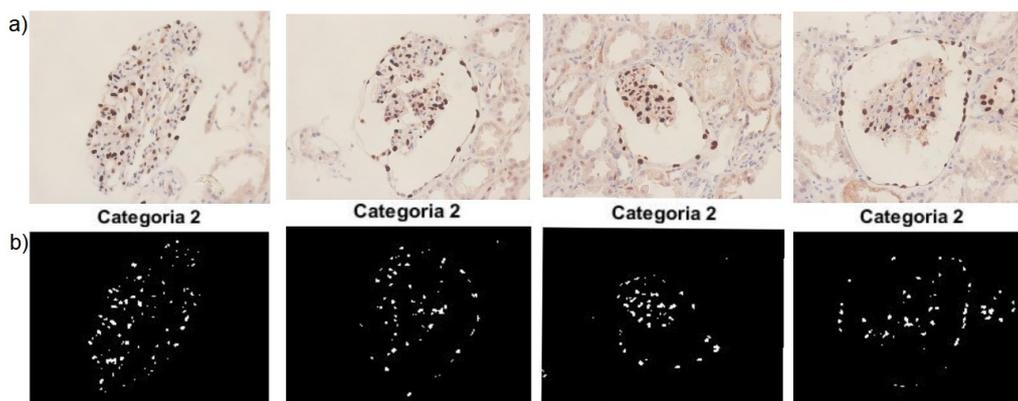
As categorias foram definidas com base nas cores predominantes da imagem. Os dados obtidos foram armazenados em uma matriz de cinco colunas e cem linhas - uma para cada categoria. Foram coletadas em média dez amostras de cor por imagem, de modo que cada amostra fosse composta pelos respectivos valores dos três canais RGB.

Valores que definiam  $\sigma$ ,  $\mu$ , os limiares  $L_s$  e  $L_i$  foram obtidos através da aplicação de funções específicas para estes fins no software Octave, instalado em um notebook de processador Core I3 e 4GB de memória.

Finalizado esse processo, os resultados para um imagem em cada um das categorias podem ser vistos na figura 6, enquanto na figura 7 estão os resultados das demais imagens somente na categoria referente aos podócitos:



**Figura 6.** Original: Imagem da seção histológica. Categorias: 1-lilás; 2- marrom (podócitos); 3-marrom claro; 4- rosa; 5- pink



**Figura 7. Original: a) Imagens originais; b) Resultados da segmentação na categoria correspondente aos podócitos (2)**

A categoria relacionada aos podócitos é a de número 2. Nas imagens originais é possível observá-los com sendo as de cor marrom no centro. As demais imagens onde os pontos brancos em destaque mostram o resultado para as outras categorias tem a função de orientar a avaliação de verdadeira efetividade do método de segmentação. Isso pode ser feito pois é possível observar os pontos que possivelmente seriam podócitos e não foram identificados ou pontos que foram relacionados a categoria dos podócitos de forma errônea.

Quanto ao processo de contagem, a Tabela 1 apresenta os valores de número de podócitos estimados para 5 imagens testadas bem como o valor no número de podócitos resultante de um processo de contagem manual. Como pode-se observar, a taxa de acerto na contagem em relação a contagem manual foi de cerca de 88% para todos os casos. Em alguns casos específicos, como foi o caso da Imagem 5, o erro em relação a contagem manual foi de apenas um podócito.

Como a segmentação foi realizada com base em intervalos de cores, a Imagem 2 apresentou muitas informações com tonalidades próximas ao intervalo correspondente a categoria dos podócitos, fazendo com que alguns pontos fossem erroneamente classificados, sendo este o principal motivo pelo qual o erro absoluto na imagem supracitada foi significativamente maior se comparado aos demais.

**Tabela 1. Resultado do processo automático de contagem dos podócitos. Comparativo com o processo de contagem manual.**

	Imagem 1	Imagem 2	Imagem 3	Imagem 4	Imagem 5	Total
Número de podócitos contados manualmente	71	91	80	57	76	375
Número de podócitos estimado	68	122	89	64	77	420
Erro Absoluto	3	31	9	7	1	45

## 5. Conclusões

As doenças glomerulares, ou seja, aquelas nas quais os núcleos podócitos estão diretamente relacionados, constituem alguns dos problemas principais na nefrologia. Os

podócitos fazem parte da estrutura microscópica situada nos rins, responsável pela filtração do sangue e produção de urina. O glomérulo é suscetível a ser danificado por uma variedade de fatores, incluindo diversas doenças sistêmicas, tais como lúpus e eritematosos sistêmicos (LES), e doenças metabólicas como diabetes melito. A detecção, estimativa do número e cálculo de densidade e volume de podócitos através de imagens de microscopia obtidas por seções histológicas é um passo na análise da relação desta densidade com diversas dessas doenças citadas.

O presente trabalho apresentou um método de detecção automática de podócitos em imagens de microscopia óptica. Foi possível concluir que o método utilizado na presente pesquisa é eficaz quando aplicado em imagens obtidas a partir de imonuluminescência com o eixo de cor já amplamente descrito em sessões anteriores. Em se tratando de eficiência pode-se afirmar que a contagem e demais cálculos realizados conseguiram ser executados em um tempo hábil muito superior se confrontado com o tempo dispendido quando o cômputo é executado de forma manual.

Apesar da confiabilidade do método estar elencado em um percentual de 88% de acertos, é importante salientar que por se tratar da análise de imagens médicas que podem de fato impactar na análise clínica de pacientes, a acurácia deve ter valores de precisão o mais alto possíveis. Considerando tal fato, como trabalho futuro, pretende-se analisar o uso de CNNs (*Convolutional Neural Networks*) para auxiliar no processo de detecção e contagem de podócitos, a fim de aumentar a eficácia do método.

## Referências

- Andre Tiba, Aluizio Araujo, H. B. T. R. (2011). Sistema autonomo de reconhecimento e contagem de ovos de aedes aegypti. *Sociedade Brasileira de Inteligencia Computacional (SBIC)*.
- Anne Carpenter, T. J. (2006). Cellprofiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Gnome Biology*.
- Filipe Peixoto, Elizângela Rebouças, F. X. P. R. F. (2015). *Desenvolvimento de um Software para cálculo da densidade de nódulos de grafita em ferro fundido nodular através de Processamento Digital de Imagens*. Scielo, 3th edition.
- Kriz W, Gretz N, L. K. (1998). Pogression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Official Journal of the International Society of Nephrology*.
- Predro Paiva, Fabiane Queiroz, A. S. M. J. (2016). Contagem automática de ovos do carrapato rhipicephalus (boophilus) microplus em imagens microscópicas. *SIBGRAPI Digital Library Archive*.
- Puelles Rodrigues, D.-D. (2015). Podocyte number in children and adults: Associations with glomerular size and numbers of other glomerular resident cells. *Journal of the American Society of Nephrology*.
- Rafael C. Gonzalez, R. E. W. (2011). *Processamento de Imagens Digitais*. Person, 3th edition.

- Rodrigues D.S, Quintino Dalmolin, M. A. B. (2006). Automatic shadows detection in high resolution images. *Bol. Ciênc. Geod., sec. Artigos, Curitiba, v. 12, no 1, p.87-99, jan-jun, 2006.*
- Sanden SK, Wiggins J.E., G. M. (2003). Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *Journal of the American Society of Nephrology.*
- White K.E., B. R. (2002). Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *American Diabetes Association.*