

Caracterização Digital da Estrutura dos Glomérulos Renais pelo Método de Saltykov

MARCOS CARNEIRO DE ANDRADE ^{1,2}
ARNALDO DE ALBUQUERQUE ARAÚJO ¹
ANA MARIA MATILDES DOS SANTOS ²
FERNANDO SOARES LAMEIRAS ²
EDUARDO ALVES BAMBIRRA ³

¹ DCC-Departamento de Ciência da Computação
UFMG-Universidade Federal de Minas Gerais
Caixa Postal 702
30161-970 Belo Horizonte, MG, Brasil
andrade@dcc.ufmg.br, arnaldo@dcc.ufmg.br

² CDTN-Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CNEN-Comissão Nacional de Energia Nuclear
Caixa Postal 1941
30161-970 Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Departamento de Anatomia Patológica
UFMG-Universidade Federal de Minas Gerais
Caixa Postal 340
30000 Belo Horizonte, MG, Brasil

Abstract. The characterization of the glomerular structure by the Saltykov method employing an image analyzer is described. Sample preparation, digitization and preprocessing of the images are described and illustrated. The volumetric glomeruli distribution is presented.

1. Introdução

A aplicação do método estereométrico de Saltykov [Saltykov-74], [Elias-71] a imagens de seções planas de fragmentos do cortex renal permite obter a distribuição volumétrica dos glomérulos presentes. Esta quantificação pode fornecer ao nefrologista um padrão sistemático de avaliação da morfologia destas microestruturas. Como exemplo [Araujo-93], a quantificação de alterações morfológicas induzidas por fármacos imunossupressores, ministrados aos pacientes submetidos a transplantes renais, pode ser estabelecida.

A estrutura microscópica dos rins revela a presença de elementos denominados nefrons que são essencialmente idênticos em estrutura e função. Cada nefron consiste de um glomérulo e um túbulo. A parte interna do glomérulo é composta de um tufo de capilares, de forma quase esférica, envolto por uma cápsula de parede dupla, denominada cápsula de Bowman. Esta parede constitui a membrana filtrante do glomérulo. O espaço entre o tufo de capilares e a parede interior da cápsula está em contato direto com a luz do túbulo. A Figura 1, apresenta corte esquemático de um

glomérulo.

Devido a alterações de qualidade no processo de preparação do material, a imagem digitalizada pode não estar pronta para análise. Em alguns casos, o uso de algoritmos especializados na solução de problemas como iluminação heterogênea, focalização inadequada e ruído, pode ser requerido. Apenas o estritamente necessário foi retificado.

Nas imagens, aqui utilizadas, freqüentemente se fez necessário retificar, de forma manual, bordas interrompidas das cápsulas de Bowman.

Neste trabalho, foi utilizado um analisador de imagens [Andrade-93], [Pujol-92] desenvolvido pelo Núcleo de Processamento Digital de Imagens - NPDI (UFMG) e pelo Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN (CNEN), que implementa o método estereométrico de Saltykov.

O método de Saltykov [Saltykov-74], [Chermant-86], considera as partículas representadas por esferas ou elipsóides aleatoriamente distribuídas no espaço. A representação por esferas é adequada para partículas aproximadamente equiaxiais, como é o caso dos

glomérulos renais aqui analisados. Um plano aleatório de corte produz círculos cujos diâmetros são ordenados por classes de tamanhos.

As distribuições tridimensionais de tamanhos são, então, derivadas a partir da medida e classificação dos diâmetros das seções de corte dos glomérulos, obtidas no plano. A partir de conceitos baseados na probabilidade e na geometria integral, estabelece-se uma série de parâmetros morfológicos.

2. Processamento e análise de imagens

O sistema de processamento digital de imagens utilizado neste trabalho PIXELWARE [Davis-92], é construído sobre uma interface gráfica, desenvolvida para dar suporte a aplicações orientadas a necessidades específicas do processamento de imagens. O núcleo do sistema inclui um conjunto de ferramentas básicas para o processamento digital de imagens pronto a ser utilizado por módulos de aplicações. Estas ferramentas implementam algoritmos em estatística de imagens, pseudocoloração, manipulação de contraste, suavização, aguçamento de bordas, operações aritméticas e transformações geométricas. O projeto de alguns algoritmos para imageamento microscópico foi baseado nos algoritmos presentes no conjunto de subrotinas SPIDER [Tamura-82].

Um fragmento cirúrgico retirado da superfície do córtex renal foi fixado em parafina e seccionado através de micrótomo produzindo seções de 5 μm de espessura. Numerosas destas seções foram coletadas em lâminas histológicas de vidro. Uma das lâminas, escolhida ao acaso, contendo aproximadamente uma centena de seções, foi fotografada através de microscópio ótico.

Dependendo da altura em que o plano de corte intercepta os glomérulos, situações diversas são encontradas. Imagens típicas de seções ao longo do plano de corte podem ser vistas nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6. A Figura 2 representa uma seção onde a área da luz do espaço urinário é substancialmente maior que a área dos tufos.

A Figura 3 mostra uma seção onde as bordas da cápsula e o contorno dos tufos estão bem delineados, não requerendo edição da imagem.

A Figura 4 mostra uma seção tangencial do glomérulo. Neste caso, o corte não incidiu sobre os tufos de capilares.

As Figuras 5 e 6 apresentam seções em que as bordas das cápsulas não aparecem de forma nítida. Na Figura 6 está explicitado o polo vascular significando um corte do glomérulo ao meio. Parte da borda aparece mal definida sendo, portanto, necessário retificá-la.

Condições adequadas de iluminação e foco foram

previamente determinadas para reduzir ao máximo o custo de pré-processamento.

A fase de preparação das amostras consumiu aproximadamente 30 horas de trabalho.

As imagens fotográficas foram digitalizadas através de um *scanner* de mesa com resolução mantida em 200 *dpi* e 256 níveis de cinza. O aumento real das fotografias correspondeu a 209 vezes. Nesta etapa foram gastas 2 horas.

As imagens foram cuidadosamente editadas para retificação manual das bordas da cápsula de Bowman, quando necessário, e as regiões de interesse (tufos e luz) foram pintadas com duas colorações diferentes. Esta última etapa visou automatizar o processamento subsequente.

O tempo gasto na fase de pré-processamento foi de 13 horas para o conjunto de ≈ 100 imagens.

As imagens foram segmentadas e rotuladas por algoritmos de segmentação por limiares fixos [Tamura-82]. Estes algoritmos produzem imagens sintéticas, cujas regiões são rotuladas por números inteiros, em conformidade com o grau de conectividade que pode ser 4 ou 8.

Para lidar com as limitações de memória impostas pelo sistema operacional MS-DOS, o algoritmo de segmentação mantém toda a imagem em disco enquanto apenas três linhas da imagem, de cada vez, são mantidas na memória central. Esta solução, embora imponha uma redução na velocidade de execução, viabiliza o processamento de imagens maiores que a memória central disponível. O tempo gasto na etapa de segmentação e rotulação foi de 2 horas num 386 de 25 MHz, correspondendo a 72 s por imagem processada.

Aproximadamente, uma centena de imagens de seções glomerulares obtidas de um fragmento cirúrgico retirado da superfície do córtex renal foram preparadas para exemplificar o processo de caracterização. A imagem segmentada da Figura 1, representa o caso típico e ilustra as regiões de interesse.

A primeira região de interesse compreende a área total da seção de corte do glomérulo. A segunda região de interesse é a área da luz do espaço urinário, representada pela parte clara entre a cápsula de Bowman e a parte central, mais escura. A parte central representa os tufos de capilares e constitui a terceira região de interesse.

Após a segmentação, foram calculadas as áreas, perímetros e diâmetros equivalentes de cada uma das regiões de interesse. O uso de limiares adequados, determinados em função dos níveis de cinza atribuídos às regiões de interesse, permitiu que as áreas total e da luz pudessem ser obtidas de forma automática.

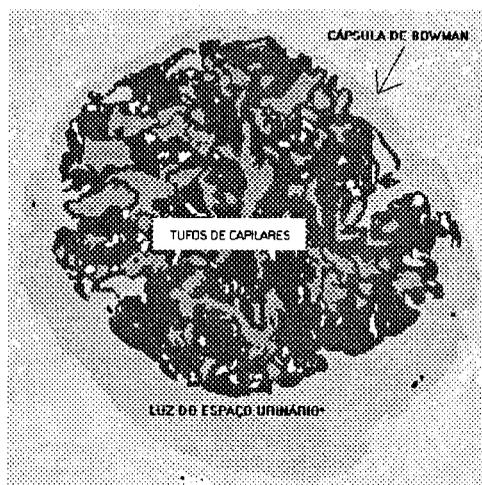


Figura 1
Corte esquemático de um glomérulo

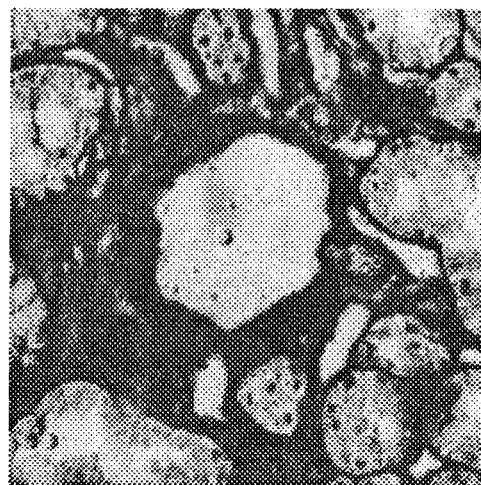


Figura 4
Seção tangencial do glomérulo

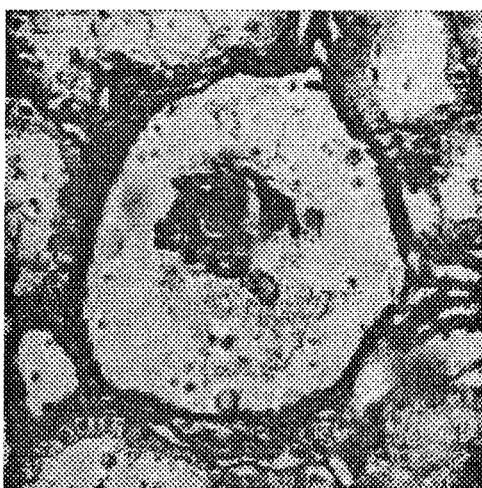


Figura 2
Área da luz do espaço urinário

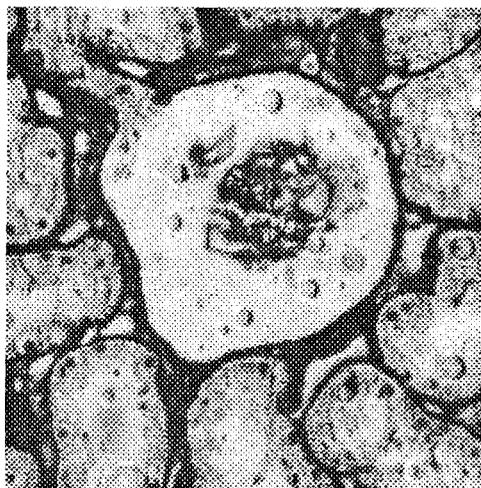


Figura 5
Bordas das cápsulas mal definidas

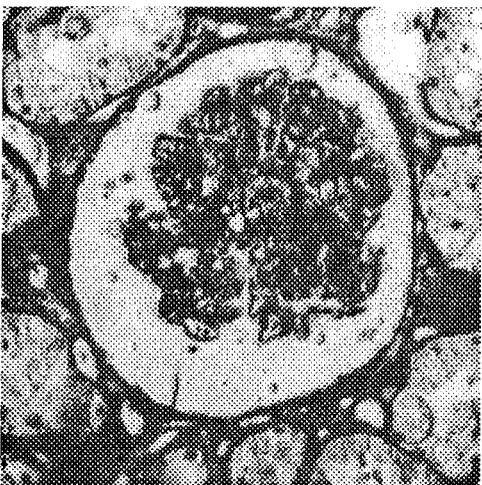


Figura 3
Bordas nítidas das cápsulas e dos tufo



Figura 6
Polo vascular explicitado

3. Resultados e discussão

As Figuras 7 e 8 apresentam as distribuições volumétricas obtidas para os volumes dos glomérulos e dos tufos, respectivamente. Nestes gráficos, as frações volumétricas obtidas são plotados na forma de percentagens, observando-se a escala logarítmica para os diâmetros.

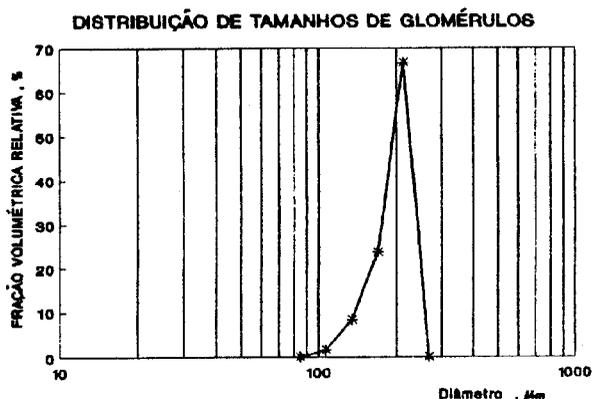


Figura 7
Distribuição de tamanhos de glomérulos

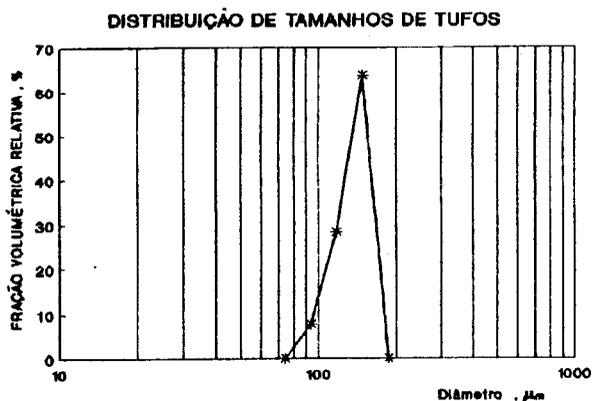


Figura 8
Distribuição de tamanhos de tufos

Um número reduzido de classes de diâmetros foi obtido tanto para o volume das cápsulas quanto para o volume dos tufos. Os volumes mais freqüentes aparecem na classe de maior diâmetro e as freqüências de ocorrência nas demais classes é significativamente menor. Dedus-se que os glomérulos possuem volumes concentrados numa faixa de valores relativamente pequena.

Os diâmetros observados, em micrometros, para cápsulas e tufos são apresentados na Tabela 1.

4. Conclusões

Foi possível medir a distribuição de tamanhos de cápsulas e tufos dos glomérulos co córtex renal com auxílio de método estereométrico de Saltykov.

Tanto as cápsulas quanto os tufos analisados apresentaram alta esfericidade e volumes numa pequena faixa de valores (relação diâmetro máximo / diâmetro mínimo de 1,6 para os tufos e 2,0 para as cápsulas).

O processamento automático das imagens tornou-se viável graças a etapa de pré-processamento com intervenção do operador.

	DIÂMETROS (μm)		
	Máximo	Mínimo	Médio
Cápsula	212.79	106.65	175,31
Tufos	148.05	93.41	125,43

Tabela 1

Valores extremos para os diâmetros

5. Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq e à FAPEMIG.

6. Referências

M. C. Andrade, Imageamento microscópico. Belo Horizonte: UFMG, 1993. Dissertação (mestrado em computação), UFMG, 1993.

A. de A. Araújo, et al. Digital processing of histopathological aspects in renal transplantation. Proceedings of the IS&T/SPIE. Conf. 1905, Biomedical Image Processing and Biomedical Visualization, 1993.

J. L. Chermant, Characterization of the ceramics by image analysis. *Ceramics International*. 12, (1986), 67-80.

C. Davis Jr., PIXELWARE: Um sistema de processamento digital de imagens. Belo Horizonte: UFMG, 1992. Dissertação (mestrado em computação), UFMG, 1992.

S.A. Saltykov, *Stereometrische Metallographie*, Leipzig, VEB, 1974.

H. Tamura et al., Design and implemetation of SPIDER - a transportable image processing software package. *Computer Vision, Graphics and Image Processing*, 23, (1982), 273-294.

J. C. F. Pujol et. al., Analisador de imagens de materiais - ANIMAT. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, MG, Brasil, 1992. Publicação CDTN-629.

H. Elias et al. Stereology: Application to biomedical research. *Physiological Reviews*, v.51, p.158-200,1971.