

Estudo da Morfologia Nuclear Miocárdica através de Técnicas de Quantificação Tridimensional e Microscopia Confocal com Varredura a Laser

LUIZ CLÁUDIO PARZIANELLO¹
MARIA DE LOURDES HIGUCHI²
SÉRGIO SHIGUEMI FURUIE¹

Instituto do Coração - HCFMUSP

¹ Serviço de Pesquisa e Desenvolvimento - Divisão de Informática

² Serviço de Anatomia Patológica

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil
{ parzianello, anp_lourdes, furuie }@incor.usp.br }

Abstract. We propose a method to study myocardial fiber nuclei morphology through Laser Scanning Confocal Microscopy and multivariate statistical analysis. Image datasets are preprocessed by the means of a blind deconvolution algorithm and the nuclei are segmented by a simple mathematical morphology technique. Features are extracted in order to describe three-dimensional nuclear morphology. A multivariate statistical analysis is performed to discriminate different pathological nuclei and to clarify the idiopathic cardiomyopathy diseases.

Keywords: Myocardial Fiber Nucleous, Laser Scanning Confocal Microscopy, Image Analysis.

1 Introdução

A cardiomiopatia é uma doença na qual o músculo cardíaco encontra-se alterado, fazendo com que o coração atue de forma inadequada. Pode ser de origem desconhecida ou estar associada a causas como hipertensão, doença das válvulas cardíacas, doenças arteriais e doenças sistêmicas, como a Doença de Chagas, por exemplo. Nosso objetivo é estudar a estrutura nuclear da fibra cardíaca através de uma análise tridimensional quantitativa baseada em técnicas de processamento de imagens digitais e estatística multivariada, de forma a permitir uma melhor compreensão do processo de deformação nuclear em diversas cardiomiopatias com o uso de Microscopia Confocal com Varredura a Laser (MCVL).

2 Metodologia

A quantificação da estrutura nuclear da fibra cardíaca requer a utilização de alguma técnica de aquisição de imagens que forneça dados referentes ao espaço tridimensional no qual estão contidos os núcleos, bem como algum procedimento que extraia atributos de forma baseados na superfície nuclear em questão.

A MCVL é uma técnica de aquisição de imagens que permite o seccionamento óptico de um espécime através da convergência do feixe de raios luminosos para um plano focal ao longo da direção axial da lente do microscópio. Esta técnica gera um conjunto de dados tridimensionais

que representam a distribuição de marcadores fluorescentes depositados ao longo de um objeto em estudo.

Propomos um método automático para a determinação dos *voxels* pertencentes à superfície nuclear miocárdica em imagens de MCVL [Parzianello *et al.* (1997)]. Este método consiste no pré-processamento das imagens, através de um algoritmo de restauração iterativa baseado na degradação intrínseca das imagens de microscopia confocal [Avinash (1996)], e a segmentação da superfície nuclear através de um conjunto de técnicas de morfologia matemática bidimensional estendidas para três dimensões, como o é caso do crescimento de regiões, da homogeneização de regiões (*holes filling*) e da determinação do contorno de regiões (estendida para a determinação da superfície de um volume). Devido ao grau de irregularidade apresentado pela superfície nuclear em alguns casos patológicos (miocardite e isquemia, por exemplo), o método apresenta a vantagem de ser independente de modelos geométricos, conforme proposto em trabalhos anteriores referentes à segmentação de estruturas nucleares não miocárdicas [Kelemen *et al.* (1996), por exemplo].

Os atributos de forma são extraídos diretamente do conjunto de dados segmentados, como é o caso do volume nuclear, a área e a rugosidade da superfície, o nível de compactação e a alongação da estrutura. Estes dados devem permitir a elaboração de um modelo de deformação nuclear derivado da análise estatística das componentes principais do espaço de atributos e da determinação do

grau de discriminação entre classes patológicas através do discriminante linear de Fisher. Novos atributos poderão ser acrescentados ao longo do estudo.

3 Material

A preparação histológica dos espécimes é feita através do seccionamento de fragmentos congelados de miocárdio formolizado em cortes de 20 μ m, lavados com 0,5% de PBS/Triton X-100 durante 30 minutos, evitando-se a emissão citoplasmática. Pode-se, ainda, atenuar esta emissão através da marcação prévia da fibra cardíaca com o uso de Faloidina-FITC 1/500 seguida da marcação nuclear através de Iodeto de Propídeo 1/400. Por fim, adiciona-se o reagente PPD de forma a prolongar a fluorescência nuclear sob uma exposição prolongada ao laser.

Quinze amostras nucleares foram utilizadas durante o desenvolvimento e a validação do algoritmo proposto, tendo sido adquiridas através de um sistema de MCVL Ar/Kr Odyssey XL (*Noran Inst.*) controlado por uma estação Indy (*Silicon Graphics*), que também executa a etapa de pré-processamento das imagens. Cada conjunto de dados resultou em 250 x 200 x 40 *voxels*, com cada elemento de volume apresentando as seguintes dimensões: 0,08 x 0,08 x 0,50 μ m. Os algoritmos de segmentação e extração de atributos foram desenvolvidos sobre uma ferramenta de desenvolvimento chamada *Application Visualization System* (AVS 5), executada numa estação Ultra 1 (*Sun Microsystems*).

A aquisição de um conjunto de 4500 amostras destinadas ao estudo da morfologia nuclear miocárdica continua em fase de execução. Este conjunto está dividido em 5 grupos de indivíduos normais, hipertensos, isquêmicos, chagásicos e idiopáticos, de forma que cada grupo tenha 30 casos amostrados destinados a análise de variabilidade morfológica inter-indivíduo. Além disso, 30 núcleos também são adquiridos aleatoriamente para cada caso, a fim de se estudar a variabilidade morfológica intra-indivíduo.

4 Discussões

A quantificação tridimensional absoluta em imagens de MCVL depende diretamente do nível de calibração do equipamento e do grau de precisão das técnicas de restauração utilizadas no procedimento. O uso de microesferas fluorescentes como padrões de calibração e estimação da função de espalhamento puntual (10 μ m e 0,1 μ m, respectivamente) torna-se imperativo no processo de validação de um estudo tridimensional em MCVL, devendo ser incorporado ao longo do estudo.

É possível utilizar técnicas relativamente simples de segmentação de imagens quando dispomos de total controle no processo de aquisição dos dados e poucas estruturas a segmentar [Parzianello *et al.* (1997)]. Esta característica torna o procedimento rápido e independente da morfologia, desejável quando tratamos de núcleos em fibras patológicas.

O problema de restauração de imagens em microscopia confocal tem sido um grande objeto de estudo em MCVL, principalmente quando o objetivo é o desempenho computacional de algoritmos baseados na estimação iterativa da função de espalhamento puntual (aproximadamente 2h de processamento para restaurar cada volume de dados citados anteriormente). Tratar de um conjunto da ordem de 4500 volumes requer um estudo mais aprofundado sobre novas técnicas de restauração otimizadas para problemas específicos, visando diminuir consideravelmente o tempo de processamento necessário baseado nas características da imagem e do objeto a ser restaurado [Avinash (1996)].

5 Conclusões

A análise tridimensional da morfologia nuclear miocárdica é de grande importância para o entendimento da evolução das diversas cardiomiopatias existentes. Mostramos que a MCVL, associada a uma técnica de aquisição controlada e um método automático de extração de atributos, permite a realização de um estudo quantitativo a respeito da morfologia nuclear normal e patológica da fibra cardíaca. O estudo dos atributos morfológicos, realizado através de análise estatística multivariada, é o objetivo final deste trabalho e deverá permitir a elaboração de um modelo de deformação da estrutura nuclear baseado no grau de relevância de cada atributo.

Referências

- G.B.Avinash, "Data-driven, Simultaneous Blur and Image Restoration in 3D Fluorescence Microscopy", *Journal of Microscopy*, v.183 (1996), 145--157.
- L.C.Parzianello, M.L.Higuchi, S.S.Furuie, "Segmentation of Myocardial Fiber Nuclei in Three-dimensional Confocal Microscopy Datasets", *Journal of Analytical Morphology*, v.4, n.2 (1997), 779--789.
- A.Kelemen, G.Székely, H-W.Reist, G.Gerig, "Automatic Segmentation of Cell Nuclei from Confocal Laser Scanning Microscopy Images", in *Proceedings of 4th International Conference on Visualization in Biomedical Computing*, Hamburg (1996), 193--202.