

VALORACION AUTOMATIZADA DE LAS CELULAS DEL ENDOTELIO CORNEAL
HUMANO POR PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES (*)

RICARDO TOLEDO, JORGE MARQUEZ, ROBERTO USISIMA Y
GABRIEL CORKIDI.

Unidad de Digitalización y Procesamiento de Imágenes
Centro de Instrumentos UNAM
A.P. 70-186, México 04510, D.F.

INTRODUCCION

El estudio de la forma de las células que componen el endotelio corneal de nuestros ojos, es fundamental en las valoraciones de las córneas destinadas a un banco de ojos. Este parámetro también resulta crítico en situaciones clínicas en donde la transparencia de las córneas se ve comprometida, así como en el diagnóstico de ciertas patologías endoteliales y en valoraciones pre y post operatorias.

La córnea es una estructura de tejido transparente y avascular, es decir, que carece de sistema de irrigación sanguínea. Tiene tres capas fundamentales que la componen: el epitelio, un tejido interno llamado estroma central, y el endotelio (Fig. 1).

Esta última capa posterior de la córnea llamada endotelio, es la responsable del metabolismo corneal. Este tejido se encarga de proporcionar nutrientes, por medio de ósmosis, del humor acuoso hacia el resto de la córnea, y al propio tejido celular que lo forma. Esta acción mantiene la transparencia y la "deturgencia" ópticas de la córnea, lo que le permite funcionar como una lente, gracias también a su forma. Se dice que es una "estructura refringente", pues refracta o desvía la luz, enfocándola hacia la retina. Por esto, el estado de dicho tejido resulta crítico durante un trasplante de córnea, una remoción de cataratas, y otras operaciones del ojo.

Para el oftalmólogo, algunos de los parámetros de interés de las células endoteliales son, por ejemplo: área y densidad celulares, perímetro, diámetros mayores y menores, factor de forma, poligonalidad, etc. La poligonalidad (por cuantos lados está compuesta la célula) es uno de los

(*) Este trabajo se ha elaborado en convenio con el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con el Dr. Enrique Graue y el oftalmólogo Jorge Valdés. Todos los desarrollos aquí mencionados se han hecho en respuesta a problemas planteados por los médicos de este instituto.

parámetros de mayor interés. Un endotelio corneal sano está compuesto por células hexagonales en un 60%, pentagonales en un 20% y heptagonales en 20%, aproximadamente. Este arreglo permite un acomodo de células eficiente, reduciendo espacios intercelulares (intersticios) y manteniendo el mínimo perímetro celular [Olsen T., 1979]. En casos de patología y de manera natural con la edad, aumenta el número de células

CORNEA:

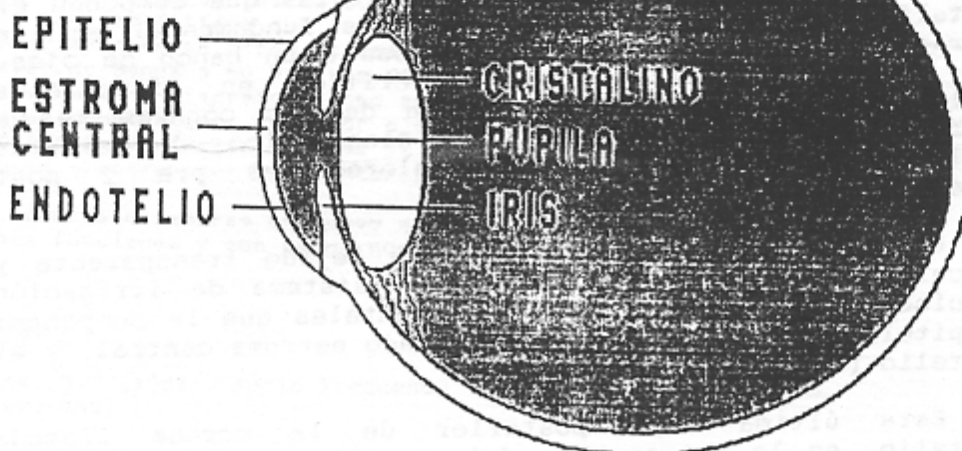


Fig 1. La córnea tiene tres capas fundamentales que la componen: el epitelio, un tejido interno llamado estroma central, y el endotelio.

no hexagonales, y la cantidad de células de más, o de menos de seis lados, resulta un dato útil para el diagnóstico del estado del tejido endotelial. Se han propuesto varios métodos para la medición de la hexagonalidad [Nishi, Hanasaki 1989; Hartmann, C. 1985]. Estos métodos se basan en el número de vecinos de cada célula para encontrar su poligonalidad, presentando errores en los casos donde existen cuatro o más células con un vértice común. Este trabajo se basa en este mismo principio, pero elimina los errores mencionados.

MATERIAL Y METODOS

La observación del endotelio corneal "in vivo" y sin dañar al mismo, es posible gracias a un diseño óptico reciente, conocido como el "microscopio especular". Este instrumento proyecta un haz de luz sobre la superficie del ojo. De este haz, aproximadamente 0.02% de la luz se refleja en la transición ("interfaz") entre el endotelio y el humor acuoso; el resto de la luz es transmitida, y es la escasa luz reflejada la que forma la imagen endotelial, que es registrada en video-cassette. Sin embargo, puesto que el video es tomado "in vivo", con luz muy molesta, las imágenes van acompañadas de movimientos oculares involuntarios del paciente. Además, la baja intensidad de la luz reflejada al microscopio especular, provoca en la imagen un alto grado de "ruido" ("basura" y objetos que no interesan, llamados "artefactos"), zonas oscuras o fuera de foco, y degradación en general.

El microscopio especular está conectado a una cámara de televisión y a una videograbadora. A la fecha, el oftalmólogo graba en cinta magnética varias tomas del endotelio del paciente. Posteriormente, analiza el video (medio minuto, aproximadamente), para seleccionar las mejores imágenes, tomando fotografías de los cuadros donde aparecen éstas con mayor claridad, y realiza las mediciones de forma de las células (morfometría). Se notará que es un proceso bastante laborioso, ya que una muestra confiable requiere de un mínimo de 50 células endoteliales. A la fecha, debido al gran número de pacientes que se atiende diariamente en los institutos de oftalmología, el análisis se efectúa con una sola fotografía por paciente, la cual contiene de 10 a 20 células.

Es aquí donde el Procesamiento Digital de Imágenes puede intervenir con el fin de reducir el tiempo requerido por el oftalmólogo para realizar el análisis, y reducir el costo del estudio, permitiendo examinar una muestra más adecuada de células endoteliales por paciente. Por otra parte, se abre la posibilidad de realizar mediciones que de otra forma, le tomarían un tiempo muy valioso al especialista, o que simplemente no puede hacer manualmente.

Desde el punto de vista del PDI, el problema es el siguiente: cómo identificar las células endoteliales individuales, a partir de imágenes sumamente degradadas y "ruidosas". Se trata de un problema de identificación de los objetos de una toma fija. Sin embargo, dada la degradación de la imagen, no se pueden aplicar métodos tradicionales de reconocimiento a partir del nivel de intensidad luminosa de la imagen de las células, y se ha recurrido a técnicas de una rama del PDI conocida como "Morfología Matemática".

El tipo de representación visual requerido para aplicar esta y otras técnicas, es la "imagen binaria". Se trata de arreglos con el mismo número de puntos (resolución espacial) que la imagen original, pero con dos niveles de gris únicamente: blanco y negro. Es aquí donde la Morfología Matemática puede participar, ya que las representaciones binarias contienen información de la forma de los objetos únicamente [Serra 1982; Matheron 1975; Giardina & Dougherty 1988].

Las operaciones básicas de la Morfología Matemática son las llamadas "erosión" y la "dilatación". Una erosión, consiste en examinar cada elemento de la imagen binaria, y cambiarlo de blanco a negro si tiene algún vecino negro. La dilatación es el proceso inverso. El resultado de la erosión es el de reducir los objetos (considerados en blanco, con el fondo negro) por su periferia. Una erosión aplicada después de una dilatación se conoce como una "apertura" y tiene como resultado un alisado de los bordes de los objetos y la separación de objetos cercanos o apenas unidos por un "puente". Una dilatación seguida de una erosión se conoce como "cerradura" y tiende a unir objetos cercanos, con efectos contrarios a la "apertura". Con la ayuda de estos filtros digitales, se logra "limpiar" la imagen, eliminando así gran parte de los "artefactos", pero conservando la forma de los objetos que nos interesan, en este caso, los bordes de las células endoteliales.

Finalmente, se emplea una forma especializada de la erosión, conocida como "esqueletización o transformación de eje medio", que reduce los objetos a líneas, como si fueran sus "esqueletos". Estos esqueletos contienen la información simplificada de las células (como una malla celular), permitiendo hacer las valoraciones cuantitativas con la ayuda de los métodos computarizados. El reconocimiento automático de algunas de las características de esta malla celular, por ejemplo los "vértices", son identificados mediante el uso de herramientas especiales, tales como los "mapas de conectividad" y las llamadas "tablas de destino", o "tablas de consulta" (Look Up Tables). Estos vértices permiten sintetizar una imagen perfectamente poligonal de cada una de las células, a fin de cuantificar precisamente su factor de poligonalidad correspondiente.

RESULTADOS

En la primera fase, el método de análisis por PDI es similar al tradicional; se registra en una videogradora una secuencia de imágenes endoteliales y posteriormente se seleccionan aquellas que presenten la menor degradación. Las imágenes son digitalizadas con una resolución de 512 x 512 píxeles con 256 niveles de gris cada uno (Fig 2).

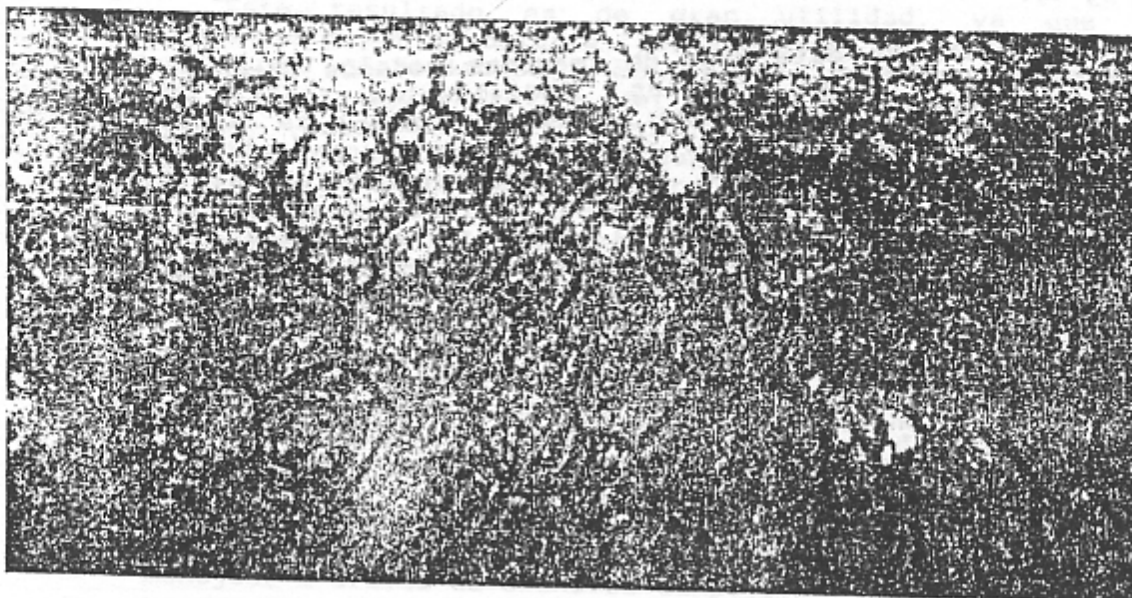


Fig 2. La imagen original del endotelio, -tomada con el "microscopio especular"-, está degradada debido al movimiento del ojo, al alumbrado heterogéneo debido a deformaciones de la córnea y al contenido de "ruido y artefactos".

Como una primera mejora al trabajo manual, la búsqueda de la mejor imagen se simplifica, mediante un programa que corrige, en muchos casos, el movimiento del ojo que había quedado registrado en la videograbación, y que hacía inservible una toma, por aparecer borrosa o "vibrante" (este efecto puede apreciarse en ocasiones que damos "pausa" a una videograbación ordinaria).

La fuente de degradación más obvia en todas las tomas, es aquella provocada por una diferencia de iluminación del microscopio especular, que va de la parte superior a la inferior de la imagen del endotelio. Esta falla es inherente al funcionamiento del propio microscopio y por lo tanto es inevitable. Esta diferencia gradual ("gradiente") de iluminación es más notoria cuando se visualiza la imagen en "pseudocolor" (colores arbitrarios asignados a cada nivel de iluminación de la imagen en blanco y negro). Este problema se soluciona "filtrando" la imagen, es decir, eliminando el fondo de esta iluminación heterogénea, manteniendo sólo la información correspondiente a las fronteras celulares. Una vez realizado esto, la imagen restante contiene la información de interés, correspondiente a la disposición o distribución espacial de los objetos, basada únicamente en sus niveles de iluminación. En general, el interior de las células aparece claro y los bordes, oscuros.

También hay "manchas", que son parte de la textura celular, y basuras propias de la señal de video, y que son retiradas todas, después del proceso de esqueletización, mediante un método que se come exclusivamente las "puntas" de los esqueletos, correspondientes a las manchas originales (Fig 3).

A partir de este tipo de imágenes podemos obtener los contornos de las células individuales para medir características tales como: áreas, diámetros, densidad celular etc. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, una de las medidas más importantes en el estudio del endotelio corneal, es la medida de la poligonalidad de las células. Esta se logra contando el número de vecinos de cada célula como lo describe [Nishi, Hanasaki 1989]. A este método se le agrega un parámetro que indica para cada vecino, si se trata verdaderamente de un vecino o de un vértice común.

Como resultado a todo este proceso, se obtiene una imagen que contiene un alto porcentaje de las fronteras celulares reconstruidas (50-80%), y se genera una "imagen sintética" de los polígonos representantes de cada célula (Fig 4).

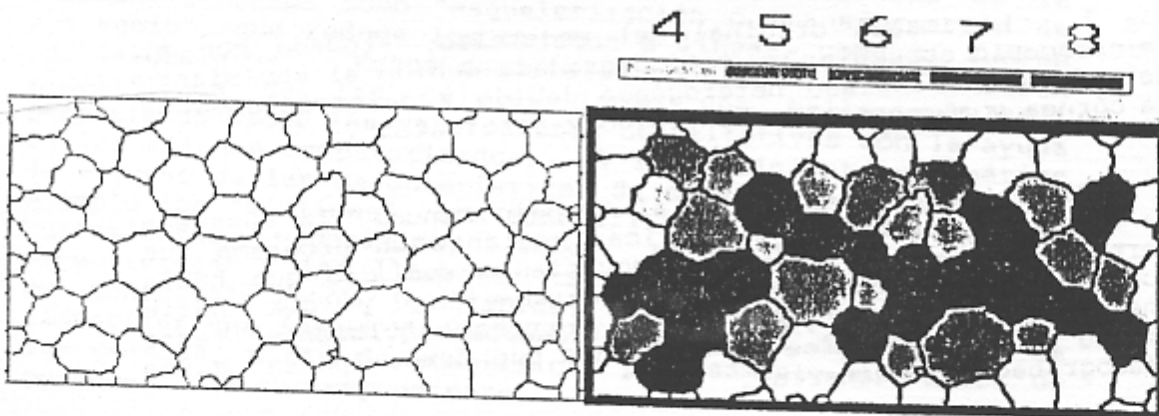


Fig 3. Mediante técnicas de PDI, se obtiene el "esqueleto" de las células endoteliales.

Fig 4. Los resultados obtenidos por PDI, permiten codificar con "pseudo color", los parámetros buscados (poligonalidad, área, etc) de las células endoteliales permitiendo una interpretación visual instantánea del estado de este tejido.

Este resultado es de gran utilidad, ya que los diferentes tipos de células (pentagonales, hexagonales, etc.) pueden ser clasificadas y coloreadas, para una apreciación más gráfica y cualitativa del estado del endotelio. Debe tomarse en cuenta que el oftalmólogo nunca había podido ver, simultáneamente marcadas, todas las células hexagonales, todas las pentagonales, etcétera, teniendo ahora, una clara idea de su repartición o distribución global. También pueden colorearse proporcionalmente a otras características tales como: área, diferencias en textura, claridad, etc.

CONCLUSION

Hemos presentado cómo un sistema de Procesamiento Digital de Imágenes y la metodología descrita, pueden ser de gran utilidad para el oftalmólogo, ya que, aparte de reducir el tiempo requerido por paciente y proporcionar nuevos datos, reduce el costo del estudio considerablemente, ya que todo es manejado a través de archivos computarizados. De esta manera, ya no es necesario un especialista dedicado a realizar la parte tediosa y repetitiva del diagnóstico y únicamente los casos muy difíciles o dudosos son identificados como tales por el sistema, quedando reservados al especialista.

BIBLIOGRAFIA

1. Giardina & Dougherty. MORPHOLOGICAL METHODS IN IMAGE AND SIGNAL PROCESSING. Prentice Hall 1988.
2. Hartmann, C. AUTOMATED MORPHOMETRY OF CORNEAL ENDOTHELIAL ANALYSIS COMBINED WITH VIDEO SPECULAR MICROSCOPY; Cornea 3: 155-167, 1985
3. Matheron. RANDOM SETS AND INTEGRAL GEOMETRY. Wiley N.Y., 1975.
4. Nishi, Hanasaki. AUTOMATED DETERMINATION OF POLYGONALITY OF CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS; Cornea 8(1): 54-57. 1989.
5. Olsen T. VARIATIONS IN ENDOTHELIAL MORPHOLOGY OF NORMAL CORNEAS AND AFTER CATARAT EXTRACTION. Acta Ophthalmologica 57; 1014-1019, 1979;
6. Serra. IMAGE ANALYSIS AND MATHEMATICAL MORPHOLOGY. Academic Press, London, 1982.