

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR DE ERITRÓCITOS POR MEIO DA ANÁLISE E PROCESSAMENTO DE IMAGENS COM O *NI VISION DEVELOPMENT MODULE - VISION ASSISTANT*

B. H. Lima*, W. L. Mikos* e J. A. P. Setti*

*UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
e-mail: mikos@utfpr.edu.br

Resumo: Este artigo apresenta o desenvolvimento de uma aplicação na área biomédica da análise e processamento de imagens a partir de técnicas de caracterização de partículas visando à avaliação da morfologia celular de eritrócitos, em especial, a identificação das alterações de forma. O sistema proposto foi desenvolvido com a plataforma *NI Vision Development Module - Vision Assistant™*. Dentro desta perspectiva, são apresentados os métodos e a sequência de funções de processamento de imagens propostas, bem como os resultados de experimentos realizados a partir de imagens digitalizadas comparadas com os resultados das análises realizadas por especialistas.

Palavras-chave: análise e processamento de imagem, morfologia celular de eritrócitos, *NI Vision Development Module - Vision Assistant*.

Abstract: *This article presents a biomedical application of NI Vision Development Module - Vision Assistant System™ for evaluation of red blood cell morphology through the image analysis and processing aiming in particular to identify changes in form and cell counting. The analysis was performed from microscopy image and methods employed for characterization are presented and the system results were compared with the results of analysis by experts.*

Keywords: *image analysis and processing, red blood cell morphology, NI Vision Development Module - Vision Assistant.*

Introdução

Os modernos laboratórios hematológicos e clínicos brasileiros estão equipados, atualmente, com contadores hematológicos automatizados para a realização de hemogramas de rotina, tendo em vista o grande volume de amostras a serem processadas diariamente [1].

Todavia, em casos especiais, essas amostras precisam ser avaliadas mediante a microscopia ótica de distensão de sangue periférico, visando à identificação das possíveis anormalidades hematológicas, as quais podem ser clínica ou biologicamente relevantes [1; 2], entre as situações que requerem microscopia Failace [3] destaca: hemogramas de pacientes menores de 5 anos ou maiores de 75 anos, hemogramas procedentes de clínicas onco-hematológicas, *flags* emitidos pelas máquinas ou resultados numéricos fora dos limites de referência.

Nestes casos, portanto, a análise de imagens

realizadas por sistemas automatizados de classificação tornam-se uma promissora alternativa à análise visual tradicional realizada por especialistas humanos.

Dentro desta perspectiva, o artigo busca apresentar o desenvolvimento de uma aplicação para a área biomédica baseada no Sistema *NI Vision Development Module - Vision Assistant™*, cujo objetivo principal é avaliar, de forma automática, a morfologia celular de eritrócitos, em especial, identificar a presença de eritrócitos falciformes (*Sickle cell*) relacionados à anemia falciforme, doença hereditária monogênica com um prognóstico desfavorável na ausência de tratamento [4; 5].

Metodologia de desenvolvimento

A aplicação proposta realiza a análise e o processamento a partir de imagens com padrão RGB em 32 bits, condizente com os sistemas de captura de imagens dos microscópios hematológicos disponíveis nos laboratórios brasileiros como apresentado na figura 1.

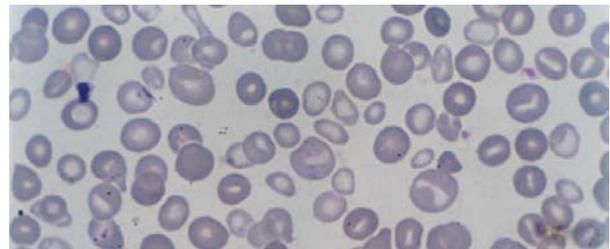


Figura 1: Distensão sanguínea - caso de anemia sideroblástica. Fonte: [3]. p.96

O método de avaliação da morfologia proposto consiste em uma sequência (*script*) de funções de processamento (algoritmos), bem como parâmetros de ajuste, os quais foram baseados em técnicas de reconhecimento de padrões e análise de partículas disponíveis no Sistema *NI Vision Development Module - Vision Assistant™* [6], os quais são detalhados a seguir.

Inicialmente, uma imagem digitalizada a partir de uma microscopia de distensão sanguínea adquirida em um padrão RGB (*Red/Green/Blue*) em 32 bits para ser processada requer uma transformação para uma escala de cinza em 8 bits. Assim, para esta finalidade, foi utilizada a função de processamento de cores: *Color Plane Extraction* [6] destinada à extração de planos específicos de cores da escala RGB, bem como alterar a

matiz e saturação das cores (*HSL-Hue Saturacion /Luminance*). Nesse caso, foi extraído o plano vermelho da imagem para posterior processamento.

Em seguida, a função de processamento *Filter* [6] foi empregada com o objetivo de suavização, detecção de contornos e remoção de ruídos da imagem processada previamente. A operação de filtragem adotada consiste em duas etapas: a primeira adotando a função de filtragem *Smoothing - Lowpass* [6] tem por objetivo suavizar a imagem, eliminar detalhes e desfocar as bordas. A segunda etapa, adotando a função *Smoothing - Median* [6] tem por objetivo atribuir para cada *pixel* um valor médio calculado a partir dos *pixels* de seu entorno.

Por sua vez, a função de processamento *Threshold* [6] foi empregada para a limiarização da imagem, pois neste caso as imagens apresentam mudanças de iluminação não homogêneas, resultando em gradientes de iluminação forte ou de sombras. Assim, a função de limiarização tem por objetivo isolar os *pixels* de interesse e definir os *pixels* restantes como parte do fundo da imagem, bem como converter essa imagem para binário.

Em seguida, a função de processamento *Basic Morphology* [6] foi adotada com a finalidade de realizar transformações que alteram a forma de eritrócitos (objetos em imagens binárias). Em especial, a função *Proper Close* [6] foi adotada para o preenchimento de pequenos orifícios e suavizar a borda desses eritrócitos.

Por sua vez, as funções de processamento *Advance Morphology* [6] foram selecionadas para realizar as operações de alto nível nas imagens binárias. Estas funções são utilizadas para tarefas como remoção de partículas pequenas de uma imagem, rotular partículas na imagem, ou preencher orifícios em partículas. Na aplicação proposta, foi selecionada a função de processamento denominada *Fill Holes* [6] com o objetivo de preencher as imagens dos eritrócitos identificados decorrentes das diferenças de intensidade da iluminação, em conjunto com a função *Remove Small Objects* [6].

Por fim, foi selecionada a função de processamento *Particle Analysis* [6], cujo objetivo é avaliar a morfologia de cada eritrócito identificado na imagem processada anteriormente.

Na figura 2 apresenta-se a interface da aplicação desenvolvida com a imagem em processo e na figura 3 apresenta-se a sequência de funções de processamento (*script*) estabelecida para esse fim.

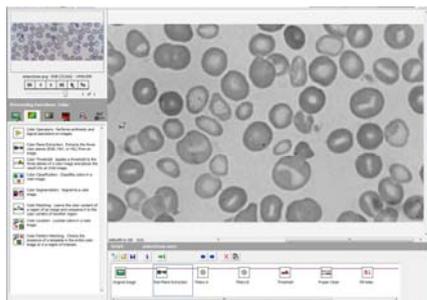


Figura 2: Interface da aplicação desenvolvida.

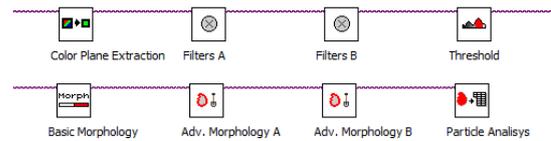


Figura 3: Sequência de funções de processamento (*script*).

Análise dos resultados e discussão

A aplicação proposta foi testada com um conjunto de imagens digitais classificadas por especialistas no âmbito do projeto *Sickle Cell Open – Online Topics & Educational Resources*, plataforma para suporte a questões médicas relacionadas à Anemia Falciforme [7].

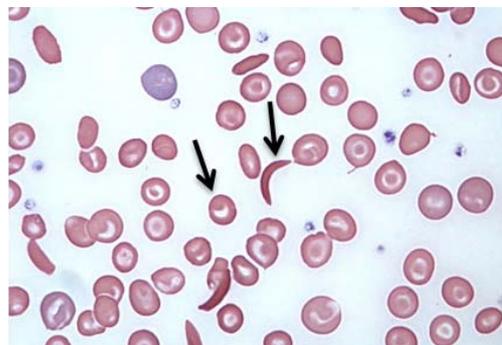


Figura 4: Imagem empregada para teste da aplicação.

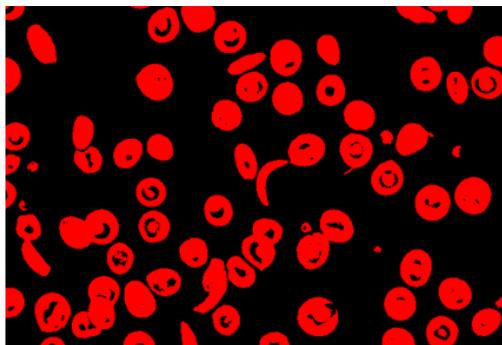


Figura 5: Imagem após a execução da sequência o processamento.

Para a avaliação da morfologia celular dos eritrócitos foram selecionadas medidas quantitativas, baseadas em parâmetros de forma de partículas, as quais foram obtidas após a execução da sequência de processamento (*script*) proposta e apresentados na tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Valores de parâmetros calculados (eritrócitos falciformes).

Eritrócitos Falciforme	Circularidade	Fator de Along.	Fator de Circular. Heywood
1	0,369	3,027	1,142
2	0,767	3,051	1,647
3	0,514	3,547	1,395
4	0,606	4,124	1,285
5	0,345	5,264	1,702
Media	0,520	3,803	1,434
Desvio Padrão	0,174	0,932	0,238
Intervalo de Confiança	0,217	1,157	0,295

Tabela 2 – Valores de parâmetros calculados (eritrócitos normais).

Eritrócitos Normais	Circularidade	Fator de Along.	Fator de Circular. Heywood
1	0,841	1,476	1,024
2	0,954	1,525	1,091
3	0,995	1,349	1,003
4	0,931	1,730	1,037
5	0,888	1,409	1,061
Media	0,922	1,498	1,043
Desvio Padrão	0,059	0,146	0,034
Intervalo de Confiança	0,074	0,181	0,042

Os parâmetros de forma, apresentados nas tabelas 1 e 2, possibilitam a caracterização morfológica quantitativa dos eritrócitos normais e falciformes. Neste sentido, é importante destacar que esses parâmetros de forma são utilizados, amplamente, para a caracterização de partículas, bem como padronizados, por exemplo, pela norma internacional ISO 13322-1 [8], e com grande potencial de aplicação na área biomédica.

- Fator de alongamento (*elongation factor*), representado pelo diâmetro máximo *Feret* dividido pelo lado mais curto do retângulo equivalente *Feret*;
- Circularidade da célula (*Cell circularity*) representa a razão entre área da superfície do eritrócito (A) e o quadrado do perímetro (P^2) [4, 9];
- Fator de circularidade de *Heywood* (*Circularity Factor*) é baseado na relação entre a área da projeção bidimensional do eritrócito e área (A) correspondente do círculo que possui o mesmo perímetro (P) do eritrócito.

Por sua vez, nas figuras 6 e 7 apresentam-se os valores do intervalo de confiança dos resultados calculados pelo sistema para os eritrócitos normais e falciformes, indicando que existe uma diferença estatística significativa, demonstrando que os parâmetros adotados podem ser empregados para a classificação dos eritrócitos.

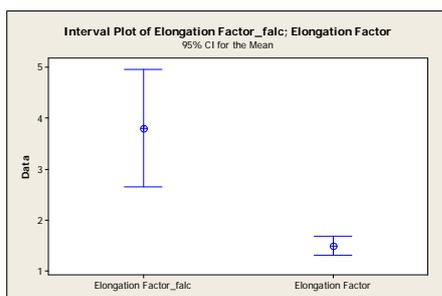
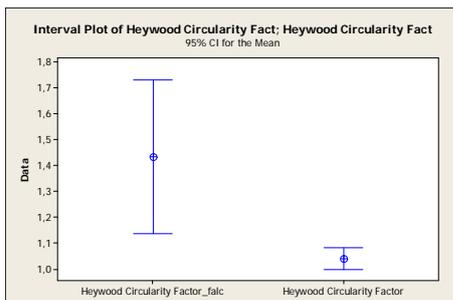


Figura 6: Intervalo de Confiança dos resultados para o Fator de Alongamento.

Figura 7: Intervalo de Confiança dos resultados para o Fator de circularidade de *Heywood*

Conclusão

Este artigo descreveu o desenvolvimento de uma aplicação na área biomédica da análise e processamento de imagens e das técnicas de caracterização de partículas, visando à avaliação da morfologia celular de eritrócitos, em especial, a contagem e identificação das alterações de forma dos eritrócitos.

O protótipo do sistema proposto foi desenvolvido a partir da plataforma *NI Vision Development Module - Vision Assistant™* e a sequência de funções de processamento (*script*) proposta foi testada com a imagem digital da microscopia ótica de distensão de sangue periférico, preparada adequadamente para identificação de anormalidades morfológicas.

O sistema proposto permite, em trabalhos futuros, a adição de novas funções de processamento, destinadas a outras avaliações relacionadas não só à identificação de alterações morfológicas como também àquelas relacionadas às alterações de cor.

Por fim, é importante ressaltar, que embora os resultados do desenvolvimento tenham sido promissores, novos testes buscando a validação da perspectiva médica devem ser conduzidos. Portanto, as conclusões aqui apresentadas devem ser consideradas à luz destas limitações.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo suporte a este projeto.

Referências

- [1] Failace, Rafael; Pranke, Patricia. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia . vol. 26, n.3. São José do Rio Preto, 2004.
- [2] Ryan DH. Automated analysis of blood cells. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ & Silberstein LE eds. Hematology — Basic Principles and Practice 2nd. Ed. 1995. New York, Churchill Livingstone, 2223-35.
- [3] Failace, Renato; Fernandes, Flavo Beno ... [et al.]. Hemograma. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- [4] Rakshita, Pranati; Bhowmik, Kriti. Detection of Abnormal Findings in Human RBC in Diagnosing Sickle Cell Anaemia Using Image Processing. International Conference on Computational Intelligence: Modeling, Techniques and Applications - CIMTA- 2013.
- [5] Cançado, Rodolfo D.; Jesus, Joice A. A doença falciforme no Brasil. Revista Brasileira de Hematologia. Vol. 29, n.3, São José do Rio Preto, July/Sept. 2007.

- [6] National Instruments Corporation. NI Vision Assistant Tutorial. Disponível em <<http://www.ni.com/pdf/manuals/322228d.pdf>>. June, 2009
- [7]SCOOTER Disponível em <<http://www.sicklecellanaemia.org/teaching-resources/resources/scooter44-63/scooter44.html>>. June, 2011
- [8] ISO 13322-1. Particle Size Analysis, Image Analysis Methods – Static Image Analysis Methods. 2004.
- [9] Lee, Howard; Chen, Yi-Ping Phoebe. Cell morphology based classification for red cells in blood smear images. Pattern Recognition Letters 49, p. 155–161, 2014.