

Análisis de Textura y Aprendizaje Computacional a partir de Microfotografía Chagásica

E. J. Rosado Sánchez^{1*}, V. Sandoval Curmina¹, N. Hevia-Montiel²

¹Departamento de ingeniería Eléctrica, Electrónica y Biomédica, Instituto Tecnológico de Mérida/Tecnológico Nacional de México, Mérida, México.

²Unidad Académica del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas en Yucatán, Universidad Nacional Autónoma de México, Mérida, México.

[*LE16080935@merida.tecnm.mx](mailto:LE16080935@merida.tecnm.mx), victor.sc@merida.tecnm.mx, nidiyare.hevia@iimas.unam.mx

Resumen— El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas en América Latina. El análisis de la presencia de nidos del parásito en muestras histopatológicas por microfotografía es requerido para determinar el daño en el tejido cardíaco que provoca miocardiopatía crónica. En este trabajo se analizó el uso de técnicas de aprendizaje computacional (redes neuronales convolucionales) en la detección de nidos de amastigotes en músculo cardíaco y la extracción de descriptores de textura de estos nidos para caracterizar y relacionar estos descriptores con la evolución del daño histológico durante la enfermedad de Chagas. Se utilizó un conjunto de microfotografías de modelo murino en etapa aguda: sujetos sanos y sujetos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Para la detección automática de nidos se utilizó una red neuronal convolucional U-Net, donde validando respecto a regiones *Gold Standard*, esta presentó valores de AUC-ROC entre 0.96-0.97, y se obtuvieron valores de 0.81-0.88 y 0.70-0.78 para los índices de DICE y Jaccard, respectivamente. Se extrajeron características de textura para cada región detectada, utilizando Energía, Homogeneidad, Entropía y Contraste para caracterizar la textura de nidos y su relación temporal la evolución de la fase aguda de la enfermedad. El método desarrollado puede eficientizar la detección de nidos y ser una herramienta de apoyo en el análisis de imágenes histológicas.

Palabras clave—Aprendizaje computacional, CNN, descriptores de textura, enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, U-Net.

I. INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un parásito intracelular, que tiene la capacidad de cambiar su morfología, permitiéndole circular en sangre (tripomastigote) o alojarse en los tejidos (amastigote). Su transmisión es principalmente vectorial mediante un insecto triatomino hematófago, que se infecta al ingerir la sangre de un mamífero parasitado. En el mamífero, el parásito circula en el flujo sanguíneo y posteriormente se anida en corazón u otros órganos. El *T. cruzi* es agente causal de la enfermedad de Chagas (EC) y capaz de producir severas lesiones en tejido cardíaco, llegando a provocar la muerte [1, 2]. De acuerdo con Florián *et al.* [2], un tercio de los infectados desarrollan miocardiopatía chagásica crónica, provocada por el efecto directo y continuo del parásito. La Organización

Mundial de la Salud (OMS) consideró en 2016 a la EC como la enfermedad parasitaria más grave de América Latina [2, 3]. Entre 2016 y 2019 se estimaron 6-7 millones de personas infectadas a nivel mundial [4]. Para el 2017, en México, se estimaron 1.1 millones de infectados, con mayores tasas de incidencia registradas en Yucatán, Oaxaca e Hidalgo [3].

Para estudiar el daño cardíaco provocado por el parásito se recurre a estudios experimentales histopatológicos en modelos murinos, debido a que los ratones desarrollan una cardiopatía crónica similar a la observada en humanos [5, 6, 7] con alteraciones en tamaño y forma del corazón como respuesta inmunológica [3, 7]. Existen técnicas de diagnóstico para analizar la funcionalidad cardíaca (electrocardiografía o ecocardiografía), sin embargo, la histopatología es una alternativa complementaria para el diagnóstico e interpretación de la fisiopatología [5]. El análisis histopatológico se basa en la observación del experto al microscopio o en microfotografías, lo que resulta un análisis relativamente subjetivo, cualitativo y dependiente del observador. En este trabajo se proponen técnicas computacionales de aprendizaje profundo, como redes neuronales convolucionales (CNN), para realizar de manera automática tareas de reconocimiento de patrones [8, 9] y el uso de descriptores de textura para caracterizar la presencia de nidos, con el fin de eficientizar objetivamente el estudio histopatológico de la enfermedad de Chagas.

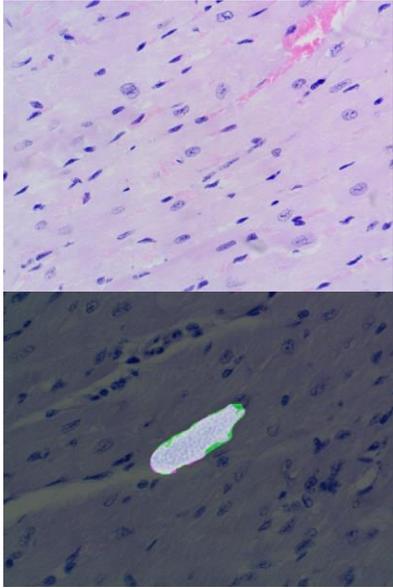
II. METODOLOGÍA

A. Modelo experimental

El modelo murino experimental se realizó con 54 ratones (ICR) hembras de 8 semanas de edad al inicio de la inoculación. Para la etapa aguda, se administró solución salina vía intraperitoneal (IP) para el grupo control (24 ratones) y para el grupo infectado (30 ratones) se les administró vía IP 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa H1 de *T. cruzi*. Se obtuvieron muestras histológicas de corazón a los 0, 15, 25, 30 y 35 días del inicio de la infección (Proyecto CONACYT PDCPN-2015-102).

B. Base de datos

La base de datos consistió en microfotografías de 21 ratones: grupo control (3 ratones; muestras histológicas de



(a)

(b)

(c)

Fig. 1. Microfotografías de cortes histológicos de corazón en modelo murino: a) sujeto grupo control, b) sujeto grupo infectado, y c) superposición entre la máscara manual (SM) en color rosa y la detección automática por la U-Net (DA), en color verde.

Las microfotografías se adquirieron con un microscopio Olympus CX23 - TouP Tek TouPView Versión x64 y un microscopio Leica DM750 - Leica Application Suite LAS EZ Versión 3.4.0. Se adquirieron 2515 microfotografías con amplificación 40x, formato TIF, multicanal RGB, resolución 2595 x 1944 píxeles, como las que se muestran en la Fig. 1; las cuales se almacenaron y procesaron en el Laboratorio Universitario de Cómputo de Alto Rendimiento (LUCAR) del IIMAS, UNAM.

C. Detección por aprendizaje profundo

La CNN utilizada fue la U-Net, debido al desempeño robusto reportado en la detección y segmentación en imágenes biomédicas de diferente naturaleza y por su relativo bajo tiempo de entrenamiento [10]. Además de que la U-Net se encuentra subclasificada como una *Fully Connect Neural* (FCN), las cuales están diseñadas para mejorar los cálculos computacionales, situación que sería extremadamente costosa para una CNN menos robusta [9]. La U-Net consta de una ruta de contracción de 3x3 convoluciones, seguida de una función de activación y una operación de agrupación, reduciendo la resolución de la imagen de entrada y extrayendo sus características, como se muestra en la Fig. 2. El proceso se repite 5 veces hasta llegar a una ruta expansiva en donde se aplican 3x3 convoluciones ascendentes hasta recuperar el tamaño original [10].

Para el entrenamiento y validación de la U-Net se seleccionaron 767 imágenes histológicas adquiridas con el Olympus CX23, tanto de sujetos del grupo control como infectados.

cada uno a 0, 25 y 35 días); y grupo infectados (18 ratones; 6 ratones por día de muestreo histológico a 25, 30 y 35 días).

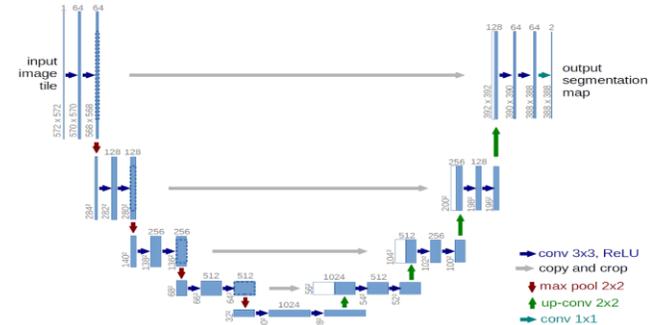
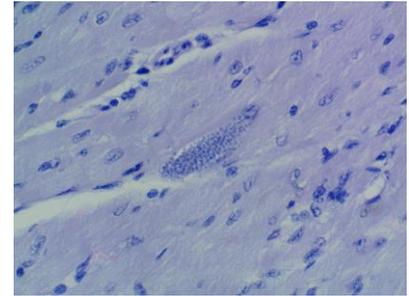


Fig. 2. Arquitectura de la red neuronal convolucional U-Net implementada para la detección de nidos de amastigotes de *T. cruzi* [10].

Se implementó un aumento de datos realizando rotaciones aleatorias de la imagen entre -45° y 45° , rotaciones de 90° e inversión sobre el eje horizontal contando con un total de 11,508 imágenes (10,357 para entrenamiento y 1,151 para validación).

La U-Net da a la salida una imagen binaria de la detección automática de nidos de amastigotes (DA). El tamaño de los nidos detectados por la U-Net varía en función de la definición del umbral de probabilidad de pertenencia de cada píxel a la región 'nido', provocando subestimación o sobreestimación en el tamaño de la región. Se ajustó el valor del umbral de probabilidad buscando un desempeño óptimo de la U-Net realizando pruebas al 50%, 70% y 90% de probabilidad de pertenecer un píxel a un nido de amastigotes, y una cuarta prueba al 50% de probabilidad, pero uniformizando el color (AC) de las imágenes a través

de sus histogramas para eliminar las variaciones RGB. Se estimó el área bajo la curva ROC (AUC-ROC) para cada uno de los umbrales considerados y así estimar el umbral óptimo en la detección.

Para el análisis de textura se obtuvo un conjunto de 650 imágenes (350 Olympus CX23 y 300 Leica DM750), seleccionadas aleatoriamente pertenecientes al grupo de ratones infectados, correspondientes a los días 25, 30 y 35 donde se observó presencia de nidos de amastigotes.

D. Validación de la detección automática

Para una validación cuantitativa de la detección de nidos de amastigotes mediante la U-Net, se compararon los píxeles pertenecientes al nido de amastigotes y fondo mediante superposición de las regiones obtenidas por la detección automática vs. la segmentación manual; considerando máscaras binarias obtenidas por la U-Net (DA) y de las segmentaciones manuales (SM) validadas por expertos. Las máscaras SM se obtuvieron a través del Image Processing Toolbox de MATLAB R2017b, mediante la aplicación Image Segmenter.

Con el propósito de validar la detección automática, se construyeron matrices de confusión de acuerdo con los casos: verdadero positivo (TP), verdadero negativo (TN), falso positivo (FP) y falso negativo (FN). Por lo que se consideraron como métricas de evaluación del desempeño las siguientes [12]:

$$\text{Exactitud} = (TP+TN)/(TP+FP+FN+TN). \quad (1)$$

$$\text{Precisión} = TP/(TP+FP). \quad (2)$$

$$\text{Sensibilidad} = TP/(TP+FN). \quad (3)$$

$$\text{Especificidad} = TN / (TN+FP). \quad (4)$$

Se obtuvieron los coeficientes de similitud Jaccard y Sørensen–Dice [11]:

$$\text{Dice Index} = (2*TP)/(2*TP+FN+FP). \quad (5)$$

$$\text{Jaccard Index} = TP/(TP+FP+FN). \quad (6)$$

Finalmente se obtuvo la curva AUC-ROC con el propósito de determinar el punto de corte donde se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta, determinando así el umbral óptimo para tener un sistema robusto.

E. Extracción de características de textura

A partir de descriptores de textura de cada uno de los nidos detectados en los diferentes días de muestreo, se busca caracterizar la textura localmente, como información complementaria al número de nidos, y su correlación con el daño histológico o hallazgos clínicos. Se utilizaron descriptores de textura de Haralick *et al.* [12], mediante matrices de co-ocurrencia (dirección 0°). A partir de las máscaras SM y DA se filtraron espacialmente las imágenes RGB originales, conservando así sólo la información local correspondiente a cada nido. Posteriormente se transformaron a niveles de gris (IRG-M) e (IRG-A),

respectivamente, se obtuvieron las matrices de co-ocurrencia y se calcularon los 15 descriptores de textura de Haralick [12].

Para el análisis temporal se analiza si existe relación entre los descriptores de textura y los hallazgos clínicos, dependiendo los días de evolución de la enfermedad. Se realizó un análisis estadístico univariable por correlación de Pearson con el conjunto de valores obtenidos de los descriptores de textura provenientes de IRG-M e IRG-A y el diagnóstico clínico de cada sujeto, con la finalidad de seleccionar los más significativos y hacer un análisis comparativo.

III. RESULTADOS

Los resultados del desempeño de la U-Net se pueden observar en la Tabla I y los valores promedio de los coeficientes de similitud entre las regiones IRG-M e IRG-A se pueden observar en la Tabla II. El umbral con mejor resultado de acuerdo con su desempeño fue el de 70% y con respecto a los coeficientes de similitud correspondió al considerar un 50% de probabilidad de pertenencia.

En general, de acuerdo con las curvas ROC todos los umbrales presentan una buena separabilidad de píxeles entre nido y fondo con un alto valor de AUC entre 0.96 y 0.97; en la Fig. 3 se observa cada una de las curvas AUC-ROC, siendo el umbral del 50% de probabilidad el que obtuvo el mayor valor de AUC-ROC igual a 0.9792.

TABLA I
DESEMPEÑO EN LA DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE NIDOS

Umbral	Exactitud	Precisión	Sensibilidad	Especificidad
50%	0.992	0.832	0.934	0.995
70%	0.993	0.900	0.878	0.997
90%	0.991	0.952	0.785	0.999
50%/AC	0.993	0.827	0.841	0.997

TABLA II
COEFICIENTES DE SIMILITUD EN LA DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE NIDOS

Umbral	Sørensen–Dice	Jaccard
50%	0.874	0.781
70%	0.882	0.704
90%	0.851	0.751
50%/AC	0.819	0.701

En total se obtuvieron 60 descriptores de textura por cada nido a partir de IRG-M e IRGA. La Tabla III muestra los valores de correlación, entre las regiones segmentadas manualmente y las detectadas de manera automática, de los descriptores de Energía, Entropía, Homogeneidad y Contraste, cuyos valores fueron mayores a 0.90 ($p < 0.05$), lo cual nos indicaría buena correspondencia en tamaño y localización de los nidos para ser consideradas en el análisis temporal. En la Tabla IV se muestran los valores promedio de los cuatro descriptores de textura obtenidos en el análisis temporal en etapa aguda, tanto al inicio en tejido sano (día 0) como a los 25, 30 y 35 días de iniciada de la infección chagásica.

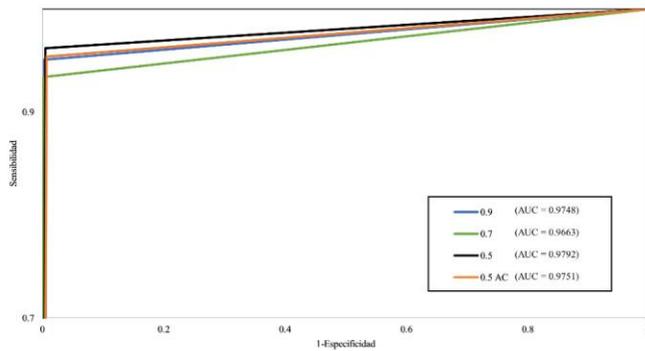


Fig. 3. Curvas Roc obtenidas a partir de las métricas de sensibilidad y especificidad para el caso de cada uno de los umbrales de probabilidad de pertenencia considerados.

TABLA III
CORRELACIÓN DE DESCRIPTORES DE TEXTURAS
(SEGMENTACIONES MANUALES VS DETECCIÓN AUTOMÁTICA)

Correlación	Energía	Entropía	Homogeneidad	Contraste
r	0.95	0.95	0.95	0.91

TABLA IV
DESCRPTORES DE TEXTURA PROMEDIO EN SUJETOS
INFECTADOS.

Día	Energía	Entropía	Homogeneidad	Contraste
0	0.962±0.004	0.284±0.038	0.989±0.003	9.373±0.673
25	0.981±0.021	0.173±0.174	0.993±0.007	4.950±3.810
30	0.976±0.025	0.207±0.208	0.992±0.008	6.627±5.873
35	0.991±0.110	0.092±0.103	0.997±0.004	2.708±2.349

*promedio ± desviación estándar

IV. DISCUSIÓN

Dado las métricas de desempeño de la U-Net para cada uno de los umbrales de probabilidad establecidos, el de mejor desempeño fue el umbral de 70% de probabilidad de pertenencia; de acuerdo con su capacidad para segmentar con mayor correspondencia espacial cada uno de los nidos de acuerdo con las métricas de similitud, también se observa que el umbral de probabilidad que presenta índices más altos de similitud fue el correspondiente al umbral del 70%. Sin embargo, si analizamos el desempeño de la segmentación de acuerdo con la capacidad de separabilidad entre píxeles que pertenecen a un nido o fondo, de acuerdo con los valores de AUC-ROC el umbral con mayor área es el del 50%. Ahora bien, dado que una problemática existente en este tipo de estudios es el desbalance en el número de píxeles que pertenecen a los nidos y el número de píxeles que pertenecen al fondo en las imágenes, se busca tener la mejor separabilidad entre clases, por lo que se estableció fijar el umbral de probabilidad de pertenencia en el 50%. En relación con los resultados del análisis de textura, si bien se encontró en este caso que la Energía, Entropía, Homogeneidad y Contraste podrían ser considerados dada su alta correlación con los valores obtenidos de las segmentaciones de referencia, no obstante, como se mostró en la Tabla IV, la Energía y Homogeneidad no presentan una diferencia significativa con respecto a los valores de tejido sano y con relación al avance de la infección. Los

valores de Entropía y Contraste presentaron mayor diferencia entre tejido sano y los presentados en los nidos de amastigotes. De acuerdo con la correlación de estos valores promedio con respecto al día en que se encuentra la etapa aguda de la infección la Energía mostró mayor correlación de 0.915 pero no es significativo ($p < 0.085$). En cuanto a su relación con los hallazgos clínicos, el pico de la parasitemia en etapa aguda se tiene a los 28 días, por lo que los valores de textura al día 30 serían de utilidad en la caracterización de la infección. Falta incluir un análisis más minucioso sobre hallazgos clínicos de la cardiopatía chagásica.

V. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método que permite mediante técnicas de aprendizaje computacional la detección y caracterización de nidos de amastigotes en el transcurso de enfermedad chagásica a partir de imágenes histopatológicas. La U-Net tuvo un alto desempeño en la detección de nidos de amastigotes a partir de microfotografías de tejido cardíaco, lográndose establecer como umbral de pertenencia de los píxeles a un nido de amastigotes de 50% con un AUC-ROC de 0.9792, permitiendo eficientizar el estudio histopatológico al reducir los tiempos en el análisis de imágenes. Se seleccionaron descriptores de textura para analizar la textura de los nidos y su relación con la evolución de la infección, como trabajo a futuro se pretende correlacionar los valores de textura con el nivel de daño histopatológico ocasionado en la infección, así como comparar los resultados de la U-Net con los de una CNN secuencial (ResNet) e implementar un algoritmo para umbrales adaptativos con el objetivo de seleccionar el umbral más adecuado de acuerdo con la imagen a segmentar.

RECONOCIMIENTO

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT: IT100220.

REFERENCIAS

- [1] Á. Pereira, M. Pérez. "Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño". *Offarm: farmacia y sociedad*, vol. 22 No. 2, pp. 104-111, Feb, 2003.
- [2] F. Florián Sanz, C. Gómez Navarro, N. Castrillo García, A. Pedrote Martínez, E. Lage Gallé. "Miocardiopatía chagásica en España: un diagnóstico a tener en cuenta". *An. Med. Interna (Madrid)*, vol. 22, no. 11, pp. 538-540, Nov, 2005. DOI 10.4321/s0212-71992005001100009.
- [3] J. Rojo-Medina, C. Ruiz-Matus, P. Salazar-Schettino, J. González-Roldán. "Enfermedad de Chagas en México". *Gac Med. Mex.*, vol. 154, no. 5, pp. 605-612, Jul, 2018. DOI 10.24875/gmm.18004515.
- [4] Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez". "Lineamientos para la vigilancia por Laboratorio de la Enfermedad de Chagas", InDRE, México: Secretaría de Salud, México, 2019, pp. 9-10.
- [5] F. Ucan-Euan, S. Hernández-Betancourt, M. Arjona-Torres, A. Panti-May, M. Torres-Castro. "Estudio histopatológico de tejido cardíaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en barrios suburbanos de Mérida, México". *Biomédica*, vol. 39, (Supl. 2), pp. 32-43, Nov, 2019. DOI 10.7705/biomedica.v39i3.4192.

- [6] L. Andrade, L. Galvão, M. Meirelles, E. Chiari, S. Pena, A. Macedo, "Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 105, no. 6, pp. 834-837, Sep, 2010. DOI 10.1590/s0074-02762010000600018.
- [7] M. A. Rossi *et al.* "Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms". *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 4, no. 8, e674, Aug, 2010. DOI 10.1371/journal.pntd.0000674.
- [8] Q. Xie, K. Faust, R. Van Ommeren, A. Sheikh, U. Djuric, P. Diamandis. "Deep learning for image analysis: Personalizing medicine closer to the point of care". *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, vol. 56, no. 1, pp. 61-73, Jan, 2019. DOI 10.1080 / 10408363.2018.1536111.
- [9] G. Carneiro, Y. Zheng, F. Xing, L. Yang. "Review of Deep Learning Methods in Mammography, Cardiovascular, and Microscopy Image Analysis." In: Lu L., Zheng Y., Carneiro G., Yang L. (eds) *Deep Learning and Convolutional Neural Networks for Medical Image Computing. Advances in Computer Vision and Pattern Recognition*. Cham, Switzerland: Springer, 2017, ch. 2, pp. 11-32. DOI 10.1007/978-3-319-42999-1_2.
- [10] O. Ronneberger, P. Fischer, T. Brox. "U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation." In: Navab N., Hornegger J., Wells W., Frangi A. (eds) *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*. MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science, vol 9351. Cham, Switzerland: Springer, 2015, pp. 234-241. DOI 10.1007/978-3-319-24574-4_28.
- [11] V. Yeghiazaryan, I. Voiculescu. "An overview of current evaluation methods used in medical image segmentation". Department of Computer Science, University of Oxford, Oxford, UK. Tech. Rep. No. RR-15-08, 2015.
- [12] R. M. Haralick, K. Shanmugam, y IH. Dinstein. "Textural Features for Image Classification". *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, vol. SMC-3, no. 6, pp. 610-621, Nov, 1973. DOI 10.1109 / TSMC.1973.4309314.