

EL PROCESAMIENTO DE IMAGENES EN EL MAL DE PARKINSON

Dr. Gabriel CORKIDI B.
Centro de Instrumentos UNAM.

RESUMEN

Se desarrolló un sistema de procesamiento digital de imágenes, específicamente concebido para el análisis interactivo de preparaciones histológicas, basado en una innovadora metodología de análisis semi-automático de preparaciones de dimensiones macroscópicas (6.4 x 6.4 cm).

Esta metodología permite combinar en tiempo real las informaciones macroscópicas (por ejemplo las zonas de interés) con el análisis a alta amplificación. El programa generaliza estos conceptos a las funciones tales como el conteo de objetos, la morfometría y la medida de densidad óptica (aplicación en histoautoradiografía).

El sistema permite la edición de documentos cartográficos de alta resolución, la síntesis de imágenes paramétricas, y la creación de archivos de resultados.

En este trabajo, la evaluación del sistema fue realizada en una aplicación particular: estudio comparativo de diversos tipos de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral humano normal y patológico (enfermedad de Parkinson). Este estudio nos permitió cuantificar y localizar las neuronas preferencialmente lesionadas en diferentes regiones neuroanatómicas en el sujeto parkinsoniano. Se hizo notar en el curso de este estudio, que un nuevo parámetro parecería estar correlacionado con la muerte de estas neuronas: la orientación de los cuerpos neuronales en la sustancia nigra.

Este trabajo fué realizado en la Sociedad BIOCUM (Les Ulis, FRANCE) en estrecha colaboración con la Unidad 289 del INSERM (Institut de Santé et de Recherche Médicale, Paris, FRANCE).

INTRODUCCION

Dentro del contexto de las afecciones del sistema nervioso central en el hombre, las enfermedades degenerativas constituyen un verdadero problema social, dada su frecuencia de aparición (enfermedad de Alzheimer 2.5/1000; enfermedad de Parkinson 1.5/1000; esclerosis lateral amiotrófica 6/100000, etc). Estas enfermedades son particularmente preocupantes dada su evolución progresiva e inexorable, dada la ausencia de una terapia sintomática (con

excepción de la L-Dopa en el caso de la enfermedad de Parkinson), y de la invalidación motora y/o intelectual que éstas producen. Las consecuencias sociales de estas enfermedades son de gran importancia, por lo que actualmente un gran esfuerzo de investigación biomédica se realiza dentro de este contexto. Sin embargo, la descripción precisa de las lesiones cerebrales en estas enfermedades degenerativas es aún incompleta, su causa es desconocida.

La etiología de estas enfermedades es hoy una gran incógnita. La investigación básica a este respecto se apoya básicamente en técnicas histológicas, es decir, en el estudio microscópico de cortes de cerebro humano a manera de detectar los parámetros que podrían conllevar a la comprensión de la muerte neuronal en estas enfermedades degenerativas.

El Procesamiento Digital de Imágenes clásico dentro del contexto de la citología ha contribuido considerablemente a la automatización del análisis de una preparación (por ejemplo de un frottis, conteo de glóbulos, etc). En efecto, la relativa simplicidad de las imágenes hematológicas que muestran elementos celulares bien separados, permitió la expansión de sistemas totalmente automáticos, sin embargo la discriminación de artefactos y de ruido sigue siendo un gran problema que introduce una cantidad importante de "falsos positivos" (PRESTON, 1980).

La complejidad de las preparaciones histológicas y de las necesidades dentro de ese campo, explican la aplicación relativamente limitada de técnicas automatizadas para el diagnóstico en anatomopatología. En efecto, el análisis automático de preparaciones histológicas presenta diversas dificultades. La información de diagnóstico de un corte histológico se presenta a dos niveles: a nivel de la estructura del tejido, y a nivel de la célula misma. El análisis de un corte histológico requiere entonces de la exploración a alta resolución espacial (análisis celular) de una superficie importante del corte (análisis de contexto, estructura del tejido). Hoy en día no existe todavía una solución general al problema de la automatización total del análisis en histología (PRESTON, BARTELS, 1988).

Desde hace más de 20 años, diferentes autores han intentado utilizar el procesamiento digital de imágenes (PDI) para aligerar la carga del operador. En efecto, el histólogo se confronta clásicamente a 5 problemas:

- La gestión de cambios de escala: a baja amplificación no se ven los detalles, a fuerte amplificación se pierde la noción de contexto, de estructura y de posición.

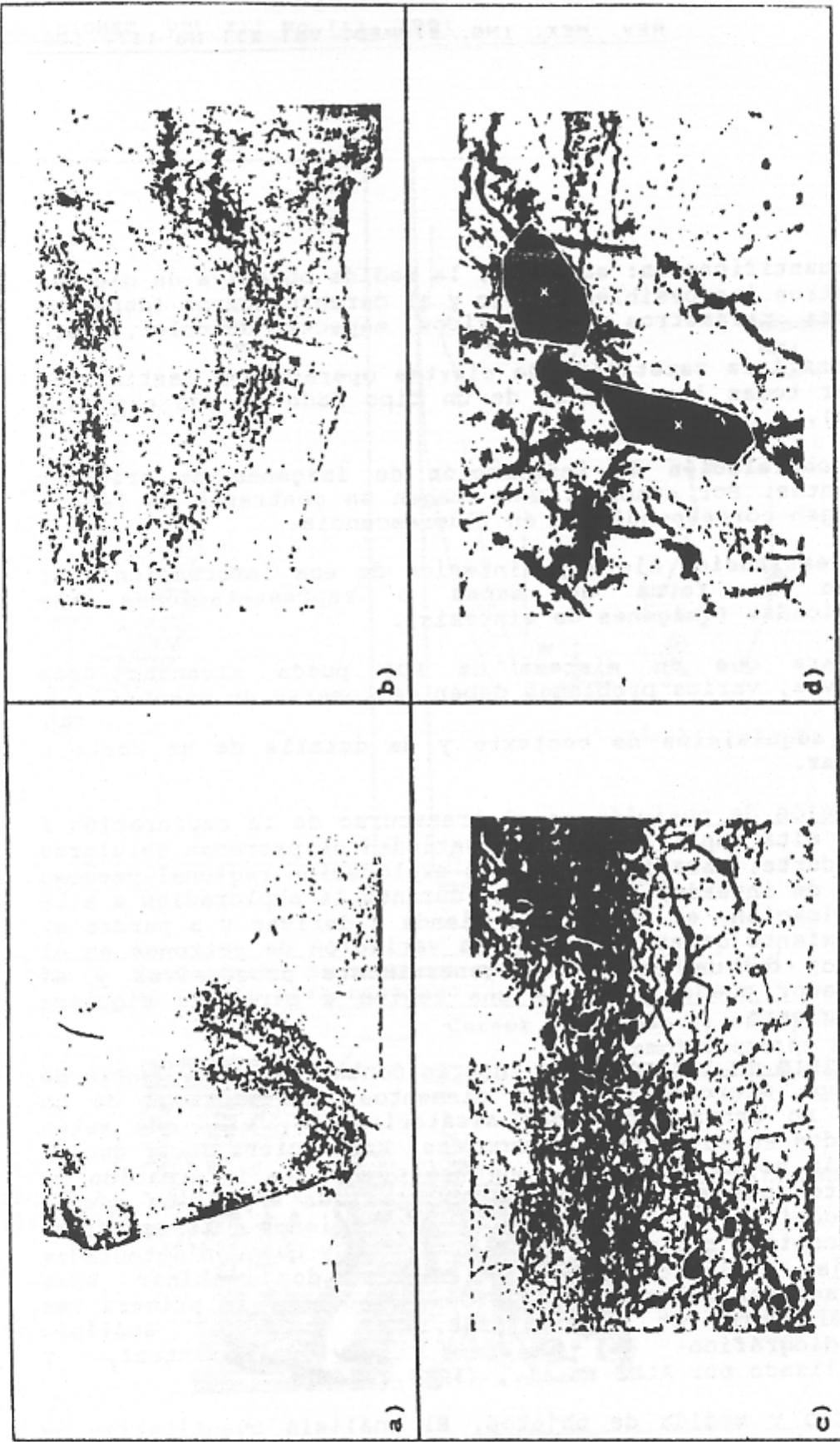


Fig. 1 Segmentación de neuronas a alta amplificación y visualización cartográfica a baja amplificación. (Regiones de interés).

- La cuantificación: es decir, la medida objetiva de ciertos parámetros inaccesibles al ojo y al cerebro humano (densidad luminosa, parámetros morfométricos, espectro de color, etc).
- El análisis repetitivo de ciertas operaciones fastidiosas (contar todas las células de un tipo dado en uno o varios cortes).
- La correlación de información de imágenes de orígenes diferentes. Por ejemplo, una imagen en contraste de fase y su imagen correspondiente en fluorescencia.
- La restitución clara y sintética de esa información, por ejemplo en forma de mapas o representaciones más sofisticadas (imágenes de síntesis).

Para que un sistema de PDI pueda alcanzar esos objetivos, varios problemas deben de tomarse en cuenta:

a) La adquisición de contexto y de detalle de un corte a explorar.

- Relación de posición en el transcurso de la exploración a baja y alta amplificación. La variedad de patrones celulares en un corte, hace imposible una exploración regional precisa (zonas de interés). En efecto, durante la exploración a alta amplificación, el observador tiende a derivar y a perder el conocimiento de su posición. La variación de patrones en el interior de un corte son generalmente progresivos y el observador puede pasar de una región a otra sin siquiera darse cuenta.

- Análisis en las zonas de interés contenidas o no dentro de un campo microscópico. Los elementos constitutivos de un tejido no están repartidos aleatoriamente, sino que están agrupados en estructuras conocidas. Esto quiere decir que el análisis no se hace sin tener en cuenta la información de contexto (que está generalmente repartida en varios campos microscópicos), es decir, informaciones topográficas macroscópicas que constituyen el tejido y que son detectadas a baja amplificación. El interés de combinar esas informaciones de contexto fué demostrado por la primera vez por BISCONTE et al., (1968,1974) para el análisis autoradiográfico del sistema nervioso central, y generalizado por ALBE et al., (1982,1984).

- Conteo y medida de objetos. El análisis cuantitativo de manera visual en un campo dado es complicado si los objetos son cuantiosos y variados. Su conteo puede ser facilitado con la ayuda de una retícula integrada en el microscopio. Los límites están dados por la fatiga del observador y por la lentitud del proceso si el conteo y la medida deben realizarse sobre varios campos y acumular.

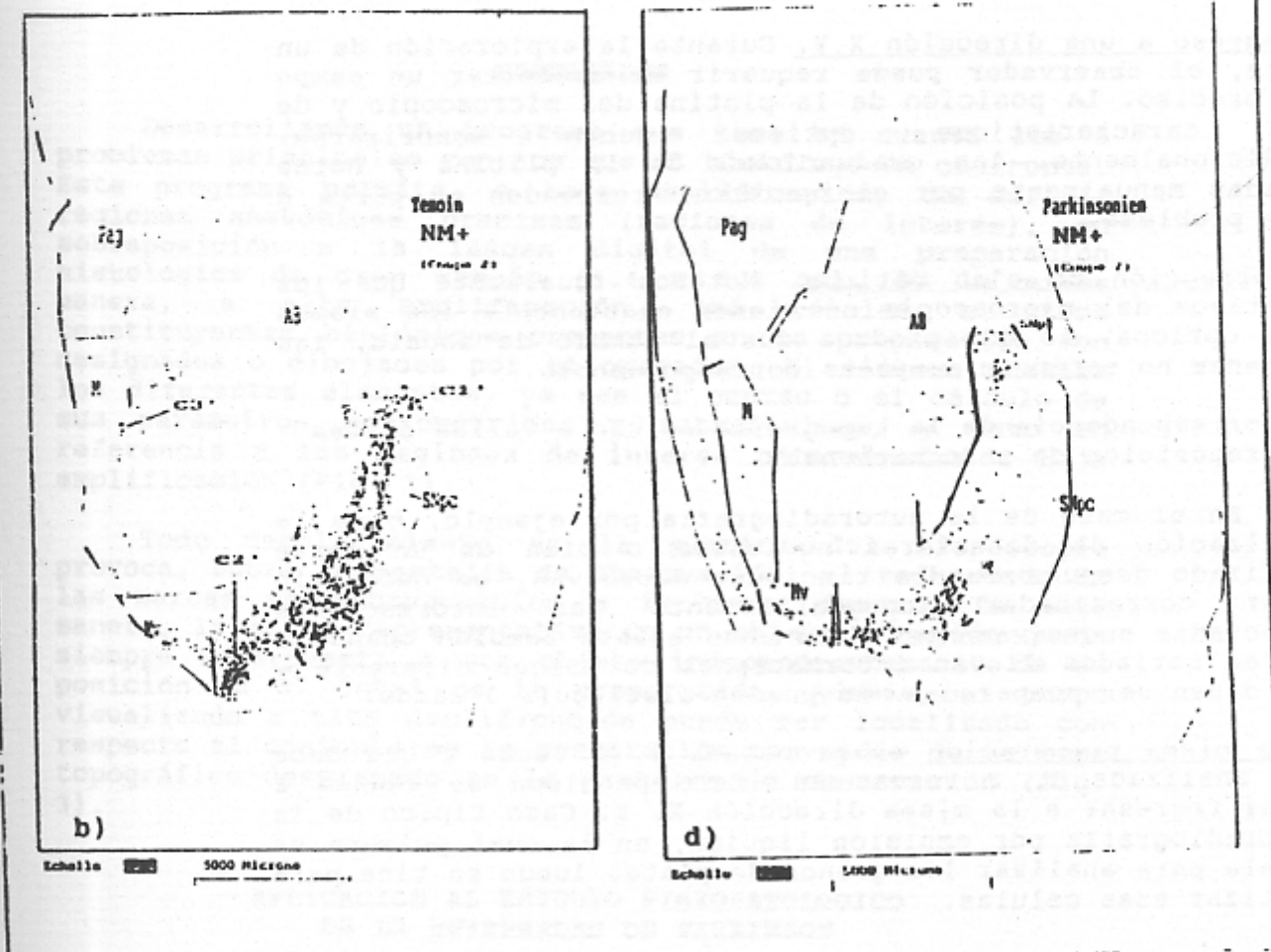


Fig. 2 Cartografía de neuronas con neuromelanina (NM⁺) en sujeto parkinsoniano.

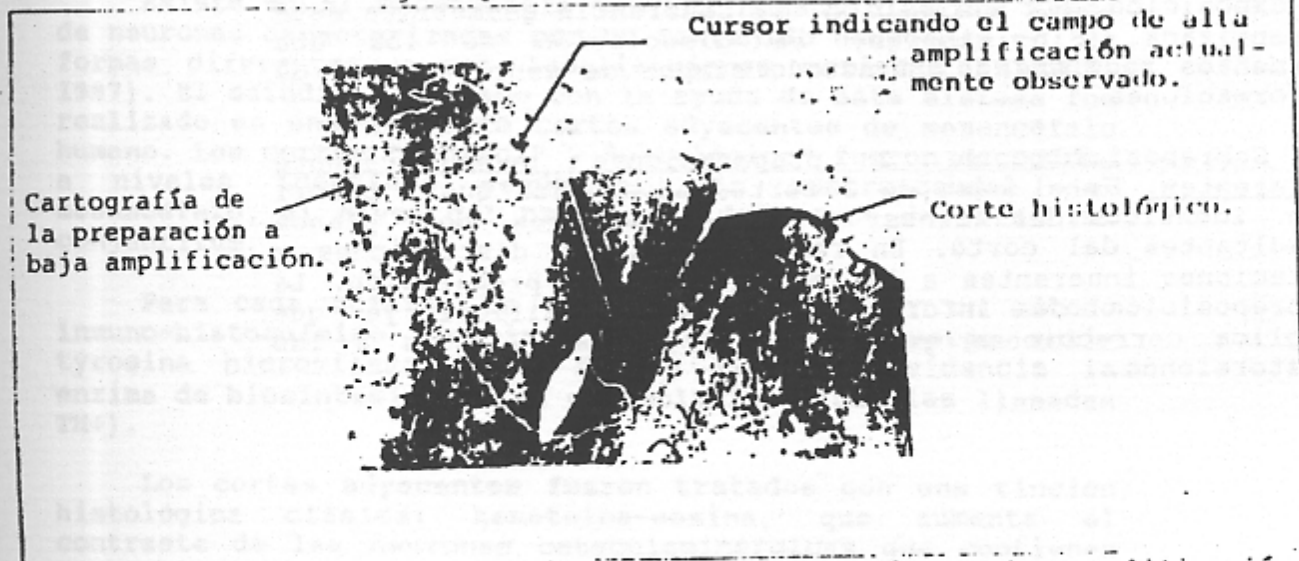


Fig. 3 Localización del campo de visualización en alta amplificación, con la ayuda de la cartografía completa de la preparación.

- Regreso a una dirección X,Y. Durante la exploración de un corte, el observador puede requerir de encontrar un campo muy preciso. La posición de la platina del microscopio y de las características ópticas deben memorizarse. Tradicionalmente, las graduaciones de la platina y notas tomadas manualmente por el operador, responden en parte a este problema.

- Corrección de ejes ópticos. Notemos igualmente que los objetivos del microscopio no tienen exactamente los mismos ejes ópticos, lo que produce que al cambio de escala, las imágenes no estén en completa correspondencia.

b) Correspondencia de la topografía de uno o varios cortes (sobreposición de informaciones).

En el caso de la autoradiografía por ejemplo, o de la utilización de detectores nucleares o bien de un corte analizado después de dos tinciones sucesivas, es necesario hacer corresponder topográficamente las informaciones detectadas sucesivamente. Este caso existe también cuando 2 cortes seriados llevan informaciones de origen diferente y que deben ser comparadas. Se pueden distinguir 3 casos:

- La misma preparación es procesada 1, 2 veces y que debe ser analizada 1, 2 veces más. Este problema se reduce a poder regresar a la misma dirección X, Y. Caso típico de la autoradiografía por emulsión líquida, en la cual primero se revela para analizar los granos de plata, luego se tiñe para analizar esas células.

- La misma preparación con detector separado. Caso de cortes finos y de films fotográficos sobrepuestos durante el tiempo de exposición. Por definición, la coherencia geométrica está garantizada. Sin embargo, la disociación de los dos elementos requiere de un método simple de sobreposición de informaciones.

- Sobreposición de 2 preparaciones geoméricamente diferentes. Es el caso de 2 cortes adyacentes que a priori son idénticos al menos al nivel de los dos planos resultantes del corte. En realidad existen distorsiones y rotaciones inherentes a la fase de corte y preparación. La sobreposición de informaciones resulta difícil ya que implica correcciones geométricas complejas ligadas a las distorsiones.

RESULTADOS

Desarrollamos un programa que toma en cuenta los 5 problemas principales con los que el histólogo se confronta. Este programa permite, a baja amplificación, de definir regiones anatómicas precisas (regiones de interés), en sobreposición a la imagen digital de una preparación histológica de gran tamaño (6.4 x 6.4 cm). De la misma manera, a alta amplificación, las células u otros constituyentes biológicos presentes en la preparación son designados o dibujados por el operador. El sistema analiza los diferentes elementos, ya sea el contéo o el cálculo de sus parámetros morfométricos y fotométricos, y esto en referencia a las regiones de interés determinadas a baja amplificación (Fig. 1).

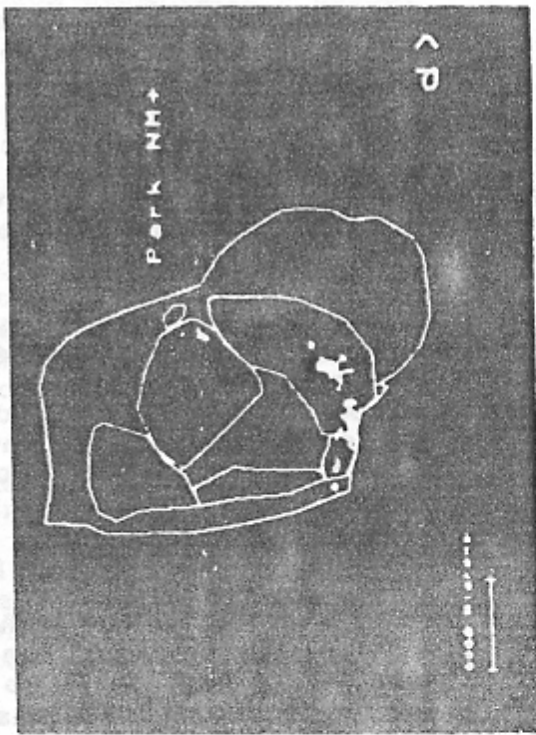
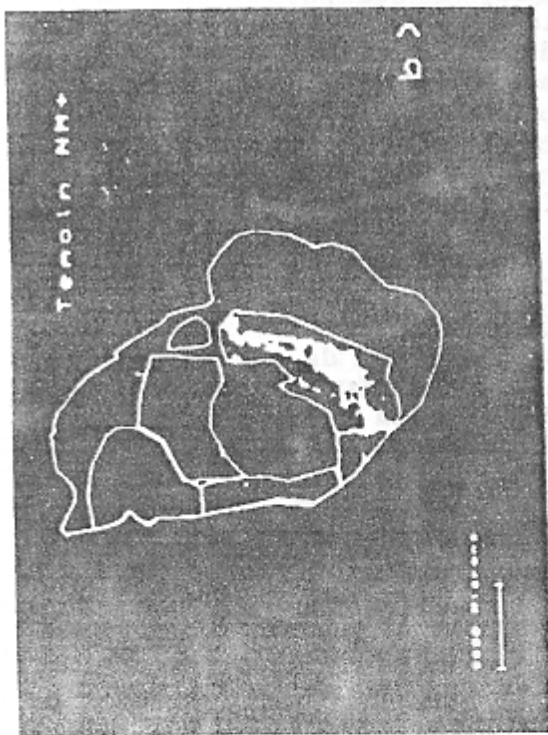
Todo desplazamiento de la platina del microscopio provoca, sobre la pantalla de observación, el refrescado de las marcas en sobreposición a la nueva imagen. De esta manera, la marca representativa de un objeto o región queda siempre superpuesta a ese objeto independientemente de su posición en el total de la preparación. Además, el campo visualizado a alta amplificación puede ser localizado con respecto al conjunto de la preparación por medio de un mapa topográfico desplegado en la pantalla de observación (Fig. 3).

APLICACION AL ESTUDIO FISIOPATOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

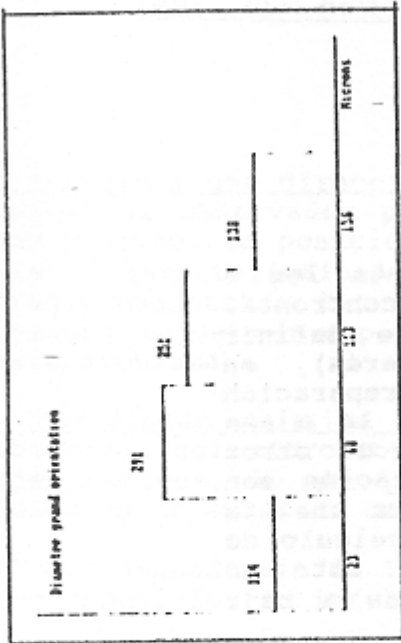
Existe en el mesencéfalo ventral humano diversos tipos de neuronas caracterizadas por un contenido neuroquímico, de formas diferentes y con localizaciones variadas (HIRSCH, 1987). El estudio elaborado con la ayuda de este sistema fue realizado en una serie de cortes adyacentes de mesencéfalo humano. Los cortes "control" y "patológico" fueron escogidos a niveles idénticos según el eje rostro-caudal del mesencéfalo, al nivel del nacimiento del cruce del brachium conjunctivum.

Para cada sujeto, un corte fue teñido por un método inmuno-histoquímico con la ayuda de un anticuerpo anti-tyrosina hidroxilasa. Este método puso en evidencia la enzima de biosíntesis de las catecolaminas (células llamadas TH+).

Los cortes adyacentes fueron tratados con una tinción histológica clásica: hemateína-eosina, que aumenta el contraste de las neuronas catecolaminérgicas que contienen neuromelanina (células llamadas NM+).



TEMOIN



PARKINSONIEN

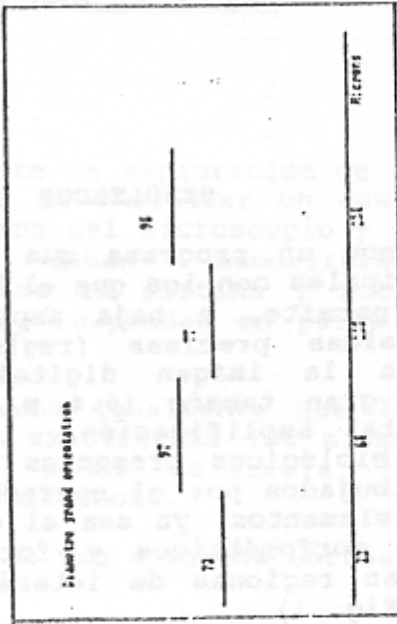


Fig. 4 Láminas parafóricas de densidad espacial.

Fig. 5 Histogramas de distribución de orientaciones de eje mayor de las neuronas en la región S. NIGRA.

Con la ayuda de este sistema, se trazaron cartografías que se muestran en la Fig. 2. En estas figuras se puede constatar que el número de neuronas catecolaminérgicas (TH+) en la sustancia nigra, ha disminuido en el sujeto parkinsoniano. Además, aparece que la desaparición es más importante para las neuronas melanizadas que para las que no lo son. Esto sugiere que la enfermedad de Parkinson afecta de manera preferencial las neuronas catecolaminérgicas de neuromelanina (HIRSCH et al, 1988).

Con estos datos, creamos con nuestro sistema las imágenes paramétricas de densidad espacial que muestra la Fig. 4. En estas imágenes de síntesis, el nivel de gris corresponde a la densidad espacial de las neuronas. Se puede observar aquí que la repartición de neuronas restantes en el corte patológico no es homogénea, sugiriendo una preservación preferencial en subregiones neuroanatómicas.

Esto parece indicar que la melanización o la no melanización de las neuronas no es el único factor que contribuye a la muerte neuronal. Numerosas preguntas se formulan: la cantidad de neuromelanina en cada neurona es un factor determinante? La zonas de proyección de esas neuronas tiene que ver con la muerte neuronal? Su tamaño, forma, orientación están en relación con la vulnerabilidad preferencial? Existe una sustancia química tóxica expresándose más en una población de neuronas que en otra? o bien una sustancia neurotrópica protegería mas a una población que a otra?

Para encontrar un posible camino que nos lleve a contestar algunas de esas preguntas, llevamos a cabo un estudio morfométrico de las neuronas de la sustancia nigra. Se calculó para cada neurona: superficie, perímetro, factor de forma, diámetro equivalente, diámetros de Ferét y sus orientaciones. Sólo los histogramas representativos de los parámetros de orientación del cuerpo celular muestran una diferencia significativa Fig. 5. En efecto, en el sujeto control, se observan dos clases de neuronas: aquellas teniendo una orientación comprendida entre 40 y 120 grados (mas bien verticales), y aquellas teniendo la orientación complementaria (más bien horizontales). La clase de neuronas verticales tiende a desaparecer de manera significativa en el sujeto parkinsoniano (por un factor de 2) (CORKIDI, 1989).

La orientación de las neuronas podría explicar, por su lugar de proyección, que el fenómeno patológico primario tenga su origen en diferentes lugares del cuerpo estriado? La clase preservada preferencialmente corresponde topográficamente con las neuronas TH+NM- (preferencialmente preservadas en el sujeto parkinsoniano)?

Estos resultados preliminares del estudio comparativo entre un sujeto control y un sujeto parkinsoniano abre el camino hacia un estudio mas completo en busca de la confirmación estadística de esta nueva constatación.

BIBLIOGRAFIA

BISCONTE J.C., FULCRAND J., MARTY R.- Analyse radioautographique dans le système nerveux central par photométrie et cartographie combinées. C.R. Soc. Biol., tome 161, 12, 2178-2182 (1968).

CORKIDI G.- Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: HISTO 200. (Application à l'étude physiopathologique de la maladie de Parkinson). Thèse de Doctorat de l'Université PARIS XII (1989).

HIRSCH E.- Approche physiopathologique de la maladie de Parkinson. Thèse de Doctorat de l'Université PARIS 6, (1987).

HIRSCH E., GRAYBIEL A.M., AGID Y.- Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. Nature, 334, 345-348 (1988).

PRESTON K.- Automation of the analysis of cell images. Anal. Quant. Cytol., 2, 1-14 (1980)

PRESTON K., BARTELS P.- Automated Image Processing for Cells and Tissue. (Reprinted from Progress in Medical Imaging), Springer-Verlag New York Inc. (1988)

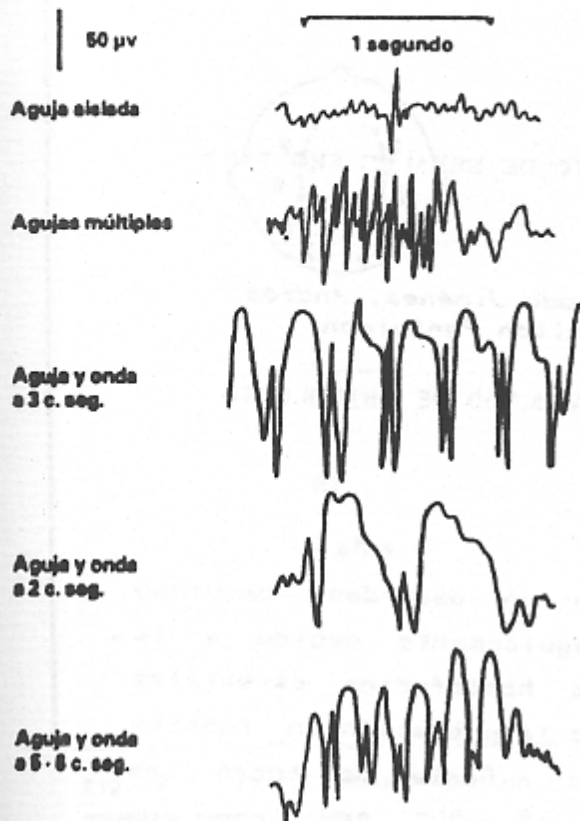


Fig. 2. - Anormalidades transitorias del tipo observado comúnmente en los registros EEG en los intervalos entre ictas.

DESCRIPCION DE DOS METODOS PARA LA DETECCION DE ESPIGAS EPILEPTICAS:

1.- Significado de la actividad iónica en epileptogénesis.- Aunque muchas formas de epilepsia exhiben similitudes en el fenómeno del EEG, sus bases químicas son diferentes.

Muchos investigadores han demostrado que al ocurrir la actividad del ataque ocurre un incremento en la concentración de K^+ en el fluido extracelular y también una disminución de la concentración de Ca^{++} (9). Estos hallazgos fueron obtenidos usando varios métodos de inducir el ataque epiléptico.

El significado de esta actividad iónica en epileptogénesis, es la razón por la cual estos autores seleccionaron un método para dar el "aviso" de este "detector" de un ataque de epilepsia (10).

Por lo tanto, vemos que la actividad iónica referida a la transición de eventos ictales, parece que es un factor común en los diferentes tipos de ataques.

Método usado en este sistema.- El sistema diseñado por Robilland, fué modificado para utilizarse en este trabajo de investigación (10). El sistema se basa fundamentalmente en el uso