

# Análisis morfológico de muestras de HUVEC empleando funciones basadas en geometría integral

## Morphological analysis of HUVEC samples with integral geometry based functions

Miriela Escobedo Nicot<sup>1\*</sup>, Silena Herold García<sup>1</sup>, Ligia Ferreira Gomez<sup>2</sup>, Camila Machado<sup>3</sup>, Elisângela Monteiro Pereira<sup>4</sup>, Wilkie Delgado Font<sup>1</sup>

**Resumen** El análisis morfológico de estructuras en imágenes digitales de muestras biológicas reviste gran interés para el mundo científico. En la rama de la medicina puede ofrecer resultados muy útiles en el estudio de diversas enfermedades o condiciones en el ser humano, así como en la valoración de los posibles efectos de diferentes tipos de intervenciones como agentes farmacológicos. En este trabajo nos centramos en la posibilidad de obtener una clasificación morfológica eficiente en imágenes de culturas *in vitro* bidimensionales de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) bajo la influencia de la  $\beta_2$  - glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI) para estudio de la angiogénesis. Se muestran los excelentes resultados obtenidos en la clasificación supervisada de células en circulares, deformadas elongadas (elongadas) o deformadas poco elongadas (otras deformaciones), empleando funciones basadas en geometría integral para el análisis morfológico. Los bordes celulares se detectaron empleando métodos de contornos activos y se utilizó el método k-NN para clasificación con un proceso de validación cruzada de  $5 \times 1$  para estimación del error. Las muestras fueron preparadas por especialistas, que además determinaron los tipos de células de cada clase.

**Abstract** Morphological analysis of structures in digital images of biological samples is of great interest to the scientific world. In the branch of medicine can provide useful results in the study of various diseases or conditions in humans, as well as the assessment of the possible effects of different types of interventions such as pharmacological agents. In this paper we focus on the possibility of obtaining an efficient morphological classification in images of *in vitro* two-dimensional endothelial cells of veins of umbilical cord (HUVEC) under the influence of  $\beta_2$  - glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) for studying angiogenesis. The excellent results obtained in the supervised classification of cells in circular, deformed elongated (elongated) and deformed slightly elongated (other deformations), using integral geometry-based for morphological analysis are shown. Cell edges were detected using methods of active contours and k-NN classification method with a  $5 \times 1$  cross-validation process for error estimation was realized. Samples were prepared by personnel who are determined cell types for each class.

### Palabras Clave

Clasificación de formas — Geometría integral — Angiogénesis — HUVEC

<sup>1</sup> Departamento de Computación, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. miri@uo.edu.cu, silena@uo.edu.cu, wilkie@uo.edu.cu

<sup>2</sup> Departamento de Análisis Clínicos y Toxicológicos, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil. Ifgomes@usp.br

<sup>3</sup> Departamento de Fisiopatología Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. camilamachado@usp.br

<sup>4</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. elimonteiro@gmail.com

\*Autor para Correspondencia

## Introducción

Uno de los procesos mediante el cual se originan los vasos sanguíneos es la angiogénesis. Este es una secuencia bien orquestada de eventos que involucran la migración y proliferación de células endoteliales, la degradación selectiva de componentes de los tejidos de la pared vascular, la forma-

ción de nuevos vasos capilares (brotos), la formación de lazos (anastomosis) y crucialmente el establecimiento del flujo de sangre a través de la nueva red vascular [1]. Para el estudio de la angiogénesis y la anti-angiogénesis existen diferentes modelos experimentales registrados en la literatura científica, los mismos según su complejidad pueden clasificarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* [2]. En particular las investigaciones

de la angiogénesis *in vitro*, han sido desarrolladas a partir de células endoteliales aisladas cultivadas de forma micro o macro vascular [3]. Endotelios de diversos orígenes han sido empleados: células endoteliales micro vasculares dérmicas humanas (HDMEC por sus siglas en inglés), células endoteliales aórticas humanas (HAEC por sus siglas en inglés) y quizás las más usadas, las células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC por sus siglas en inglés), que han sido cultivadas con éxito desde 1973 [4].

Los ensayos *in vitro* posibilitan el estudio a partir de imágenes de microscopía, de los procesos de migración y proliferación de células endoteliales y organización bidimensional o tridimensional de estructuras capilares, lo cual permite en muchos casos identificar el conjunto de posibles efectos de un tipo de intervención (proteínas, células, agentes farmacológicos) o de los eventos moleculares y/o celulares en la angiogénesis. En los últimos años se han realizado diversos estudios dirigidos a la automatización de la caracterización y/o cuantificación de estos procesos involucrados en la angiogénesis a partir de culturas de células endoteliales *in vitro* [15], [6], [7], [8], [9]).

Otros estudios se han centrado en utilizar el análisis morfológico de células endoteliales *in vitro* debido a las diferentes morfologías que aparecen en estas culturas y que pueden ser correlacionadas con la aparición de los fenotipos celulares *tip* y *stalk*. Las células tipo *tip* se caracterizan por su comportamiento migratorio y definen, a través de las alteraciones del microambiente, cuál será la ruta del crecimiento del broto vascular [10]. La morfología de este tipo de células puede asociarse con formas elongadas. Por otra parte las células tipo *stalk* son altamente proliferativas, garantizando la estabilidad y la formación del lumen vascular en desarrollo [11]. La morfología de este tipo de células puede asociarse con formas circulares.

En el análisis morfológico cuantitativo de estructuras en imágenes digitales para estudio de la angiogénesis es fundamental el proceso de extracción de características de interés en el borde analizado para el posterior empleo de algoritmos de cuantificación o de clasificación adecuados. En [12] los autores determinan el ancho y en ([13],[14]) la longitud y el tamaño de estructuras con forma de tubos capilares; en [15] se propone una metodología que a partir del uso de técnicas de morfología matemática, realiza la cuantificación de estructuras con forma de tubos capilares, uno de los parámetros analizados es la forma de las estructuras; en [16] se utiliza el análisis morfológico, específicamente la relación  $E_{je_{menor}}/E_{je_{mayor}}$ , para el estudio de las interacciones células tumorales/células endoteliales; en [17] se usa el análisis de forma de las HUVEC (en el sentido de elongadas o circulares usando el coeficiente de circularidad), bajo varias combinaciones de tensión de cizallamiento y presión hidrostática en microfluídos.

En estos trabajos, cuando se hace el análisis celular hasta las 24 horas de incubación, se estudian las alteraciones morfológicas haciendo una diferenciación en dos clases: circulares

y elongadas. A partir de las 48 horas de incubación, el análisis que se realiza permite solo el estudio de las estructuras con formas de tubos capilares, por ello sólo se usa en este caso cuan elongada es la estructura, además de la longitud y el tamaño de la misma.

Realizar el análisis de deformaciones celulares en muestras 2D a partir de las 24 horas de incubación permite sugerir el comportamiento precoz de las células ante el estímulo al cual están siendo expuestas, por ello resulta de interés en vez de hacer una diferenciación que divida solamente el conjunto en células circulares y elongadas, realizar una diferenciación que exprese diferentes niveles de deformación y que pueda ser correlacionada con los procesos de migración y proliferación celular, y la consiguiente aparición de los fenotipos *tip* y *stalk*.

Existen estudios en eritrocitos utilizando funciones descriptoras de contornos que realizan una diferenciación similar, o sea, a partir de varias clases. En [19] se emplea por primera vez en el análisis morfológico la función *soporte generalizada* definida en [20] y se proponen algunas variantes de la misma como descriptores de contornos. Esta función se basa en la conocida función soporte, frecuentemente empleada para describir figuras convexas, pero que en el caso de las figuras no convexas coincide con la envoltura convexa del conjunto, por lo que no es capaz de discriminar en determinados casos de no convexidad. La función soporte generalizada resuelve este problema y ofrece excelentes resultados en la clasificación de figuras no convexas en general según su forma. En [21] se utiliza esta función y algunas de las variantes propuestas en [19] para obtener representaciones matriciales de características del contorno de eritrocitos en muestras de sangre periférica, que permiten obtener nuevos descriptores de forma. Se introduce además una nueva función derivada de un resultado clásico de geometría integral, la fórmula de Crofton.

En este trabajo teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en [21] en la aplicación de funciones descriptoras de contornos basadas en la geometría integral para la clasificación supervisada de eritrocitos en muestras de sangre periférica fueron excelentes y además la semejanza en cuanto a los tipos morfológicos entre eritrocitos y HUVEC, se propone realizar el análisis morfológico para diferenciación celular en HUVEC en tres tipos: células circulares, células deformadas elongadas (elongadas) y células deformadas poco alargadas (otras deformaciones), empleando los descriptores que mostraron mejor desempeño en el estudio de eritrocitos. Se decidió usar tres clases en la clasificación celular para correlacionar los resultados con la aparición de los fenotipos celulares *tip* o *stalk*, para lo cual es de interés separar en las células elongadas las que tengan mayor o menor grado de elongación, lo cual permite hacer una diferenciación más efectiva.

Se empleó además la transformada de Fourier para estudiar los descriptores obtenidos y reducir la dimensionalidad de los mismos. Para obtener los contornos de interés en este trabajo se emplearon métodos de evolución de contornos, denominados level sets. Se realizó un proceso de validación

cruzada de  $5 \times 1$  para estimación del error.

## 1. Métodos

### 1.1 Preparación de las muestras

Los estudios fueron conducidos con subfracciones del proceso de purificación que son ricas en monómeros de  $\beta_2$ GPI purificada, obtenidas por elución de la columna de Heparina Sefarosa después de filtración por membranas de acetato de celulosa, con poros de diámetro  $0,22 \mu\text{m}$  para eliminar la contaminación bacteriana y dilución en medio de cultura sin suero. Las células endoteliales en la concentración de  $2 \times 10^4$  células/ml, fueron colocadas en medio de cultivo RPMI 1640<sup>1</sup> suplementado con suero fetal bovino a 10 % en placas de 24 pozos, sobre cubreobjetos de vidrio con 13 mm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave. En cada pozo con las muestras, fue adicionado una concentración igual a  $30 \mu\text{g/ml}$  de la proteína. La incubación fue interrumpida a las 24 h y 48 h, para la observación del efecto de la proteína sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Las células adheridas a los cubreobjetos de vidrio fueron teñidas con una mezcla de Hematoxilina y Azul de Metileno utilizada en laboratorios de Hematología (May-Grunwald-Giemsa), para un resultado de patrón suave con buena transparencia citoplasmática.

### 1.2 Captura de las imágenes

Fueron obtenidas imágenes de distintos campos de 8 muestras de HUVEC en ensayos 2D, a partir de una cámara Point Grey (GS3-U3-1455M) con objetivo de aumento de  $3,2 \times$ . En la etapa de estandarización fueron obtenidas también imágenes con un objetivo de  $10 \times$ , pero se optó por utilizar las imágenes con aumento menor y campo más amplio. Las imágenes obtenidas son de  $1384 \times 1036$ . Para cada lámina, que incluyen tres pozos de cultivo, fueron capturadas entre 17 y 22 imágenes de campos secuenciales sobre un diámetro determinado en la muestra. Esta manera de manipulación de las muestras permitió estandarizar el procedimiento de captura para todo el conjunto de muestras y verificar la distribución de células sobre la lámina.

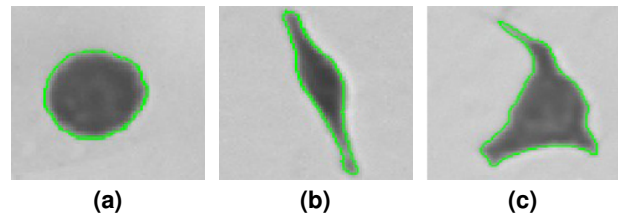
Un especialista seleccionó las células a ser usadas, determinando cuáles de las células presentes en las imágenes obtenidas son circulares, deformadas alargadas (elongadas) y deformadas poco alargadas (otras deformaciones). Estas células fueron aisladas de forma manual en imágenes individuales de  $114 \times 114$  píxeles, con el objetivo de aplicar algoritmos de clasificación supervisada. En total fueron obtenidas 300 imágenes individuales, 100 para cada clase definida.

### 1.3 Segmentación

La segmentación de las imágenes se realizó a partir de métodos basados en la evolución de contornos. Los contornos activos o modelos deformables, como también se les conoce en la literatura, fueron propuestos con efectividad por primera vez por Kass y Terzopoulos [22]. El concepto de contorno

activo se genera a partir de la idea de adaptar dinámicamente contornos o superficies bajo la influencia de fuerzas externas e internas, siguiendo propiedades físicas como la elasticidad, suavidad, dureza y otras. La evolución espacial del contorno activo de una curva inicializada depende de la imagen y/o de la parametrización de la curva. La dinámica del contorno activo se detiene cuando éste alcanza los límites del objeto y la curva corresponde a una curva de energía mínima.

Dentro de la familia de los contornos activos, específicamente se utilizaron los contornos activos geométricos. Estos están basados en la teoría de la evolución de la curva por su curvatura media y fueron propuestos por Osher y Sethian en [23]. En esta familia de contornos activos, la dinámica de la curva depende de su curvatura media y de la imagen. Los contornos activos geométricos se solucionan utilizando el método level set, el cual es una poderosa herramienta para estudiar el movimiento de interfaces conociendo un modelo de la velocidad normal de la interfaz. La aplicación de este método es efectiva debido a que responde bien frente a condiciones de ruido debido a su principio de funcionamiento. En la Figura 1, se muestran los resultados de la segmentación para los diferentes tipos de deformaciones valoradas.



**Figura 1.** (a) Célula circular, (b) célula deformada alargada y (c) célula deformada poco alargada.

### 1.4 Descriptores morfológicos

En esta sección se explicarán las funciones empleadas en esta investigación para caracterizar los contornos: la función soporte generalizada, una variante de la misma denominada soporte generalizada integrada ponderada y el descriptor de Crofton. En lo sucesivo,  $D$  denota un dominio compacto en  $\mathbb{R}^2$  de perímetro  $L$  y área  $F$ .

#### 1.4.1 Función Soporte Generalizada en $\mathbb{R}^2$

Entre las funciones empleadas para obtener propiedades cuantitativas referentes a una determinada forma o conjunto plano se encuentra la función soporte [24], que aunque ha sido definida para conjuntos planos en general, realmente es empleada frecuentemente para describir conjuntos convexos debido a que son determinados de forma única por la representación de la función soporte que les corresponda [25]. En el caso de los conjuntos no convexos la función soporte coincide con la función soporte de la envoltura convexa del conjunto, por lo que existen distintos conjuntos no convexos que tienen la misma función soporte. Una definición alternativa de la función soporte para conjuntos no convexos es la función soporte

<sup>1</sup>Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute.

generalizada, introducida en [20], y que es la que empleamos en este trabajo para describir formas no convexas.

Sea  $D$  un dominio compacto en  $\mathbb{R}^2$  de perímetro  $L$  y área  $F$ . Sea  $\sigma$  la longitud de la intersección  $D \cap L_1^2$ , donde  $L_1^2$  denota una línea en el plano  $\mathbb{R}^2$ . Si  $L_1^2 \cap \partial D \neq \emptyset$  y  $L_1^2 \cap \text{int} D = \emptyset$ , sea  $\sigma = 0$ . Denotamos por  $\sigma_M(\phi)$  el máximo de la longitud de  $L_1^2 \cap \text{int} D$  cuando  $\phi$  es fijo; y para  $l \geq 0$  y  $0 \leq \phi < 2\pi$ , se define:

$$r(l, \phi) = \min\{l, \sigma_M(\phi)\} \quad (1)$$

**Definición 1** Para  $\sigma \geq 0$ ,  $0 \leq \phi \leq 2\pi$ , la función soporte generalizada de  $D$  se define como:

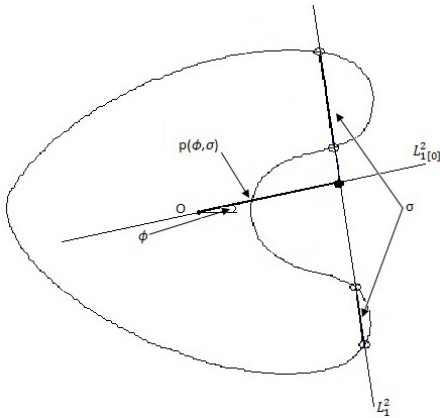
$$p(\sigma, \phi) = \begin{cases} \sup_{L_1^2} \{p : \text{Length}(L_1^2 \cap \text{int} D) \geq \sigma\}, & 0 \leq \sigma \leq \sigma_M(\phi) \\ 0, & \sigma > \sigma_M(\phi) \end{cases} \quad (2)$$

donde la línea  $L_1^2$  se caracteriza por la expresión  $x \cos \phi + y \sin \phi - p = 0$ .

En este caso  $p(0, \phi)$  es la función soporte conocida. En tal caso si  $D$  es convexo tenemos:

$$\int_0^{2\pi} p(0, \phi) d\phi = L \quad (3)$$

La Definición 1 se ilustra en la Figura 2, donde se observa que existen algunos valores de  $\phi$  para los que la función soporte generalizada de este conjunto no va a coincidir con la de su envoltura convexa para casi todos los valores de  $\sigma$ , lo que hace posible que esta función logre discriminar entre conjuntos no convexas con la misma envoltura convexa.



**Figura 2.** Función soporte generalizada.

La función soporte generalizada es muy buena descriptora para conjuntos compactos dado que tiene dos argumentos:  $\phi$  (ángulo que define la dirección perpendicular a la línea  $L_1^2$ ) y  $\sigma$  (longitud de la cuerda determinada por  $L_1^2 \cap \text{int} D$ ). Una vez que el primer argumento,  $\phi$ , se fija, la función soporte generalizada como función de su segundo argumento  $\sigma$  ofrece información acerca del ancho de la figura a lo largo de la dirección perpendicular a  $\phi$ . Si se fija  $\sigma$ ,  $p(\sigma, \phi)$  nos dice

en qué direcciones el segmento o conjunto de segmentos de longitud  $\sigma$  están contenidos en la figura, y si es el caso nos dice la distancia a la que se encuentran ubicados desde el origen de coordenadas fijado, que en este trabajo se está tomando siempre como el centroide o centro de masa de la figura analizada.

#### 1.4.2 Función Soporte Generalizada Integrada Ponderada

Esta función es una variante de la anterior y fue propuesta en [26]. Sólo depende de un parámetro, el ángulo  $\phi$ , al igual que la función soporte, pero a diferencia de esta logra discriminar entre un conjunto y su envoltura convexa. Una posibilidad pudiera ser:

$$Q(0, \phi) = \int_0^{\sigma_M(\phi)} p(\sigma, \phi) d\sigma. \quad (4)$$

Pero en lugar de esto es más apropiado considerar una versión ponderada de  $Q(0, \phi)$  que plantea lo siguiente:

**Definición 2** Dado un dominio plano compacto  $D$  y  $0 \leq \phi < 2\pi$ , definimos la función soporte generalizada integrada ponderada como

$$W(\phi) = \frac{\sigma_M(\phi)}{\sigma_M} Q(0, \phi) = \frac{\sigma_M(\phi)}{\sigma_M} \int_0^{\sigma_M(\phi)} p(\sigma, \phi) d\sigma. \quad (5)$$

Dado que  $Q(0) = \int_0^{2\pi} Q(0, \phi) d\phi$  es una medida que, en el caso convexo, coincide con  $\pi F$ , distintos conjuntos compactos pueden tener la misma función  $Q(0, \phi)$ . Sin embargo esta función soporte generalizada integrada ponderada permite diferenciar estos casos al considerar dentro de la función un valor que representa a la cantidad de valores de  $\sigma$  existentes para cada ángulo  $\phi$ .

#### 1.4.3 Descriptor de Crofton

En [21] se introduce un nuevo descriptor basado en principios de geometría integral [20, 27]. Considerando  $L_1^2$  una línea en el plano determinada por:

$$x \cos \phi + y \sin \phi - p = 0,$$

la función soporte de  $D$  se define como:

$$p(\phi) = \sup_{L_1^2} \{p : L_1^2 \cap D \neq \emptyset\}. \quad (6)$$

Dada una línea  $L_1^2$ , sea  $\sigma(\phi, p)$  la longitud de la intersección  $D \cap L_1^2$ . Consideremos la integral:

$$c(\phi) = \int_0^{p(\phi)} \sigma(\phi, p) dp. \quad (7)$$

El principio de Cavalieri para el caso de dos dimensiones [28] plantea que  $c(\phi) + c(\phi + \pi) = F$ , para cada  $\phi \in [0, 2\pi)$ . De aquí podemos derivar una nueva función para describir formas, tomando un valor pequeño  $\rho \geq 0$  que se fija, de tal forma que  $\rho \leq p(\phi)$ ,  $\forall \phi \in [0, 2\pi)$ , entonces:

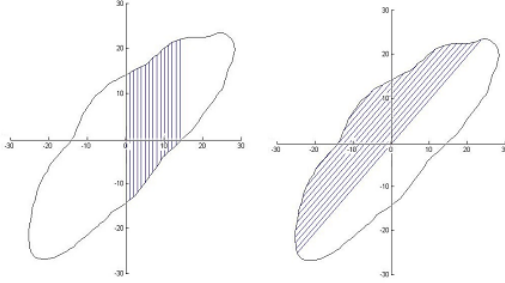
**Definición 3** Dado  $\rho$ , el descriptor de Crofton está definido como:

$$c_\rho(\phi) = \int_0^\rho \sigma(\phi, p) dp. \quad (8)$$

Para una imagen digital  $c_\rho(\phi)$  es aproximado por sumas:

$$c_\rho(\phi) \approx \Delta\rho \sum_{i=0}^n \sigma(\phi, i\Delta\rho), \quad (9)$$

donde  $\Delta\rho = \rho/n$ , (ver Figura 3).



**Figura 3.** Descriptor de Crofton:  $c_\rho(\phi)$  representa el área sombreada de  $D$  para  $\phi = 0$  y  $\phi = 3\pi/4$ , respectivamente.

#### 1.4.4 Transformada de Fourier

Muchas funciones para descripción de formas dependen en gran medida del tamaño de la forma o del punto inicial considerado en el contorno. Para evitar esta dependencia se emplean características asociadas a la forma pero independientes del punto de inicio o del tamaño, como las que aporta la aproximación de la función de representación del contorno por series de Fourier [24], que hemos utilizado en este caso para garantizar estos objetivos y además reducir dimensionalidad de los descriptores obtenidos.

Si  $f(\phi)$  es una función periódica que es integrable en  $[0, 2\pi]$  y que describe el contorno de un conjunto plano  $D$  se tiene:

$$f(\phi) \approx \frac{a_0}{2} + \sum_{k=1}^p (a_k \cos(k\phi) + b_k \sin(k\phi)) \quad (10)$$

para un valor dado natural  $p \geq 0$ .

A partir de las conocidas características de la transformada de Fourier los coeficientes  $A_k = \sqrt{a_k^2 + b_k^2}$ ,  $k = 1, \dots, p$  son invariantes al punto de inicio escogido, es decir, a las rotaciones de  $D$ . Por otro lado el coeficiente  $a_0$  es considerado un parámetro de tamaño, por lo que los valores  $A_k/a_0$ ,  $k = 1, \dots, p$  pueden ser empleados como parámetros invariantes a escala para describir la forma.

Las funciones (5) y (7) son funciones unidimensionales, en estos casos es usada la aproximación de Fourier 1D. Para la función soporte generalizada (2) se consideró un conjunto de valores fijos de  $\sigma$ :  $0, \Delta l, 2\Delta l, \dots, n\Delta l$  y luego se aplicó la aproximación de Fourier 1D a la función  $p(\sigma, \phi)$ , como una función de  $\phi$  para cada  $\sigma$ .

## 2. Resultados y discusión

### 2.1 Descripción de los experimentos realizados

Para los objetos de cada clase se seleccionó el origen como su centro de masa y fueron aplicados los descriptores explicados anteriormente. Fueron usadas aproximaciones discretas para cada función (Ver Ecuación 9),  $\Delta l = 1$  y  $\Delta\phi = 1$ . El número de coeficientes de Fourier usado fue 5 para todas las funciones, de forma tal que el vector obtenido para todos los casos es 5-dimensional. Para la función  $p(\sigma, \phi)$  la cantidad de valores de  $\sigma$  detectados por la función no es el mismo para todas las clases y depende en cada caso del tamaño de la región examinada. En este estudio, los valores de  $\sigma$  detectados para las células valoradas, varían de 8 a 65, y para la función  $p(\sigma, \phi)$  el número de valores de  $\sigma$  considerados fue  $N = 8$ , dando a lugar a un vector característico de  $5 \times 8 = 40$ .

Después de obtenidos los diferentes vectores característicos, para todos los casos se usó el algoritmo de clasificación supervisada k-NN ([29],[30]). Fueron considerados dos vecinos y como métrica de distancia la distancia Euclídea. Para validar el desempeño de la clasificación, fue realizado un proceso validación cruzada de  $5 \times 1$  para estimación del error [31]. El conjunto de imágenes fue particionado en 5 subconjuntos y fueron realizadas 5 rondas de validación cruzada. En cada ronda, 4 subconjuntos fueron usados como datos de entrenamiento y el otro subconjunto fue usado como dato de validación. Los resultados de la validación fueron promediados.

Para todas las clases fueron obtenidos los valores de sensibilidad, precisión y especificidad, medidas de calidad que son extraídas a partir de la matriz de confusión [32]. La sensibilidad (True Positive Rate (TPR) por sus siglas en inglés) es la proporción de objetos que están clasificados dentro de la clase  $C_i$ , de entre todos los objetos que realmente son de la clase  $C_i$ . La precisión (P) es la proporción de objetos que realmente tienen clase  $C_i$  de entre todos los objetos que se han clasificado dentro de la clase  $C_i$ . Y por último, la especificidad (True Negative Rate (TNR) por sus siglas en inglés) es la proporción de objetos que han sido clasificados dentro de las otras clases diferentes a la clase  $C_i$  y que no pertenecen a la clase  $C_i$ .

### 2.2 Resultados obtenidos

Los resultados mostrados en las Tablas 1, 2 y 3 muestran que el empleo de estos descriptores en la clasificación morfológica de las células es efectivo. Se utilizó la notación  $C$  para referirnos a las células circulares,  $DE$  para las deformadas elongadas y  $DPE$  para las deformadas poco elongadas. En todos los casos se obtiene un 92 % de sensibilidad o más en la clasificación, con valores de precisión y especificidad cercanos igualmente a este valor, lo cual quiere decir que en general los descriptores son capaces de discriminar correctamente los tipos de células definidos. La clase que mejor se logra diferenciar es la circular, lo cual es el comportamiento adecuado debido a que es la clase con objetos mejor diferenciados del resto de los otros objetos en las dos clases restantes,



que tienen forma relativamente elongada en todos los casos. En ningún caso se clasificó una célula circular como una deformada elongada y viceversa. En el caso específico de la clase de deformadas poco elongadas, que tiene objetos con mayor variación de la forma, la clasificación muestra resultados más discretos, con sensibilidades de 86 % en todos los casos, debido a que estos objetos al ser también relativamente elongados en varios casos se clasifican como pertenecientes a esa clase. No obstante la precisión y la especificidad de la clase permanecen altas, lo cual quiere decir que las funciones, a pesar de que en comparación con la clase circular, definen menos objetos como pertenecientes a la clase, los que definen son realmente pertenecientes a la misma.

**Cuadro 1.** Resultados obtenidos con la función  $p(\sigma, \phi)$ .

	<i>C</i>	<i>DE</i>	<i>DPE</i>	<i>TPR</i>	<i>P</i>	<i>TNR</i>
<i>C</i>	99	0	1	99.00	98.02	88.50
<i>DE</i>	0	91	9	91.00	88.35	92.50
<i>DPE</i>	2	12	86	86.00	89.58	95.00
<b>Totales</b>				92.00	91.98	92.00

**Cuadro 2.** Resultados obtenidos con la función  $W(\phi)$ .

	<i>C</i>	<i>DE</i>	<i>DPE</i>	<i>TPR</i>	<i>P</i>	<i>TNR</i>
<i>C</i>	99	0	1	99.00	99.00	88.50
<i>DE</i>	0	88	12	88.00	89.80	94.00
<i>DPE</i>	1	10	86	89.00	87.25	93.50
<b>Totales</b>				92.00	92.05	92.00

**Cuadro 3.** Resultados obtenidos con la función  $C_p(\phi)$ .

	<i>C</i>	<i>DE</i>	<i>DPE</i>	<i>TPR</i>	<i>P</i>	<i>TNR</i>
<i>C</i>	97	0	3	97.00	96.04	90.50
<i>DE</i>	0	94	6	94.00	91.26	92.00
<i>DPE</i>	4	9	87	87.00	90.63	95.50
<b>Totales</b>				92.67	92.64	92.67

### 3. Conclusiones

En este trabajo se realizó un estudio del desempeño de tres funciones descriptoras de contornos basadas en geometría integral en la clasificación morfológica de HUVEC en tres tipos: células circulares, células deformadas elongadas (elongadas) y células deformadas poco alargadas (otras deformaciones). Los resultados obtenidos empleando los descriptores propuestos mostraron que se puede obtener una clasificación morfológica de estas células con un 92 % de sensibilidad o más, manteniendo además buenos resultados en cuanto a precisión y especificidad de la clasificación. El descriptor de Crofton mostró los mejores resultados, con un 92.67 %, lo que se corresponde con lo propuesto en bibliografía sobre la superioridad de la descripción de esta función.

Realizar un análisis morfológico de forma automatizada como el propuesto en este trabajo, resulta de gran importancia para el estudio de la angiogénesis, debido a que puede

emplearse para la cuantificación de fenómenos en imágenes del campo completo de observación, como la aparición de los fenotipos celulares *tip* y *stalk*, que usualmente son estudiados en culturas 3D a partir de 48 horas de incubación, lo cual permite que se simplifique la cuantificación y se reduzca el costo del análisis de la respuesta de proliferación asociada a efectos de sustancias anti-angiogénicas sobre las células endoteliales.

### Agradecimientos

Al profesor Durvanei Augusto Maria, del Instituto Butantan, por las células endoteliales utilizadas en este trabajo. A los profesores Dr. C. Mikiya Muramatsu y Dr. C. Adriano Alencar, por ceder el microscopio y las instalaciones utilizadas para las medidas y al Dr. C. Diogo Soga por el montaje de la instalación usada para la captura de las imágenes, todos pertenecientes al Instituto de Física de la Universidad de São Paulo, Brasil. Este trabajo está soportado por las agencias de investigación brasileñas CAPES, FAPESP y CNPq a través de su proyecto PDJ 402601/2015-7, la Universidad de São Paulo y la Universidad Fluminense, ambas de Brasil y la Universidad de Oriente, Cuba.

### Referencias

- [1] S. R. McDougall, A. R. Anderson, and M. A. Chaplain, "Mathematical modelling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: clinical implications and therapeutic targeting strategies," *Journal of theoretical biology*, vol. 241, no. 3, pp. 564–589, 2006.
- [2] R. Auerbach, W. Auerbach, and I. Polakowski, "Assays for angiogenesis: a review," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 51, no. 1, pp. 1–11, 1991.
- [3] M. Bahramsoltani, J. Plendl, P. Janczyk, P. Custodis, and S. Kaessmeyer, "Quantitation of angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo, ex vivo and in vitro—an overview," *Altex*, vol. 26, no. 2, p. 95, 2009.
- [4] E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick, "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. identification by morphologic and immunologic criteria," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, no. 11, p. 2745, 1973.
- [5] D. Guidolin, G. Albertin, and D. Ribatti, "Exploring in vitro angiogenesis by image analysis and mathematical modeling," *Microscopy: science, technology, applications and education*, vol. 2, pp. 876–884, 2010.
- [6] C. P. Khoo, K. Micklem, and S. M. Watt, "A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the matrigel assay in vitro," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 17, no. 9, pp. 895–906, 2011.

- [7] M.-L. Boizeau, P. Fons, L. Cousseins, J. Desjobert, D. Si-brac, C. Michaux, A.-L. Nestor, B. Gautret, K. Neil, C. Herbert, *et al.*, “Automated image analysis of in vitro angiogenesis assay,” *Journal of laboratory automation*, p. 2211068213495204, 2013.
- [8] I. Valavanis, T. Goudas, M. Michailidou, I. Maglogian-nis, H. Loutrari, and A. Chatziioannou, “A novel image analysis methodology for the evaluation of angiogenesis in matrigel assays and screening of angiogenesis-modulating compounds,” in *IFIP International Conference on Artificial Intelligence Applications and Innova-tions*, pp. 61–71, Springer, 2015.
- [9] C. Balsat, S. Blacher, N. Singolle, F. Kridelka, and A. Noël, “Image analysis characterization of the lymph/angiogenesis in experimental models and clinical studies,” *Acta Stereologica*, 2015.
- [10] L.-K. Phng and H. Gerhardt, “Angiogenesis: a team effort coordinated by notch,” *Developmental cell*, vol. 16, no. 2, pp. 196–208, 2009.
- [11] E. Dejana, E. Tournier-Lasserre, and B. M. Weinstein, “The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications,” *Developmental cell*, vol. 16, no. 2, pp. 209–221, 2009.
- [12] E. Montanez, R. P. Casaroli-Marano, S. Vilaro, and R. Pagan, “Comparative study of tube assembly in three-dimensional collagen matrix and on matrigel coats,” *Angiogenesis*, vol. 5, no. 3, pp. 167–172, 2002.
- [13] A. Niemisto, V. Dunmire, O. Yli-Harja, W. Zhang, and I. Shmulevich, “Robust quantification of in vitro angio-genesis through image analysis,” *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 24, no. 4, pp. 549–553, 2005.
- [14] A. F. Santos, A. B. Zaltsman, R. C. Martin, A. Kuz-min, Y. Alexandrov, E. P. Roquemoire, R. A. Jessop, M. G. M. v. Erck, and J. H. Verheijen, “Angiogenesis: an improved in vitro biological system and automated image-based workflow to aid identification and charac-terization of angiogenesis and angiogenic modulators,” *Assay and drug development technologies*, vol. 6, no. 5, pp. 693–710, 2008.
- [15] J. Angulo and S. Matou, “Application of mathematical morphology to the quantification of in vitro endothelial cell organization into tubular-like structures,” *Cellular and Molecular Biology*, vol. 53, no. 2, pp. 22–35, 2007.
- [16] R. Chotard-Ghodsniya, O. Haddad, A. Leyrat, A. Dro-chon, C. Verdier, and A. Duperray, “Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow,” *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 2, pp. 335–344, 2007.
- [17] M.-C. Liu, H.-C. Shih, J.-G. Wu, T.-W. Weng, C.-Y. Wu, J.-C. Lu, and Y.-C. Tung, “Electrofluidic pressure sensor embedded microfluidic device: a study of endothelial cells under hydrostatic pressure and shear stress combi-nations,” *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 9, pp. 1743–1753, 2013.
- [18] D. Zhang and G. Lu, “Review of shape representation and description techniques,” *Pattern recognition*, vol. 37, no. 1, pp. 1–19, 2004.
- [19] X. Gual-Arnau, S. Herold-García, and A. Simó, “Shape description from generalized support functions,” *Pattern Recognition Letters*, vol. 34, pp. 619–626, 2013.
- [20] R. Delin, *Topics in Integral Geometry*. World Scientific, Singapore, 1994.
- [21] X. Gual-Arnau, S. Herold-García, and A. Simó, “Eryth-rocyte shape classification using integral-geometry-based methods,” *Medical & biological engineering & computing*, vol. 53, no. 7, pp. 623–633, 2015.
- [22] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, “Snakes: Acti-ve contour models,” *International journal of computer vision*, vol. 1, no. 4, pp. 321–331, 1988.
- [23] S. Osher and J. A. Sethian, “Fronts propagating with curvature-dependent speed: algorithms based on hamilton-jacobi formulations,” *Journal of computatio-nal physics*, vol. 79, no. 1, pp. 12–49, 1988.
- [24] L. A. Stoyan and H. Stoyan, *Fractals, Random Shapes and Point Fields*. John Wiley and Sons, 1995.
- [25] V. Kindratenko, “On using functions to describe the shapes,” *J. Math. Imaging Vision*, vol. 18, pp. 225–245, 2003.
- [26] X. Gual-Arnau, S. Herold-García, and A. Simó, “Shape description from generalized support functions,” *Pattern Recognition Letters*, vol. 34, no. 6, pp. 619–626, 2013.
- [27] L. Santaló, *Integral Geometry and Geometric Probabi-lity*. Addison-Wesley, 1976.
- [28] H. Gundersen, E. Jensen, K. Kieu, and J. Nielsen, “The efficiency of systematic sampling in stereology reconsi-dered,” *Journal of Microscopy*, vol. 193, pp. 199–211, 1999.
- [29] T. Cover and P. Hart, “Nearest neighbor pattern classifi-cation,” *IEEE Trans. Inform. Theory*, vol. 13, pp. 21–27, 1967.
- [30] M. Nixon and A. Aguado, *Feature Extraction and Image Processing*. Academic Press, 2008.

- [31] F. Ferri and E. Vidal, *Comparison of several editing and condensing techniques for colour image segmentation and object location. In Pattern Recognition and Image Analysis, Series in Machine Perception and Artificial Intelligence*. World Scientific, 1992.
- [32] S. V. Stehman, "Selecting and interpreting measures of thematic classification accuracy," *Remote Sensing of Environment*, vol. 62, no. 1, pp. 77–89, 1997.