



DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES EN VIVO PARA REVELAR LOS PROGENITORES Y LA DINÁMICA CELULAR DE LA REGENERACIÓN DE MIEMBROS

Manuel Guillermo Forero Vargas, Santiago Rodríguez Cuellar, Christian Saúl González Santos, Diana Sofía Rojas Rodríguez, Camilo Andrés Restrepo Taborda, Reynel Duván Peña Ambrosio

Universidad de Ibagué
Ibagué, Colombia

Michalis Averof

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL)
Lyon, Francia

Resumen

La regeneración celular de tejidos es un proceso biológico complejo y requiere un análisis exhaustivo. Hasta hace poco no había forma de seguir la regeneración celular en seres vivos. Recientemente se introdujo el crustáceo *Parhyale hawaiiensis* como modelo experimental in-situ para el análisis de este proceso. Sin embargo, el estudio de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal aún se hace a mano. En este artículo se presentan los avances en el desarrollo de una técnica basada en el procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones. El trabajo comprende la evaluación de varios métodos de filtrado no lineal y deconvolución, entre ellas dos nuevas técnicas orientadas a la eliminación de ruido, y la evaluación de diversos métodos de clasificación con el fin de identificar cada una de las células. Finalmente se plantea el seguimiento de células durante la regeneración. Esta nueva técnica se constituirá en una herramienta de gran utilidad en el estudio de la regeneración de tejidos en seres vivos.

Palabras clave: microscopía confocal; *Parhyale hawaiiensis*; regeneración de tejido; reconocimiento de patrones; procesamiento de imágenes

Abstract

*Cellular tissue regeneration is a complex biological process and requires an exhaustive analysis. Not long ago there was no way of tracking cell regeneration in living beings. Recently the crustacean *Parhyale hawaiiensis* was introduced as an in-situ experimental model for the analysis of this process. However, the study of the images obtained from confocal microscopy is still done manually. This paper presents the advances in the development of a technique based on image processing and pattern recognition. The work involves the evaluation of several nonlinear and deconvolution filters, including two new techniques aimed at eliminating noise, and the evaluation of various classification methods in order to identify each cell. Finally a cell tracking process during regeneration is proposed. This new technique will be a very useful tool in the study of tissue regeneration in living beings.*

Keywords: *confocal microscopy; *Parhyale hawaiiensis*; tissue regeneration; pattern recognition; image processing*

1. Introducción

Algunos animales, como artrópodos y reptiles, tienen la capacidad de regenerar partes de su cuerpo, después de sufrir una lesión severa o amputación. Al igual que el desarrollo embrionario, la regeneración es un proceso complejo, que implica la movilización de gran número de células de un modo regulado para restaurar las partes que faltan a su forma y función original. Sin embargo, en comparación con el desarrollo embrionario, la regeneración es más difícil de estudiar ya que se produce en especies y fases de la vida que son complejas para la observación continua. El análisis mediante imágenes en vivo es particularmente difícil debido a dos razones principales. En primer lugar, la regeneración es un largo proceso, que se desarrolla en una escala de tiempo de semanas y, en segundo lugar, se produce en etapas de larvas y adultos cuando los animales son grandes, de gran movilidad y constituidos por alto número de células. Estos factores limitan severamente la capacidad de observar la regeneración de órganos en forma continua, con suficiente resolución temporal y espacial; trayendo como consecuencia que hasta ahora muy pocos trabajos en regeneración han sido realizados, y se han limitado al estudio de series de imágenes estáticas, captadas en diferentes etapas y de diferentes individuos.

El problema de realizar el estudio y análisis del proceso de regeneración de células en las especies es uno de los que han cobrado mayor importancia en los últimos años en el área de la Biología, estimulando su investigación (Konstantinides et al., 2014), (Alwes et al., 2016). En los estudios se menciona la importancia de realizar identificación y seguimiento al proceso de reproducción de células conocidas como progenitoras. Para ello, hasta el momento se han utilizado técnicas rudimentarias, orientadas a realizar seguimiento a mano de dichas células, generando resultados sesgados, no reproducibles y costosos en tiempo para el investigador, constituyendo un serio inconveniente en la etapa de análisis de datos.

Recientemente Konstantinides y Averof (2014) introdujeron el pequeño crustáceo *Parhyale hawaiiensis* como un modelo experimental para estudios de regeneración (Ver figura 1.a) *Parhyale* tiene una serie de atributos que lo hacen muy adecuado para este estudio mediante el uso de imágenes en vivo. En primer lugar, la regeneración de miembros es relativamente rápida, requiriendo sólo alrededor de una semana en adultos jóvenes para regenerar completamente sus patas. En segundo lugar, su exoesqueleto es transparente y las extremidades tienen menos de 100 μm de diámetro, permitiendo obtener imágenes a través de todo su espesor. Así, es posible cuantificar el crecimiento celular, la aparición de nuevas células y su seguimiento en el tiempo. Sin embargo, este proceso es altamente rutinario e ineficiente en términos de tiempo y recursos, ya que el seguimiento de las células se debe realizar de manera manual. Teniendo en cuenta que las células se desplazan en un entorno tridimensional en el tiempo, se hace uso de la microscopía confocal para adquirir imágenes 2D de diferentes planos del volumen en forma continua durante la regeneración, empleando marcadores fluorescentes para teñir las células y captar su actividad individual (ver figura 1.b). A través de este método es posible seguir el comportamiento de las células durante la regeneración con el fin de reconocer las trayectorias de las células progenitoras y sus hijas originadas a partir de su mitosis.

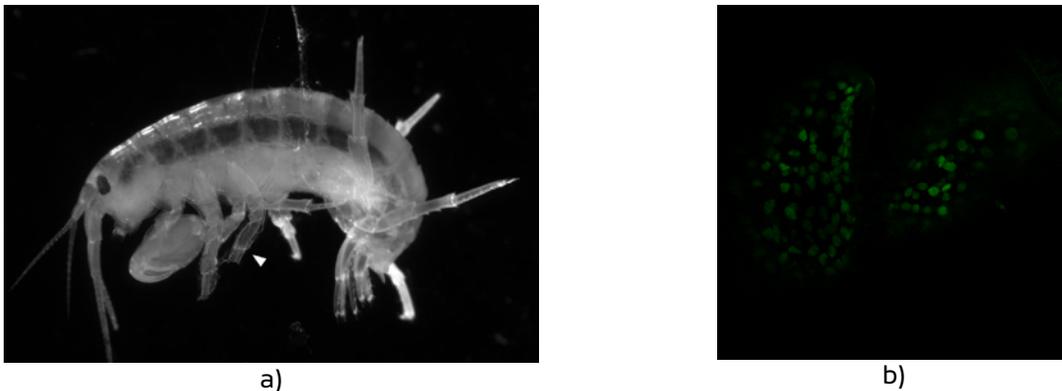


Figura 1. a) *Parhyale hawaiiensis* adquirido con microscopía confocal y b) Corte de extremidad en regeneración de adquirido con microscopio confocal. (Konstantinides et al., 2014)

Para las imágenes en vivo, los animales fueron expuestos a una temperatura de 37°C durante 45 min para inducir la expresión transgen via PhHS 24 horas antes de empezar a registrar. Para inmovilizar las piernas durante el proceso se utilizó pegamento quirúrgico (2-octyl cyanoacrylate, Dermabond). El animal anestesiado se colocó lateralmente sobre un cubreobjetos redondo con sus patas T4 o T5 pegadas sobre la superficie del vidrio; Se utilizó un trozo de cubreobjeto roto como separador, pegado al cuerpo del animal y al cubreobjetos redondo. El animal fue introducido en agua de mar artificial durante al menos 2 horas antes de la amputación. Las piernas T4 y T5 fueron amputadas en el carpo usando un microcuchillo (Science Tools GmbH, Germany).

Las imágenes fueron adquiridas durante proceso de regeneración de tejido de una extremidad, previamente amputada, de *Parhyale hawaiiensis* durante la etapa adulta

joven, en un microscopio confocal invertido cLSM Zeiss 780 usando un objetivo 20x (EC Plan-Neofluar) a temperatura ambiente (20–24°C). Las pilas de imágenes adquiridas cubren la totalidad de la extremidad en crecimiento con una separación entre imágenes de 2 μm tomadas cada 10 a 45 min con una resolución de 1024 \times 1024 píxeles (Alwes et al., 2016). Microesferas de 1 μm de diámetro teñidas con fluoróforo con excitación máxima de 377 y emisión máxima de 479 nm fueron empleadas para la adquisición de las imágenes con el fin de determinar la función de dispersión del punto, conocida en inglés como PSF. Una base de datos fue construida con 150 muestras positivas y 150 negativas de tamaño 15x15 extraídas de 50 de las imágenes, donde el pixel central determina su clasificación como célula o fondo.

Los algoritmos fueron implementados en lenguaje Java para el software de libre acceso ImageJ, excepto los programas de reconocimiento de patrones que fueron escritos en lenguaje Python.

2. Deconvolución de imágenes

Con el fin de mejorar la definición de las imágenes y reducir el ruido introducidos por los lentes del microscopio, las imágenes fueron deconvolucionadas empleando el filtro de Wiener, utilizando la imagen de una microesfera mostrada en la figura 2.

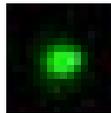


Figura 2. Imagen de la función PSF.

Para encontrar el mejor valor de gamma se filtraron las imágenes con valores de gamma en el rango [0.01 – 1] y se observó el perfil de un conjunto de células agrupadas buscando el resultado que permitiera distinguir las células reduciendo el ruido sin perder los bordes.

3. Eliminación de Ruido

Luego de deconvolucionar las imágenes, el siguiente paso busca eliminar el ruido sin afectar el borde de las células. El ruido en las imágenes de microscopía de fluorescencia sigue una distribución de Poisson, ya que la adquisición se basa en la emisión de fotones. Dado que el número de fotones producidos es muy pequeño, la variación estadística de fotones detectados es la fuente más importante de ruido. Aunque algunos investigadores emplean filtros lineales, como el operador gaussiano, no son los más recomendados para reducir el ruido de Poisson, que es dependiente de la señal. Además, el uso de filtros lineales difumina los bordes de las células, haciéndolas más difíciles de distinguir, especialmente cuando están demasiado juntas. En este caso, resultan más adecuados los filtros no lineales. Con el fin reducir el ruido sin perder la definición de los bordes de las células se exploraron otros tipos de filtros no lineales, tales como el filtro mediana, por ejemplo, es uno de los métodos

más simples y versátiles (Forero et al., 2011), en este caso los resultados obtenidos fueron pobres, el filtro anisotrópico, (Perona et al., 1990), el ROF (Rudin et al., 1992) el cual se basa en el cálculo variacional, los filtros de ondículas (Wavelet) 'A trous' y Haar, el bilateral (Tomasi et al., 1998) que considera la diferencia entre niveles de gris de los píxeles para mantener los bordes, el propagado (Chang et al., 2015) que explora las relaciones entre cada píxel y el píxel central de un área de interés y los píxeles vecinos, y los filtros, desarrollados dentro de esta investigación: propagado mejorado, el cual permite utilizar máscaras de convolución de cualquier tamaño y propagado bilateral, que además considera la distancia entre cada píxel de la máscara con el píxel central. Los resultados obtenidos de estos filtros se pueden apreciar en la figura 3, donde se puede apreciar que los filtros con mejores resultados son el ROF y el bilateral, siendo este último el mejor método encontrado debido a su gran desempeño y su tiempo de procesamiento rápido.

4. Detección celular mediante técnicas de procesamiento de imágenes

Después de eliminar la mayor cantidad de ruido posible en las imágenes, se utilizarán métodos de procesamiento de imágenes para la segmentación de células. En este procedimiento, se subdividen las imágenes en regiones o clases con el fin de diferenciar las células utilizando métodos de segmentación tales como umbralización y watershed para la detección de regiones de interés y la discriminación de objetos a partir de su color, intensidad o textura. Adicionalmente, la segmentación permite eliminar de las imágenes el ruido que no se logró remover con los filtros (Forero et al., 2011). Dado que la segmentación no es una técnica perfecta se requiere del uso de técnicas basadas en la forma de la célula con el fin de separarlas.

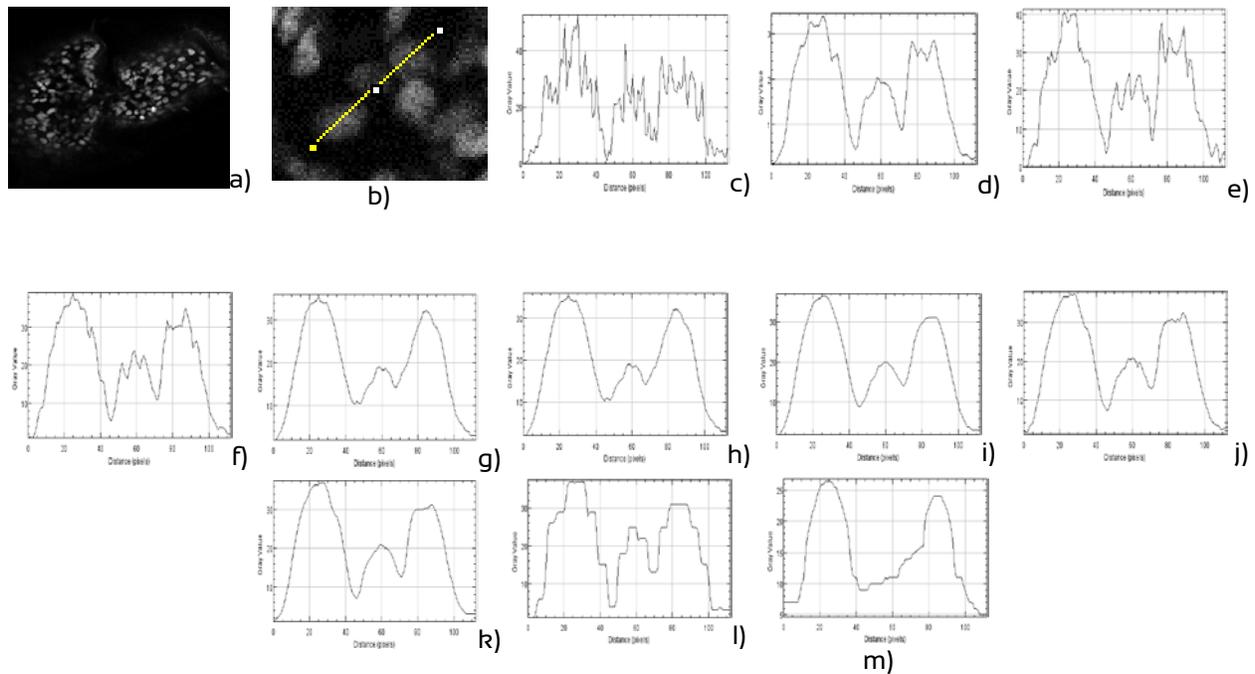


Figura 3. Filtrado de la imagen de *Parhyale hawaiiensis*. a) Imagen original. b) Detalle de la imagen a. c) Perfil de la imagen b. Resultados: d) Wiener. e) Mediana. f) Propagado. g) Propagado mejorado. h) Propagado Bilateral. i) Bilateral. j) ROF. k) Anisotropic Diffusion. l) Haar. m) Atrous.

Tal como se observa en la figura 3, una vez filtradas las imágenes, cada perfil se asemeja a un sistema montañoso, donde en los mejores casos cada célula corresponde a una cima. Como una cima aún puede tener varios picos, este problema es solucionado empleando una transformada h-máxima (Forero et al., 2011). Luego, cada cima es detectada sirviendo para identificar cada célula. Las formas de las células fueron recuperadas haciendo crecimiento por regiones y aquellas que pudieran aparecer unidas fueron separadas empleando una transformación watershed. Este proceso está aún en ejecución. La figura 4 ilustra un resultado preliminar.

5. Detección celular mediante técnicas de reconocimiento de patrones

Paralelamente a la segmentación, y con el fin de explorar otras alternativas que permitan la identificación de células, es necesaria la implementación y evaluación de diversos descriptores y métodos de aprendizaje de máquinas, para encontrar los métodos más adecuados basados en su desempeño. La idea es identificar directamente cada píxel de una imagen como perteneciente a una célula o al fondo de acuerdo al resultado producido por un clasificador. El aprendizaje de máquinas es un área que busca el desarrollo de sistemas que permitan tomar decisiones de manera autónoma basados en algún tipo de experiencia. Por lo tanto, se desarrollaron varios algoritmos para la identificación de células usando técnicas de aprendizaje: clasificador probabilístico fundamentado en el teorema de Bayes, árboles de decisión,

los cuales se expresan como un conjunto de normas de decisión, K-Vecinos más cercanos (K-NN), considera el número de vecinos más próximos a la muestra para realizar la clasificación, máquina de soporte vectorial, conocida por su siglas en inglés SVM (Support Vector Machine), la cual maximiza los márgenes de separación entre las clases y redes neuronales. Con el fin de reducir el número de descriptores empleados para realizar la clasificación de las células se realizó un análisis de componentes principales PCA permitiendo además reducir el tiempo de ejecución de los algoritmos mejorando la exactitud.

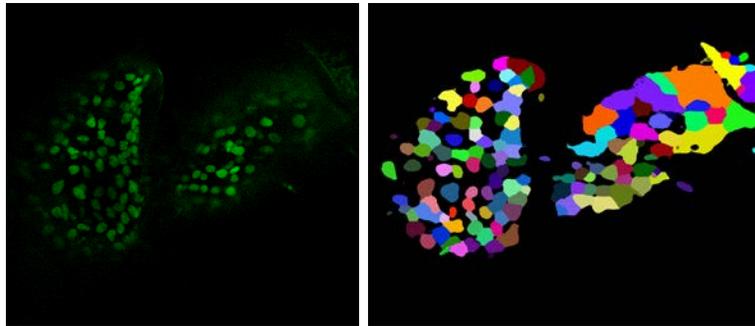
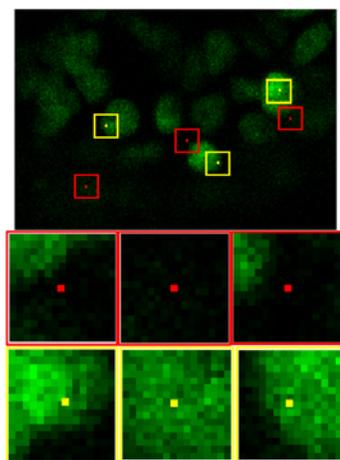


Figura 4. Segmentación: Resultados preliminares.

En la figura 5 se observan 3 muestras de cada clase tomadas de la base de datos empleada para la clasificación. Dado que la intensidad de cada píxel de una muestra es empleada como descriptor, se tiene un total de 225 descriptores dado que el tamaño de cada muestra es de 15x15 píxeles.



a)

Algoritmo	Tiempo de ejecución en Mili segundos	Exactitud con la base de datos de Validación
Bayes	2,60	0.98
Bayes PCA	2,01	1.0
K-Vecinos	9,66	0.98
K-Vecinos PCA	5,72	0.98
Red Neuronal	47,33	0.98
Red Neuronal PCA	53,57	0.95
Máquina de Vector de Soporte	4,01	1.0
Árbol de Decisión	6,45	0.96
Árbol de Decisión PCA	10,97	0.96
Máquina de vector de Soporte PCA	3,68	1.0

b)

Figura 5. Base de datos. a) Adquisición de 3 muestras negativas (fondo) y 3 positivas (célula) respectivamente. b) Resultado de los algoritmos de clasificación.

Para el entrenamiento se utilizó el 60% de las muestras, 20% para pruebas y el 20% restante para validación. Los resultados se presentan en la figura 5.b:

Tomando en cuenta la complejidad de los algoritmos de aprendizaje al que le lleva

mayor tiempo de ejecución es a la red neuronal y su exactitud no es la esperada. En la figura 6 se presentan algunos resultados preliminares de la identificación de células.

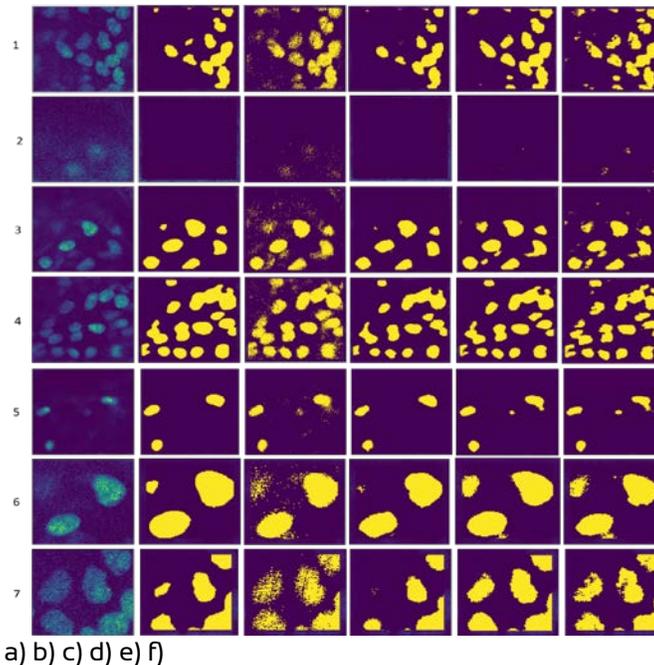


Figura 6. Resultados de detección para 7 fragmentos de la regeneración celular para los 5 clasificadores en estudio. a) Imagen Original. b) Clasificador Bayesiano. c) Método de Árboles de decisión. d) Método K-Vecinos. e) Método Máquina de vector de soporte. f) Método Redes Neuronales.

6. Seguimiento de células

Finalmente, para comprender el proceso de la regeneración desde el punto de vista de cómo se desplazan, organizan y cuáles de las células terminan haciendo parte de la conformación de una extremidad, con cada una de ellas se realizará: 1) su reconocimiento en el volumen y 2) la identificación de su trayectoria.

La identificación de una misma célula a través del volumen se lleva a cabo mediante un proceso de etiquetado tridimensional que consiste en la asignación del mismo valor a los cortes de la célula que aparecen en las imágenes de microscopía confocal previamente segmentadas.

A partir de esta información se procede a determinar de forma automatizada la posición de las células identificadas y su desplazamiento en el tiempo, propio de la especie *Parhyale hawaiensis*, con el fin de hallar su correspondencia en imágenes sucesivas en el tiempo, empleando criterios basados en mediciones de distancia, como la distancia Euclidiana, en un proceso conocido como seguimiento (o tracking en inglés). Reconocer el movimiento de cada célula contribuirá a la identificación de secuencias específicas de eventos y comportamientos de las células durante la regeneración para hallar posibles patrones de trayectoria y comportamiento de las células progenitoras e hijas que hasta el momento se trataba de realizar de forma

manual (Alwes et al., 2016). Existe una extensa cantidad de técnicas y software para realizar el trabajo de seguimiento que deberán seleccionarse considerando el tipo de imágenes, la morfología y densidad de las células, además otras situaciones que pueden complicar el seguimiento como la superposición, apoptosis, mitosis, y de ser necesaria, la selección manual de las regiones de las células como un punto de partida (Yang et al., 2016). La presentación final de las trayectorias obtenidas de cada célula, serán almacenadas y expresadas mediante grafos que permitirán seleccionar la célula de interés para seguir su trayectoria a través del tiempo ya sea que se trate de células progenitoras o hijas.

7. Referencias

- Alwes, F., Enjolras, C., & Averof, M. (2016). Live imaging reveals the progenitors and cell dynamics of limb regeneration. *eLife*, 5, e19766.
- Chang, J. H.K., & Wang, Y. C. F (2015). Propagated image filtering. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 10-18.
- Forero, M., & Hidalgo, A. (2011). Image Processing Methods for Automatic Cell Counting In Vivo or In Situ Using 3D Confocal Microscopy. *Advanced Biomedical Engineering*, pp. 183–230.
- Konstantinides, N., & Averof, M. (2014). A common cellular basis for muscle regeneration in arthropods and vertebrates. *Science (New York, N.Y.)*, pp. 788–91.
- Perona, P., & Malik, J. (1990). Scale-space and edge detection using anisotropic diffusion. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, pp. 629–639.
- Rudin, L. I., Osher, S., & Fatemi, E. (1992). Nonlinear total variation based noise removal algorithms. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, pp. 259–268.
- Tomasi, C., & Manduchi, R. (1998). Bilateral filtering for gray and color images. *Proc. IEEE Int'l Computer Vision Conf*, pp. 839-846.
- Yang, F. W., Venkataraman, C., Styles, V., Kuttenger, V., Horn, E., von Guttenberg, Z., & Madzvamuse, A. (2016). A computational framework for particle and whole cell tracking applied to a real biological dataset. *Journal of Biomechanics*, 49(8), pp. 1290–1304.

Sobre los autores

- **Manuel Guillermo Forero Vargas:** Ingeniero Electrónico, Magíster en Ingeniería Eléctrica, Máster en Imagenología Médica, PhD en ingeniería Biomédica UTC Francia. Decano ingeniería. Director semillero Lún grupo D+TEC. Universidad de Ibagué. manuel.forero@unibague.edu.co
- **Santiago Rodríguez Cuellar:** Ingeniero Electrónico, Estudiante Maestría en Ingeniería de Control. Miembro semillero Lún. Universidad de Ibagué. santiago.cuellar@unibague.edu.co
- **Christian Saúl González Santos:** Ingeniero Electrónico, Estudiante Maestría en

Ingeniería de Control. Miembro semillero Lún. Universidad de Ibagué. cristian-saul-66@hotmail.com

- **Diana Sofía Rojas Rodríguez:** Ingeniera Electrónica, Estudiante Maestría en Ingeniería de Control. Miembro semillero Lún. Universidad de Ibagué. rojas_rodriguez@outlook.com
- **Camilo Andrés Restrepo Taborda:** Estudiante Ingeniería Electrónica. Miembro semillero Lún. Universidad de Ibagué. camilo9412@hotmail.com
- **Reynel Duván Peña Ambrosio:** Estudiante Ingeniería Electrónica. Miembro semillero Lún. Universidad de Ibagué. reynel.22@hotmail.com
- **Michalis Averof:** Biólogo, PhD Biología Universidad de Cambridge. michalis.averof@ens-lyon.fr

Los puntos de vista expresados en este artículo no reflejan necesariamente la opinión de la Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería.

Copyright © 2017 Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería (ACOFI)