



Encuentro Internacional de  
Educación en Ingeniería ACOFI

**GESTIÓN, CALIDAD Y DESARROLLO  
EN LAS FACULTADES DE INGENIERÍA**

**CARTAGENA, COLOMBIA  
18 al 21 de septiembre de 2018**



# **SISTEMA DE CONTEO AUTOMÁTICO DE COLONIAS DE CÉLULAS TUMORALES**

**Lizeth Rodríguez Ramos, María  
Fernanda Rojas Castro, Nicolás  
Roldán Fajardo, Karen Cepeda  
Forero, Alejandro Ondo Méndez**

**Universidad del Rosario  
Bogotá, Colombia**

**Juan Manuel López López**

**Escuela Colombiana de Ingeniería  
Bogotá, Colombia**

**Manuel G. Forero**

**Universidad de Ibagué  
Ibagué, Colombia**

## **Resumen**

La radiobiología, que estudia el efecto de la interacción radiación-materia en sistemas biológicos, es un área fundamental para la optimización del tratamiento del cáncer por radioterapia. Una de las técnicas más utilizadas en radiobiología son los ensayos clonogénicos (o de formación de colonias), que buscan medir la pérdida en la capacidad de división celular en una célula tumoral después de haber sido tratada con radiación ionizante. El análisis de los datos obtenidos por esta técnica requiere del conteo de las colonias formadas a partir de cientos de células inicialmente irradiadas y cultivadas. Aunque existen algunos sistemas automáticos para el conteo de colonias, estos son en general muy costosos y/o sólo parcialmente automáticos. Por esta razón, en la mayoría de los casos el conteo se realiza de forma manual, haciendo de éste un proceso tedioso e impreciso. Para solucionar este problema, radiobiólogos, ingenieros y estudiantes de ingeniería biomédica y medicina de tres universidades, se unieron para desarrollar una estrategia que facilite la obtención de los datos de los ensayos clonogénicos. En este trabajo se presenta un nuevo método automático para el conteo de colonias de ensayos clonogénicos, basado en técnicas de procesamiento de imágenes. Se compararon los resultados obtenidos con el sistema automático con conteos manuales para verificar la calidad y precisión del método propuesto. Con esta nueva técnica, se espera aportar al desarrollo de soluciones prácticas en el ámbito radiobiológico, que ayuden a mejorar la obtención de datos experimentales conducentes a proponer soluciones, desde el laboratorio, a problemas de salud en el área de la radio-oncología.

**Palabras clave:** conteo de colonias celulares; procesamiento de imágenes; microscopía

### **Abstract**

*Radiobiology, which studies the effect of radiation-matter interaction in biological systems, is a fundamental area for the optimization of cancer treatment by radiotherapy. One of the most widely used techniques in radiobiology is clonogenic (or colony forming) assays, which seek to measure the loss in the cell division capacity in a tumor cell treated with ionizing radiation. The analysis of the data obtained by this technique requires counting of the colonies formed from hundreds of initially irradiated and cultured cells. Although there are some automatic systems for colony counting, these are generally very expensive and/or only partially automatic. For this reason, in most cases, the counting is done manually, making this a tedious and inaccurate process. In order to solve this problem, radio biologists, engineers and students of biomedical engineering and medicine from three universities, came together to develop a strategy to facilitate the collection of clonogenic assays data. In this work, a new automatic method for colony counting of clonogenic assays is presented, based on image processing techniques. The results obtained with the automatic system were compared with manual counts to verify the quality and precision of the proposed method. With this new technique, it is expected to contribute to the development of practical solutions in the radiobiological field, that help to improve the obtaining of experimental data leading to propose solutions, from the laboratory, to health problems in the area of radio-oncology.*

**Keywords:** *celular colony counting; image processing; microscopy*

## **1. Introducción**

Por su relación costo-beneficio y la variabilidad de tipos tumorales que pueden ser tratados con esta herramienta, aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer son tratados con radioterapia. Existen elementos esenciales que afectan el éxito o fracaso del tratamiento, entre los que se destacan: la reparación diferencial de las células tumorales y normales entre los tratamientos fraccionados, la redistribución de las células en fases radiosensibles del ciclo celular, la repoblación de las células tumorales entre los fraccionamientos, las condiciones de oxigenación de las células tumorales antes y durante el tratamiento, la radiosensibilidad intrínseca de cada tipo de tumor, así como el tipo y la energía de la radiación ionizante utilizada en el tratamiento (Hirst, *et. al.*, 2010). Teniendo en cuenta estas consideraciones, la evaluación de la supervivencia celular en líneas tumorales y cultivos primarios derivados de muestras de pacientes, es una herramienta fundamental en la investigación para la optimización del tratamiento del cáncer por radioterapia (Cepeda-Forero *et. al.*, 2018). Estos estudios hacen parte del área de la radiobiología. Desarrollar conocimiento en éste área es vital en nuestro país, dada la importancia del tratamiento del cáncer por radioterapia en Colombia y en el mundo. Estos estudios contribuyen a una mejor comprensión del efecto de los tratamientos con radioterapia metabólica y de fuente externa, y permitirán diseñar futuras estrategias para su optimización.

Las primeras descripciones acerca de células tumorales en las que se evalúa la habilidad para formar colonias tras ser sometidas a radiaciones ionizantes se remontan a Puck y Marcus en 1956 (Puck, 1956), quienes estudiaron los efectos de rayos X a altas dosis en la formación de colonias en células HeLa (carcinoma de cérvix), observando, además de los cambios en el número de colonias, diferencias morfológicas en las células sometidas a radiación. El ensayo de supervivencia celular o clonogénico ha sido usado desde entonces en una gran cantidad de estudios con diversos tipos de células y ha aportado una gran cantidad de información acerca del efecto de la radiación en células de mamífero.

El ensayo detecta todas las células que conservan la capacidad para producir un gran número de progenie a partir de una única célula. Una célula que conserva su capacidad para dividirse y proliferar produciendo una colonia constituida por clones a partir de una única célula se denomina "clonogénica" (Franken, *et al.*, 2006). Se ha establecido el número de células que componen una colonia en 50, ya que se requieren al menos 5 a 6 generaciones de replicaciones sucesivas para alcanzar este número de células.

Una curva de supervivencia celular describe la relación entre el agente productor del insulto y la proporción de células que sobreviven. Una de las mayores limitaciones en la aplicación de las curvas de supervivencia es el conteo del número de colonias. Este proceso, que en la mayoría de laboratorios debe hacerse manualmente, consume una gran cantidad de tiempo del investigador, debido a la variabilidad en el número, tamaño y forma de las colonias, en dependencia del tipo de células que se utilicen en el experimento. Aunque existen algunos sistemas automáticos de conteo actualmente, estos son en general muy costosos y/o sólo parcialmente automáticos.

El procesamiento de imágenes ha sido utilizado recientemente para el desarrollo de aplicaciones que permiten automatizar este tipo de procesos, permitiendo obtener resultados rápidos, reproducibles y no sesgados, mejorando el ecosistema del servicio de análisis de muestras en cancerología (Khan, *et al.*, 2018), (Brugger, *et al.*, 2012). La aplicación de metodologías de procesamiento de imágenes puede ser una forma útil para aumentar la eficiencia en la construcción de curvas de supervivencia, permitiendo disminuir el tiempo invertido en el análisis de los datos, y convertir la técnica en herramienta de análisis de datos de alto rendimiento (aumento en el número de ensayos y muestras procesadas por experimento). Con este propósito, en este artículo se presenta un trabajo conjunto en desarrollo de radiobiólogos e ingenieros de tres instituciones diferentes (Universidad del Rosario, Universidad de Ibagué y Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito) para automatizar el conteo de colonias de células cancerosas.

## 2. Métodos y Materiales

### 2.1. Materiales

Para este trabajo se utilizaron como modelo las líneas celulares de glioblastoma (U87) y de cáncer de mama (MCF-7). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Biowest®) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Hyclone®), y se sembraron en cajas de Petri para cultivo celular de 60 mm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 70%-80%.

Se realizó un ensayo de formación de colonias con las células U87 y MCF-7, siguiendo el protocolo de sembrado pre-tratamiento (Franken, *et al.*, 2006). Las células cultivadas en cajas de Petri fueron disgregadas por incubación con tripsina/EDTA (Gibco®), contadas y transferidas a cajas de cultivo de 6 cajas. Se sembraron entre 200 y 2000 células por caja, por triplicado, en dependencia de la dosis de radiación a utilizar, y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para permitir su adhesión. Una vez adheridas las células, fueron irradiadas con fotones de rayos X de 6 MV, con un acelerador lineal de uso clínico (Varian Medical Systems® TrueBeam™), en dosis de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy para el ensayo de formación de colonias. Para garantizar el equilibrio electrónico y una mejor homogeneidad de dosis en el volumen blanco, las cajas se irradiaron por debajo, sobre un simulador físico de parafina. Las células se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB durante 14 días. Luego se realizó la fijación y tinción de las colonias formadas con cristal violeta con una mezcla de formaldehído al 4% y cristal violeta al 1%.

Catorce fotografías fueron escaneadas (ver figura 1) con un equipo Hewlett Packard (HP Scanjet Pro) con una resolución de 944 x 636 píxeles en formato jpg. Estas imágenes fueron evaluadas a mano por tres especialistas y empleadas como referencia para verificar la calidad de los resultados del método de conteo. El algoritmo fue desarrollado en el lenguaje de programación Python.

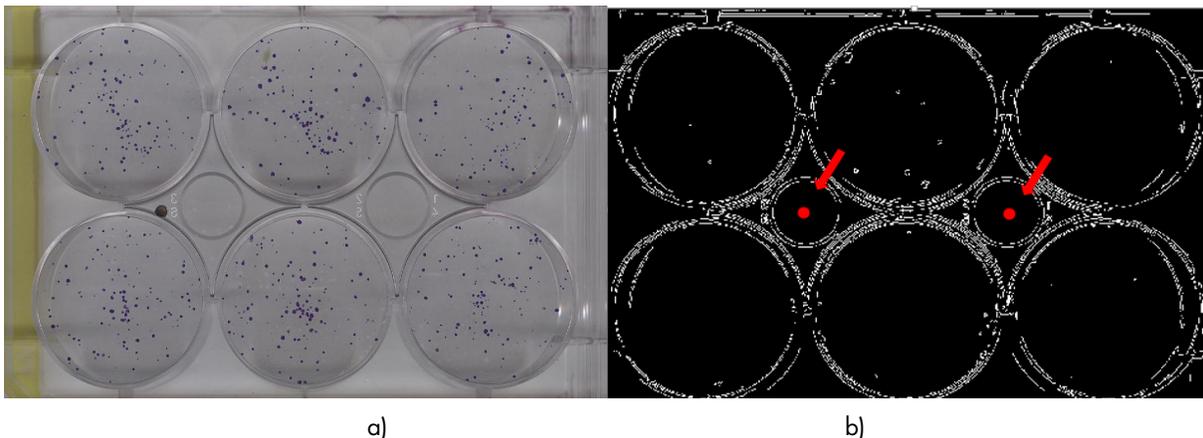


Figura 1. a) Ejemplo de fotografía del cultivo. Se pueden observar seis pozos, en donde las manchas violetas son las colonias de células que se desean contar. b) Máscara de Canny. Los centros de referencia encontrados con correlación cruzada se marcan con rojo. Estos centros son utilizados posteriormente para la ubicación de los pozos.

## 2.2. Metodología de Procesamiento de las Imágenes

Las imágenes fueron convertidas a escala de grises y posteriormente se realizó un ajuste de contraste con una función lineal, con el fin de mejorar el desempeño del método de umbralización usado más adelante para una mejor identificación de las regiones que contienen las colonias. El primer paso del análisis de las señales fue la ubicación de los pozos que contienen las colonias. Para ello se llevó a cabo una correlación cruzada entre elementos circulares y una imagen de bordes (detección de bordes tipo Canny sobre la imagen en escala de grises). De esta manera, se consiguió la ubicación de dos estructuras circulares de referencia, en la caja de Petri (ver figura 1b), lo que permitió luego la ubicación precisa de los seis pozos.

Una vez obtenidas las coordenadas de los 6 centros (Figura 2a), aquellos píxeles que cumplieran con una distancia euclidiana menor o igual al radio promedio de las cajas, conservaron su valor, por el contrario, los que no, se hicieron cero, para de esta forma poder segmentar únicamente los círculos que correspondiesen a cada una de las 6 cajas y eliminar lo que correspondía al recipiente donde fueron colocadas (Figura 2b).

Teniendo en cuenta regiones cuadradas mínimas de la imagen inicial en grises sobre las cuales se pudiese inscribir sólo una caja, se determinó un umbral mediante Otsu para así sólo tener en cuenta áreas locales de la imagen y no tener en cuenta aquellas que pudiesen afectar al método. Dicho umbral fue escalado por un factor igual al valor promedio de intensidad de la imagen. Con el respectivo umbral, se binariza cada caja segmentada por distancia anteriormente, produciendo una máscara por caja. Luego de umbralizar, se identificaron y etiquetaron los objetos que tuvieran una 8-conectividad, determinando así el número total de objetos.

Se observó que varios de los objetos identificados corresponden a los bordes de las cajas. Debido a la forma y color de estos bordes, se planteó un método basado en características geométricas y distancia euclidiana en color, en el espacio de color CIElab para eliminarlos. Se determinaron características como área convexa y excentricidad. Tomando como referencia las características de las regiones que se sabía eran colonias, se estableció un umbral para estas con el fin de descartar la mayor cantidad de regiones que no fueran colonias (Figura 2c). No obstante, muchos de los bordes segmentados persistían, por lo que se implementó un método consistente en extraer un anillo que contuviera los bordes de cada caja, sobre la imagen original en RGB (Figura 2d). Posteriormente se convirtió esta imagen al espacio de color CIElab y con dicho anillo se determinó el color promedio. Basados en un umbral, se determinaron los píxeles en la imagen RGB que superan la distancia euclidiana en el espacio de color CIElab, para luego binarizarla y obtener así una máscara que correspondiera a las colonias de los bordes, multiplicandola luego con la máscara obtenida con el método de binarización de Otsu (Figura 2d).

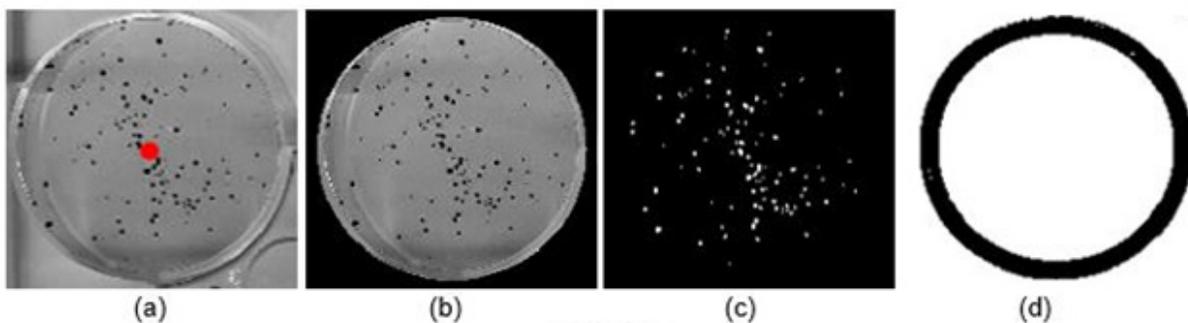


Figura 2. a) Localización de los centros de las cajas, b) Segmentación por distancia euclidiana de un solo pozo. c) Segmentación por Otsu y eliminación de componentes, d) Obtención de anillo para eliminación de bordes por segmentación por color.

Finalmente, se etiquetaron nuevamente los objetos remanentes empleando 8-conectividad y se realizó el conteo de colonias por caja guardando la imagen resultante y el respectivo conteo en un archivo. Con el fin de validar el método, se comparó el número de colonias contadas

manualmente por los tres expertos en las imágenes de referencia y el conteo arrojado por el sistema automático.

### 3. Resultados

Para evaluar la validez del sistema, se determinaron los errores porcentuales entre los datos obtenidos con el programa y los obtenidos por los expertos. Una vez determinados los errores porcentuales por caja, se calculó la media y la desviación estándar del error por imagen. Como puede observarse en la figura 3, el porcentaje de error es en promedio 14.62%, con una desviación estándar promedio de 8.64, lo que indica una dispersión alta en los resultados.

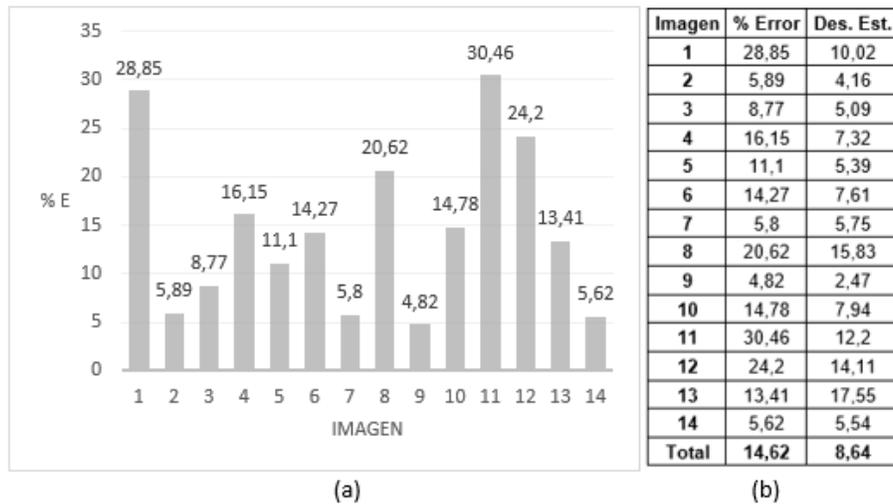


Figura 3. a) Error porcentual del conteo por caja en cada una de las imágenes, b) Error promedio y desviación estándar de cada imagen.

Este error porcentual puede reducirse introduciendo mejoras al algoritmo, basadas en la observación del tipo de muestras que producen el mayor error, paso en el cual se encuentra el desarrollo actualmente. De igual manera, es posible desarrollar un protocolo de adquisición con el fin de mejorar la calidad de las muestras basados en la comparación de los errores obtenidos con cada una de ellas, con el fin de obtener una aplicación más robusta.

### 4. Conclusiones

Un nuevo programa en desarrollo para el conteo automático de colonias de células tumorales en fotografías de cajas de cultivo ha sido presentado. Este sistema, desarrollado en colaboración entre investigadores de tres universidades, y de áreas disciplinares diferentes, introduce un gran aporte técnico en la investigación en radiobiología, permitiendo a los especialistas contar con sistemas más eficientes, rápidos y precisos para la cuantificación de colonias de células tumorales al realizar ensayos clonogénicos. Este programa beneficiará a los investigadores en radiobiología, pero también a investigadores en otras áreas de la oncología y la toxicología en

general, ahorrando tiempo al investigador que podrá concentrarse en el análisis de datos. Además, este tipo de programas son la base para acercarse a los ensayos clonogénicos a los sistemas de adquisición de datos de alto rendimiento (high throughput screening), permitiendo procesar un alto número de muestras en poco tiempo.

Este proyecto ha sido el fruto del trabajo colaborativo a distancia entre tres instituciones con especialistas en dos áreas complementarias de la ingeniería biomédica: la biología celular y el procesamiento de imágenes, construyendo de esta manera un ecosistema interdisciplinario para el desarrollo de herramientas de uso en investigación biomédica, es decir, un ecosistema donde los pacientes se beneficiarán de los avances obtenidos por un equipo de investigación multi- e interdisciplinario, enfocado en satisfacer las necesidades para mejorar la calidad del servicio médico del sistema hospitalario.

## 5. Referencias

### Artículos de revistas

- Brugger S.D., Baumberger C., Jost M., Jenni W., Brugger U., Mühlemann K. (2012). Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates, *PLoS ONE* Vol. 7, Issue 3, e33695.
- Cepeda Forero, K., Barrera Langer, M., Mosquera Paternina, A., Montoya Vega, C., Riveros Calvete, P., Mendoza Guerra, A., ... Ondo Méndez, A. (2018). Radioresistencia en glioblastoma: papel de la hipoxia en la genotoxicidad inducida por radiaciones ionizantes, *Ciencia E Investigación Médico Estudiantil Latinoamericana*, Vol. 23, Núm. 1.
- Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, Vol. 1, No. 5, 2315–9.
- Hirst, D. G., & Robson, T. (2010). Molecular biology: the key to personalised treatment in radiation oncology? *The British Journal of Radiology*, Vol. 83, No. 993, 723–8.
- Khan, AU, Torelli, A, Wolf, I, Gretz, N, AF Khan, Arif Ul Maula, Torelli, Angelo, Wolf, Ivo, Gretz, Norbert TI. (2018). AutoCellSeg: robust automatic colony forming unit (CFU)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques. *SCIENTIFIC REPORTS*, Vol. 8. 7302.
- Puck, T. T. (1956). ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 103, No.5, pp. 653–666.

### Sobre los Autores

- **Juan Manuel López López:** Ing. Electrónico, Magister en Ingeniería. Área: Electrónica y de Computadores, Doctor en Ingeniería (c), Profesor Asistente, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito [juan.lopezl@escuelaing.edu.co](mailto:juan.lopezl@escuelaing.edu.co).
- **Manuel Guillermo Forero Vargas:** Ing. electrónico. Magister en Ing. Eléctrica. Área: Bioingeniería. Master en imágenes médicas y Doctor en Ing. Biomédica. Decano Facultad de Ingeniería, Universidad de Ibagué. [manuel.forero@unibague.edu.co](mailto:manuel.forero@unibague.edu.co).

- **Alejandro Oyono Ondo Méndez:** Biólogo. Doctor en Ciencias-Química. Área: Bioquímica. Doctor en Ciencias de la Vida y la Salud. Área: Biología Celular y Molecular, Université de Nice – Sophia Antipolis. Profesor Asociado, Universidad del Rosario. [alejandro.ondo@urosario.edu.co](mailto:alejandro.ondo@urosario.edu.co).
- **Karen Daniela Paola Cepeda Forero:** Médico, Universidad del Rosario. Miembro del Semillero de Investigación en Bioquímica (SiBio), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario. [karencepeda8@gmail.com](mailto:karencepeda8@gmail.com)
- **Lizeth Rodríguez Ramos:** Estudiante de Ingeniería Biomédica, Miembro del Semillero de Investigación el Procesamiento de Imágenes y Señales PROMISE. Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito - Universidad del Rosario. [lizeth.rodriguez-r@mail.escuelaing.edu.co](mailto:lizeth.rodriguez-r@mail.escuelaing.edu.co)
- **María Fernanda Rojas Castro:** Estudiante de Ingeniería Biomédica, Miembro del Semillero de Investigación el Procesamiento de Imágenes y Señales PROMISE. Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito - Universidad del Rosario. [maria.rojas-c@mail.escuelaing.edu.co](mailto:maria.rojas-c@mail.escuelaing.edu.co)
- **Nicolás Roldán Fajardo:** Estudiante de Ingeniería Biomédica, Miembro del Semillero de Investigación el Procesamiento de Imágenes y Señales PROMISE. Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito - Universidad del Rosario. [nicolas.rolدان@mail.escuelaing.edu.co](mailto:nicolas.rolدان@mail.escuelaing.edu.co)

---

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

Copyright © 2018 Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería (ACOFI)