



LA FORMACIÓN DE INGENIEROS:  
UN COMPROMISO PARA EL  
DESARROLLO Y LA SOSTENIBILIDAD

15 al 18  
DE SEPTIEMBRE

20  
20

[www.acofi.edu.co/eiei2020](http://www.acofi.edu.co/eiei2020)

# NUEVO MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CONTEO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS EN *Drosophila*

**Manuel G. Forero**

**Universidad de Ibagué  
Ibagué, Colombia**

**Jun Sun, Alicia Hidalgo**

**University of Birmingham  
Birmingham, Reino Unido**

## Resumen

El cerebro es el órgano más desconocido del cuerpo humano. Por ello, para su estudio se utilizan modelos animales, entre los que destaca la *Drosophila* o mosca de la fruta, que tiene un cerebro pequeño, en comparación con el de otras especies superiores, puede ser manipulado genéticamente y reproducirse en periodos de tiempo muy cortos. Entre los temas de estudio se encuentra el de conocer más a fondo la función de las neuronas dopaminérgicas, células cerebrales responsables de producir la dopamina, mensajero químico del sistema nervioso central, y enviarla a otras neuronas del sistema nervioso. Estas neuronas están involucradas en una amplia variedad de procesos biológicos, esencialmente en la motivación, el movimiento y las tareas intelectuales. Así pues, la degradación de estas células puede dar lugar a una variada gama de patologías, entre las que se encuentran el Parkinson y la esquizofrenia. Para su estudio las células dopaminérgicas o sus paredes en moscas son teñidas e imágenes 3D de microscopía confocal del cerebro son adquiridas para su identificación y conteo. Esta tarea es larga, tediosa, subjetiva, imprecisa y consume mucho tiempo. Por esta razón, en este trabajo se introduce un nuevo método para la identificación y conteo automático de células dopaminérgicas basado en técnicas de procesamiento de imágenes. La técnica implementada como un plugin del programa de libre acceso imageJ permite una medición rápida y mucho más exacta de las células dopaminérgicas.

**Palabras clave:** conteo celular; microscopía confocal; imágenes biomédicas; imágenes biológicas; células dopaminérgicas

## Abstract

The brain is the most unknown organ of the human body. Therefore, animal models are used for its study, among which the *Drosophila* or fruit fly stands out, which has a small brain, compared to that of other superior species, can be genetically manipulated and reproduce in very short periods of time. Among the topics of study is to learn more about the function of dopaminergic neurons, brain cells responsible for producing dopamine, a chemical messenger of the central nervous system, and sending it to other neurons in the nervous system. These neurons are involved in a wide variety of biological processes, essentially in motivation, movement and intellectual tasks. Thus, degradation of these cells can lead to a wide range of pathologies, including Parkinson's and schizophrenia. For their study the dopaminergic cells or their walls in flies are stained and 3D confocal microscopic images of the brain are acquired for their identification and counting. This task is long, tedious, subjective, inaccurate and time-consuming. For this reason, a new method for automatic identification and counting of dopaminergic cells based on image processing techniques is introduced in this work. The technique, implemented as a plug-in to the freely available program *imageJ*, allows a fast and much more accurate measurement of the number of dopaminergic cells.

**Keywords:** cell count; confocal microscopy; biomedical imaging; biological imaging; dopaminergic cells

## 1. Introducción

El cerebro es el miembro más importante y a la vez más desconocido del organismo humano. Dada la imposibilidad por razones éticas de experimentar con seres humanos, se recurre para su investigación a modelos experimentales animales, entre los que se destaca la *Drosophila* o mosca de la fruta, que tiene un cerebro de tamaño reducido, en comparación con el de otras especies superiores, puede ser modificado genéticamente y reproducirse en muy poco tiempo. Uno de los temas de investigación está relacionado con el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas, células cerebrales encargadas de producir la dopamina, mensajero químico del sistema nervioso central, y de enviarla a otras neuronas del sistema nervioso. Estas neuronas están envueltas en un amplio abanico de procesos biológicos, esencialmente en la motivación, el movimiento y las tareas intelectuales. Por lo tanto, la degeneración de estas células puede conducir a una amplia gama de patologías, incluyendo el Parkinson y la esquizofrenia. Para su análisis se tiñen las células dopaminérgicas o sus paredes en las moscas y se adquieren imágenes de microscopía confocal tridimensionales del cerebro para su identificación y recuento. Esta tarea es larga, tediosa, subjetiva y consume mucho tiempo.

El procesamiento de imágenes biomédicas se ha convertido en uno de los campos más activos dentro del desarrollo de nuevas técnicas para el análisis de muestras biológicas. Se busca fundamentalmente adquirir de forma más rápida y precisa tanta información como sea posible de las imágenes adquiridas de diferentes fuentes, lo cual conlleva una mejora en la fiabilidad y el análisis de los resultados. Por este motivo, en este trabajo se presenta un nuevo método para la identificación y conteo automáticos de células dopaminérgicas basado en técnicas de procesamiento de imágenes. La técnica, implementada como un plug-in del programa de libre

acceso imageJ, permite una medición rápida y mucho más precisa del número de células dopaminérgicas.

## 2. Materiales

Las muestras son cerebros disecados de la mosca del vinagre, *Drosophila*, de genotipo CantonS/Oregon en que un GFP unido a la membrana se expresa en células dopaminérgicas. Los cerebros fueron disecados, fijados en 4% para-formaldeido por 30 minutos, luego lavados con 0.5% PBST, seguido de incubación en la solución de bloqueo -10% Normal Goat Serum (NGS) en PBST y teñidos con anti-Tyrosine hydroxilase a una dilución de 1:250 en 10% NGS PBST, que detecta la enzima determinante de la formación de dopamina. El anticuerpo secundario fue goat anti-mouse a una dilución de 1:500 en 10% NGS PBST. Las muestras fueron montadas en un medio de montaje Vestashield y escaneadas en un confocal Zeiss 710, con un lente de 40x, velocidad de barrido 8 y promedio 1.

Para esta investigación se emplearon 2 pilas de 116 y 207 imágenes de la cabeza de *Drosophila* adulta con una resolución de 1024 x 1024 y tamaño real de 0.207 x 0.207 x 0.3 micras y 3 pilas de 273, 301 y 347 con igual resolución y tamaño real de 0.33 x 0.33 x 0.3 micras, adquiridas con un sistema de barrido laser confocal Leica equipado con un microscopio invertido DMRE2. Para el desarrollo de la aplicación se empleó un computador Intel Core I7-CPU Q820@1.73Ghzx8 con 3 GB de memoria RAM, tarjeta gráfica GeForce GTX280M, corriendo sobre Ubuntu Linux 16.04LTS. El método fue implementado en Java como un plugin del software de libre acceso ImageJ.

## 2. Desarrollo

Las imágenes de microscopía confocal no son uniformes, sufren de atenuación a medida que la imagen adquirida es más profunda dentro del tejido, a la vez que la intensidad de la señal disminuye a medida que el fluoroforo se agota. La figura 1 muestra una proyección de la pila de 207 imágenes, donde cada círculo observado está formado por las paredes de las células dopaminérgicas a ser detectadas y contadas. Una sección de una de las imágenes se aprecia en la figura 2.

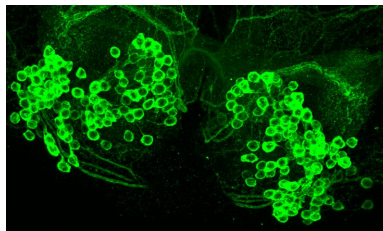


Figura 1. Proyección de una pila de imágenes de microscopía confocal del cerebro de *Drosophila*, donde se aprecian las células dopaminérgicas que desean contarse.

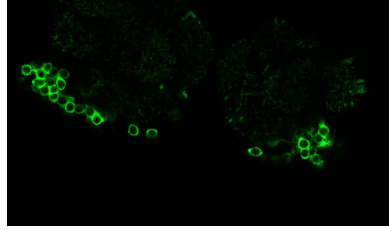


Figura 2. Imagen de un corte de pila de microscopía confocal del cerebro de *Drosophila*.

Estas imágenes están contaminadas principalmente por ruido Poisson. Aunque varios filtros no lineales pueden ser empleados para reducir el ruido se prefirió la mediana, previamente empleado con éxito en este tipo de imágenes (Forero et al, 2009, 2010a, 2010b, 2011, 2012), puesto que permite reducir el ruido en corto tiempo, sin tener grandes pérdidas en los bordes. La eficiencia computacional es importante en el desarrollo de este método debido al muy alto número de imágenes y a su tamaño, lo cual hace lo que se busque que los métodos empleados sean lo más eficientes computacionalmente. La figura 3 ilustra el resultado obtenido del filtrado.

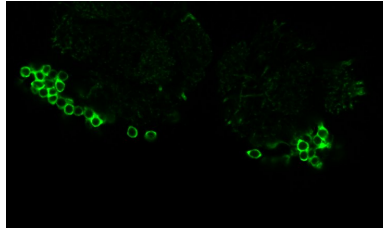


Figura 3. Resultado de procesar la imagen de la figura 2 con filtro mediana.

Dado que frecuentemente se encuentran paredes celulares de intensidad irregular, y que en un paso posterior derivaría en la detección incorrecta de células, se realiza un proceso de cerrado morfológico 3D en imágenes monocromáticas, el cual se realiza mediante la combinación de una dilatación 3D seguida por una erosión 3D, tal como se observa en la figura 4.

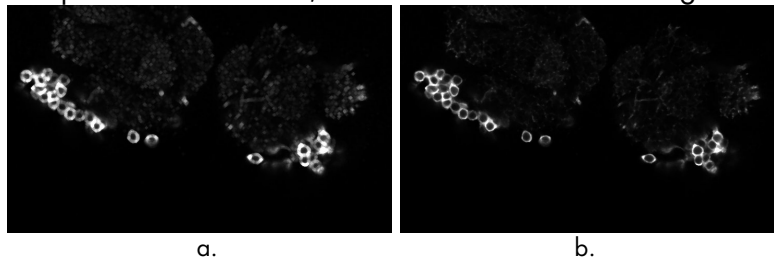


Figura 4. Cerramiento morfológico de la imagen de la figura 3. a. Dilatación 3D. b. Erosión 3D.

Como puede observarse cada célula puede identificarse como una zona oscura rodeada por la pared celular, la cual se distingue por píxeles de mayor intensidad. Puesto que, en el fondo, debido al ruido, también es posible encontrar mínimos locales que pueden ser identificados incorrectamente como células, se procedió a hacer cero todos aquellos píxeles, dentro de una ventana de tamaño  $25 \times 25$ , cuya diferencia entre el mínimo y el máximo nivel de gris dentro de la ventana fuera inferior a 10, y cuyo valor máximo fuera 60. Estos valores fueron tomados a partir de la observación de las características de las intensidades del fondo. La figura 5 presenta el resultado obtenido.

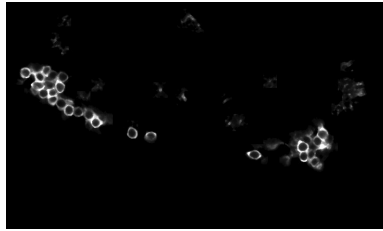


Figura 5. Eliminación de regiones oscuras de la imagen de la figura 4.

Con el fin de marcar cada célula, se procedió a encontrar cada sima en la imagen, sabiendo que si se interpreta la imagen como un sistema orográfico donde la intensidad del píxel representara la altura en cada punto, cada célula se identificaría como un pozo rodeado completamente de altas montañas. Para encontrar estas simas se utilizó una transformación h-mínima extendida 3D, la cual fue implementada mediante una técnica basada en grafos conocida como Image Foresting Transform (Falcao, 2004) para hacerla computacionalmente muy eficiente. La figura 6 muestra el resultado obtenido.

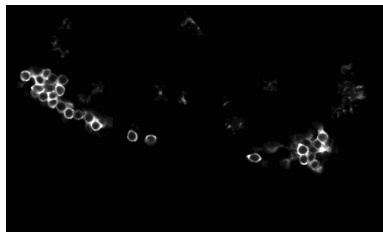


Figura 6. Imagen resultante de la transformación h-mínima extendida.

Puesto que dentro de cada célula es posible encontrar más de un mínimo local, lo cual tendría como resultado el conteo de una célula varias veces, se realizó una detección de domos inversos 3D, tal como se muestra en la figura 7a. Estos posteriormente fueron luego binarizados, figura 7b, para su posterior etiquetado 3D (Forero, 2002), donde cada domo inverso es usado como semilla para identificar cada célula, eliminando la región más grande de la imagen correspondiente al fondo, tal como se ilustra en la figura 8.



Figura 7. Detección de domos inversos. a. Resultado de la transformación Domo 3D. El contraste fue ampliado para permitir la observación de los domos inversos. b. Imagen binarizada de los domos inversos, usados como semillas.

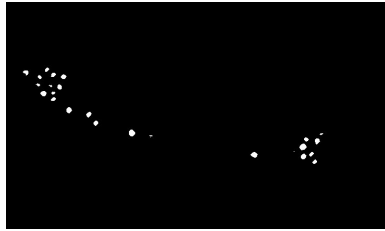


Figura 8. Semillas obtenidas. Cada semilla tiene una etiqueta diferente, habiendo eliminado el objeto de mayor tamaño correspondiente al fondo.

Una vez obtenidas las semillas se realizó una transformación watershed 3D, utilizando cada semilla como fuente de agua dentro de cada pozo, inundando cada pozo de la figura 6, para evitar desbordamientos por aquellas paredes celulares que aún pudieran haber quedado abiertas, se restringió la inundación, de manera que ésta sólo podía crecer hacia valores de gris más altos. De esta manera, se obtuvo el resultado final ilustrado en la figura 9, habiendo construido una paleta de colores con el fin de identificar cada célula más fácilmente.

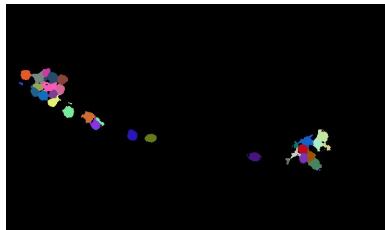


Figura 9. Imagen final obtenida con el método desarrollado.

### 3. Resultados

Los resultados obtenidos fueron bastante buenos, habiendo obtenido una precisión superior al 90% en la identificación de células dopaminérgicas. A pesar del empleo de técnicas altamente eficientes de cálculo, el tiempo de procesamiento en el computador utilizado fue mayor a 20 minutos en las pilas de 207 imágenes. Por esta razón, se está empleando un recorte manual para reducir el tamaño de las imágenes, consiguiendo realizar el conteo en menos de 5 minutos. Actualmente se está desarrollando el proceso de validación para determinar el rendimiento exacto del método propuesto. Dada la precisión obtenida, esta técnica es ya empleada corrientemente para el estudio de células dopaminérgicas en *Drosophila* por parte de miembros del XXXX.

### 4. Conclusiones

En este artículo se ha presentado un nuevo método para la detección de células dopaminérgicas en imágenes de microscopía. Esta técnica, actualmente en uso por parte de científicos de la Universidad de Birmingham, facilita el trabajo del especialista, permitiendo un conteo mucho más preciso y rápido de células dopaminérgicas en el cerebro de *Drosophila* adulta. Esta técnica espera ser un paso hacia delante en el estudio de enfermedades neurodegenerativas y útil para mejorar la comprensión del cerebro.

## 5. Referencias

### Artículos de revistas

- Falcao, A.X. and Stolfi, J. and de Alencar Lotufo, R. (2004). The image foresting transform: theory, algorithms, and applications. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 26(1), pp. 19-29.
- Forero, M.G.; Kato, K. and Hidalgo, A. (2012). Automatic cell counting in vivo in the larval nervous system of *Drosophila*. *Journal of Microscopy*, 246, pp. 202-212.
- Forero, M. G. and Hidalgo, A. (2011). Image processing methods for automatic cell counting in vivo or in situ using 3D confocal microscopy. In *Advanced Biomedical Engineering*. Gargiulo, G. D. and McEwan, A., Eds. InTech, pp. 183-204.
- Forero M.G., Learte A.R., Cartwright S. Hidalgo A. (2010a). DeadEasy Mito-Glia: Automatic counting of mitotic cells and glial cells in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5(5): e10557.
- Forero M.G., Pennack J.A. and Hidalgo A. (2010b). DeadEasy Neurons: Automatic counting of HB9 neuronal nuclei in *Drosophila*. *Cytometry Part A* 77A(4):371-378.
- Forero M.G., Pennack J., Learte A.R. and Hidalgo A. (2009). DeadEasy Caspase: Automatic counting of apoptotic cells in *Drosophila*. *PLoS ONE* 4(5): e5441. doi:10.1371/journal.pone.0005441.

### Libros

- Forero, M.G. (2002). *Introducción al procesamiento digital de imágenes*. ISBN 958-33-3819-2. Bogotá, pp. 255.

### Sobre los Autores

- **Manuel Guillermo Forero Vargas:** Ing. Electrónico Universidad Javeriana. Magister en Ing. Eléctrica. Área: Bioingeniería y Control Universidad de Los Andes. Master en imágenes médicas y Doctor en Ing. Biomédica Université de Technologie de Compiègne, Francia. Postdoctorado en Imágenes de Microscopía Instituto de Óptica Daza de Valdés, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España. Ha sido docente de la Universidad Nacional de Colombia y Universidad Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. Profesor invitado del Instituto de Neurociencias de Castilla y León Universidad de Salamanca. Investigador de las Escuelas de Biociencias de las Universidades de Birmingham y Cardiff, Reino Unido. Actualmente es Tutor semillero en Procesamiento de Imágenes y Reconocimiento de Patrones Lún. Decano Facultad de Ingeniería, Universidad de Ibagué. manuel.forero@unibague.edu.co.
- **Jun Sun:** Pregrado de la Huazhong Agriculture University, Wuhan, China. Master realizado en el laboratorio de Zaiqing Yang en Hzau, Wuhan, China. Doctora del ESPCI-PSL en París, Francia. Actualmente es Marie-Curie Research Fellow en la Escuela de Biociencias de la Universidad de Birmingham, Reino Unido. J.SUN.1@bham.ac.uk.

- **Alicia Hidalgo:** Título en Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, España. PhD de la Universidad de Oxford, Reino Unido. Posdoctorados en biociencias de la Universidad Autónoma de Madrid, España, y Gordon Institute, Universidad de Cambridge, Reino Unido. Estableció su equipo de investigación en el Departamento de Genética, Universidad de Cambridge. Después se trasladó a la Universidad de Birmingham, como Senior Lecturer, luego Reader en Neurobiología del Desarrollo, y actualmente es Professor en Neurogenética de la Universidad de Birmingham, donde actualmente labora. [a.hidalgo@bham.ac.uk](mailto:a.hidalgo@bham.ac.uk).

---

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

Copyright © 2020 Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería (ACOFI)