



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

15 al 18
DE SEPTIEMBRE

20
20

www.acofi.edu.co/eiei2020

CONTEO AUTOMÁTICO DE COLONIAS DE CÉLULAS TUMORALES

**Manuel G. Forero, Laura Andrea
Medina Sánchez**

**Universidad de Ibagué
Ibagué, Colombia**

**Andrés Felipe Patiño, David Mora,
Harold Ríos, Alejandro Oyono Ondo
Méndez**

**Universidad del Rosario
Bogotá, Colombia**

Paulo Quintero, Juliana Sandoval

**Centro de Control de Cáncer Ltda
Bogotá, Colombia**

**Sandra Liliana Cancino Suárez, Juan
Manuel López López**

**Escuela Colombiana de Ingeniería
Julio Garavito
Bogotá, Colombia**

Resumen

Introducción: El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que células anormales se multiplican e invaden otros tejidos sin control. Uno de los tratamientos más comunes del cáncer es la radioterapia, en la cual se irradia el área cancerosa para destruir las células tumorales y reducir el crecimiento. En la radiobiología, que estudia los fenómenos que ocurren en los seres vivos tras ser sometidos a radiación, se utilizan los ensayos clonogénicos. Para su análisis se requiere del conteo manual de colonias, formadas por células cancerosas que mantienen su capacidad reproductora. Sin embargo, este proceso es tedioso, impreciso, subjetivo y toma mucho tiempo.

Objetivo: Desarrollar una nueva técnica basada en el procesamiento digital de imágenes para realizar el conteo automático de colonias celulares y evaluar su exactitud diagnóstica para identificar colonias de células tumorales.

Materiales y métodos: Se utilizaron cultivos celulares de las líneas tumorales de seno MCF7 y glioblastoma U87. Se realizaron ensayos clonogénicos exponiendo las células tumorales a radiación; tras 14 días de crecimiento, se fijaron y tiñeron las colonias celulares. Con las imágenes obtenidas por escaneo de los ensayos, utilizando el Software ImageJ y aplicando técnicas de filtrado, umbralización, binarización de colores, transformación y etiquetado se desarrolló el

método de conteo automático; se añadió una interfaz para permitir la edición manual del conteo. La valoración de la exactitud diagnóstica del método desarrollado se realizó definiendo como estándar de referencia el conteo manual de colonias.

Resultados: El método desarrollado mostró un buen rendimiento diagnóstico para la detección de colonias de células tumorales con una sensibilidad del 98,62% (IC 95%: 98.30% - 98.99%) y una especificidad de 81,07% (IC 95%: 78.93% - 83.21%). La detección de colonias tumorales tuvo una exactitud diagnóstica del 95,7% (IC 95%: 95.26% - 96.17%).

Discusión y conclusiones: Se propone el conteo automático de colonias celulares como una herramienta útil en las investigaciones biomédicas sobre el cáncer. El método desarrollado demostró una adecuada eficiencia diagnóstica. Estudios posteriores podrán indagar la precisión y reproducibilidad del método propuesto.

Palabras clave: radioterapia; conteo de colonias; radio-oncología

Abstract

Introduction: Cancer is a group of diseases in which abnormal cells multiply and invade other tissues without control. One of the most common treatments for cancer is radiotherapy, in which the cancerous area is irradiated to destroy tumor cells and reduce tumor growth. In radiobiology the science that studies the effects of ionizing radiation on organisms is common to use the clonogenic assays. For its analysis is required the manual count of colonies, made up from cancer cells that maintain their reproductive capacity. However, this process is tedious, imprecise, subjective, and time consuming.

Objective: We aim to develop a new technique based on the digital image processing to perform the automatic counting of cell colonies and evaluate its diagnostic accuracy to identify tumor cell colonies.

Materials and methods: We used cell cultures of breast tumor lines MCF7 and glioblastoma U87. Clonogenic assays were performed exposing tumor cells to radiation; after 14 days of growth the colonies were fixed and stained. With the images obtained by scanning, using the ImageJ software we developed the automatic counting method using filtering, thresholding, color binarization, transformation and labelling techniques; additionally, an interface was added to allow manual editing of the count. The evaluation of the diagnostic accuracy of the developed method was carried out by defining the manual colony count as a reference standard.

Results: The developed method showed a good diagnostic performance for the detection of tumor cell colonies with a sensitivity of 98.62% (95% CI: 98.30% - 98.99%) and a specificity of 81.07% (95% CI: 78.93% - 83.21%). The detection of tumor colonies had a diagnostic accuracy of 95.7% (95% CI: 95.26% - 96.17%).

Discussion and conclusions: *The automatic counting of cell colonies is proposed as a useful tool in biomedical research on cancer. The developed method demonstrated an adequate diagnostic efficiency. Subsequent studies may investigate the reproducibility of the proposed method.*

Keywords: *radiotherapy; colony counting; radio-oncology*

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad que se origina cuando ocurre un daño irreparable en el ADN de una célula. Como resultado de este daño, la célula empieza a adquirir mutaciones hasta que llega al punto donde adquiere la capacidad para dividirse de manera descontrolada alterando el funcionamiento del órgano, facilitando la formación de tumores e invasión de otros tejidos (Closa & Macip, 2018). Uno de los tratamientos más comunes del cáncer es la radioterapia, la cual utiliza la radiación para destruir las células cancerosas, así como reducir el tamaño de los tumores. Sin embargo, existen células que tras ser expuestas a radiación son capaces de conservar su integridad reproductiva y, por lo tanto, no permiten eliminar de manera permanente la enfermedad. Para estudiar esta modalidad de tratamiento, desde el área de radiobiología se realizan ensayos clonogénicos que miden la respuesta celular ante un agente citotóxico. Estos ensayos requieren del conteo manual de las células formadoras de colonias, proceso que resulta tedioso, requiere de mucho tiempo, puede estar sesgado y no es reproducible.

Actualmente existen algunos sistemas para el conteo de colonias que no son del todo automáticos como el CoCoNut, desarrollado por el Centro de Tecnologías Nucleares (Nutech) de la Universidad Técnica de Dinamarca (Siragusa, et al., 2018), el ColonyArea, desarrollado para el programa de ImageJ, que solo entrega una estimación de la densidad de colonias dada por área (Guzmán, et al., 2014) y el contador realizado mediante el sistema de inferencia difusa que da una explicación del método incompleta y no explica claramente el proceso seguido para la segmentación de las imágenes, dejando dudas acerca de la confiabilidad del programa (Lin, et al., 2011). Otros contadores disponibles comercialmente como el GelCount de la marca Oxford Optronix, son equipos que realizan el conteo automáticamente, pero debido al costoso hardware para la adquisición de imágenes no resultan beneficiosos para pequeños laboratorios que tienen un presupuesto limitado. El objetivo de este estudio fue desarrollar una nueva técnica basada en el procesamiento digital de imágenes para realizar el conteo automático de colonias celulares y evaluar su exactitud diagnóstica para identificar colonias de células tumorales.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Para este trabajo se realizaron cultivos de líneas celulares de glioblastoma U87 y de cáncer de mama MCF-7 en medio de cultivo DMEM (Biowest®), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Hyclone®), y sembradas en cajas para cultivo celular de 60 mm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 70%-80%.

Siguiendo el protocolo de sembrado pre-tratamiento (Franken, et al., 2006) se realizó el ensayo clonogénico con las células U87 y MCF-7. 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. En cada caja se sembraron entre 200 y 2000 células, por triplicado, dependiendo de la dosis de radiación a utilizar, posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂, para permitir su adhesión. Una vez adheridas, fueron irradiadas con fotones de rayos X de 6 MV, en dosis de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy con un acelerador lineal de uso clínico (Varian Medical Systems® TrueBeam™). 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. Finalmente, se fijaron y tiñeron con cristal violeta las colonias que se formaron con una mezcla de formaldehído al 4% y cristal violeta al 1%.

Para adquirir las imágenes se utilizó un escáner Hewlett Packard (HP Scanjet Pro) con una resolución de 944 x 636 píxeles en formato jpg. El uso del escáner permite obtener la máxima relación señal/ruido en las imágenes. Para este trabajo se escanearon catorce fotografías de las cajas de cultivo tal como la ilustrada en la figura 1.

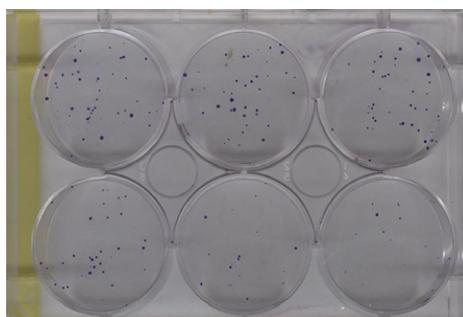
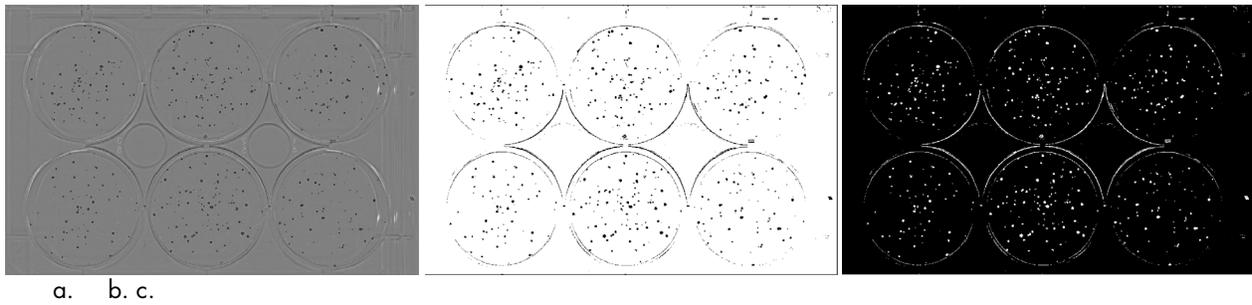


Figura 1. Ejemplo de fotografía tomada a un cultivo donde se evidencian los seis pozos que contiene las colonias teñidas de color violeta.

2.2. Métodos

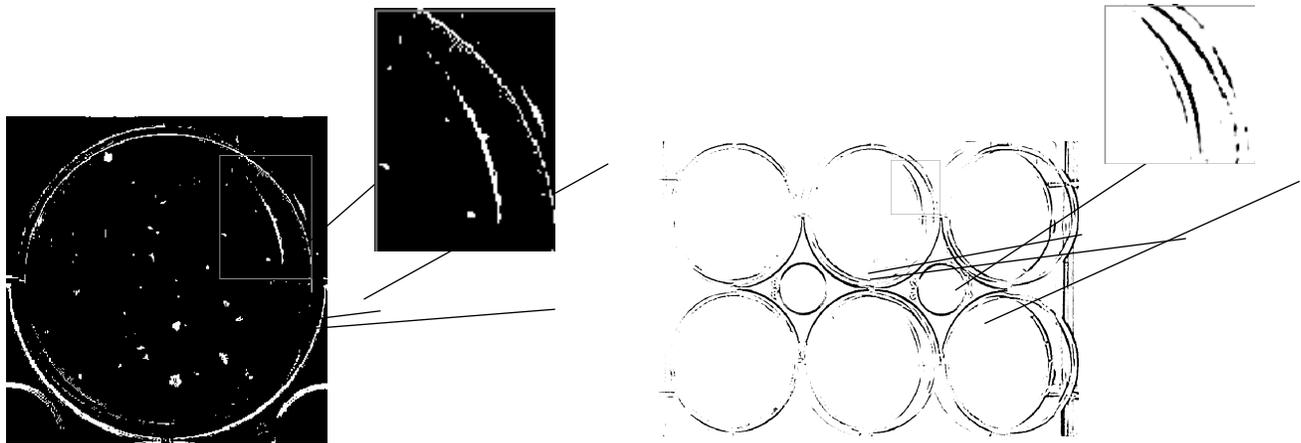
Las imágenes adquiridas en RGB fueron convertidas a escala de grises. Posteriormente se realizó un pretratamiento con el fin de reducir la señal de fondo, para ello se aplicó el Filtro mediana que elimina el ruido sin volver la imagen difusa, preservando los bordes de los objetos. A continuación, se umbralizó la imagen mediante la técnica de Otsu, este proceso asigna a los píxeles de la imagen un valor de '1' si su nivel de gris está por encima del valor umbral o '0' si no lo está. De esta forma la imagen quedó binarizada como se observa en figura 2b y 2c.



a. b. c.

Figura 2. a) Imagen resultante de aplicar el Filtro mediana. b) Imagen segmentada mediante la técnica de Otsu c) Imagen resultante de invertir la Imagen 2b.

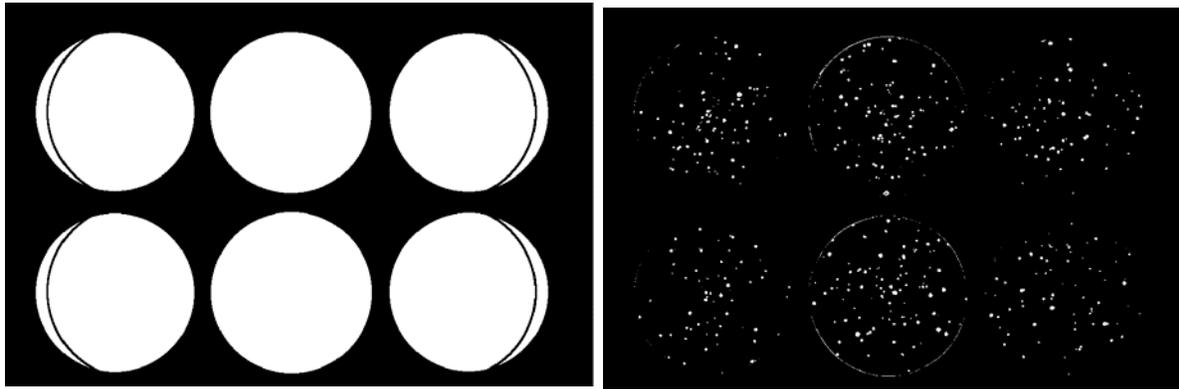
En la figura 1 se observan sombras oscuras en cada plato debido a la iluminación angular producto del escaneo. Algunas de estas quedan presentes al momento de segmentar ya que su tonalidad de grises es semejante al de las colonias. Para eliminarlas se tomó la imagen original en 8 bits y se aplicó filtros morfológicos tales como, "cierre" y "sombrero mexicano", esto con el propósito de eliminar las colonias de los pozos y dejar solamente el contorno de la caja como se muestra en la figura 3b.



a. b.

Figura 3. a) Ejemplo de las manchas presentes en la umbralización. b) Imagen resultante de aplicar filtros morfológicos en la cual se observan las sombras de los frascos.

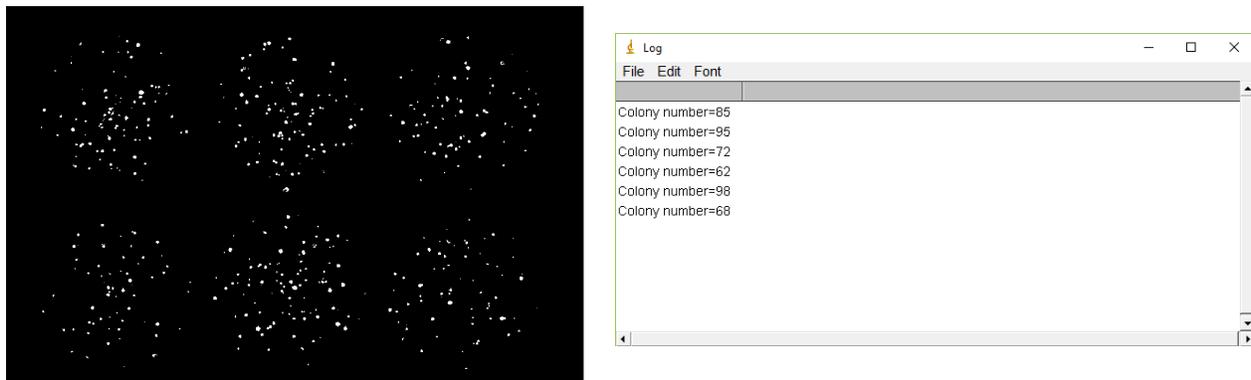
Utilizando la Transformada de Hough, una técnica que permite hallar formas geométricas, se lograron detectar los círculos exteriores del contorno de los pozos y los círculos internos donde se encuentran las sombras. Con estos se creó una máscara como se aprecia en la figura 4a, para eliminar por medio de operaciones entre imágenes las manchas no deseadas y el fondo que no corresponde a la región de interés. Por medio de la sustracción de imágenes se logró obtener la imagen que se observa en la figura 4b.



a. b.

Figura 4. a) Imagen de creación de máscara con trazos de los círculos internos. b) Imagen resultante de la sustracción entre las imágenes 2c y 4a.

Los círculos de los pozos obtenidos con la Transformada de Hough se utilizaron para eliminar los bordes de los frascos. Para segmentar las colonias que se encontraban fusionadas se realizó una transformación Watershed. Luego se etiquetaron las partículas presentes en la imagen, usando 8-conectividad, asignando de esta forma un valor diferente a cada partícula. De esta manera, se obtuvo el número de colonias por frasco como se aprecia en la figura 5b.



a. b.

Figura 5. Imagen resultante de eliminar los bordes del frasco. b) Imagen del resultado obtenido con el presente método, en este se muestra el número de colonias de cada pozo.

Finalmente, se elaboró un menú que permite editar los resultados de manera rápida. Éste se compone de cinco botones (ver Figura 6), el primero "Count cells colonies" ejecuta el método de conteo, los botones "Draw colonies" y "Erase" permiten al usuario marcar las colonias que el programa no logró identificar y borrar las falsas, el cuarto "Count new colonies" realiza nuevamente el conteo con las modificaciones hechas y el último "Synchronize Windows" es una opción para sincronizar la imagen original con la segmentada para realizar las modificaciones con mayor exactitud.

Figura 6. Barra de menú del método.



Análisis del rendimiento diagnóstico

Para evaluar la eficiencia en la detección de colonias del método desarrollado se comparó con el método de referencia: el conteo manual de colonias. Este proceso requiere la observación directa de los pozos, identificación y conteo de las colonias. Se define como una colonia celular aquel cúmulo de células que tras haber pasado 14 días en crecimiento posterior a la exposición a radiación, alcanza un número igual o mayor 50 células y se interpreta como la conservación de la capacidad clonogénica de la célula. Los elementos descritos como otros pueden corresponder a detritos celulares, artefactos o colonias menores a 50 células. El proceso de identificación y conteo de colonias fue realizado secuencialmente por dos investigadores. La evaluación de la exactitud diagnóstica se realizó calculando las medidas de sensibilidad, especificidad y eficiencia diagnóstica. Realizando aproximación a la distribución normal por el tamaño muestral se calcularon intervalos de confianza al 95% para las medidas de rendimiento diagnóstico.

3. Resultados

Al realizar la comparación de los métodos los resultados son categorizados como verdaderos positivo (VP): elementos detectados que si eran colonias; falso positivo (FP): elementos detectados que no eran colonias; falso negativo (FN): elementos no detectados que si eran colonias; verdadero negativo (VN): elementos no detectados que no eran colonias. Tabla 1.

Método automático	Conteo manual		
	Elemento (colonia)	Elemento (otro)	Total
Positivo	6447 (VP)	243 (FP)	6690
Negativo	90 (FN)	1041 (VN)	1131
Total	6537	1284	7821

Tabla 1. Resultados de la evaluación del método de conteo.

Utilizando los datos anteriores, se calculó la sensibilidad, especificidad, exactitud y proporción de error del método con sus respectivos intervalos de confianza exploratorios:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{6447}{6447 + 90} = 0.9862 \rightarrow 98,62\% (IC\ 95\% \ 98.30\% - 98.99\%)$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{1041}{1041 + 243} = 0.8107 \rightarrow 81,07\% (IC\ 95\%: \ 78.93\% - 83.21\%)$$

$$Exactitud = \frac{VP + VN}{Total} = \frac{6447 + 1041 + 90 + 243}{7488} = 0.9574 \rightarrow 95.74\% (IC\ 95\%: \ 95.26\% - 96.17\%)$$

La evaluación del método de conteo automático desarrollado demostró una sensibilidad del 98,62% (IC 95%: 98.30% - 98.99%) lo que indica que el método tiene una capacidad del 98.62% de detectar adecuadamente las colonias. Se evidenció una especificidad del 81.07% (IC 95%: 78.93% - 83.21%), esto indica que la proporción de elementos que sin ser colonias fueron detectadas como tal (falsos positivos = 1-especificidad) fue del 19% (IC 95%: 16.83% - 21.19%). Se calculó la eficiencia o exactitud diagnóstica 95.74% (IC 95%: 95.26% - 96.17%) la cual nos demuestra una excelente proporción de colonias y de elementos diferentes a colonias identificados correctamente por el método propuesto. Desde el otro ángulo, la proporción de errores, ya sean falsos positivos o falsos negativos, que cometió el método propuesto en la identificación de colonias celulares tumorales fue del 4.25% (IC 95%: 3.81% - 4.7%)

4. Discusión

Se evidencia que los resultados del método propuesto tienen una alta sensibilidad y exactitud del conteo de colonias de células tumorales de manera automática basado en las imágenes digitales de las cajas de cultivo que las contienen. Previamente, se había desarrollado un método basado en procesamiento digital de imágenes, que extraía las regiones de interés y por medio de segmentación local etiquetaba las colonias para cuantificarlas. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron muy buenos. El nuevo método aquí presentado, mejora significativamente dichos resultados. Una de las razones principales corresponde al empleo de técnicas que mejoran los problemas de bajo contraste de las colonias con respecto al fondo de las imágenes, colonias celulares fusionadas y elementos no deseados debido a las sombras generadas por la iluminación.

5. Conclusiones

El trabajo presentado tiene un interés particular en desarrollar un método basado en procesamiento de imágenes que permita ayudar a los procesos de los ensayos clonogénicos con el fin de mejorar la terapia de radiación contra el cáncer. El procesamiento de imágenes ha sido muy utilizado en el desarrollo de aplicaciones médicas que automaticen procesos, obtengan resultados rápidos y sean confiables ayudando al personal de distintas áreas en su labor diaria. La oncología es una de las tantas especialidades médicas que se ha visto beneficiada gracias a la utilización de las técnicas de procesamiento de imágenes. Asimismo, el procesamiento digital de imágenes en estas aplicaciones tiene como reto, realizar una segmentación precisa que sea obtenida mediante un proceso automático, y que dicho proceso automático se ejecute rápidamente.

Los resultados obtenidos demuestran que el proceso de segmentación fue altamente acertado, pues consiguió detectar las colonias con una exactitud del 95,74%, lo que constituye en un gran aporte técnico para la investigación en radiobiología y para el personal del área de radio-oncología ya que les permite contar con un sistema eficiente, rápido y preciso para la cuantificación de colonias de células tumorales al realizar los ensayos clonogénicos.

6. Referencias

Artículos de revistas

- Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., & Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, Vol. 1, No. 5, pp. 2315–2319.
- Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J. y Abankwa, D. (2014). ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. *PLoS ONE*, Vol. 9, No. 3.
- Lin, S., Chen, H. y Lin, Y. (2011). Automatic Counting Cancer Cell Colonies using Fuzzy Inference System. *Journal of Information Science and Engineering*, Vol. 27, No. 2, pp. 749-760.
- Siragusa, M., Dall’Olio, S., Fredericia, P. M., Jensen, M. y Groesser, T. (2018). Cell colony counter called CoCoNut. *PLoS ONE*, Vol. 13, No. 11.

Libros

- Closa, D. y Macip, S. (2018). 100 preguntas sobre el cáncer: Todo lo que necesitas saber sobre su historia, tratamiento y prevención. Kailas Editorial, Madrid, pp. 16.

Sobre los Autores

- **Alejandro Oyono Ondo Méndez:** Biólogo, Doctor en Ciencias-Química y Doctor en Ciencias de la Vida y la Salud Université de Nice – Sophia Antipolis. Profesor Asociado, Universidad del Rosario. alejandro.ondo@urosario.edu.co.
- **Andrés Felipe Patiño:** Estudiante de Maestría en epidemiología, Miembro del Grupo de Investigación Clínica, Universidad del Rosario. andresf.patino@urosario.edu.co.
- **David Mora:** Estudiante, Miembro del Semillero de Investigación en Cáncer y Radiobiología, Universidad del Rosario. david.mora@urosario.edu.co.
- **Harold Mena Ríos:** Estudiante, Miembro del Semillero de Investigación en Cáncer y Radiobiología, Universidad del Rosario. harold.mena@urosario.edu.co.
- **Manuel Guillermo Forero Vargas:** Ingeniero Electrónico, Máster en Ingeniería Eléctrica, Máster en imágenes médicas y Doctor en Ingeniería Biomédica. Tutor del Semillero en procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones Lún Decano Facultad de Ingeniería, Universidad de Ibagué. manuel.forero@unibague.edu.co.
- **Laura Andrea Medina Sánchez:** Estudiante de Ingeniería Electrónica, Miembro del Semillero en procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones Lún, Universidad de Ibagué. lauramedina630@gmail.com.
- **Juan Manuel López López:** Ingeniero Electrónico, Máster en Ingeniería. Área: Electrónica y de Computadores, Doctor en Ingeniería de la Universidad de Los Andes, Profesor Asistente, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. juan.lopezl@escuelaing.edu.co.

- **Sandra Liliana Cancino Suarez:** Ingeniera Electrónica, Máster en Ingeniería, Estudiante de Doctorado en Ingeniería de la Universidad del Norte, Profesora Asistente, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. sandra.cancino@escuelaing.edu.co.
- **Paulo Quintero:** Físico médico, estudiante de doctorado en física, Universidad de Hull, P.A.Quintero-Mejia-2019@hull.ac.uk. Físico Médico del Centro de Control de Cáncer Ltda. pqinterome@gmail.com
- **Juliana Sandoval Navia:** Físico Médico del Centro de Control de Cáncer Ltda. julianan@centrodecontroldecancer.com.co.

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)