



# IV CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

"Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento"

6, 7 y 8 de Junio de 2013, Tonantzintla, Cholula, Puebla



## SISTEMA DE RASTREO DE CÉLULAS AL NADO LIBRE

J.A. Pimentel<sup>a</sup>, J. Carneiro<sup>b</sup>, A. Darszon<sup>c</sup>, G. Corkidi<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, UNAM, [jarturo@ibt.unam.mx](mailto:jarturo@ibt.unam.mx)

<sup>b</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, [jcarneir@igc.gulbenkian.pt](mailto:jcarneir@igc.gulbenkian.pt)

<sup>c</sup> Instituto de Biotecnología, UNAM, [darszon@ibt.unam.mx](mailto:darszon@ibt.unam.mx), [corkidi@ibt.unam.mx](mailto:corkidi@ibt.unam.mx).

### RESUMEN.

Presentamos un sistema automático de rastreo simultáneo de micro-partículas diseñado para adquirir y procesar información relacionada al desplazamiento tridimensional de células rápidas al nado libre. Nuestro sistema de adquisición usa un dispositivo piezoeléctrico (montado en un microscopio óptico) para hacer oscilar el plano focal de un objetivo de larga distancia de trabajo en el interior de una muestra biológica (a lo largo de 250  $\mu\text{m}$ ). Mientras tanto, una cámara rápida adquiere grupos de imágenes que registran la información 3D+t de la dinámica celular dentro de la muestra. En la primera parte de este trabajo mostramos algunas de las características básicas de nuestro sistema experimental, la estimación del error asociado y las correcciones que implementamos. En la segunda fase describimos el procedimiento para el procesamiento de la información obtenida en la etapa previa. Parte fundamental de esta etapa es una novedosa técnica de segmentación que aprovecha el cambio sistemático en la apariencia de las células que ocurre como resultado de sus propiedades traslucidas y su interacción con luz. Esta característica permite discriminar efectivamente entre células y artefactos (con equivalente tamaño y forma) presentes en la muestra biológica, por ejemplo polvo o brillos. La eficiencia del proceso de segmentación es muy alta, lo que simplifica notablemente el rastreo. Evaluamos el funcionamiento global de nuestro sistema aplicándolo al rastreo de espermatozoides de erizo marino, células de nado rápido.

### 1. INTRODUCCIÓN.

Un aspecto común en los sistemas biológicos es la gran cantidad de factores que afectan el desarrollo de un proceso. Particularmente compleja, la motilidad celular es un evento regulado por múltiples variables, dentro de las cuales, una de las más importantes es el ambiente químico en el que nada la célula. Al respecto, en las últimas décadas han existido importantes esfuerzos orientados a estudiar la forma en que diferentes células o microorganismos interpretan las condiciones químicas de su entorno y los mecanismos celulares que traducen las señales internas en movimiento. Por ejemplo, en eventos como fecundación, bio-remediación, entre muchos otros [1-4]. En este contexto, resulta muy relevante desarrollar métodos de adquisición y análisis de datos que permitan estudiar estadísticamente los efectos del ambiente químico en la motilidad celular. Al respecto, el estado del arte en rastreo de microorganismos o células al nado libre ha evolucionado notablemente, desde el sistema propuesto por H. Berg en 1960 para seguir el nado 3D de una bacteria de *E. Coli* (vel. de 100  $\mu\text{m/s}$  aprox.) [5], hasta trabajos como el de Wu *et al*, donde a partir de imágenes 2D y usando algoritmos de enfoque, reconstruyen el nado simultáneo de varias bacterias (*E. Coli*) en volúmenes de 60  $\mu\text{m}$  de profundidad [6]. Otro ejemplo es el trabajo de Sheng *et al* donde usan holografía digital para registrar el nado simultáneo de dinoflagelados, microorganismos rápidos (250  $\mu\text{m/s}$  aprox.) [7]. Pese a sus ventajas, estas propuestas presentan algunas restricciones; poca profundidad de rastreo y oclusiones en el caso de Wu o el uso de fuentes de luz coherente y alto costo computacional para decodificar patrones de interferencia en el caso de Sheng. En este contexto describimos un eficiente sistema automatizado de adquisición y análisis de

imágenes capaz de proporcionar información cuantitativa de las trayectorias descritas por células móviles en una gran variedad de condiciones experimentales.

## 2. SISTEMA EXPERIMENTAL

El principio del sistema experimental se basa en el trabajo de Corkidi *et al* [8]; consiste en hacer oscilar el plano focal del objetivo de un microscopio al interior de la muestra biológica y al mismo tiempo, usando una cámara rápida, registrar la información en una secuencia de imágenes (ver Fig. 1). El movimiento del plano focal se controla usando un dispositivo piezoeléctrico P-725 (Physik Instruments, MA, USA) que se monta entre un objetivo de larga distancia de trabajo (40X 0.60 AN Olympus Ph 2 FL N) y un microscopio (Olympus IX71). El piezoeléctrico se controla por un nano-posicionador E-501 que, dirigido por un generador de ondas y amplificador E-505 (Physik Instruments, MA, USA), reproduce una señal triangular de 250  $\mu\text{m}$  en amplitud y 30 Hz en frecuencia. Simultáneamente, una cámara rápida (Motion-Pro HS4, RedLake, AZ, USA) de 4 Gigabytes en RAM adquiere 16380 imágenes TIFF de 512x512 píxeles a una tasa de 2000 cuadros por segundo (durante 8.19 segundos).

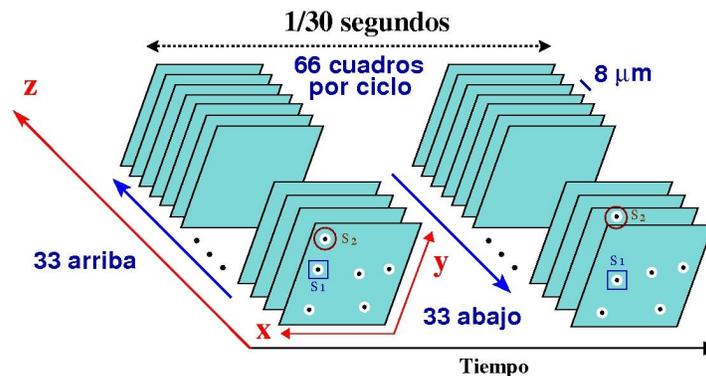


Fig. 1. Esquema del principio de la adquisición de datos usado para registrar la información del desplazamiento 3D de las células. La frecuencia de oscilación del piezoeléctrico (30 Hz) y la frecuencia de adquisición de la cámara (2000 cps.) se ajustan para asegurarse que entre dos barridos sucesivos, cada espermatozoide (etiquetas S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) permanezca en una vecindad menor a dos veces la longitud de su cuerpo (4  $\mu\text{m}$ ).

El experimento incluye un módulo de control (Warner Instruments TCM/CL-100) para preservar la temperatura de la muestra biológica. Para aislar la muestra de las vibraciones del piezoeléctrico (y externas), el recipiente que la contiene se coloca por una estructura independiente al microscopio, estructura que se monta en una mesa óptica (TMC) como se muestra en la Fig. 2. Pese al montaje rígido, la vibración real de el piezoeléctrico incluye componentes paralelas al plano focal que, cuando se transmiten al objetivo, contaminan las trayectorias de las células con desplazamientos laterales. Hemos medido estas componentes utilizando una referencia especial: un micro-orificio perforado en una lámina de aluminio. Cuando la luz pasa por el orificio, forma un punto blanco cuyo centro de masa puede rastrearse a lo largo de toda la oscilación (diafragma abierto para mayor profundidad de campo). Rastreando este objeto determinamos el movimiento real del piezoeléctrico, la curva que lo describe es la que presentamos en la Fig. 3.

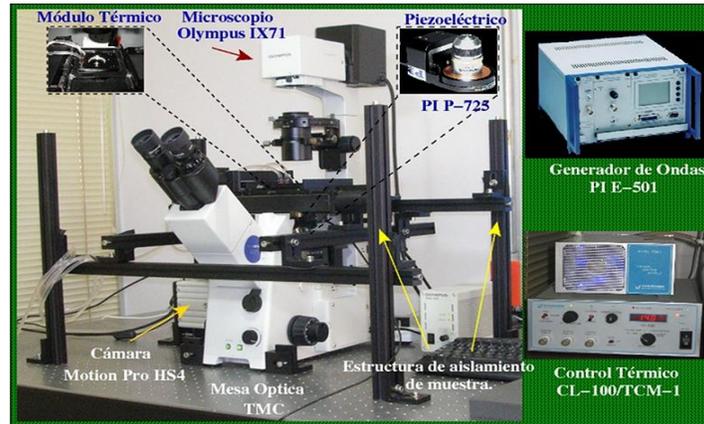


Fig. 2. Sistema de adquisición de imágenes. El dispositivo piezoeléctrico, controlado por un generador de ondas desplaza el plano focal de un objetivo de larga distancia de trabajo dentro de una muestra biológica. El sistema está montado en una mesa óptica que lo aísla de las vibraciones externas y absorbe la energía mecánica del dispositivo piezoeléctrico.

Usando la información de esta curva es posible sustraer los movimientos artificiales en el desplazamiento de las células [9]. Un segundo aspecto a resolver consiste en corregir pequeños corrimientos de fase no acumulativos pero sistemáticos que el piezoeléctrico posee respecto al movimiento ideal. Para conseguirlo usamos un criterio de correlación que identifica la fase real del piezoeléctrico después de cada ciclo (Fig. 2): ubicamos la imagen  $i$  correspondiente al fondo de la primer secuencia, recorremos  $T$  imágenes (donde  $T$  es el periodo) y en una vecindad  $i+T$ , buscamos la imagen que mejor correlacione con la denotada por  $i$ . El resultado es que hallaremos un nuevo índice que denota ubicación del fondo. Iterando este proceso e interpolando una curva promedio entre el inicio y fin de cada ciclo, obtenemos una serie de tiempo que, dado el número de imagen, proporciona la posición en profundidad  $Z$  a la que fue adquirida.

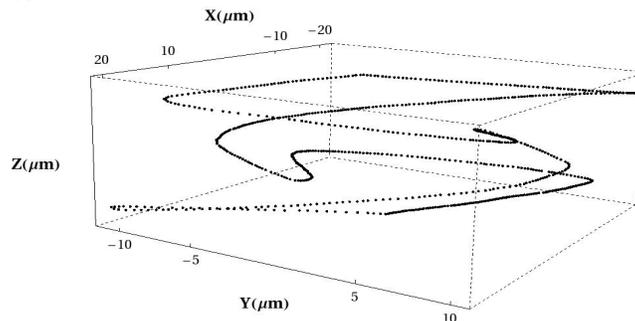


Fig. 3. Curva tridimensional que corresponde al desplazamiento promedio en X-Y-Z descrito por el piezoeléctrico a lo largo de un ciclo de 30 Hz y 250  $\mu\text{m}$  en amplitud. Esta trayectoria se obtiene rastreando el centro de masa de un micro-orificio en una lámina (para detalles ver [9]).

### 3. SEGMENTACIÓN DE CÉLULAS.

El sistema experimental involucra dos diferentes escalas de tiempo; la primera ( $t_1$ ), definida por el periodo del piezoeléctrico (1/30 segundos), se relaciona con el tiempo en el que se realiza el muestreo del micro-volumen y la segunda ( $t_2$ ) asociada al tiempo entre la adquisición de dos cuadros consecutivos (1/2000 segundos). Analizando series de imágenes realizamos una importante observación: en la escala  $t_2$  la apariencia de las células siguen un patrón de cambios sistemático. Dado que en la escala  $t_2$  la célula permanece prácticamente estática concluimos que el cambio en la apariencia está asociado a la posición relativa del observador respecto al objeto (ver Fig. 4.a.i y Fig. 4.a.ii). Conforme el plano focal se aproxima a la célula, el espermatozoide pasa de ser un punto oscuro rodeado de un anillo blanco a ser un punto brillante rodeado de un anillo negro Fig. 4.b. Esta inversión de contraste es característica de estructuras translúcidas que funcionan como cavidades resonantes cuando se exponen a fuentes de luz [10] y no ocurre en artefactos como polvo etc, (Fig. 4.c).

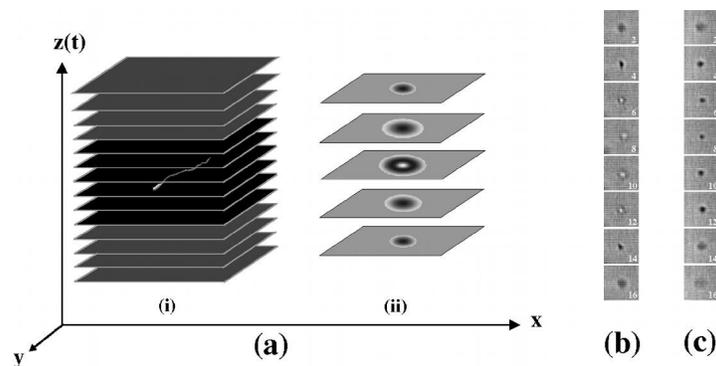


Fig. 4. Esquema y patrón real de los cambios de apariencia exhibidos por la célula en la escala de tiempo  $t_2$ . **(a)**: i. Mientras el piezoeléctrico barre el micro-volumen, la posición del observador cambia respecto a la célula que permanece prácticamente estática. ii. Proyecciones de un espermatozoide en las imágenes 2D (planos focales) de la secuencia muestreada. **(b)** Secuencia de imágenes experimentales que ilustran la evolución de la apariencia de una célula a lo largo de un muestreo en la profundidad. **(c)** Secuencia de muestreo para un artefacto (polvo), obsérvese como el artefacto no presenta la inversión de contraste del caso anterior. El orden de la secuencia se denota por las etiquetas.

Usando esta singularidad hemos planteado un método de segmentación que reconoce el patrón de inversión de contraste exhibido por las células [11], para ello, construimos una secuencia de inversión de contraste promedio (Fig. 5). Usando esta secuencia, el procedimiento de segmentación propuesto es:

1. Pre-proceso de la secuencia de video, donde se elimina el fondo y se realiza el contraste de las células.
2. Segmentación por umbrales multinivel para crear una lista preliminar de objetos brillantes y oscuros relativo al fondo.
3. Construimos mascarar promedio para células con apariencia oscura y otra para células en etapa brillante, calculamos la correlación entre estas mascarar y la lista preliminar del paso 2, preservando los objetos brillantes y oscuros con apariencia y tamaño similar al de las células.
4. La salida del paso tres se somete a un algoritmo que usando criterios de vecindad entre detecciones, busca las transiciones de contraste que distinguen a las células.

La salida final está formada por todas las detecciones que forman parte del patrón de inversión de contraste, esto es, alrededor de 15 detecciones por célula.

#### 4. RESULTADOS

Adquirimos y analizamos datos experimentales del nado del espermatozoide de erizo marino (*L. Pictus*) obteniendo resultados como el que se muestra en la Fig. 6, que ilustra la salida del algoritmo de segmentación contrastada contra la clasificación de un experto. Para evaluar la eficiencia de nuestro algoritmo, iteramos este procedimiento en una secuencia de 100 imágenes y obtenemos los resultados que se muestran en la Fig. 7. A partir de ellos y usando las expresiones descritas en las ecuaciones 1 y 2, calculamos la eficiencia (PPV y NPV) de nuestro detector de células (Fig. 7) [12].

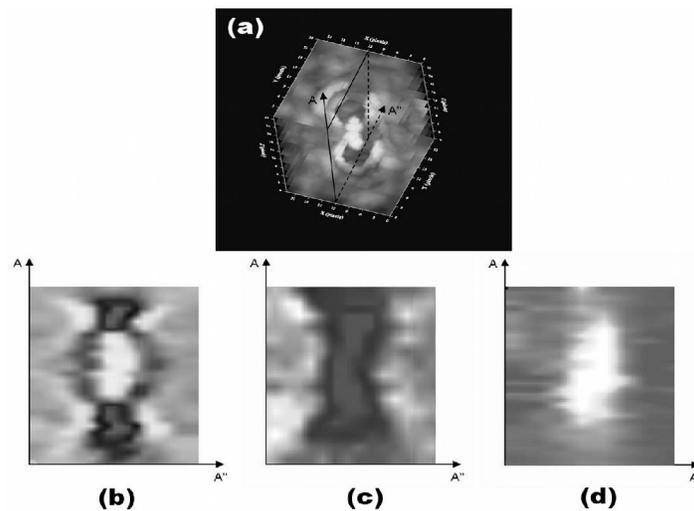


Fig. 5. (a) Mascara tridimensional correspondiente a la evolución en la apariencia de las células relativa al plano focal de muestreo. (b) Corte AA' tomada de la máscara 3D anterior, obsérvese que el perfil 2D exhibe claramente el patrón de inversión anillo claro/ centro oscuro hacia anillo oscuro/centro blanco. Corte AA' tomado de la máscara 3D correspondiente a un artefacto (c) y objeto brillante (d).

$$PPV = TP / (TP + FP) \quad (1),$$

$$NPV = TN / (TN + FN) \quad (2).$$

Donde, TP corresponde a fracciones (secciones) de células correctamente clasificadas (Fig. 4), TN corresponde a fracciones de artefactos correctamente clasificados, FP fracciones de artefactos mal clasificados y FN fracciones de células mal clasificadas.

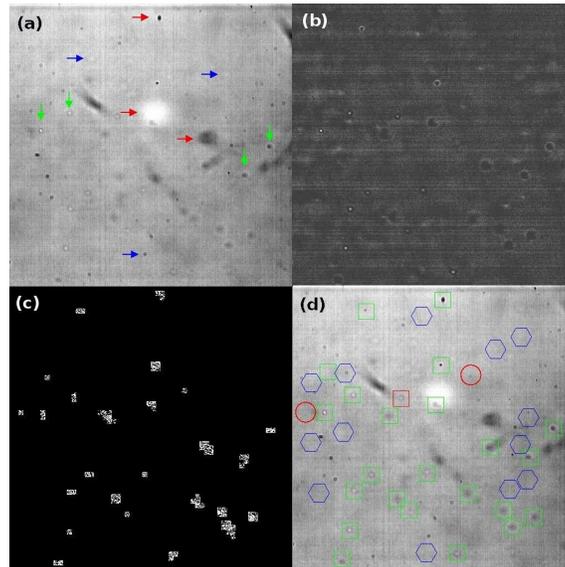


Fig. 6. Etapas de la segmentación. **(a)** Imagen Original con tres clases de objetos. Artefactos fijos (flechas rojas), células (flechas verdes) y artefactos con apariencia variable (flechas azules). **(b)** Imagen después de eliminar fondo y artefactos fijos. El experto etiqueta artefactos (hexágonos azules) y células (cuadros verdes). **(c)** Detecciones que presentan inversión de contraste. **(d)** Segmentación automática de células (cuadros verdes), artefactos con apariencia variable (hexágonos azules), falsas células (círculos rojos) y células no detectadas (cuadros rojos).

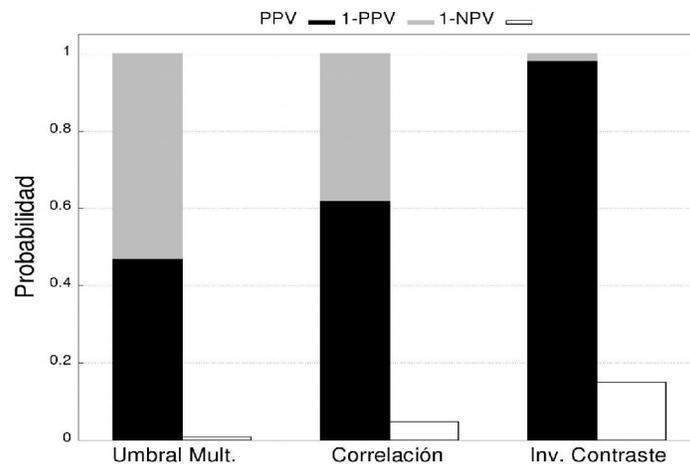


Fig. 7. Evolución de los parámetros asociados a la clasificación de células a través de la secuencia definida en el algoritmo de segmentación. Para cada etapa la gráfica muestra la probabilidad de una correcta clasificación (PPV), la probabilidad de clasificar incorrectamente un artefacto (1-PPV) y la probabilidad de clasificar incorrectamente una célula (1-NPV).

En la parte final del algoritmo, el parámetro PPV alcanza un valor de 0.98, lo que significa que de cada 100 detecciones clasificadas como fracciones pertenecientes a células, 98 serán



acertadas y solo 2 serán erróneas. Esta alta sensibilidad tiene un coste; perder 15 de cada 100 detecciones, sin embargo, como ya mencionamos, cada célula tiene múltiples detecciones asociadas (Fig.4.a), por tanto, aunque se pierdan algunas de ellas, la célula aún puede detectarse. En términos del rastreo, el beneficio de una excelente eficiencia se puede apreciar en la Fig. 8 que muestra la salida de cada etapa de la segmentación en un espacio 3D. Observamos que el número de detecciones disminuye secuencialmente hasta que al final prácticamente solo quedan secciones de células (móviles o muertas). En esta situación el rastreo se simplifica significativamente, y es posible realizarlo mediante un algoritmo que asocia detecciones basado en criterios de desplazamiento espacio-temporal mínimo (Fig. 8.d). El algoritmo incluye criterios de máximo desplazamiento que evitan que se incluyan movimientos físicamente imposibles en las trayectorias.

#### 4. CONCLUSIONES

Desarrollamos un novedoso y eficiente sistema de adquisición y análisis de datos orientado al rastreo 3D de células. El algoritmo de segmentación propuesto se basa en información asociada al patrón de difracción de la célula y permite identificar eficientemente esta clase de estructuras traslúcidas en un ambiente ruidoso. Por sus características el algoritmo es aplicable incluso en datos generados por sistemas de adquisición distintos, por ejemplo, los basados en holografía digital. Comparado con los sistemas reportados, nuestra propuesta permite explorar condiciones experimentales más diversas y reduce los costes computacionales, factores indispensables para el estudio estadístico de los movimientos de las células o microorganismos.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. M. Eisenbach and L. C. Giojalas, "Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 276-285, 2006.
2. C. H. Geneva, Ed., *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, Fifth. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, 2010.
3. M. Morisawa, "Cell signaling mechanisms for sperm motility.," *Zoological science*, vol. 11, no. 5, p. 647, 1994.
4. R. Ellis and C. Athale, "Computational Imaging in Cell Biology," *The Journal of Cell Biology*, vol. 161, no. 3, pp. 477-481, May. 2003.
5. H. C. Berg, "How to Track Bacteria," *Review of Scientific Instruments*, vol. 42, no. 6, pp. 868-871, 1971.
6. M. Wu, J. W. Roberts, S. Kim, D. L. Koch, and M. P. DeLisa, "Collective Bacterial Dynamics Revealed Using a Three-Dimensional Population-Scale Defocused Particle Tracking Technique," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 7, pp. 4987-4994, 2006.
7. J. Sheng, E. Malkiel, and J. Katz, "Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions," *Applied optics*, vol. 45, no. 16, pp. 3893-3901, 2006.
8. G. Corkidi, B. Taboada, C. D. Wood, A. Guerrero, and A. Darszon, "Tracking sperm in three-dimensions," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 373, no. 1, pp. 125-129, 2008.
9. A. Pimentel and G. Corkidi, "Mechanical vibration compensation method for 3D+t multi-particle tracking in microscopic volumes," in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE*, 2009, pp. 1429-1432.
10. R. Anthone, P. Flament, G. Gouesbet, M. Rhazi, and M. E. Weill, "Interaction between a laser beam and some liquid media," *Appl. Opt.*, vol. 21, no. 2, pp. 4-6, 1982.
11. J. A. Pimentel and G. Corkidi, "Three dimensional template matching segmentation method for motile cells in 3D+t video sequences.," in *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2010, vol. 1, pp. 4777-4780.
12. J. A. Pimentel, J. Carneiro, A. Darszon, and G. Corkidi, "A Segmentation Algorithm for Automated Tracking of Fast Swimming Unlabelled Cells in Three-dimensions," *Journal of Microscopy*, Vol. 245, no. 1, pp. 72-81, 2012.