

Reconocimiento de patrones de imágenes digitales obtenidas mediante microscopio y parametrizadas según la técnica de Micronúcleos y la técnica Ensayo Cometa empleada por el Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental UNaM-IBS-CONICET para la detección de daños celulares.

Caffetti Yanina Andrea¹, Vera Laceiras María Silvia¹, Acosta Nelson^{2,3}, Pisarello María Inés⁴, Caffetti Jacqueline Diana^{1,5,6}.

¹Facultad de Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.

²Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil.

³Universidad Nacional de Tres de Febrero, Caseros, Buenos Aires.

⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes.

⁵Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

⁶Becaria Postdoctoral CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Instituto de Biología Subtropical (UNaM-IBS-CONICET).

yanina007@gmail.com,

vlhsilvia@gmail.com,

el.nelson.acosta@gmail.com,

mainespisarello@exa.unne.edu.ar, jacqui_caffetti@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen:

En esta línea de investigación se estudian y analizan diferentes técnicas de clasificación, segmentación y extracción de contornos de imágenes digitales, en particular se centra la atención en las líneas de investigación que utilizan el algoritmo DeepMask, algoritmos evolutivos y redes neuronales. Se presentan aquí algunos resultados preliminares y se pretende aplicarlos a imágenes obtenidas mediante microscopios, específicamente a aquellas parametrizadas según la técnica de Micronúcleos y Ensayo Cometa, ambos empleados por el Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental de la UNaM-IBS-CONICET para la detección de daños celulares.

Palabras claves: imágenes digitales, microscopio, patrones de imágenes, algoritmos de segmentación, extracción de

contornos, redes neuronales, clasificación de imágenes.

Contexto:

La línea de investigación en que se enmarca el proyecto corresponde a la propuesta de tesis para acceder al título de Magíster en Tecnologías de la Información dictado conjuntamente por la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) y la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Se diseña según lo relevado en el Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental que se emplaza en la UNaM. El área de Monitoreo Ambiental analiza el daño genético en organismos acuáticos y su impacto sobre la salud humana como consecuencia de la exposición a contaminantes urbanos e industriales presentes en los ríos y arroyos de la Provincia de Misiones. Actualmente se aplican dos técnicas específicas: el Test o Técnica de Micronúcleos y Ensayo Cometa o Electroforesis en gel de células

individuales, a muestras tomadas del Río Paraná, por ejemplo [1]. Para facilitar el trabajo del Laboratorio, se propone investigar la posibilidad de aplicar técnicas de clasificación, segmentación y extracción de contornos de las imágenes digitales producidas por microscopio.

Introducción:

Descripción de actividades del Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental, Instituto de Biología Subtropical; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales; Universidad Nacional de Misiones; CONICET (UNAM-IBS-CONICET):

El Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental inició sus actividades en el año 1989, dedicándose a estudios citogenético-evolutivos en diferentes modelos animales con principal énfasis en peces neo tropicales de agua dulce. Luego se incorporó la línea de citogenética humana, prestando servicios de diagnóstico en convenio entre la UNaM y el Instituto de Previsión Social de la Provincia de Misiones (IPS). Y a partir del año 1993 se incluyó la línea de mutagénesis y monitoreo ambiental, que tiene como objetivos estudiar el impacto de contaminantes en ambientes naturales y en bioensayos de laboratorio a través de técnicas citogenético-moleculares. Actualmente, el laboratorio está constituido por su director, el Dr. Alberto Fenocchio; docentes-investigadores: Mgter. Cristina Pastori, Dra. Jacqueline Caffetti y Lic. Héctor Roncati; así como tesistas, becarios de grado y postgrado: Lic. Ulises Pioli, Lic. Melina Maldonado y los alumnos Angemara Rau y Sergio Müller.

El laboratorio en su línea de investigación

referida a agentes contaminantes acuáticos, aplica técnicas específicas de genética toxicológica, como el Ensayo Cometa o el Test de Micronúcleos. Estos denominados “biomarcadores genéticos” [1], son útiles como señales de alerta temprana en cursos de agua contaminados y, por lo tanto, su análisis resulta de interés predictivo en evaluaciones de estado de calidad de cursos hídricos y manejo de cuencas.

En el test de Micronúcleos, los protocolos aceptados internacionalmente exigen el recuento de 1000 a 2000 células por individuo (considerándose al menos el análisis de 10-15 individuos por cada sitio estudiado). Estas células son clasificadas en distintos subtipos de acuerdo al daño que presentan, por ejemplo: células normales, células con micronúcleos, y otro grupo denominado células con alteraciones de la morfología nuclear que a su vez incluyen: núcleos con lobulaciones, con muescas, con hendiduras, en forma de ocho, con gemaciones, con puentes, binucleadas, entre otras. Este análisis debe hacerse mediante el uso del microscopio, recorriendo todo el preparado en el mayor aumento (100X), según los protocolos de referencia [2, 3, 4].

El Ensayo Cometa, es otra técnica donde se cuentan 100 células por cada individuo (de un total de 10-15 individuos por tratamiento). Estas 100 células se clasifican en 5 clases dependiendo de la intensidad de fluorescencia y el largo de las “colas de los cometas” que son equivalentes a la cantidad de ADN fragmentado o con daño: Clase 0 (sin daño, es decir, no tiene cola); Clase 1 (tamaño de la cola hasta una vez el diámetro de la cabeza); clase 2 (tamaño de la cola hasta dos veces el diámetro de la cabeza); clase 3 (tamaño de la cola hasta

tres veces el diámetro de la cabeza) y clase 4 (casi todo el ADN aparece fragmentado en la cola).

El registro y clasificación de estos tipos celulares se hace manualmente. Una vez se clasifican todas las células en las 5 clases, debe calcularse el score de daño por cada individuo y, a su vez, por cada tratamiento (promediando los datos de los 10-15 individuos).

El registro manual que lleva adelante el Laboratorio, incluye anotaciones en cuadernos del número de células en cada clase y luego pasar los datos a una planilla de Excel para el cálculo del score o ID.

Actualmente cuando se habla de tratamiento de las imágenes digitales, se pueden citar un gran número de técnicas y desarrollos que se encuentran en constante perfeccionamiento, entre ellos la capacidad de segmentación y clasificación de una imagen tratándola como un objeto. La segmentación semántica a nivel de instancia o la segmentación de instancia, por ejemplo, es la tarea de detectar y segmentar conjuntamente instancias individuales de objetos en una imagen [6]. La extracción de contornos en imágenes digitales es una operación que facilita también los procesos de segmentación e identificación de patrones, tanto para tareas de reconocimiento e interpretación, como también de clasificación de objetos [7].

Se inicia la investigación con la posibilidad de obtener imágenes digitales en el Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental a través del uso del microscopio y una cámara. El objetivo del procesamiento digital de dichas imágenes, que se plantea en esta investigación, es extraer información útil

que pueda parametrizarse según las técnicas de Test de Micronúcleos o Ensayo Cometa.

Líneas de Investigación y Desarrollo:

Para el Test de Micronúcleos se propone investigar la posibilidad de brindar un tratamiento de imagen que logre el corte del recuento al alcanzar el total de células requeridas (1000 o 2000 según corresponda) y a la vez de permitir codificar cada uno de los subtipos celulares en una misma plantilla donde finalmente se calculan tanto los totales de células analizadas en cada clase como las frecuencias finales de cada grupo. Actualmente, las líneas de investigación son: identificación y detección de imágenes a través de la detección de contornos según la propuesta de R. Katz y C. Delrieux [8]. Básicamente, un operador gradiente, herramienta utilizada para la detección de las variaciones en los niveles de intensidad que pudieran corresponder a los contornos de interés. Y, red neuronal convolucional (CNN) única para generar cuadros de delimitación, máscaras de segmentación y clasificar objetos en paralelo, utilizando el algoritmo DeepMask [6]. Investigación en la que una CNN profunda aprende a generar máscaras de segmentación de objetos a partir de una imagen de entrada.

Para la mejora del Ensayo Cometa en test de fluorescencia (captura, clasificación, conteo y gestión de los resultados) se usarán técnicas digitales que combinan algoritmos matemáticos y computacionales que incluyen fuzzy logic [15], redes neuronales [16] y gestión del conocimiento [17]. La captura en este momento se realiza a través de cámaras digitales sobre el microscopio, en un

espacio de total oscuridad para que el reactivo aplicado presente la fluorescencia. Se propone tratamiento de estas imágenes de tipo .jpg, a través de técnicas digitales y/o control predictivo con Modelo MPC para la clasificación [20] y conteo. Con esta clasificación, junto al score y aplicando gestión del conocimiento [17], se intentará ver la evolución de los daños en ADN, o bien, poder predecir compatibilidad en prótesis de acuerdo a aleación de metales en cada individuo. El objetivo del Modelo MPC consiste en el hallazgo de una trayectoria futura de la variable manipulada u. Es decir la implementación de un algoritmo de control predictivo en espacio de estados. Esto se logra utilizando un modelo de predicción que describe el comportamiento de las variables del proceso a controlar, el cual reside en el controlador [18].

Las predicciones dependen de los valores conocidos hasta el instante k_i y de las señales de control futuras. La solución al problema devuelve un vector que contiene las acciones de control futuras cuya dimensión depende del horizonte de control, sin embargo, solamente el primer elemento de este vector debe ser enviado a la planta. Este proceso se vuelve a repetir para cada instante k_i .

Resultados obtenidos/esperados:

Hasta el momento, se estudiaron y analizaron diferentes fuentes de información para definir aquellas técnicas de clasificación de imágenes, incluso aquellas capturadas por microscopio, que tienen menor margen de error en cuanto a la detección de objetos y por consiguiente, menor intervención humana a la hora de procesarlos [9,10,11,12,13,14].

Se espera al finalizar la investigación, el desarrollo de un prototipo basado en la

técnica de manipulación de imágenes que más se adapte a las especificaciones del Laboratorio de Citogenética General y Monitoreo Ambiental de la UNaM-IBS-CONICET en la detección de daños celulares, planteando como línea de investigación futura, la posibilidad de trabajar en otros proyectos que actualmente se llevan a cabo en dicho Laboratorio.

Formación de Recursos Humanos:

Este proyecto de investigación forma parte del desarrollo de dos tesis de posgrado, correspondientes a la carrera de Magíster en Tecnologías de la Información dictada por la Universidad Nacional de Misiones y la Universidad Nacional del Nordeste. Cada tesis tiene como estudio de caso una técnica de análisis utilizada en el Laboratorio, es decir, una tesis trabaja con el Ensayo Cometa y la otra con el Test de Micronúcleos. La tesis que hace referencia al Ensayo Cometa se encuentra bajo la dirección de la Dra. María Inés Pisarello, y la tesis que se vincula al Test de Micronúcleos es dirigida por el Dr. Nelson Acosta. Se articulan con la línea de investigación de la Becaria Postdoctoral del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) en el Instituto de Biología Subtropical (UNaM-IBS-CONICET) que lleva adelante la codirección de ambas tesis.

Bibliografía:

[1] GNA. Furnus, JD. Caffetti, EM. García, MF. Benitez, MC. Pastori, AS. Fenocchio. "Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina)" Brazilian Journal Biology [online]. Vol.74, n.1, pp.217-221. ISSN 1519-6984.

- <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13712>, 2014.
- [2] K. Al-Sabti, CD. Metcalfe. “Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water”. Mutation Research 343, Netherlands, 1995.
- [3] M. Fenech. “The in vitro micronucleus technique”. Mutation Research 455, Netherlands, 2000.
- [4] J. Barsiene, V. Dedonyte, A. Rybakovas, L. Andreikenaite, OK. Andersen. “Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil”. Aquatic Toxicology 78S, 2006.
- [5] JA. Di Rienzo, F. Casanoves, MG. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, CW. Robledo. InfoStat versión 2012, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [online] <http://www.infostat.com.ar>
- [6] T. Nguyen, A. Shinya, T. Harada, R. Thawonmas. “Segmentation Mask Refinement Using Image Transformations. IEEE Access Dic. 2017.
- [7] A. Jain. Fundamentals of Digital Image Processing. Prentice-Hall, Cambridge, 1996.
- [8] R. Katzy, C. Delrieux. Estrategias Evolutivas para la Detección de Contornos en Imágenes Digitales. Universidad Nacional del Sur, Alem 1253, (8000) Bahía Blanca, 2008.
- [9] M. Datcu and K. Seidd. Image information mining: exploration of image content in large archives. In IEEE Conference on Aerospace, volume 3, pages 253–264, 2000.
- [10] C. Sanz, A. De Giusti. Clasificación de imágenes digitales utilizando patrones N-dimensionales. LIDI. Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Informática. Facultad de Informática. UNLP, 2002.
- [11] J. Li, Y. Song, Y. Li, S. Cai, Z. Yang. Automatic Target Segmentation based on Texture for Microscopic Images of Chinese Herbal Powders. Control and Decision Conference (CCDC), pp.1473-1478, at Guiyang, May 2013.
- [12] S. Gupta, S. Sen Purkayastha. Image Enhancement and Analysis of Microscopic Images using various Image Processing Technique. International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA), Vol. 2, Issue 3, pp.044-048, May-Jun 2012.
- [13] R. Gonzales, R. Woods Digital Image Processing. Prentice Hall, New Jersey, 2002.
- [14] Q. Wu, F. Merchant, K. Castleman. Microscopic Image Processing. Pearson, 2010.
- [15] V. Cross; Fuzzy Information Retrieval, [online] <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01014019> .1994
- [16] L. Pasa; J. Costa; M. Medeiros; Fusion of Kohonen Maps Ranked by Cluster Validity indexes. Dic 2017.
- [17] H. Takeuchi, I. Nonaka. The Knowledge-Creating Company, How Japanese companies create the dynamics of innovation, Oxford University Press, 1995.
- [18] J. Zambrano, A. González. “Implementación de un algoritmo de control predictivo en espacio de estados sobre una plataforma de simulación desarrollada en Matlab®”. Ingenius. N.º9, (Enero-Junio). pp. 5-14. ISSN: 1390-650X. 2013.