

Medición del Volumen de Quistes de *Toxoplasma gondii* mediante Visión por Computador en Imágenes de Microscopia de Fluorescencia

¹Valencia-Vidal Brayan A., ²Juez-Castillo Graciela

^{1,2} Grupo de Investigación OSIRIS-BIOAXIS, Programa de Bioingeniería, Universidad El Bosque
Bogotá, Colombia

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito que afecta diversos organismos de sangre caliente, entre ellos el ser humano, se caracteriza por presentar infección crónica con formación de quistes especialmente en tejido cerebral. Los quistes de este parásito presentan diversos tamaños mediados por procesos de interacción entre el huésped y el patógeno. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un algoritmo computacional para estimar el volumen de quistes de *T. gondii* presentes en imágenes biológicas. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopia de fluorescencia usando un microscopio electrónico Carl Zeiss Imager.A2 AXIO y cámara Nikon Carl Zeiss SONY DSC-S85 (4.1 Mega pixels CCD 6x zoom). El algoritmo se desarrolló a través del tratamiento digital de imágenes de los quistes presentes, mediante el uso de la librería OpenCV. Este método computacional estimó el volumen de 30 quistes del parásito suponiendo una conformación elipsoidal y obteniéndose volúmenes entre 12,5 (10^3) y 114(10^3) μm^3 para los quistes de *T. gondii* encontrados. El algoritmo calculó el volumen en píxeles y posteriormente realizó la trazabilidad de la imagen para obtener el volumen estimado del quiste en micrómetros cúbicos (μm^3).

Palabras claves: *Toxoplasma gondii*; Volumen del Quiste, Visión por computador, Procesamiento de Imágenes

1. INTRODUCCIÓN

El parásito protozoario *Toxoplasma gondii* posee un amplio ciclo de vida debido a que tiene la capacidad potencial de infectar varias especies de animales de sangre caliente, lo que le permite distribuirse en la naturaleza fácilmente [1]. Se caracteriza por poseer dos sistemas de reproducción sexual y asexual, la primera establecida en animales de la familia *Felinae* y determinada por el estado de desarrollo ooquistico el cual después de ser liberado al ambiente se convierte en un potencial factor de infección al ser ingerido por otras especies de sangre caliente entre ellos el humano. La segunda forma de reproducción del parásito está definida por los estados taquizoito y bradizoito, los cuales definen la infección aguda y crónica respectivamente. El bradizoito de este parásito por mecanismos biológicos forma quistes tisulares que se distribuyen en 54 regiones del cerebro definidas anatómicamente pero no de manera homogénea, debido a que algunas regiones cerebrales presentan mayor número de quistes [1].

Algunos reportes indican que existen 3 mecanismos de impacto por la presencia del *T. gondii* en el cerebro, muerte neuronal o atrofia de los procesos neurales, dilatación de ventrículas en ratones con evidencia de infección crónica y reducción en el volumen de materia gris en pacientes con diagnóstico de esqui-

zofrenia y positivos para *T. gondii* [1]. Además se asocia la presencia del parásito con alteración en el metabolismo de algunos neurotransmisores, citosinas e interleucinas, en el caso de ratones infectados se observan cambios en los procesos de modulación de comportamiento, orientación espacial y mecanismos de aprendizaje [1]. No obstante aún no hay estudios que reporten claramente las funciones cerebrales involucradas en los procesos de interacción huésped-patógeno, por ende es relevante continuar el análisis de aquellas características físicas que generen información del estado de desarrollo quístico y poder contribuir con el entendimiento de este patógeno oportunista de gran prevalencia.

La literatura reporta que el mecanismo de acción de *T. gondii* depende de factores como tipo de virulencia que presente la cepa, esto indica que de acuerdo a la características de genotipificación del parásito éste desarrolla uno u otro estado que le permiten establecer el proceso de invasión celular, por ejemplo, la virulencia en modelos murinos se ha clasificado en tres tipos, cepas tipo I altamente virulentas, cepas tipo II, III y exóticas definidas como avirulentas y las cuales tienen la capacidad de inducir directamente la formación del bradizoito y posteriormente el desarrollo del quiste estableciendo la infección crónica [2]. En Colombia se ha reportado presencia de cepas avirulentas de *T. gondii* en carnes de consumo humano [4], lo cual indica que en nuestro país circula con alta prevalencia este parásito elevando la importancia en los estudios del patógeno que permitan profundizar en el conocimiento de la parasitosis.

Durante la fase crónica el bradizoito se replica de forma lenta en respuesta al sistema inmune del huésped lo que contribuye con la variedad en el tamaño del quiste formado [3]. Varios estudios reportan variedad en el tamaño de los quistes tisulares cerebrales, el tamaño de un quiste puede dar información respecto a varios procesos de desarrollo biológico de la infección, entre ellos, ruptura natural de quistes con posterior liberación de bradizoitos y formación de nuevos quistes y procesos mediados por células T [3].

Para contribuir con la comprensión de los mecanismos de interacción del estado quístico de *T. gondii*, los autores de este trabajo han participado en otras publicaciones, entre ellas, el desarrollo de un algoritmo computacional que permitió detectar automáticamente quistes de *T. gondii* en imágenes biológicas utilizando características morfológicas de este estado de desarrollo del parásito como la circularidad y textura [5]. Otro de los estudios fue la medición automática del área de quistes del parásito en nm^2 teniendo en cuenta el criterio elipsoidal del mismo [6]. En la actualidad el tamaño de un quiste se mide generalmente con el cálculo del diámetro del mismo [7], sin embargo la determinación del volumen se considera un factor biológico importante debido a que presenta información respec-

to al número estimado de bradizoitos que pueda almacenar la estructura quística tisular, como lo evidencia Adam *et al.*, 2013 en su estudio en el que determina que el tamaño del quiste medido por el volumen está relacionado proporcionalmente con la cantidad de bradizoitos, un mayor volumen del quiste indica posiblemente mayor número de bradizoitos internamente. Por tanto, en este trabajo se estableció como objetivo desarrollar un algoritmo computacional para estimar el volumen de quistes de *T. gondii* presentes en imágenes biológicas, obtenidas de muestras de tejido cerebral de ratón infectado con cepa avirulenta aislada en una región del Departamento del Meta, Colombia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo Experimental Molecular

La obtención de las imágenes utilizadas se realizó con una cámara Nikon Carl Zeiss SONY DSC-S85 (4.1 Mega pixels CCD 6x zoom), a partir de microscopía de fluorescencia mediante el uso de un microscopio electrónico Carl Zeiss Imager.A2 AXIO

a una escala de visualización de 400X. Las muestras biológicas analizadas corresponden a quistes de la cepa avirulenta JUEZ1 de *T. gondii* aisladas de tejido cerebral de ratón con 8 meses de infección. El proceso experimental y manejo del modelo vivo que complementa el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo siguiendo estrictamente los protocolos de bioseguridad establecidos por la Universidad de los Andes, todo el análisis molecular experimental se desarrolló en los laboratorios del Grupo de Investigación Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, BBMP, de la Universidad de los Andes, Bogotá. Col, con la implementación de la técnica molecular PCR, la cual permitió amplificar un fragmento de 579pb correspondiente al gen B1 del parásito y protocolo de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos, anticuerpo primario anti-rabbit (DHO-DHOD) y anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con FITC, utilizando un total de 20uL de suspensión (Homogenizado de quistes de *T.gondii* en PBS1X) de quistes tisulares por cada lámina examinada, este procedimiento contribuyó con la visualización fluorescente de los quistes exhibiendo una morfología y tamaño específico (Fig 1A y B).

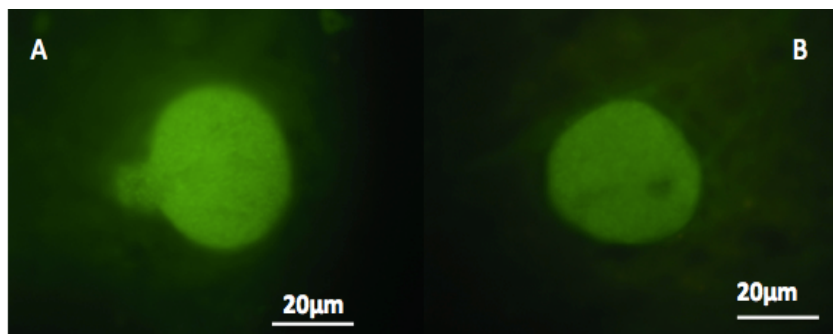


Figura 1. Quistes de *T. gondii*. Cepa avirulenta JUEZ1. Tejido de cerebro de ratón con 8 meses de infección. Inmunofluorescencia Indirecta 400x. (A) Quiste en proceso de liberación de bradizoitos (B) Quiste elipsoide.

Algoritmo Computacional

Para el desarrollo del algoritmo de procesamiento de las imágenes analizadas se utilizó la librería OpenCV utilizando el lenguaje de programación C++ y como IDE QT. El procesamiento de imágenes contempló diversas etapas relacionadas con el pre-procesamiento, segmentación, etiquetado, extracción de características y reconocimiento e interpretación (Fig. 1). Para el algoritmo implementado se consideran las características morfológicas del quiste tisular del parásito *T. gondii*, entre ellas, la forma regular elipsoide y el tamaño del mismo [7].

En la etapa de pre-procesamiento se realizó un filtrado de la imagen (Fig. 3B) con el fin de eliminar ruido y resaltar las características del quiste. Posteriormente se segmentó la tonalidad fluorescente para determinar la ventana de trabajo en la cual se encuentra el quiste. Para la etapa de binarización (Fig. 3C) se umbralizó la imagen para separar la estructura quística del resto de material celular. Se determinó el contorno del quiste (Fig. 3D) para hallar los radios principales de la región en la que se encuentra el quiste.

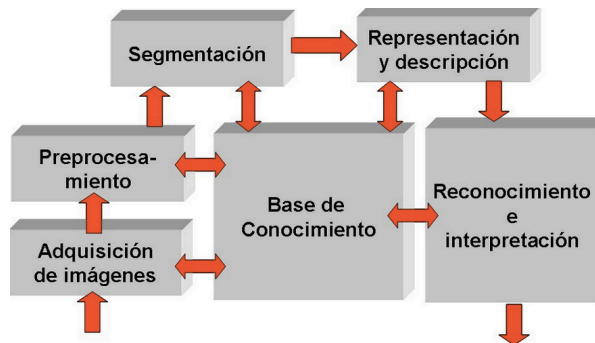


Figura 2. Etapas de Procesamiento Digital de la Imagen. [En línea] Disponible en: <http://sabia.tic.udc.es>

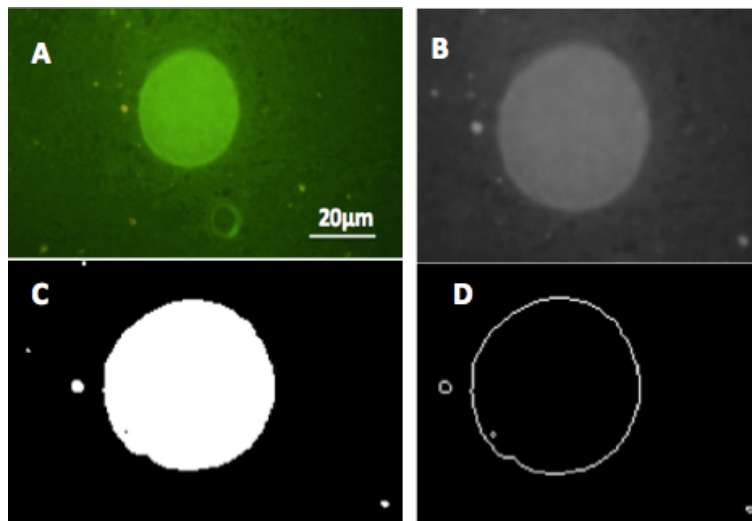


Figura 3. (A) Quiste de *T. gondii*, Imagen original. Inmunofluorescencia Indirecta. (B) Imagen Filtrada. (C) Imagen Binarizada. (D) Imagen de contorno del quiste.

3. RESULTADOS

Cálculo de volumen de Quistes de *T. gondii*

Una vez determinados los radios principales de la elipse que encierra el contorno del quiste (Fig. 4), se utilizó el menor de estos dos radios para definirlo como el radio de profundidad de la elipsoide (R3). Posteriormente utilizando Ec. (1) se calculó el volumen en pixeles de 30 quistes del parásito, luego a partir de la escala del micrómetro se determinó el valor del volumen en μm^3 Ec. (2). Los resultados obtenidos por este algoritmo son consistentes con los hallados por Adam y colaboradores en el 2013, quienes reportaron la medición del volumen de varios quistes de *T. gondii* asociando el tamaño del mismo con el tiempo de infección del ratón, sus resultados mostraron diferentes volúmenes, entre ellos, $54,15 \pm 35,18$ ($10^3 \mu\text{m}^3$) para ratones

con 2 meses de infección, $139,15 \pm 175,05$ ($10^3 \mu\text{m}^3$) con 3 meses post-infección y $107,97 \pm 67,32$ ($10^3 \mu\text{m}^3$) para 4 meses de post-infección, esto indica que los quistes al parecer alcanzan un nivel estacionario después de los 4 meses de infección estabilizando su tamaño, sin embargo se tiene en cuenta que el crecimiento del quiste depende de condiciones biológicas establecidas con el huésped [3].

$$V(\text{pixeles}) = \frac{4\pi R1R2R3}{3} \quad \text{Ec. 1}$$

$$V(\mu\text{m}^3) = \frac{V(\text{pixeles})}{(\text{Valor pixeles por } \mu\text{m})^3} \quad \text{Ec. 2}$$

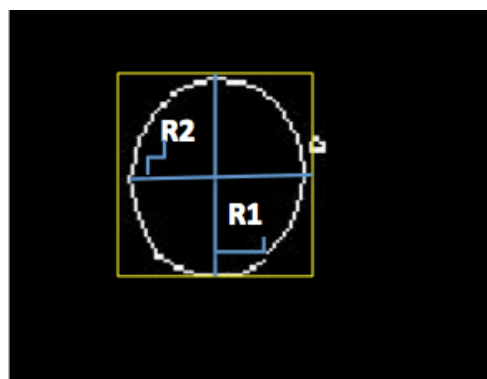


Figura 4. Extracción de los radios del contorno del quiste (R1 y R2).

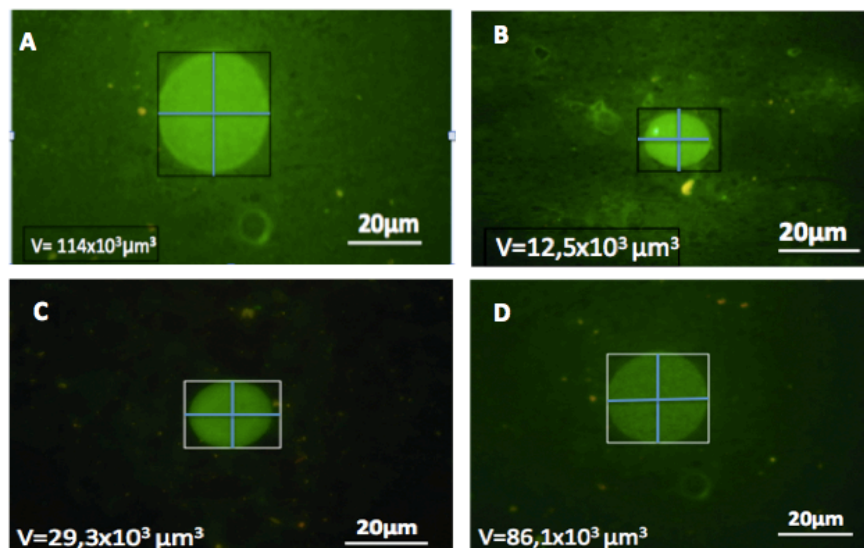


Figura 5. Determinación del Volumen de un Quiste de *T. gondii*. Inmunofluorescencia Indirecta.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se logró desarrollar un algoritmo de procesamiento de imágenes para la medición del volumen de quistes de *T. gondii*, obtenidas de tejido cerebral de ratón con presencia de infección crónica. El método contempló la morfología del quiste definida en la mayoría de los casos por una elipsoide y en otros por una esfera. En el cálculo de volumen de los quistes analizados se obtuvieron diferentes valores, lo que puede indicar que el tamaño de un quiste varía dependiendo de mecanismos biológicos propios de la interacción del parásito con la célula hospedera, demostrando posiblemente que los bradizoitos no se replican sincrónicamente dentro del quiste y por ende se evidencia un número de parásitos diferente en cada uno de ellos y como consecuencia su tamaño es variable.

Actualmente diversos estudios sugieren la relación entre la infección crónica por *T. gondii* y la presencia de enfermedades neurodegenerativas [3], este trabajo contribuyó con una herramienta matemática que permite analizar el volumen que ocupa un quiste dentro del tejido cerebral de ratón, permitiendo profundizar en los mecanismos biológicos propios del parásito utilizados para establecerse en su huésped por largos periodos de vida.

Al momento de calcular el volumen de determinadas imágenes fue necesario ajustar los parámetros de umbralización, debido a que se presentaban resultados incorrectos en la detección del contorno del quiste y como consecuencia medidas erróneas en el volumen, por ello se plantea para trabajos futuros mejorar los métodos de filtrado y segmentación que permitan robustecer el algoritmo y su función de forma automática. Además se plantea utilizar el algoritmo para análisis de imágenes provenientes de microscopía óptica.

Agradecimientos

Facultad de Ingeniería, Programa de Bioingeniería, Universidad El Bosque. Bárbara H. Zimmermann, Directora del grupo de investigación BBMP de la Universidad de Los Andes.

5. REFERENCIAS

- [1] M. Berenreiterová., J. Flegr., A. Kuběna., P. Nĕmec, The Distribution of *Toxoplasma gondii* Cysts in the Brain of a Mouse with Latent Toxoplasmosis: Implications for the Behavioral Manipulation Hypothesis, *PLoS One*, 2011; 6(12).
- [2] J. P. Dubey., D. S. Lindsay., C. A. Speer, Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts, *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr; 11(2): 267–299.
- [3] M. Adam., M. Sullivan., Z. Xiaopeng., S. Ozuri., E. Ochiai., S. Crutcher., M. A. Gilchrist, Evidence for Finely-Regulated Asynchronous Growth of *Toxoplasma gondii* Cysts Based on Data-Driven Model Selection. *PLoS Comput Bio*, 2013 Nov; 9(11).
- [4] B. H. Zimmermann., G. Juez., A. Hortúa, Aislamiento de una nueva cepa avirulenta de *Toxoplasma gondii* nativa de Colombia. *Biomédica. Instituto Nacional de Salud*, 2011, Vol 31. Pág 356.
- [5] A. Quiñones., M. Jiménez., G. Juez, Procesamiento y Análisis Digital de Imágenes Biológicas para el reconocimiento automático de quistes de *Toxoplasma gondii*, *Memorias Quinta Conferencia Iberoamericana de Complejidad, Informática y Cibernética, CICIC 2015*, ISBN: 978-1-941763-18-6, Pág 97-102.
- [6] M. Jiménez., A. Quiñones., G. Juez, Método Computacional para la Medición automática del área de Quistes del parásito *Toxoplasma gondii*, *Revista de Sistemas, Cibernética e Informática*, 2015, Vol 12: 1, ISSN: 1690-8627, Pág 32-37.
- [7] H. Hooshyar., P. Rostamkhani., M. Arbabi, Study on growth of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in laboratory mouse, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2009; 2(4): 140-14.