

Método Computacional para la Medición automática del área de Quistes del parásito *Toxoplasma gondii*

Mario F. Jiménez Hernández

Grupo de Investigación BIOAXIS, Programa de Bioingeniería, Universidad El Bosque
Bogotá, Colombia

Armando A. Quiñones Quiñones

Grupo de Investigación BIOAXIS, Programa de Bioingeniería, Universidad El Bosque
Bogotá, Colombia

y

Graciela Juez Castillo

Grupo de Investigación BIOAXIS, Programa de Bioingeniería, Universidad El Bosque
Bogotá, Colombia

RESUMEN

Toxoplasma gondii, es un organismo intracelular que puede causar infecciones parasitarias, afectando al ser humano e invadiendo tejidos como el cerebro. En pacientes inmunocomprometidos entre ellos con VIH-SIDA, *T. gondii* es capaz de reactivar la infección y causar encefalitis toxoplásmica. La infección crónica por *T. gondii*, se caracteriza por la formación de un quiste que le permite al patógeno, mantenerse en el huésped por largos periodos e incluso por todo el tiempo de vida del mismo. En ocasiones el quiste sufre rupturas y libera bradizoitos, quienes tienen la capacidad de formar nuevos quistes, de ahí la variedad en el tamaño de los mismos. La medición del tamaño de un quiste contribuye con información sobre la relación del parásito y la respuesta inmune del huésped, esto permitirá la búsqueda de sustancias que inhiban el proceso de formación quístico. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un algoritmo para la determinación del área de quistes de *T. gondii* provenientes de material biológico de consumo humano, mediante el Toolbox Image Processing del software Matlab 2013. El algoritmo determinó el área de varios quistes del parásito, indicando la medida específica en píxeles y posteriormente la trazabilidad a una medida dimensional dada en nanómetros cuadrados (nm^2).

Palabras Claves: *Toxoplasma gondii*, Quiste, Área, procesamiento digital de imágenes, elipsoide.

1. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular miembro del filum apicomplexa que posee una amplia variedad de hospederos con importancia humana y veterinaria. Este patógeno es altamente prevalente debido a que su infección puede perdurar a través de toda la vida

en el cerebro de aproximadamente el 30% de los humanos [1]. *T. gondii* es de amplia distribución gracias a su ciclo de vida que le permite la reproducción sexual en animales de la familia felinidae y la asexual en varios animales vertebrados. La infección en los huéspedes intermediarios entre ellos el hombre se da por diferentes vías, la ingestión de quistes tisulares directamente presentes en carne poco cocida y ooquistes en vegetales y agua destinada al consumo [2].

Aunque se caracteriza por producir enfermedades congénitas en humanos, *T. gondii* es particularmente perjudicial en tejidos que no tienen regeneración celular entre ellos, el cerebro, ojos y músculo esquelético o cardíaco [3]. Este parásito es de amplia importancia clínica por las enfermedades que causa en el feto como muerte cerebral o severas secuelas neurológicas entre ellas hidrocefalia, microcefalia, ceguera y como infección oportunista en personas inmunocomprometidas con cáncer, trasplante de órganos y VIH causando un alto porcentaje de mortalidad y morbilidad [4]. Algunos estudios reportan que alrededor del 30 al 50% de personas con VIH que han sido infectadas crónicamente con *T. gondii* presentan encefalitis toxoplásmica y aproximadamente la mitad de las infecciones agudas durante el embarazo conllevan a enfermedades congénitas del neonato [5].

La infección crónica generada por *T. gondii* se caracteriza por la formación de un quiste de membrana delgada en el cual se replican lentamente los bradizoitos, como respuesta a este proceso el tamaño del quiste aumenta y mantiene las condiciones de vida para que el patógeno permanezca allí por largos periodos de tiempo [6]. Actualmente se tiene limitada información respecto a los procesos específicos que le permiten al patógeno formar el quiste evadiendo el sistema inmune, sin embargo se ha reportado que los mecanismos de interacción huésped-patógeno están mediados por la ruptura de algunos

quistes, formación de nuevos quistes y por procesos que involucran células del sistema inmunológico [6].

En organismos inmunocompetentes que presentan infección crónica, los quistes de manera espontánea sufren rupturas y liberan los bradizoitos, éstos invaden células vecinas y se convierten en taquizoitos que pueden ser controlados por el sistema inmune, sin embargo *T. gondii* tiene la capacidad de formar nuevos quistes, por ello se puede encontrar variedad en el tamaño de los mismos [6]. La medición del tamaño de un quiste contribuye con información sobre mecanismos involucrados entre la relación del parásito y la respuesta inmune del huésped.

En Colombia se han encontrado cepas exóticas de *T. gondii*, estas cepas se caracterizan por ser avirulentas y formar quistes en cerebro de ratón [7, 8]. Esto indica que este estado de desarrollo del parásito tiene prevalencia en nuestro país lo que puede sugerir que la población humana infectada con *T. gondii* posiblemente este siendo afectada por este tipo de cepas, de ahí la importancia de continuar con estudios que permitan caracterizar el estado quístico del patógeno.

Debido a la alta prevalencia de este parásito en varias regiones de Colombia, este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un algoritmo para la determinación del área de quistes de *T. gondii* provenientes de material biológico de consumo humano con presencia de la cepa avirulenta JUEZ1, mediante el Toolbox Image Processing del software Matlab 2013. El algoritmo determinó el área de varios quistes del parásito, indicando la medida específica en píxeles y posteriormente la trazabilidad a una medida dimensional dada en nanómetros cuadrados (nm^2), teniendo en cuenta parámetros como zoom óptico y circularidad del quiste. En un trabajo posterior se propone estimar el volumen que ocupa un quiste de *T. gondii* en el cerebro de su hospedero, a partir de la definición del área del mismo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo estuvo dividido en dos partes, el primero definido por el desarrollo experimental realizado para la obtención de los quistes de *T. gondii* a partir de cerebro de ratón infectado con cepa avirulenta JUEZ1 nativa de Colombia. El proceso inicio con la recolección de las muestras, tejidos de corazón y lengua de cerdos destinados al consumo de la población Colombiana. Las muestras fueron procesadas y analizadas utilizando técnicas moleculares, posteriormente se inocularon en ratones CFW (Carwort Farm Inbreed of Webster) de aproximadamente 21 días de nacidos. Los ratones fueron suministrados y supervisados por el ente de control de animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Con la inoculación del parásito se permitió el desarrollo y obtención de los quistes en cerebro de ratón, se siguieron de manera estricta las normas de bioética y protección animal.

Los ratones infectados fueron sacrificados y su cerebro aislado para realizar procesos histoquímicos y moleculares. El proceso histoquímico fue desarrollado con reactivo Giemsa, el cual permitió fácilmente la tinción de las estructuras quísticas, este proceso se llevo a cabo en los laboratorios BBMP de la universidad de los Andes. El estudio histoquímico permitió la visualización de los quistes de *T. gondii* a diferentes escalas, usando un microscopio Olympus CX31RTSF y posterior captura de imágenes de microscopía óptica, mediante cámara Panasonic DMC-FH2. La segunda parte de la metodología se caracterizó por el análisis de las imágenes obtenidas mediante el toolbox Image Processing, el cual permitió determinar el área de cada quiste visualizado.

Algoritmo

El tratamiento digital de imágenes actualmente se está implementando para la detección de características como tamaño, cantidad y forma en patógenos que ocasionan enfermedades [9,10]. Por medio del Toolbox de imágenes del software Matlab 2013, se procesaron 30 fotografías con presencia de quistes de *T. gondii*, para finalmente establecer el área de cada uno de ellos. Las imágenes fueron capturadas con una cámara fotográfica de referencia Panasonic DMC-FH2 directamente sobre el lente del microscopio.

Por otro lado, un sistema de procesamiento de visión esta compuesto por las siguientes etapas: preprocesamiento, segmentación, etiquetado, extracción de principales características, y clasificación [11]. Por ejemplo, una de éstas características es el criterio elipsoidal en la morfología de los quistes de *T. gondii* [6], factor que contribuyó para la segmentación y posterior cálculo del área del quiste (Fig. 1A).

Segmentación de Color

En la segmentación se utilizaron principalmente 2 procesos:

- Filtro de la imagen
- Segmentación de la imagen.

En el algoritmo se utilizó un filtro promedio para minimizar el ruido de la imagen (Fig. 1B) y posteriormente se segmentó la tonalidad azul. Para esto se seleccionó la escala RGB de la imagen original y al color azul se le sustrajo por medio de un filtro promedio el componente verde y rojo.

Binarización

La binarización es el proceso en donde por medio de un umbral se separa la información de primer plano de la imagen y se elimina lo que queda en segundo plano. En este caso, luego de binarizar la imagen y convertir los píxeles en un rango de $[0,1]$, se utilizó un umbral:

$U_m = 0.65$, para binarizar y segmentar la imagen, logrando eliminar el ruido y obteniendo la sección de interés (Fig. 2A). Luego de tener binarizada la imagen fue necesario realizar un proceso de encerramiento, para

definir los objetos restantes en la imagen o aquellos que tienen pixeles vecinos y etiquetarlos a través de la asignación de un color (Fig. 2B).

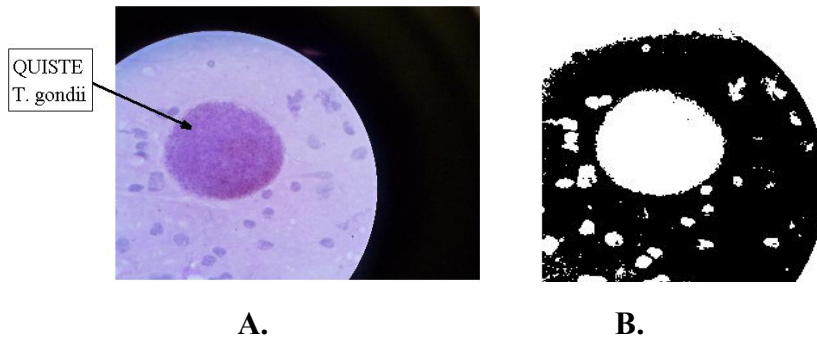


Fig. 1. (A) Quiste de *T. gondii*. Cepa JUEZ1 nativa de Colombia. Tinción Giemsa, tejido de cerebro de ratón con 10 meses de infección. (B) Segmentación de color. Zoom óptico 40x . Cámara PANASONIC DMC-FH2.

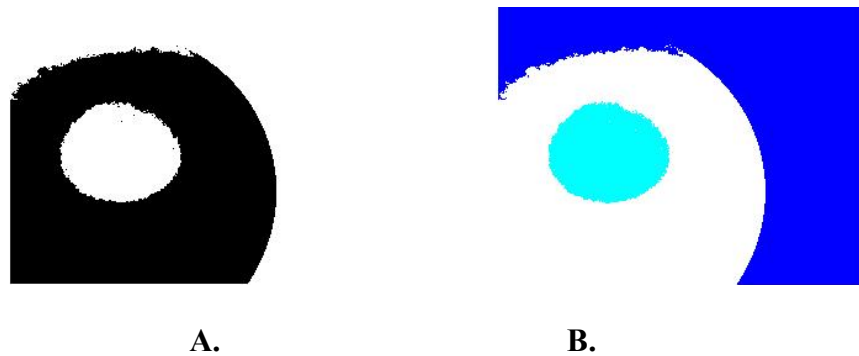


Fig. 2. (A) Imagen binarizada. (B) imagen etiquetada. Quiste de *T. gondii*. Cepa JUEZ1 nativa de Colombia. Tinción Giemsa, tejido de cerebro de ratón con 10 meses de infección. Zoom óptico 40x . Cámara PANASONIC DMC-FH2.

Determinación del área de quistes de *T. gondii*.

Como ya se tienen definidos los diferentes objetos que se encuentran en la imagen, es necesario determinar la frontera de los mismos, y luego, por medio de un umbral de área establecer el objeto de interés en la imagen (Fig. 3). El área del quiste de *T. gondii* se calculo en pixeles, y luego por medio de una imagen patrón se realizó la trazabilidad espacial, debido a que se conoce con

anterioridad las coordenadas en unidades reales entre un pixel y otro (Fig. 4A y 4B). De esta forma el área en pixeles fue trazada a una unidad de área en nanómetros cuadrados (nm^2). Con la imagen patrón y teniendo en cuenta el zoom del microscopio, se calculo el número de pixeles que se tenía en una distancia de 1mm. Posteriormente se halló la distancia de un pixel sin zoom en metros (D_p) (Ec.1).

Número de pixeles en 1mm a 10x = 4.2031×10^3 pixeles.

$$D_p = \frac{1mm}{\text{Número de pixeles en 1mm}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Distancia de un pixel en metros (D_p)= $23.792 \mu m$

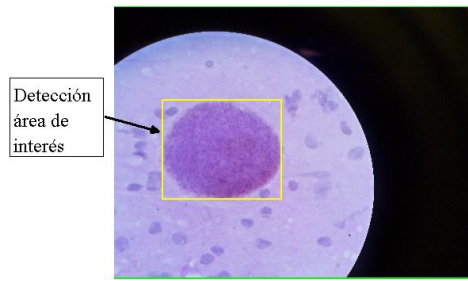


Fig. 3 Detección de un Quiste de *T. gondii*. Cepa JUEZ1 nativa de Colombia. Tinción Giemsa, tejido de cerebro de ratón con 10 meses de infección. Zoom óptico 40x . Cámara PANASONIC DMC-FH2.

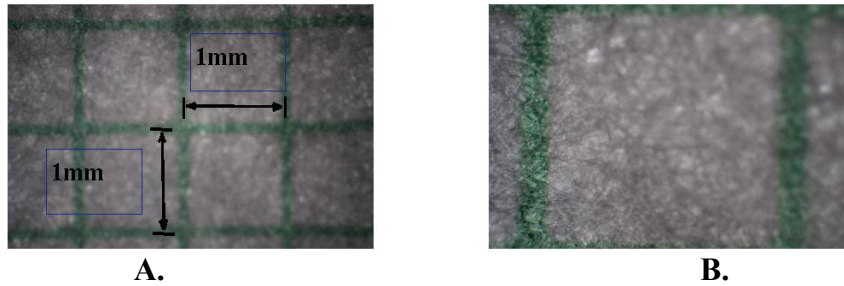


Fig. 4. Imágenes de microscopía óptica. (A) Imagen patrón, hoja de papel milimetrado, zoom 4x. (B) Imagen patrón, hoja de papel milimetrado, zoom 10x. Microscopio Olympus CX31RTS. Cámara Panasonic DMC-FH2

3. RESULTADOS

El método de tinción histoquímica con Giemsa permitió la visualización de diversos quistes de *T. gondii* en cerebro de ratón, éstos presentaron formas elipsoides como es referenciado por Sullivan, A *et al.*, 2013, los cuales están rodeados por una pared relativamente delgada (Fig 1A). Algunos estudios reportan resultados respecto a la determinación del tamaño de un quiste de *T. gondii* basado en la medición del diámetro y volumen del mismo [6], el método computacional de este trabajo, permitió calcular por medio de procesamiento digital de imágenes el área de los quistes, a partir del diámetro mayor y diámetro menor de la elipse característica de la estructura quística. Para la implementación del algoritmo se determinó el área de 30 quistes de *T. gondii*, obtenidos a través de los métodos descritos anteriormente, algunas de las imágenes se observan en la Fig 7.

Reconocimiento e interpretación

El quiste de *T. gondii* en su estructura celular tiene una forma elipsoide (Fig 5), cuya fórmula para calcular el área se define por:

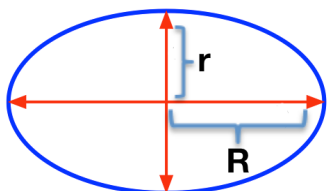


Fig 5. Área de una elipsoide.

$$A_{\text{elipsoide}} = \pi \cdot r \cdot R \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

R = Radio mayor

r = Radio menor

Cálculo del área

Para determinar el área de los quistes de *T. gondii*, el algoritmo calculó la distancia en cantidad de pixeles del diámetro mayor y el diámetro menor de la elipse propia del quiste (Fig. 6). Dichos valores calculados por el método computacional son:

$$D.\text{img} = 1.3935 \times 10^3 \text{ pixeles.} \\ (\text{Diámetro mayor de la elipse del quiste}).$$

$$d.\text{img} = 1.1399 \times 10^3 \text{ pixeles.} \\ (\text{Diámetro menor de la elipse del quiste}).$$

Con la distancia del diámetro mayor (D.img), y del diámetro menor (d.img) en número de pixeles, se realizó la trazabilidad a una unidad real, teniendo en cuenta el resultado de la Ec. 1 y el zoom al que fue tomada la fotografía, posteriormente se calculó el área del quiste. Este procedimiento se realizó para las 30 muestras diferentes de quistes de *T. gondii* de la cepa JUEZ1, nativa de Colombia, tomadas con un zoom de 40x. Para la Fig. 6, el cálculo del área fue:

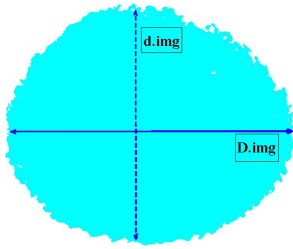


Fig. 6. Extracción de quiste de *T. gondii* de la imagen. Zoom 40x.

$$R = \frac{D_{\cdot\text{imag}} \cdot D_p}{2 \times \text{Zoom } \text{optico } \text{microscopio}} = 41.444 \mu\text{m}.$$

Ec. 3

$$r = \frac{d_{\cdot\text{imag}} \cdot D_p}{2 \times \text{Zoom } \text{optico } \text{microscopio}} = 33.901 \mu\text{m}.$$

Es necesario dividir los diámetros calculados por el algoritmo sobre dos, debido a que la ecuación del área de la elipse involucra son los radios (Ver Ec. 3).

4. CONCLUSIONES

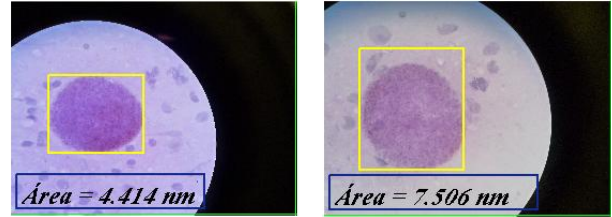
El algoritmo de tratamiento digital de imágenes diseñado para el cálculo del área de quistes de la cepa JUEZ1 de *T. gondii*, nativa de Colombia, presentó óptimos resultados al momento de comparar las mediciones reales otorgadas por el desarrollo computacional y los métodos tradicionales, siendo este algoritmo, un método capaz de acelerar los procesos de medición y cálculo para la caracterización de quistes. Por otro lado, los diámetros determinados por el algoritmo son coherentes con los encontrados en la literatura, se validaron 30 muestras de diferentes quistes de la cepa JUEZ1, y los resultados presentaron una precisión mayor a los arrojados por los métodos tradicionales (microscopía óptica con micrómetro), debido a que el método computacional logró medir centésimas de micrómetro. En un trabajo posterior se prepone estimar el volumen que ocupa un quiste de *T. gondii* en el cerebro de su hospedero, a partir de la definición del área del mismo.

Algunos reportes de la literatura han relacionado la presencia de *T. gondii* con desórdenes cerebrales entre ellos esquizofrenia [12], no obstante este parásito tiene alta prevalencia en tejido cerebral, por ello es de gran

El área del quiste *T. gondii* es:

$$\text{Área}_{T.gondii} = \pi \cdot r \cdot R$$

$$\text{Área}_{T.gondii} = 4.414 \text{ nm}$$



A.

B.

Fig. 7. A, B. Área de quistes de *T. gondii*. Cepa JUEZ1 nativa de Colombia. Tinción Giemsa, tejido de cerebro de ratón con 10 meses de infección. Zoom 40x. Cámara PANASONIC DMC-FH2.

importancia el estudio de los mecanismos asociados a la infección crónica. Este trabajo contribuyó con información respecto a la determinación del área de quistes de *T. gondii*, aislados de muestras biológicas nativas de Colombia, fortaleciendo la caracterización del estado quístico de *T. gondii*.

Agradecimientos

Juan Miguel Escobar, Director del Programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque. Barbara H. Zimmermann, Directora del grupo de investigación BBMP de la Universidad de Los Andes.

5. REFERENCIAS.

- [1]. D.J. Ferguson, F.L. Henriquez, M.J. Kirisits, S.P. Muencih, S.T. Prigge, D.W. Rice, W.R. Craig, y R.M. McLeod. Maternal inheritance and stage-specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host, *Eukaryot Cell*, Vol. 4, No. 4, 2005, pp 814-26.
- [2]. M.D. Cleary, U. Singh, I.J. Blader, J.L. Brewer, J.C. Boothroyd, *Toxoplasma gondii* asexual development:

- identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression, *Eukaryot Cell*, Vol. 1, No. 3, 2002, pp 329-40.
- [3]. J.K. Frenkel, Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today*, Vol. 4, No. 10, 1988, pp 273-278.
- [4]. D.M. Israelski, J.S. Remington, Toxoplasmic encephalitis in AIDS, *Clin Infect Dis*, Vol. 15, No. 2, 1992, pp 211-22.
- [5]. L.D. Sibley, J.C. Boothroyd, Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage, *Nature*, Vol. 359, No. 6390, 1992, pp 82-85.
- [6]. A. Sullivan, Z. Zhao, Suzuki, Y. Ochiai, Crutcher, S., Gilchrist, M. Evidence for Finely-Regulated Asynchronous Growth of *Toxoplasma gondii* Cysts Based on Data-Driven Model Selection, *PLoS Comput Biol*. Vol. 9, No. 11, 2013.
- [7]. B.H. Zimmermann, G. Juez, A. Hortúa, Aislamiento de una nueva cepa avirulenta de *Toxoplasma gondii* nativa de Colombia. *Biomédica. Instituto Nacional de Salud*. Vol 31, 2011, Pág 356.
- [8]. H.J. Lora, J.E. Aricapa, L.E. Pérez, S.E. Arias, D. Idarraga, J. Gómez, Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infection*, Vol. 11, 2007, pp 117-123.
- [9]. C. A. Castañon, J. S. Fraga, S. Fernandez, A. Gruber, L. Costa, Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*, *Pattern Recognition*, Vol. 40, 2007, pp 1899- 1910.
- [10]. J. E. Arco, J. M. Górriz, J. Ramírez, I. Álvarez, C.G. Puntonet, Digital image analysis for automatic enumeration of malaria parasites using morphological operations. *Experts Systems With Applications*. Vol. 42, 2014, pp 3041-3047.
- [11]. E. Saenz, M. F. Jiménez, A. A. Ramírez, Strawberries Collecting Robot Prototype in Greenhouse Hydroponic Systems, *IEEE Xplore, Image Signal Processing, and Artificial Vision (STSIVA)*, 2013 XVIII Symposium of, 2013, pp 1-4.
- [12]. J.L. Xiao, R.H. Yolken, Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015.