

Análisis de secuencias de imágenes de cultivos celulares

Débora Chan¹, Úrsula Winter², Paula Schaiquevich², Juliana Gambini^{3, 4}, Marcelo Howlin¹

¹ Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, Departamento de Ingeniería Industrial, Av. Medrano 951, (C1179AAQ) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina ² CONICET – Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

³ Instituto Tecnológico de Buenos Aires, Departamento de Ingeniería en Informática, Av. Eduardo Madero 399, (C1106ACD), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

⁴ Universidad Nacional de Tres de Febrero, Departamento de Ingeniería en Computación, Mosconi 2736 (B1674AHF), Sáenz Peña, Provincia de Buenos Aires, Argentina

debiechan@gmail.com

Recibido el 11 de febrero de 2019, aprobado el 7 de marzo de 2019

Resumen

El retinoblastoma es un tumor ocular frecuente en la infancia. En el Hospital Prof. J.P. Garrahan, se utilizan actualmente un número de fármacos que se administran por distintas vías según el criterio del oftalmólogo y del oncólogo.

El topotecan es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de este tumor. La principal ventaja del topotecan es que puede cuantificarse su penetración en la célula a través de la fluorescencia emitida por el mismo, por excitación de un láser. Debido a esta fluorescencia, el topotecan aparece en color gris claro en las imágenes de microscopio. Este trabajo está dedicado al estudio y aplicación de técnicas de análisis y procesamiento de secuencias de imágenes, combinadas con modelos estadísticos, con el objeto de determinar y predecir el tiempo de penetración del topotecan en cúmulos tumorales (conjunto de células tumorales). Evaluando la influencia del tamaño de los cúmulos y si el individuo ha sido tratado previamente con quimioterapia. Los experimentos se realizan con imágenes de microscopio tomadas sobre cultivos celulares de tejidos tumorales, inyectados con topotecan

PALABRAS CLAVE: ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE IMÁGENES - TOPOTECAN - TIEMPO DE PENETRACIÓN - MODELOS MIXTOS

Abstract

Retinoblastoma is a frequent ocular tumor in childhood. In the Hospital Prof. J.P. Garrahan, are currently used several drugs in different ways of administration according to ophthalmologist and the oncologist criteria. Topotecan is a widely used drug in this tumor treatment. The main advantage of topotecan is that its penetration into the cell can be quantified through the fluorescence emitted by it, when excited by a laser. Due to its fluorescence, topotecan appears light gray in the microscope images. This work is devoted to determine and predict the penetration time of topotecan in tumor clusters, by the study and application of image processing techniques on sequences of images, combined with statistical models. The influence of the size of the clusters and if the individual has been previously treated with chemotherapy are assessed. The experiments are performed with microscope images taken on cell cultures of tumor tissues, injected with topotecan.

KEYWORDS: IMAGES SEQUENCES ANALYSIS - TOPOTECAN - PENETRATION TIME - COMBINED MODELS

Introducción

El retinoblastoma es el tumor ocular más frecuente en la infancia y se presenta con la aparición de células malignas en la retina del ojo. En Argentina, se detectan 45 nuevos casos por año, y el 80% son derivados para su atención en el Hospital Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan, de la Ciudad de Buenos Aires, donde el índice actual de curación es superior al 98%.

La tasa de incidencia de esta afección oncológica en nuestro país es similar a la observada en otros, aunque en países desarrollados se logra una detección más temprana. La detección precoz está altamente relacionada con la supervivencia del paciente, por tratar el tumor en estados menos avanzados.

A nivel mundial, aproximadamente el 60% de los casos de retinoblastoma se presentan en forma unilateral (un solo ojo) mientras que el 40% restante lo hace comprometiendo ambos ojos. En la enfermedad unilateral, la edad media de aparición en los niños es de dos años de edad, mientras que en la bilateral es de 1 año.

Entre sus síntomas, se encuentra que en la pupila del ojo se observa un reflejo blanquecino, conocido como leucocoria, cuando se expone a la luz, un hecho que puede detectarse en las fotos tomadas con cámaras digitales.

Este tumor crece en la retina y luego, por desprendimiento del mismo, se forman las siembras vítreas que son tumores que flotan en el humor vítreo del ojo del paciente. Dichas siembras son de difícil tratamiento dada la dificultad del acceso de la quimioterapia por carecer de vasos sanguíneos. Es por ello, que su presencia es fundamental para decidir el tratamiento a seguir.

Para su tratamiento, en el Hospital Garrahan, se utilizan actualmente un número reducido de fármacos que se administran por distintas vías según el criterio del oftalmólogo y del oncólogo tratantes, incluyendo: vía sistémica (infusión endovenosa), intravítrea e intra-arterial. Cada vía de administración tiene sus ventajas y desventajas y la administración de una u otra depende del criterio médico. Las vías de administración local como son la intravítrea y la

intra-arterial presentan la ventaja de exposición local del fármaco en el tumor y no a nivel sistémico, reduciendo la aparición de eventos adversos serios tales como mielosupresión severa (Schaiquevich, et al., 2013).

Este trabajo está focalizado en técnicas de análisis y procesamiento de secuencias de imágenes combinadas con análisis estadístico, con el objeto de determinar el tiempo de penetración del topotecan en cúmulos tumorales (conjunto de células tumorales). El topotecan es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de retinoblastoma. El experimento consiste en los siguientes pasos: se obtienen dos cultivos celulares primarios a partir del tumor intraocular de dos pacientes, los cuales fueron enucleados dado el avance de la enfermedad.

Luego de la firma del consentimiento informado (Protocolo #904, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan), una vez finalizada la enucleación por el oftalmólogo, éste toma muestras de tumor, las cuales se colocan en medio de cultivos definidos para cultivos celulares primarios. Una vez establecidos los cultivos y caracterizados según la morfología y marcadores celulares de la retina, se los utiliza para estudiar la velocidad de penetración del fármaco. La principal ventaja de haber elegido el topotecan es que puede cuantificarse su penetración a través de la fluorescencia emitida por el mismo por excitación de un láser. El microscopio utilizado es Olympus Fluoview FV1000 confocal laser scanning microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with imaging software (Olympus Fluoview FV10-ASW v1.7c) and equipped with a UPlanSApo 20X/0.75 NA objective.

Los cultivos celulares estudiados pertenecen a dos pacientes:

- Individuo 1: el paciente fue enucleado en primera línea de tratamiento sin haber recibido quimioterapia previamente.
- Individuo 2: el paciente había recibido quimioterapia previamente a la enucleación del ojo afectado.

Estos cultivos celulares a los que nos referimos en lo sucesivo como neuroesferas se clasifican, según su visualización, en tres tamaños: pequeñas, medianas y grandes.

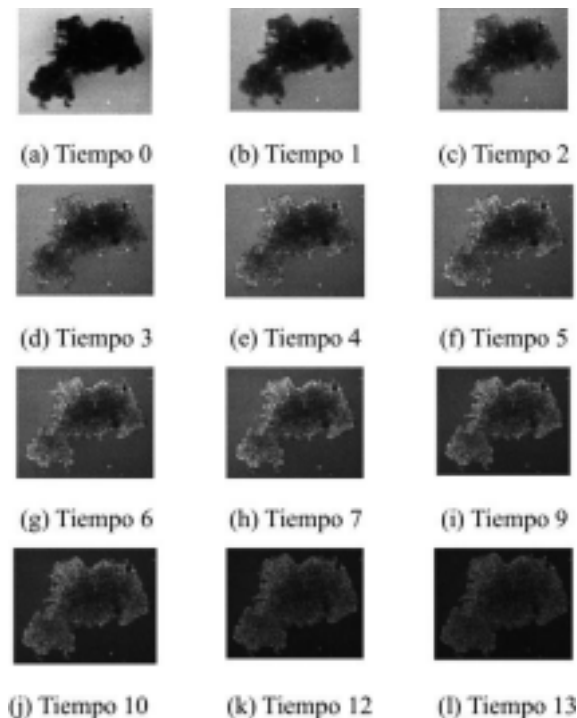


Fig. 1. Ejemplo de una secuencia de imágenes de microscopía tomadas cada 30 segundos, correspondientes al Individuo 1 y tamaño grande

El experimento consiste en tomar secuencias de imágenes de microscopio de cada una de las neuroesferas, a las que se ha inyectado 1 microlitro de una solución 10 µg/ml de topotecan. Se desea estudiar el tiempo de penetración de la droga sobre la neuroesfera según la fluorescencia.

La droga se inyecta en el preparado y se observa en las fotos de microscopio en color gris claro. Luego se sacan fotos equiespaciadas en el tiempo de la evolución de la droga, hasta que el experto no observa modificaciones en las imágenes.

La Figura 1 muestra un ejemplo de estas imágenes donde, según el experto, la droga tardó 7,5 minutos en penetrar completamente. Las imágenes originales fueron recortadas para realizar el procesamiento de forma más eficiente.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Estimar el tiempo que tarda el topotecan en penetrar en la neuroesfera mediante el análisis de secuencias de imágenes, por fluorescencia

del fármaco, y visualización por utilización de microscopía confocal, en neuroesferas derivadas de tumor de pacientes con retinoblastoma. Se considera que el topotecan penetra la célula cuando se visualiza en la imagen de color gris claro. Se considera que la droga penetró en el centro de la neuroesfera cuando ésta tiene un color gris homogéneo en la región central.

2. Comparar la velocidad de penetración del topotecan entre los dos tipos de neuroesferas (según la procedencia).

3. Comparar la velocidad de penetración del topotecan entre tamaños de neuroesferas derivadas del mismo tumor.

Interpretación de la secuencia de imágenes

En esta sección se describen los métodos de análisis de imágenes utilizados para la interpretación de la secuencia de imágenes obtenidas con microscopio.

a. Preprocesamiento

Las imágenes de microscopía poseen ruido ge-

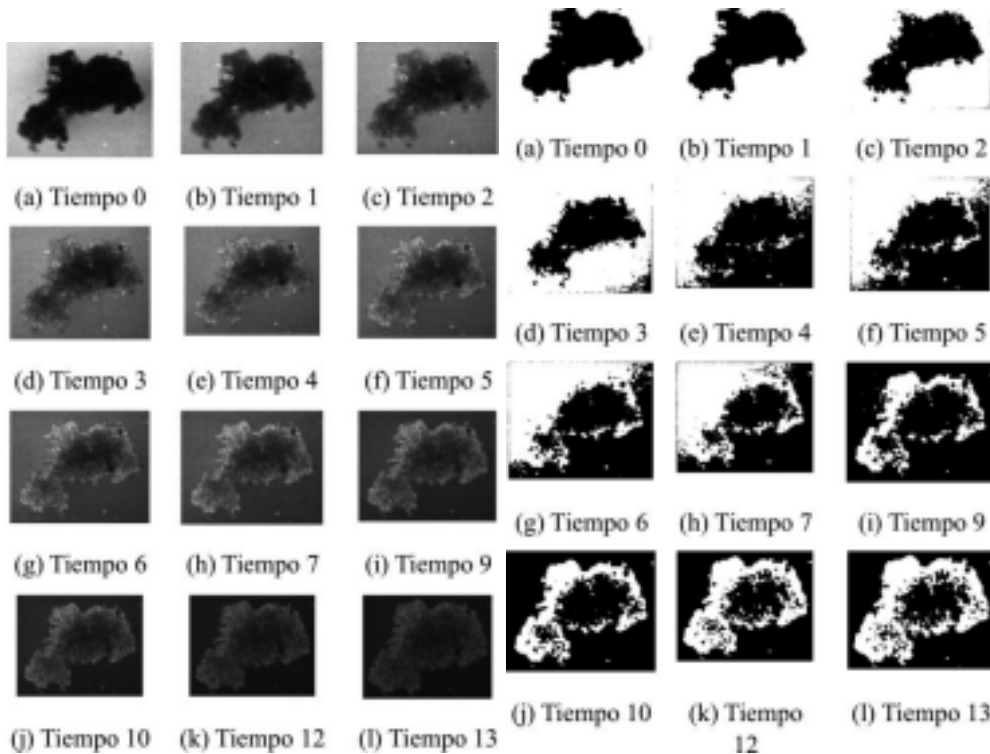


Fig. 2. Resultado de aplicar el método de Difusión Anisotrópica a las imágenes de la Figura 1

Fig. 3. Segmentación en dos clases utilizando el método de Otsu

nerado por el método con el cual se realiza el experimento Haider, el cual se observa en la Figura 1 en forma de granulado. El ruido con funde a los métodos automáticos de análisis de imágenes y es necesario eliminarlo antes de comenzar el análisis. Se aplica un método de eliminación de ruido con preservación de bordes llamado método de Difusión Anisotrópica (Perona & Malik, 1990). La Figura 2 muestra el resultado de aplicar el método a las imágenes de la Figura 1.

b. Clasificación de la imagen completa

Luego de aplicar el suavizado se procede a la umbralización de las imágenes por el método de Otsu, dividiendo la escena en 2, 3 y 4 clases como muestran las Figuras 3, 4 y 5, respectivamente. En el artículo (Sezgin & Sankur, 2004), se realiza un análisis detallado de los métodos de umbralización multinivel.

Puede observarse que hay un cambio de iluminación en las imágenes que afecta el coloreo. Además, en la Figura 5 se aprecia que en las

últimas tres imágenes, la diferencia de colores dentro de la neuroesfera resulta mínima. De esta forma, observamos que la diferencia de color en la secuencia de imágenes estaba condicionada por los niveles de gris que están fuera de la neuroesfera y por lo tanto no podemos realizar un modelo apropiado de inferencia que nos permita decidir si el topotocan penetró en la célula. Por esta razón, realizamos la clasificación utilizando solamente los píxeles dentro de la neuroesfera.

Clasificación de los píxeles dentro de la neuroesfera

En el estudio realizado en la sección b. se realiza el análisis de cada imagen por separado, pero la idea de este trabajo es realizar el análisis en toda la secuencia. Además, los niveles de gris de los píxeles que no pertenecen al interior de la célula, afectan la clasificación de los píxeles que están dentro de la neuroesfera, llevando a conclusiones erróneas. Para eso, estimamos el contorno de

D. Chan et al. - Análisis de secuencias de imágenes... **Proyecciones**, vol.17 nº. 1, Abril de 2019 61

Contornos Activos, presentado en (Shi & Karl, 2008). Este método, recibe como dato de entrada, el nivel de gris del objeto del cual se desea encontrar el contorno y devuelve una lista de píxeles pertenecientes al contorno del objeto de interés. Posee múltiples ventajas frente a otros métodos de contornos activos porque no resuelve numéricamente ecuaciones diferenciales, sino que el contorno se encuentra por el intercambio entre dos listas de píxeles vecinos, ahorrando significativamente costo computacional. Este método es tan eficiente que puede utilizarse en aplicaciones que requieran tiempo real. Las Figuras 6(a), 7(a) y 8(a) muestran el contorno estimado para las neuroesferas grandes del Individuo 1. Luego calculamos el umbral para segmentar en dos regiones dentro de la neuroesfera y utilizamos el mismo contorno y el mismo umbral para analizar toda la secuencia. Los resultados se presentan a continuación. Las Figuras 6, 7 y 8 muestran los resultados de la

segmentación durante la evolución de las neuroesferas N1, N2 y N3, respectivamente de tamaño grande para el Individuo 1. Las Tablas 1, 2 y 3 muestran los resultados obtenidos: el porcentaje de píxeles negros en cada instante, el valor mínimo, el máximo y la diferencia. Recordamos que los píxeles negros indican que el topotecan no penetró en la célula y por lo tanto un porcentaje alto de píxeles negros dentro del objeto significa que el topotecan no penetró en la neuroesfera. En los tres ejemplos anteriores, observamos que en la última imagen de la secuencia el porcentaje de píxeles negros es 0 y por lo tanto se considera que el fármaco penetró completamente en la célula.

La Figura 9 muestra los resultados para las neuroesferas grandes del Individuo 2. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos. En este caso se observa que el topotecan no llega a penetrar el centro de la neuroesfera.

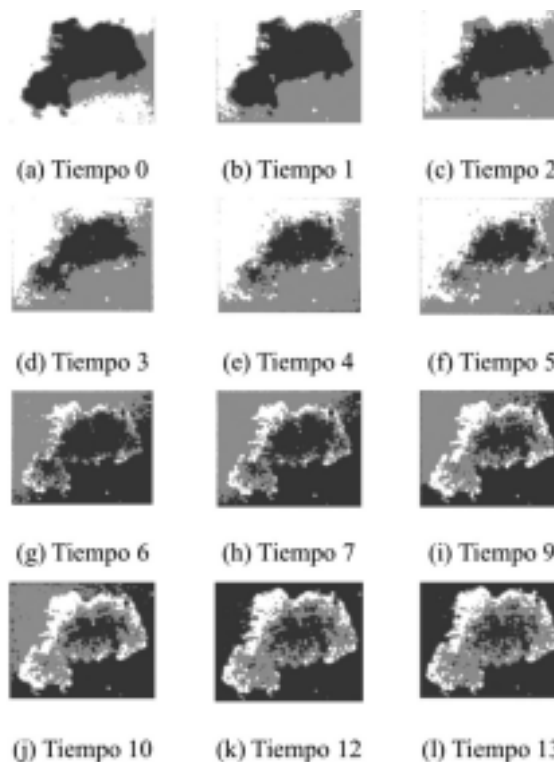


Fig. 4. Segmentación en 3 clases utilizando el método de Otzu multinivel

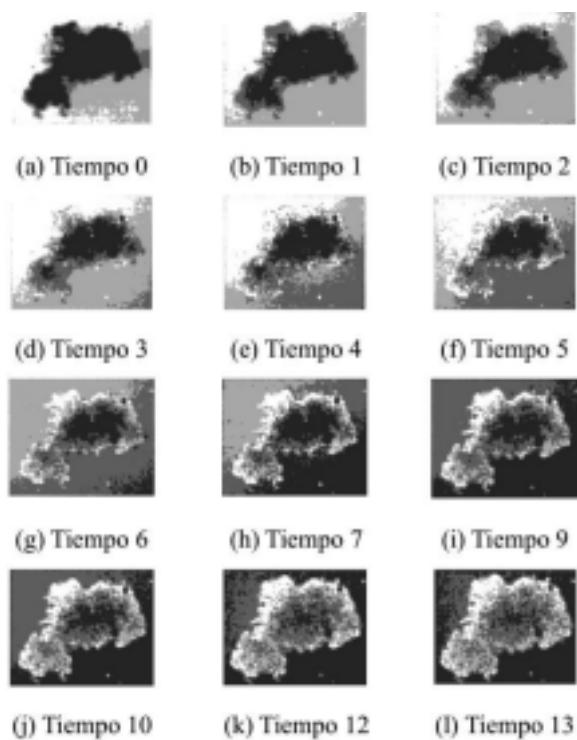


Fig. 5. Segmentación en 4 clases utilizando el método de Otsu multinivel

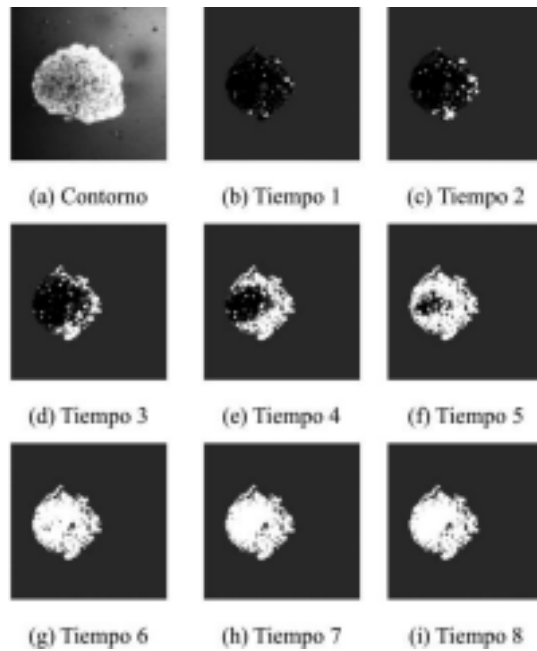


Fig. 6. Segmentación de la Neuroesfera 1, tamaño grande, Individuo 1. Cantidad de Píxeles tomados en cuenta: 123577

D. Chan et al. - Análisis de secuencias de imágenes... *Proyecciones*, vol.17 n°. 1, Abril de 2019 63

Tabla 1. Resultados Individuo 1 neuroesfera grande N1

Foto	% Píxeles negros	Mín.	Máx.	Dif.
1	0,947555	0	3	3
2	0,871521	0	5	5
3	0,682133	0	9	9
4	0,399694	0	16	16
5	0,134062	0	26	26
6	0,005365	0	37	37
7	0	1	51	50
8	0	2	67	65

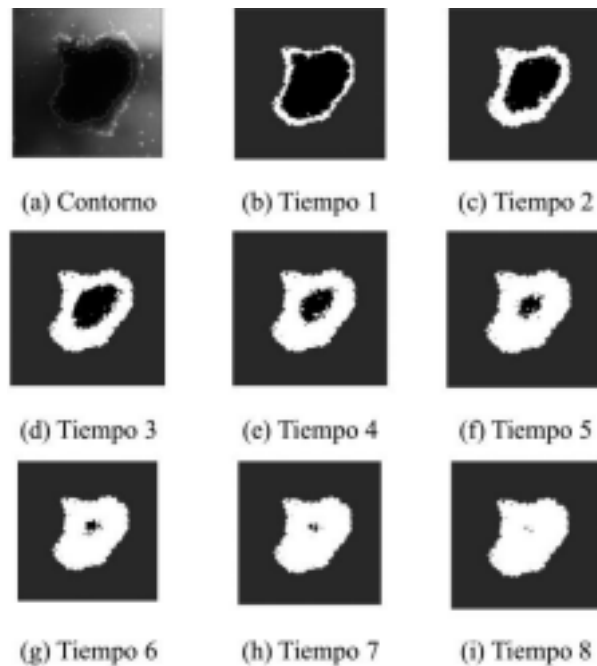


Fig. 7. Segmentación del interior de la neuroesfera tamaño grande, N2, Individuo 1. Cantidad de Píxeles: 217371

PROYECCIONES - Publicación de investigación y posgrado de la FRBA www.frba.utn.edu.ar/investigacion/proyecciones

Tabla 2. Resultados Individuo 1 neuroesfera grande N2

Foto	% Píxeles negros	Mín.	Máx.	Dif.
1	0,702748	1	52	51
2	0,440735	2	99	97
3	0,272483	3	126	123
4	0,145585	6	146	140
5	0,064323	8	170	162
6	0,026347	10	192	182
7	0,009638	11	205	194
8	0,001560	12	215	203
9	0,000000	15	229	214

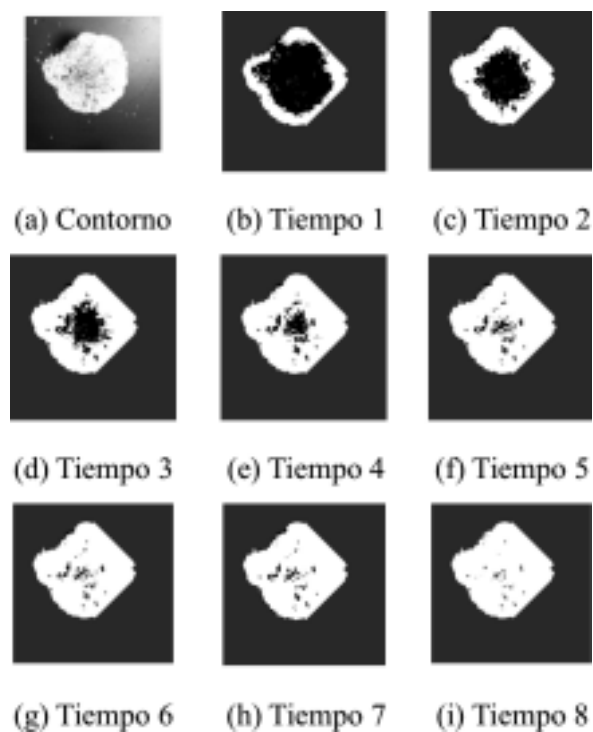


Fig. 8. Segmentación del interior de la neuroesfera tamaño grande, N3, Individuo 1. Cantidad de Píxeles: 255116

D. Chan et al. - Análisis de secuencias de imágenes... *Proyecciones*, vol.17 nº. 1, Abril de 2019 65

Tabla 3. Resultados Individuo 1 neuroesfera grande N3

Foto	% Píxeles negros	Mín.	Máx.	Dif.
1	0,586964	0	254	254
2	0,325001	15	255	240
3	0,177907	29	255	226
4	0,088720	43	255	212
5	0,043043	57	255	198
6	0,028391	60	255	195
7	0,035176	49	255	206
8	0,000843	90	255	165

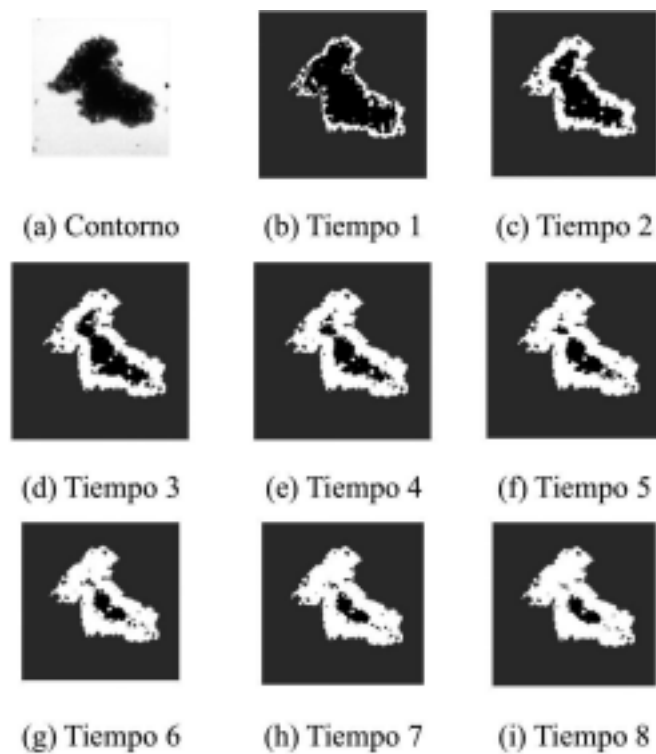


Fig. 9. Segmentación de la Neuroesfera 1, tamaño grande, Individuo 2. Cantidad de Píxeles tomados en cuenta: 213825

PROYECCIONES - Publicación de investigación y posgrado de la FRBA www.frba.utn.edu.ar/investigacion/proyecciones

Tabla 4. Resultados Individuo 2 neuroesfera grande N1

Foto	% Píxeles negros	Mín.	Máx.	Dif.
1	0,663921	5	97	92
2	0,396296	7	131	124
3	0,269707	9	177	168
4	0,192723	10	205	195
5	0,150282	11	218	207
6	0,116067	14	226	212
7	0,099778	13	227	214
8	0,084550	14	227	213
9	0,079733	16	236	220
10	0,075361	15	236	221
11	0,065918	16	235	219
12	0,059680	16	230	214
13	0,055106	18	225	207
14	0,054161	18	215	197
15	0,053385	17	214	197
16	0,047932	17	194	177
17	0,050307	19	181	162
18	0,057355	17	163	146
19	0,083709	18	144	126
20	0,000313	24	187	163

D. Chan et al. - Análisis de secuencias de imágenes... *Proyecciones*, vol.17 nº. 1, Abril de 2019 67

Análisis estadístico

Para cada una de las secuencias de fotos de las neuroesferas, se establece un umbral. Utilizando este valor como referencia se registra para cada foto de la secuencia el porcentaje de píxeles negros, un tono de gris máximo, un tono de gris mínimo y la diferencia entre am

bos extremos, es decir el recorrido de niveles de gris en la secuencia de imágenes.

Este criterio fue establecido, luego de observar que a medida que el quimioterápico ingresa a las neuroesferas, el porcentaje de negros disminuye progresivamente.

Considerando como variable respuesta el porcentaje de negros de la imagen, se ensayaron diversos modelos lineales y no lineales de estimación y predicción, evaluando el grado de ajuste así como el comportamiento de los residuos (Pinheiro, et al. 2012).

En la Figura 10 se aprecia la evolución del porcentaje de píxeles negros después de la umbralización, para cada imagen de la secuencia de las neuroesferas grandes para ambos individuos.

En la Figura 11 se aprecia la evolución del porcentaje de píxeles negros después de la umbralización, para cada imagen de la secuencia de las neuroesferas medianas para ambos individuos.

En la Figura 12 se aprecia la evolución del porcentaje de píxeles negros después de la um

bralización, para cada imagen de la secuencia de imágenes de las neuroesferas pequeñas para ambos individuos.

En la Figura 12 se aprecia que en algunos casos no penetró la droga. Excluimos esos datos para estimar la velocidad de penetración del modelo.

Modelos por tamaño

Para cada uno de los tamaños considerados, se ajustan modelos lineales con efectos mixtos, a fin de estimar el porcentaje de píxeles negros en función del tiempo, por tamaño de neuroesfera. Luego se establece un valor porcentual V_p de píxeles negros, a partir del cual se considera que toda la neuroesfera ha recibido el topotecan y se estiman los tiempos de alcance de este valor, en cada uno de los casos.

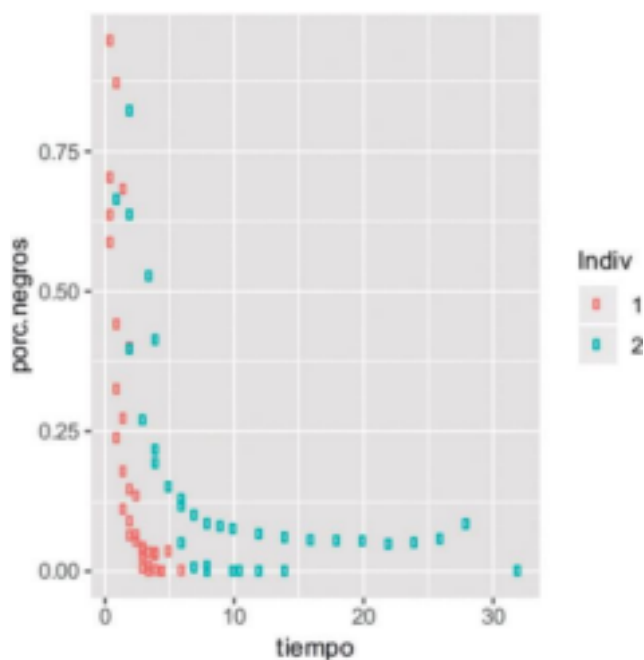


Fig. 10. Evolución del porcentaje de píxeles negros en secuencia de imágenes de neuroesferas grandes

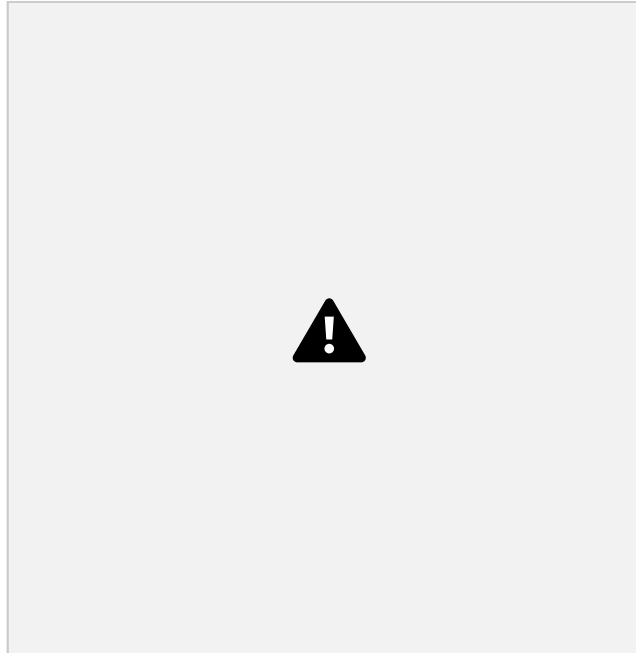


Fig. 11. Evolución del porcentaje de píxeles negros en secuencia de imágenes de neuroesferas medianas

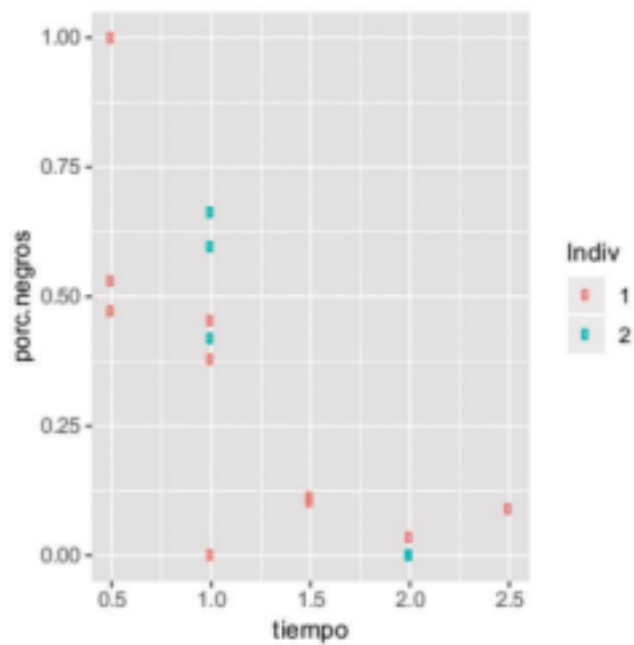


Fig. 12. Evolución del porcentaje de píxeles negros en secuencia de imágenes de neuroesferas pequeñas



Fig. 13. Neuroesferas grandes, datos agrupados

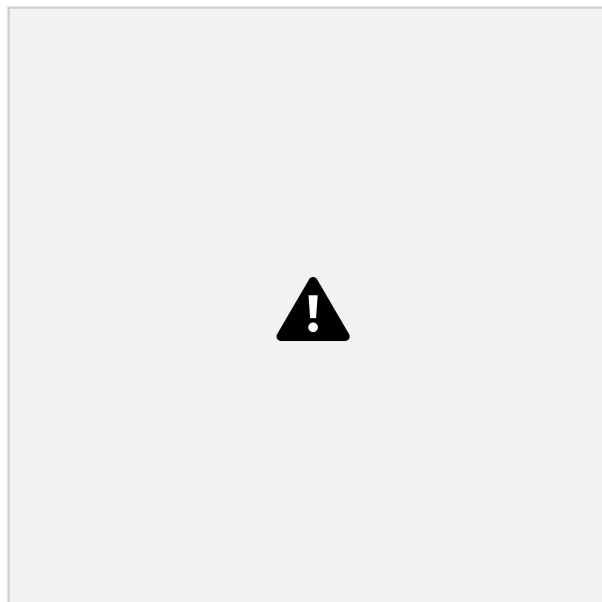


Fig. 14. Estructura de los residuos del modelo para neuroesferas grandes

Cuanto menor es el valor de V_p , mayor es la penetración del topotecan. El investigador experto en farmacología interrumpe la toma de fotos de una secuencia cuando no detecta visualmente modificaciones en la imagen. Por lo tanto, es posible que en alguna secuencia no los individuos, en función del tiempo. Siendo:

se alcance el valor objetivo V_p .

Neuroesferas grandes

La Figura 13 muestra la evolución del valor medio del porcentaje de negros durante la secuencia de imágenes para todas las neuroes

- (1)
- neuroesferas grandes disponibles, para cada uno de
- porcentaje de negro de la k -ésima neuroesfera de la j -ésima imagen correspondiente al i -ésimo individuo.
 - tiempo desde el inicio en que se registró la imagen.
 - efecto aleatorio de la k -ésima Neuroesfera del i -ésimo individuo.
 - Los individuos son dos, $1 \leq i \leq 2$

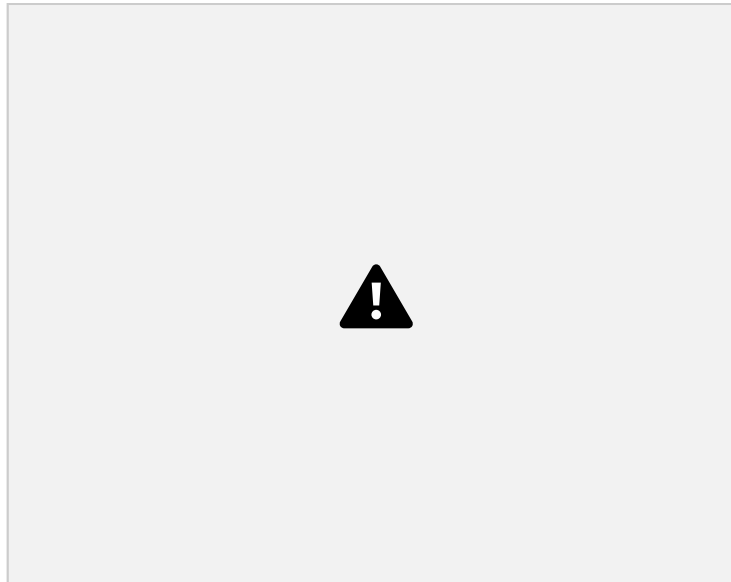


Fig. 15. Neuroesferas medianas: datos agrupados

los residuos del modelo.

- La cantidad de neuroesferas depende del individuo y de la secuencia, podemos indicar $1 \leq k \leq n(k(i))$
- Los efectos fijos se indican con letras griegas y los aleatorios con letras latinas.

Los valores estimados de los coeficientes para los efectos fijos del modelo de neuroesferas

$$\left[\text{Redacted} \right] \quad (2)$$

para el individuo 1

$$\left[\text{Redacted} \right] \quad (3) \text{ para el individuo 2}$$

Todos los coeficientes correspondientes a los efectos fijos del modelo de neuroesferas grandes resultaron estadísticamente significativos con un nivel del 5%.

Diagnóstico del modelo

Dada la significancia de los coeficientes, corresponde estudiar los supuestos del modelo para garantizar la validez de los tests y estimaciones basados en este. A este procedimiento que se realiza sobre los residuos del modelo se lo denomina análisis diagnóstico (Mun & Lindstrom, 2013).

- Test de Shapiro Wilks: p-valor = 0,08
- Test de Levene: p-valor = 0,93

Estos tests indican que se satisfacen los supuestos de normalidad y homocedasticidad de

En la Figura 14 se observa la presencia de una leve estructura sistemática en los residuos, pero dado que predice razonablemente bien, se decide no incorporar nuevas variables al modelo, siguiendo un criterio de parsimonia.

Neuroesferas medianas

En la Figura 15 se aprecian los datos de todas las neuroesferas de cada uno de los individuos así como el valor medio de porcentaje de neogros en función del tiempo por individuo en las neuroesferas medianas.

La expresión del modelo propuesto para las neuroesferas medianas es el expresado en la ecuación (1).

Los coeficientes para los efectos fijos estimados en el modelo de neuroesferas medianas por individuo

$$\left[\text{Redacted} \right] \text{ resultaron:} \quad (4)$$

para el individuo 1

$$\left[\text{Redacted} \right] \text{ para el individuo 2} \quad (5)$$

Todos los efectos fijos se consideran estadísticamente significativos con un nivel del 5%.

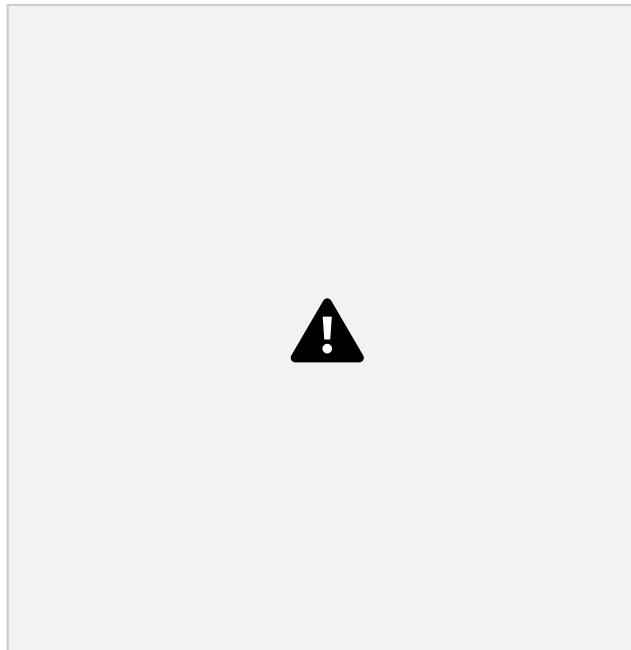


Fig. 16. Estructura de residuos del modelo para neuroesferas medianas

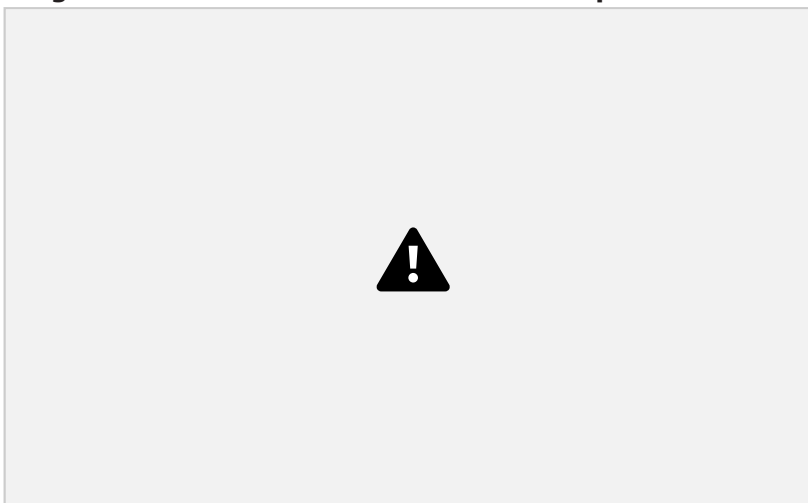


Fig. 17.

Neuroesferas pequeñas: datos agrupados

Diagnóstico del modelo

- Test de Shapiro Wilks: p-valor = 0,59
- Test de Levene: p-valor = 0,61

Estos tests indican que se satisfacen los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos del modelo.

No se aprecia en la Figura 16 estructura sistemática de los residuos.

Neuroesferas pequeñas

En la Figura 17 se aprecian los datos de todas

las neuroesferas de cada uno de los individuos así como el valor medio del porcentaje de neuroesferas grandes en función del tiempo por individuo en las neuroesferas pequeñas.

El modelo propuesto se corresponde con el presentado en la ecuación (1).

Los coeficientes estimados para los efectos fijos del modelo correspondiente a neuroesferas pequeñas por individuo resultaron:

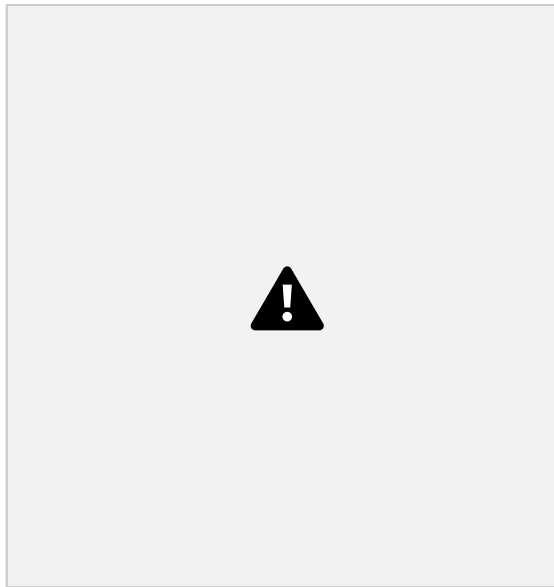


Fig. 18. Estructura de residuos del modelo para neuroesferas pequeñas

$\beta = 0,13$ • Test de Levene p valor se corresponde con las neuroesferas medianas. Esto logra que el coeficiente de grande cargue con la diferencia entre grande y mediano y el coeficiente pequeña cargue con la diferencia entre pequeña y mediana.

$\beta = 0,33$
 (6) (7)

para el individuo 1

• Pequeña: vale 1 si la neuroesfera es pequeña y 0 en otro caso.

para el individuo 2

Diagnóstico del modelo

• Test de Shapiro Wilks p valor Esto señala que el nivel 0 conjunto de ambas variables, La expresión para el Modelo Global propuesto es la siguiente:

Estos tests indican que se satisfacen los su puestos de normalidad y homocedasticidad de

los residuos del modelo.

(8)

En la Figura 18 no se aprecia presencia de estructura sistemática de los residuos.

Modelo Global

Dado que las expresiones de los modelos para cada uno de los tamaños resultaron similares, intentamos integrar los tres modelos construidos en un modelo global con una variable categórica por tamaño.

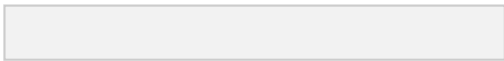
La variable tamaño se define con los siguientes

Siendo:
niveles:

- Grande: vale 1 si la neuroesfera es grande y 0 en otro caso.
 - es el efecto aleatorio de la neuroesfera anidado en el individuo.
 - j-ésimo tiempo registrado para la k-ésima neuroesfera del i-ésimo individuo.
 - efectos fijos correspondientes al tamaño de la neuroesfera.
- Los valores estimados para los coeficientes de los efectos fijos del modelo global por individuo

resultaron:

(9
)



para el individuo 1

D. Chan et al. - Análisis de secuencias de imágenes... *Proyecciones*, vol.17 n°. 1, Abril de 2019 73

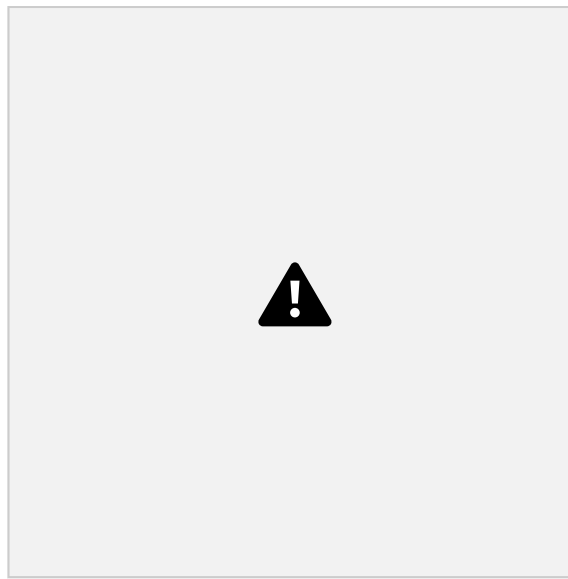
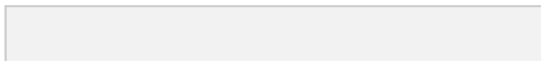
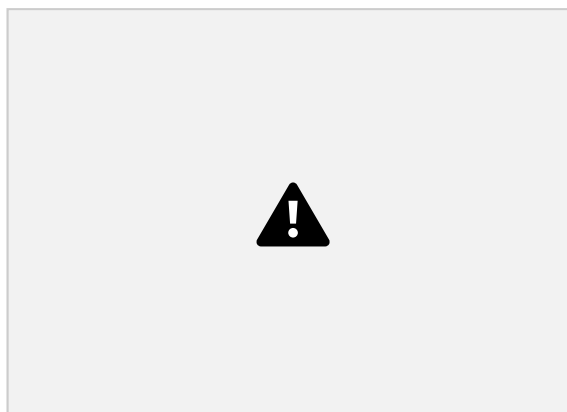


Fig. 19. Estructura de residuos del Modelo Global

Tabla 5. Tiempo estimado de penetración del topotecan en la neuroesfera



Diagnóstico del modelo

para el individuo 2

- Test de Levenne p valor = 0,717 Los

resultados de estos tests indican que se

Dado que todos los efectos fijos del modelo

- Test de Shapiro Wilks p valor = 0,0275
- (10) resultaron estadísticamente significativos por lo que podemos inferir que las diferencias entre los tiempos estimados para las neuroesferas pequeñas y grandes son significativamente diferentes de los tiempos estimados para las neuroesferas medianas. satisfacen los supuestos de normalidad y ho

mocedasticidad de los residuos.

En la Figura 19 se aprecia una leve estructura

de los residuos, sin embargo el modelo predice correctamente.

PROYECCIONES - Publicación de investigación y posgrado de la FRBA www.frba.utn.edu.ar/investigacion/proyecciones

74

Tiempos estimados

Establecemos un umbral en el 10% de píxeles negros; es decir que consideramos que el quimioterápico ha cubierto el cultivo en el instante en que a lo sumo el 10% de los píxeles se mantienen negros.

Basados en este umbral estimamos el instante en el cual para cada modelo se puede asegurar que el topotecan ingresó al centro del cultivo celular.

En la Tabla 5 se aprecian los tiempos medios por individuo y por tamaño estimados en los modelos individuales por tamaño y en el Modelo Global.

En todos los casos los tiempos estimados son similares excepto en el caso de las neuroesferas medianas y grandes correspondientes al segundo individuo.

Conclusiones

Si bien se han considerado diferentes variables respuesta que podrían indicar el momento de penetración del fármaco, en este trabajo se seleccionó al porcentaje de píxeles negros de la imagen.

Como la secuencia ha sido definida empíricamente, sería interesante establecer un algoritmo para la condición de parada, como por ejemplo que la diferencia entre dos imágenes sucesivas sea en menos del 10% de los píxeles. En este trabajo se contaba con imágenes correspondientes a dos individuos, dados los altos costos de generación de la experiencia.

Debe destacarse sin embargo que esta limitación ha tenido un impacto en la precisión de las estimaciones, dada por ejemplo la imposibilidad de estimar la variabilidad grupal, correspondiente a los grupos definidos por el antecedente de un tratamiento previo.

Las estimaciones de los tiempos de penetración realizadas a partir de los modelos individuales resultan en general más precisas que las realizadas con el modelo global. La utilidad fundamental del modelo global radica en que habilita la realización de contrastes para determinar si los tiempos de penetración son distintos por tamaño de neuroesfera o entre individuos. Es evidente en la estimación de tiempos correspondientes al segundo individuo, que ha recibido previamente tratamiento quimioterápico, que el tiempo de penetración es superior al del primer individuo independientemente del tamaño del cultivo.

Sin embargo esta diferencia es más notoria en los cultivos medianos y grandes, mientras que en las neuroesferas pequeñas es muy leve.

Las diferencias en los tiempos de penetración por tamaño son tales que independientemente del individuo se puede afirmar que a mayor tamaño de la neuroesfera se incrementa el tiempo de penetración.

En futuros trabajos se analizarán otras variables respuesta, se compararán las estimaciones logradas con cada uno de los modelos y se definirá un protocolo para controlar en forma automática el final de la secuencia.

Referencias

- CHANTADA, G.; DUNKEL, I.; DE DÁVILA, M. & ABRAMSON, D., (2004). Retinoblastoma patients with high risk ocular pathological features: who needs adjuvant therapy? *British journal of ophthalmology* , 1069-1073.
- HAIDER, S.A.; CAMERON, A.; SILVA, P.; LUI, D.; SHAFIEE, M.; BROOMAN, A.; HAIDER, N. AND WONG, A., (2016) «Fluorescence microscopy image noise reduction using a stochastically-connected random field model», *Scientific Reports* volume 6.
- MUN, J. & LINDSTROM, M. J., (2013). Diagnostics for repeated measurements in linear mixed effects models. *Statistics in medicine* , 1361-1375.
- PERONA, P. & MALIK, J., (1990). Scale-space and edge detection using anisotropic diffusion. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* , 629-639.
- PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S. & SARKAR, D., (2012). Linear and nonlinear mixed effects models. R package version .
- SCHAIQUEVICH, P.; CECILIANO, A.; MILLAN, N.; TAICH, P.; VILLASANTE, F.; FANDINO, A. C. y otros., (2013). Intra-arterial chemotherapy is more effective than sequential periocular and intravenous chemotherapy as salvage treatment for relapsed retinoblastoma. *Pediatric blood & cancer* , 766-770.
- SEZGIN, M., & SANKUR, B., (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J. Electronic Imaging* , 146-168.
- SHI, Y., & KARL, W., (2008). A real-time algorithm for the approximation of level-set-based curve evolution. *Image Processing* , 645-656.
- SHIELDS, C. L., KALIKI, S., ROJANAPORN, D., AL-DAHMAH, S., BIANCIOTTO, C. G., & SHIELDS, J. A., (2012). Intravenous and intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: what have we learned? . *Current opinion in ophthalmology* , 202-209.

PROYECCIONES - Publicación de investigación y posgrado de la FRBA www.frba.utn.edu.ar/investigacion/proyecciones