

# Lawrence Berkeley National Laboratory

## Lawrence Berkeley National Laboratory

### Title

Contribution of the three-dimensional image analysis to the study of breast cancer

### Permalink

<https://escholarship.org/uc/item/63c9b6k9>

### Author

Ortiz de Solorzano, Carlos

### Publication Date

2001-05-02

# **Contribución del Análisis de Imagen 3D al Estudio del Carcinoma Mamario**

**Carlos Ortiz de Solórzano**

**Lawrence Berkeley National Laboratory  
University of California  
Berkeley, CA**

## **1. Introducción**

El desarrollo del análisis de imagen como disciplina autóctona y su consiguiente aplicación en el entorno biomédico han ido siempre en paralelo con la evolución del ordenador personal. Cada avance en el diseño de microprocesadores, unido al desarrollo de cada vez mas sofisticados dispositivos de adquisición y visualización de imágenes, constituye una nueva posibilidad de crecimiento, rara vez desaprovechada por los investigadores y desarrolladores en el campo del análisis de imagen.

El espectro de aplicación del análisis y visualización de imagenes en biomedicina es tan amplio como numerosos son los campos de especialización de la ciencias biomédicas: a modo de ejemplo podemos citar la mejora e interpretación de imágenes Radiológicas para la detección precoz y localización pre-tratamiento de tumores mediante Mamografía, Ultrasonidos, Resonancia Magnética Nuclear o Tomografía Optica, el filtrado y reconstrucción tomográfica de imágenes de microscopía electrónica para revelar la estructura tridimensional de proteínas o los estudios neurológicos de actividad cerebral mediante Tomografía por Emisión de Protones.

En el campo de la Histo-Patología y la Citometría la introducción del análisis de imagen ha sido relativamente mas lenta que en otras areas. Entre las posibles razones de este retraso, podemos destacar la complejidad y alta variabilidad de la información visual, en función del tejido u órgano analizado, del tipo de tinción utilizado, del estado patológico, etc. Debido a esta variabilidad, la identificación y dignóstico Histo-Patológico sigue normas difícilmente formalizables en reglas susceptibles de ser implementadas de manera automática. Una segunda causa es el relativo retraso en el desarrollo de herramientas de adquisición y análisis de imagen miscroscópica

tridimensional, necesarias ya que al ser todo tejido tridimensional, el análisis basado en la extracción de características bidimensionales es necesariamente incompleto. Afortunadamente, la situación ha mejorado en los últimos años: en el terreno de la adquisición debido al redescubrimiento de la microscopía multidimensional (confocal o de excitación múltiple); en lo que se refiere a las herramientas de análisis y visualización 3D, debido el abaratamiento de la tecnología y al incremento exponencial de la capacidad de computación de los ordenadores, que permite realizar operaciones computacionalmente intensas en máquinas al alcance de la mayoría de los presupuestos.

El propósito de esta contribución es presentar algunas nuevas desarrollos del análisis de imagen tridimensional y mostrar ejemplos de aplicación de los mismos a estudios en los que se requiere correlacionar la morfología de un tejido (en distintos niveles de resolución) con su función. Las aplicaciones están principalmente orientadas al estudio de la Biología del Cáncer de Mama, aunque su rango de aplicación es mucho más amplio. Las herramientas se presentarán en orden decreciente de resolución, o lo que es lo mismo, en orden creciente de extensión (y por tanto de significación) del análisis.

## **2. Segmentación 3D de Núcleos en Microscopía Confocal**

Dado que es en el núcleo donde ocurren la mayor parte de los eventos del proceso carcinogénico, nuestro primer esfuerzo se centró en delimitar los contornos (*segmentación*) de los mismos en imágenes tridimensionales (*confocales*) de cortes gruesos de tejido. Esto nos permitirá después determinar la posición o el número de otros elementos nucleares (genes, ARN's, proteínas nucleares) dentro de los mismos que nos darán la información sobre la función o el comportamiento de la células correspondientes.

El tejido utilizado son biopsias de tejido mamario de 40 micras de grosor inmersas en parafina con el fin preservar la consistencia y morfología del tejido. Dicho grosor asegura la existencia de suficientes células intactas y al mismo tiempo está en el rango de adquisición óptimo de imágenes confocales, que está limitado por la atenuación de la luz con la profundidad del tejido y otros efectos de "scattering", debidos a la falta de acoplamiento del índice de refracción del medio en el que está inmerso el tejido al índice de refracción de la lente.

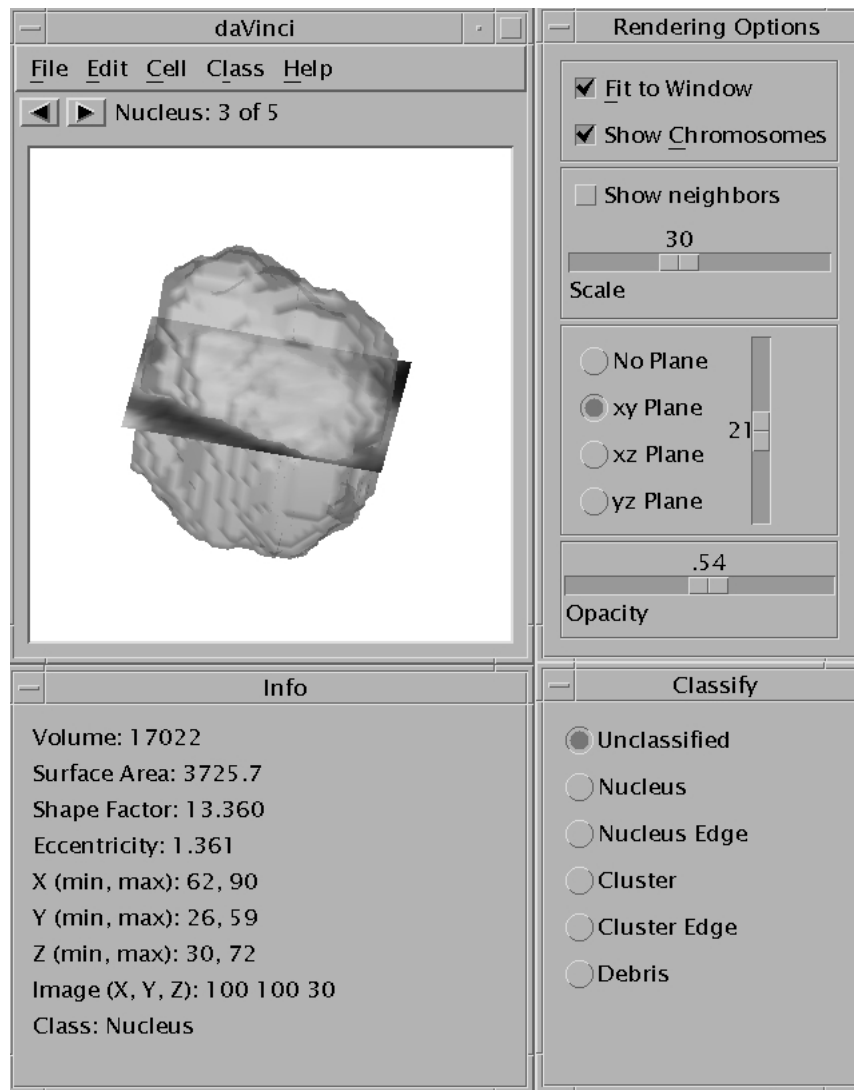
La contratincción utilizada para los núcleos fue YO-PRO-1. La adquisición de las imágenes se realizó con un microscopio confocal Zeiss 410 (Carl Zeiss Inc., Thornwood, N.Y., USA), con un objetivo 40X (Zeiss Plan-Apo, 1.3 NA) , un láser de Ar/Kr (con líneas de emisión 488/568) y un láser de HeNe (excitación a 622 nm). Las imágenes se tomaron excitando la muestra a 633nm y filtrando la emisión fluorescente con un filtro PB de 665nm. En tiempo de adquisición las imágenes fueron ampliadas digitalmente (x2) en el plano imagen, resultando una resolución lateral de 0.2  $\mu\text{m}$ . La distancia entre secciones consecutivas en el eje Z (enfoco) se fijó en 0.5  $\mu\text{m}$ , produciendose una media de 80 secciones por imagen.

La segmentación de las imágenes se realizó en tres pasos: El primero es una umbralización adaptativa de la imagen cuyo objetivo es separar las zonas de la imagen con emisión fluorescente (núcleos) del fondo. A continuación, utilizando un software para visualización desarrollado en nuestro laboratorio (DaVinci, ver Figura 1), el usuario puede ver una reconstrucción tridimensional de cada objeto segmentado, con el fin de facilitar su clasificación como núcleo, cluster de núcleos o debris. Finalmente, se utiliza recursivamente un algoritmo automático basado en la Transformada de Hough para dividir los clusters. (Para una descripción exhaustiva, consultar [Ortiz de Solórzano 99]).

## 2.1 Aplicación a la medida de la Inestabilidad Genética

Como primera aplicación del algoritmo descrito, se estudió la variación de los niveles de inestabilidad genética en Cáncer de Mama. La inestabilidad genética es una de las posibles causas de evolución en tumores sólidos, al facilitar la acumulación de mutaciones genéticas necesarias para la evolución fenotípica de las células cancerosas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los niveles reales de inestabilidad y su evolución en los distintas fases histológicas de evolución del cáncer.

Nuestro estudio consistió en cuantificar la variación del número de copias de dos cromosomas en diferentes fases de evolución del cáncer, utilizando Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) en cortes gruesos de tejido y análisis de imagen tridimensional. Concretamente se midió la variación (célula a célula) del número de copias del centrómero del cromosoma 1 y de la región 20q13, en muestras de tejido normal (N), hiperplástico (UDH), Carcinoma In Situ (DCIS) y Carcinoma Invasivo (IC).

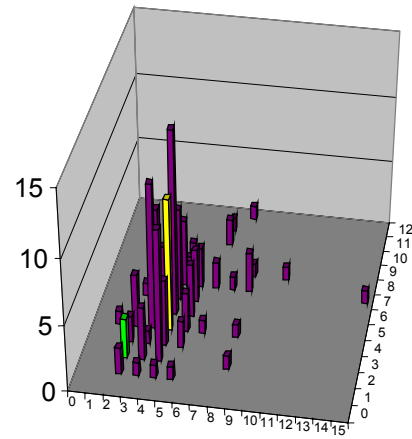
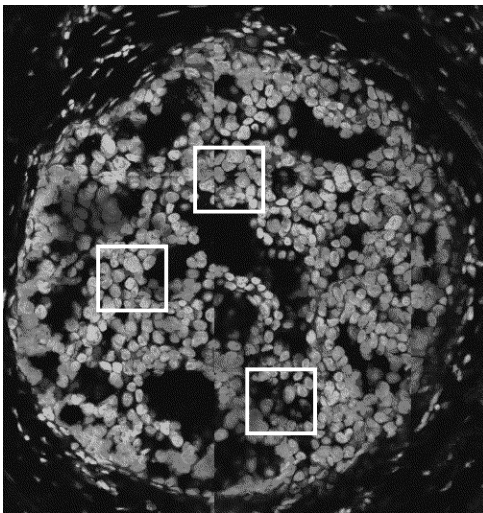


**Figura 1.** DaVinci (Data Visualization and Computer Interaction). Vista de los paneles que componen la aplicación. La ventana superior izquierda muestra una reconstrucción (rendering) de los objetos segmentados (ver texto para detalles sobre la segmentación). El panel superior derecho da acceso a algunas herramientas de visualización aplicables a la reconstrucción, como por ejemplo escalado (zoom), intersección (y visualización simultánea) de los objetos con planos de la imagen original, control de la opacidad de la superficie, etc. La ventana inferior izquierda contiene información sobre el objeto visualizado. La ventana inferior derecha permite clasificar el objeto visualizado.

Para medir el número de copias, se realizó la segmentación de los núcleos siguiendo el procedimiento previamente descrito. A continuación se segmentaron señales FISH en los canales de imagen correspondiente a los fluorocromos utilizados en la

hibridación (Alexa568 y Cy5 para 20q13 y 1c respectivamente). En la segmentación de las señales en 3D se utilizó un algoritmo Top Hat con reconstrucción. Los resultados de la segmentación se combinaron con los de la segmentación de los núcleos y se enumeraron, núcleo a núcleo, las dos sondas utilizadas. Finalmente se representaron los resultados de la enumeración combinados de todos los casos estudiados mediante histogramas tridimensionales que representan el número de núcleos con cada una de las posibles combinaciones de número de copias de las dos señales. (Ver **Figura 2**).

Los resultados muestran una variación intercelular mínima en las muestras de tejido normal y UDH, y una variación muy pronunciada en los casos de DCIS y IC. Las muestras IC presentaron también aneuploidía, en cantidades variables en las distintas partes de cada muestra. La variación observada en el número de cromosomas entre células vecinas fue mucho mayor de la esperada, lo que parece indicar que los cambios en el número de copias no son el resultado de selección clonal sino más bien de la creciente inestabilidad existente en la división celular.



**Figura 2.** Enumeración del número de copias de un espécimen con DCIS. La imagen de la izquierda muestra un conducto mamario atrofiado lleno de células cancerosas, así como tres áreas en las que se tomaron imágenes 3D confocales y se aplicó el análisis descrito en el texto. La imagen de la derecha muestra la distribución de número de copias por núcleo para las dos sondas FISH utilizadas (20q13 and 1c).

Para una explicación más detallada de estos resultados, consultar [Chin 00] y [Chin 01].

## 2.2 Aplicación al estudio de los mecanismos de compensación de niveles de expresión de genes

Los métodos descritos anteriormente se utilizaron también para estudiar los mecanismos de regulación de expresión genética en *C.elegans*. Concretamente, nuestro trabajo consistió en estudiar los mecanismos por los que los complejos reguladores son capaces de identificar el cromosoma *X*, con el fin de reducir a la mitad sus niveles de expresión genética en los especímenes hermafroditas (*XX*). Para eso, se estudió si el complejo de compensación genética (DCC) es capaz de reconocer una parte del cromosoma *X* adherida a uno de los autosomas o necesita el cromosoma completo para actuar. Con ese fin, se segmentaron los núcleos de varias decenas de embriones de *C.elegans*, y se detectó la expresión de la tinción inmunocitoquímica del DCC dentro de todos los núcleos.

De esta manera se comparó el volumen y el número de volúmenes de expresión del DCC en embriones normales (*XX* wild type) y en los embriones conteniendo la porción sub-cromosómica adicional (*XX+s*). Como resultado, se comprobó que el DCC se adhirió a una porción igual al 30% del cromosoma *X*, y sólo de dicha porción, sin extenderse al autosoma adyacente. Por lo tanto el DCC no necesita la presencia del cromosoma completo para actuar. El DCC, en cambio, no fue capaz de reconocer porciones menores del 30%.

Para una descripción más detallada de los métodos y resultados, consultar [Lieb 00].

### **3. Segmentación Celular**

En determinadas ocasiones, por ejemplo cuando debido a deformaciones patológicas del núcleo se presume que los límites nucleares no coinciden con el de los límites de la cromatina, o cuando se pretende segmentar nucleos que están muy densamente agrupados, la segmentación descrita en el apartado no da resultados satisfactorios. En dichos casos se hace necesario buscar soluciones alternativas.

En un estudio reciente [Ortiz de Solórzano 01], exploramos la posibilidad de segmentar núcleos (y posteriormente células completas) en imágenes de cultivos y tejidos marcados con fluorescencia a través de anticuerpos de proteínas asociadas a la membrana

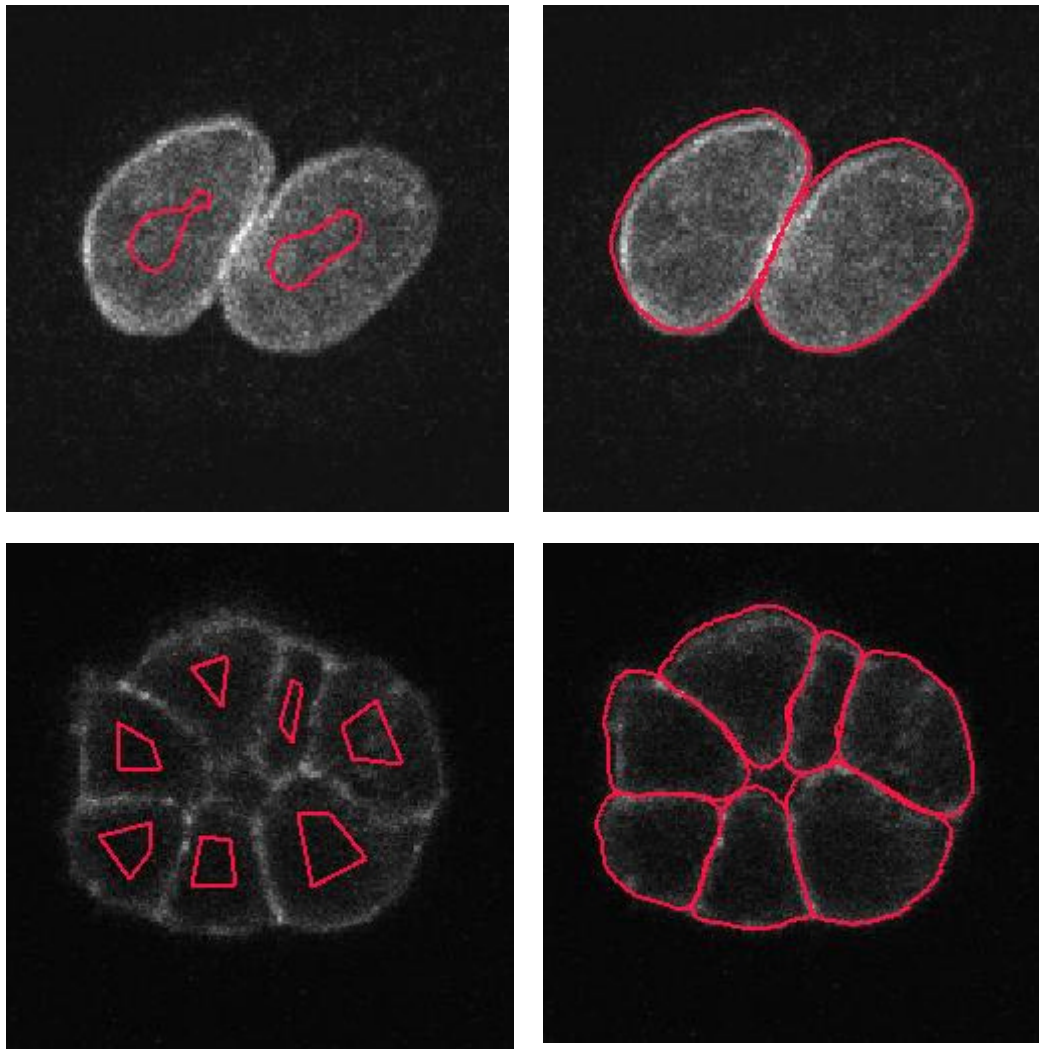
nuclear (o la superficie celular en el caso de la segmentación de las células completas). Las proteínas elegidas, por su distribución homogénea en epitelios diversos, fueron *LaminaA* para el núcleo e Integrinas  $\alpha6$  ó  $\beta1$  para la superficie celular. En ambos casos, la tinción fluorescente de la proteína produce imágenes con alta intensidad en la periferia del núcleo o de la célula y un fondo relativamente oscuro en el interior de los mismo.

La segmentación, completamente automática, se realizó en dos fases. Primero se determinó el centro del cada núcleo o célula mediante proyección acumulativa del gradiente de la imagen. A continuación, los límites externos de los objetos obtenidos se utilizan como semillas de un algoritmo que expandió los contornos de las semillas hasta ajustarlos a los contornos externos de los núcleos o de las células. Para ello, el algoritmo resuelve la ecuación de la propagación de un frente de onda geométrico bajo los efectos de una fuerza determinada por las características de la imagen a segmentar. La Figura 3 muestra dos ejemplos de los resultados de la segmentación. Para una más detallada explicación de los métodos utilizados y de los experimentos realizados, consultar [Ortiz de Solórzano 01] y [Sarti 00]

#### **4. Reconstrucción Tridimensional de Tejidos**

Los métodos descritos en los dos apartados anteriores, basados en el análisis de imágenes confocales, son útiles cuando el volumen de tejido que se necesita analizar es relativamente pequeño. Las limitaciones provienen de la cantidad de datos generados en este tipo de análisis (a modo de ejemplo, el tamaño de una imagen de un volumen de 100x100x40 micras es de aproximadamente 20Mb) y de las limitaciones en la calidad de la imagen debido a problemas de desacoplamiento del índice de refracción con el grosor de la muestra y a problemas de eficiencia de los procesos inmunocitoquímicos en cortes gruesos de tejidos.





**Figura 3.** Segmentación de núcleos y células mediante marcadores de proteínas relacionadas con la membrana nuclear (Lamin A, fila superior) o la superficie celular (Integrina  $\alpha 6$ , fila inferior). Las imágenes de la columna izquierda muestran las imágenes originales con los marcadores (semillas) encontrados automáticamente (en la fila superior) o marcados manualmente (fila inferior). La columna derecha muestra el resultado de la segmentación obtenida utilizando el procedimiento referido en el texto.

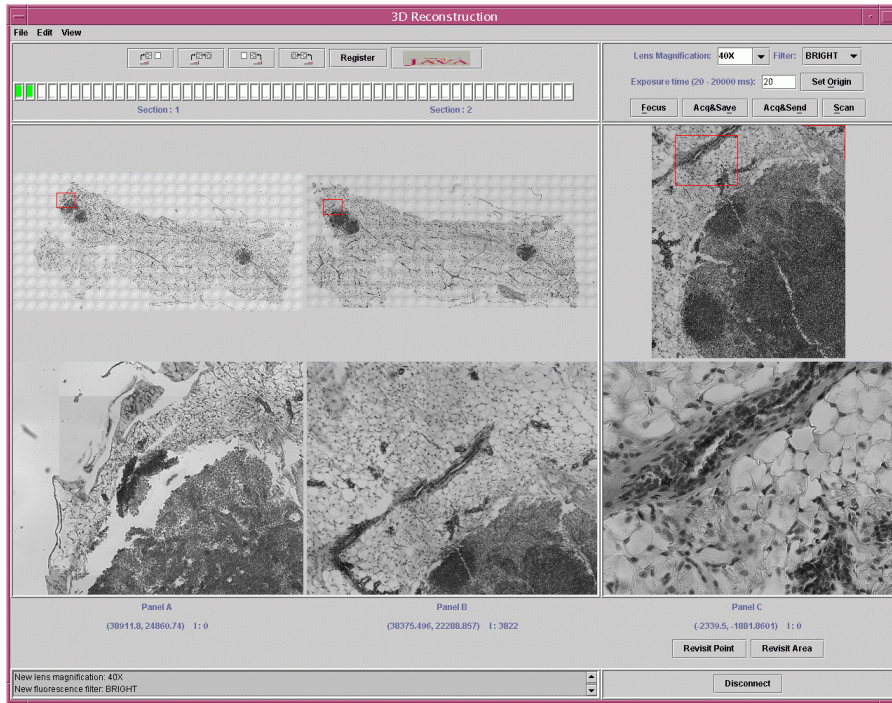
Cuando se necesita analizar mayores volúmenes, los métodos anteriores producen cantidades de información descomunales, por lo que se hace necesario desarrollar nuevos métodos, basados en reconstrucción computarizada a partir de secciones físicas del tejido. Un proyecto en curso en nuestro laboratorio tiene como objetivo la creación de un sistema de microscopía que permita adquirir y posteriormente reconstruir tejidos a partir

de secciones de tejido. La aplicación principal del sistema será la reconstrucción de la glandular mamaria (o porciones de la misma) para realizar estudios que requieran una correlación entre la morfología y la biología normal y/o neoplástica de la glándula mamaria.

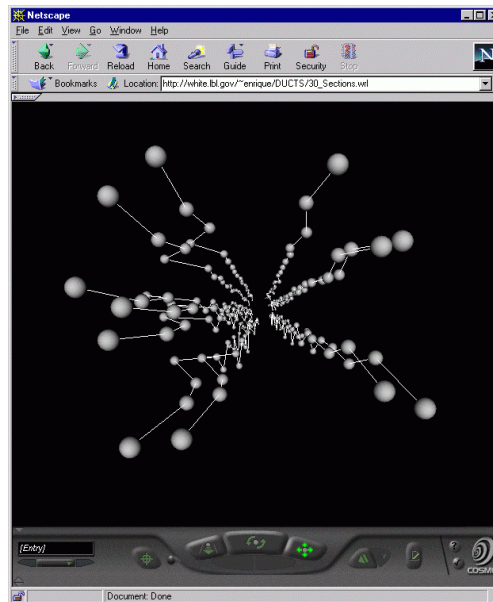
El sistema desarrollado permite adquirir secciones en baja resolución (1 pixel = 5  $\mu\text{m}$ ) utilizando microscopía de campo claro o de fluorescencia. Una vez todas las secciones de un corte (o bloque) han sido adquiridas, el sistema permite la marcación y enlace de estructuras de interés (conductos mamaros, capilares, etc.) en las imágenes de las secciones y el trazado (manual inicialmente) de sus conexiones en las tres dimensiones, con el fin de crear una reconstrucción topológica de la glándula mamaria. Finalmente, el sistema permite visitar áreas de interés en alta resolución (1 pixel = 0.5  $\mu\text{m}$ ) para realizar el análisis deseado (ver ejemplos citados más adelante).

El sistema se basa en una arquitectura cliente-servidor en que el cliente solicita operaciones del servidor, que es una aplicación independiente que controla las partes automatizadas del microscopio (movimientos de la pletina, cambio de filtros de excitación fluorescente, apertura/cierre del filtro de bloqueo de excitación fluorescente, etc.) y la adquisición de las imágenes (definición del tiempo de exposición, enfoque automático del microscopio, adquisición de secuencias de imágenes y creación de una imagen mosaico correspondiente a toda la sección, etc.). La comunicación entre el cliente y el servidor se realiza a través de *sockets*, que son el método estándar de comunicación en Internet.

En el lado del cliente, el sistema consiste en una interfaz de usuario gráfica, implementada en JAVA, que permite acceder a las operaciones básicas proporcionadas por el servidor y a algunas opciones más avanzadas, como visitar y/o re-adquirir áreas, marcando el área deseada sobre una imagen previamente adquirida. El cliente también da acceso a otras operaciones no relacionadas con la adquisición de las imágenes, tales como crear Casos (series de imágenes relacionadas), añadir una sección a un caso existente, registrar secciones consecutivas, hacer anotaciones sobre las imágenes, marcar y enlazar estructuras de interés (por ejemplo conductos mamaros) en y entre secciones, etc. Ver Figura 4.



(a)



(b)

**Figura 4.** (a) Vista de la interfaz de usuario de la aplicación. La interfaz muestra dos secciones consecutivas de tejido de glándula mamaria de ratón, adquiridas a baja resolución (2.5X) y un área adquirida en alta resolución (panel derecho) (40X) a partir de una de las secciones de baja resolución. (b) Reconstrucción topológica de un pequeño volumen de glándula mamaria del ratón. Las esferas corresponden a puntos marcados manualmente por el operador en secciones consecutivas. La reconstrucción está enlazada con las imágenes originales y con el microscopio.

#### 4.1 Aplicaciones al estudio de los mecanismos de expansión del Cáncer Mamario

El sistema descrito será utilizado para estudiar los mecanismos de expansión del Cáncer de Mama previos a la invasión. Para ello, se reconstruirán biopsias de tejido con Carcinoma In Situ, prestando especial atención a las regiones periféricas de las mismas. A partir de secciones histológicas H&E se determinará la distribución del tumor y sus conexiones (si existen) con conductos morfológicamente y citológicamente normales. Una vez encontradas las conexiones, se utilizarán secciones FISH intermedias a las H&E para determinar si dentro de los conductos morfológicamente 'sanos' existen células con las mismas características genéticas que las células de las zonas cancerosas. La presencia de dichas células y su distribución pueden darnos información sobre los mecanismos de expansión del Cáncer anteriores a la invasión.

Otra aplicación del sistema en curso es el estudio de la expresión comparativa de los receptores de Progesterona (RP) y Estrógeno (RE) en el desarrollo de la glándula mamaria normal y neoplástica. Para ellos se utilizará un procedimiento similar al utilizado en la aplicación anterior, pero esa vez utilizando glándula mamaria de ratón, 'muestreada' en distintas fases de su desarrollo. La comparación entre el desarrollo normal y el neoplástico se hará utilizando ratones transgénicos con un imbalance entre los niveles de expresión de los dos tipos de RP (RPa y RPb) que tienen una predisposición natural a desarrollar tumores durante el desarrollo de la glándula. Se realizará una reconstrucción de las glándulas completas seguidas de la detección de la expresión de los receptores en distintas parts de la misma, con el fin de crear mapas de expresión comparativa entre las glandulas normales y las neoplásticas. Con ello se pretender proporcionar algo de luz sobre el papel de las hormonas y sus receptores en el proceso de aparición y desarrollo del Cáncer de Mama.

#### **5. Conclusiones**

En el presente artículo se han presentado una serie de tecnologías de análisis y visualización tridimensional así como algunos ejemplos de aplicaciones de las mismas a estudios sobre el Cáncer de Mama. La intención del mismo ha sido mostrar como dichas técnicas pueden aportar información cuantitativa y estructural difícilmente obtenible mediante otros métodos.

## 6. Agradecimientos

Los trabajos y estudios presentados en este artículo han sido o están siendo financiados por las siguientes fuentes: NIH grant CA-67412, Department of Energy (DOE), Office of Health and Environmental Research, contrato DE-AC03-76SF00098, Department of Defense (DOD) Breast Cancer Research Program grants DAMD17-00-1-0227 y DAMD17-00-1-0306 y un contrato con Zeiss Inc.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a K. Chin, W. Chou, R. Fernández-González, E. García-Rodríguez, J. Gray, A. Jones, S. Lelievre, J. Lieb, S. Lockett, R. Malladi y A. Sarti, sin cuya colaboración ninguno de los estudios podrían haberse realizado.

## 7. Bibliografía

- [Chin 00] Chin K., Kuo W-L., Chou W., Ortiz de Solórzano C., Knowles D.K., Lockett S.J., Gray J.W. Rates of genome instability in human breast cancers: FISH analysis in vitro and in vivo. *Cytometry Supplement* 10:83. Proceedings of the XX Congress of the International Society of Analytical Cytology. 2000.
- [Chin 01] Chin K., Ortiz de Solórzano C., Knowles D., Jones A., Chou W., Rodríguez E., Huang C-H, Wei R., Gray J., Lockett S. 3D Image Analysis of Thick Breast Cancer Specimens shows High Cell-to-Cell Genetic Heterogeneity. Enviado a *Nature Genetics* (2001)
- [Lieb 00] Lieb J.D, 4, Ortiz de Solórzano C., García Rodríguez E., Jones A, Angelo M, Lockett S.J., Meyer B.J. The *C. elegans* Dosage Compensation Machinery Is Recruited to X-Chromosome DNA Attached to an Autosome. *Genetics* 156 (4): 1603-1621, 2000.
- [Ortiz de Solórzano 99] Ortiz de Solórzano C., García Rodríguez E., Jones A. Sudar D. Pinkel D., Gray J.W., Lockett S.J. Segmentation of Confocal Microscope Images of Cell Nuclei in Thick Tissue Sections. *Journal of Microscopy-Oxford*, 193(3):212-226. 1999.
- [Ortiz de Solórzano 01] Ortiz de Solórzano C., Lelievre S., Lockett S.J., Malladi R. Segmentation of Cell and Nuclei using Membrane Related Proteins. *Journal of Microscopy-Oxford* 201 (3): 404-415, 2001.
- [Sarti 00] Sarti A., Ortiz de Solórzano C., Lockett S.J, Malladi R. Computer-Aided Cytology: A Geometric Model for 3D Confocal Image Analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47(12): 1600-1609, 2000.