

ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES DE FASE PARA EL ESTUDIO DE CULTIVOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

DIGITAL ANALYSIS OF PHASE IMAGE TO STUDY MESENCHYMAL STEM CELL CULTURE

Horacio Castellini¹, Dominique Dumas², Sébastien Hupont², Alicia Fontana³, Marcela Delannoy^{3,4}, Miguel Oliveros³; J. Magdalou²; B. Riquelme^{3,4}

1 Departamento de Física, FCEIA (UNR) - Rosario, Argentina

2 Plateau Technique d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire, FR3209 CNRS -PTIBC IBISA – UMR7561 - Nancy, Francia

3 Área Física, FCByF (UNR) - Rosario, Argentina

4 Óptica Aplicada a la Biología – IFIR (CONICET-UNR) – Rosario, Argentina

e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar, riquelme@ifir-conicet.gov.ar

Recibido 30/03/2012; aprobado 10/09/2012

En los últimos años se ha visto cómo las células madre o troncales han pasado de ser un concepto de interés científico principalmente en el campo de la biología, a ocupar tantas páginas en las revistas científicas como en la prensa. Los conocimientos que en este campo de la medicina se vienen produciendo de forma casi diaria ha disparado las expectativas de los enfermos y de los médicos de que las células madre vayan a contribuir a la curación de múltiples enfermedades humanas devastadoras como la diabetes, la enfermedad de Parkinson, el infarto de miocardio u otras. Se presenta una técnica óptica no invasiva, basada en el análisis digital de imágenes de fase que permite analizar el cultivo de células madres mesenquimales. De esta forma es posible analizar y cuantificar la dinámica de los cambios producidos durante el crecimiento y la diferenciación celular. Se analizan distintas etapas de la evolución de cultivos de células madre mesenquimales con el objetivo de determinar los parámetros de imagen representativos del crecimiento y de la diferenciación de estas células. Estos experimentos contribuirán a un mejor entendimiento de la dinámica de las células madres, ayudando al avance de diversas aplicaciones médicas.

Palabras Claves: imagen de fase, células madres mesenquimales, técnicas no invasivas, diferenciación celular, cultivo celular

In recent years we have seen how stem cells or stem has grown from a concept of scientific interest mainly in the field of biology, to occupy many pages in scientific journals and the press. The knowledge in this field of medicine have been occurring almost daily so triggered the expectations of patients and physicians that stem cells will help cure many devastating human diseases such as diabetes, the disease Parkinson, myocardial infarction or many other. We present a non-invasive optical technique based on digital image analysis phase allowing to observe the culture of mesenchymal stem cells. This make is possible to analyze and quantify the dynamic changes during growth and cell differentiation. We analyze different stages of the evolution of mesenchymal stem cell cultures in order to determine the imaging parameters representative of growth and differentiation of these cells. These experiments contribute to a better understanding of the dynamics of stem cells, helping to advance medical application. .

Key Words: phase image, mesenchymal stem cell, Non-invasive techniques, cell differentiation, cell culture

I. INTRODUCCIÓN

Las células madre son aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación (es decir, producir más células madre) y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, que se convertirán finalmente por diferenciación en tipos celulares especializados. Una célula madre o troncal es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes

de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria¹.

Tradicionalmente se han considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multipotenciales. Sin embargo, trabajos publicados recientemente sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de lo esperado, existiendo células troncales pluripotenciales en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias^{2,3}.

Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse pluripotencial tiene que

cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta^{2,3}.

Las células madre mesenquimales (MSC) humanas⁵ están presentes en el estroma de la médula ósea,

constituyendo una población totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas, y su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimáticos (hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma). Se han aislado y cultivado MSC humanas, y lo que es mejor, se ha logrado su diferenciación controlada hasta células con rasgos típicos de osteocitos, condrocitos o adipocitos, respectivamente (figura 1).

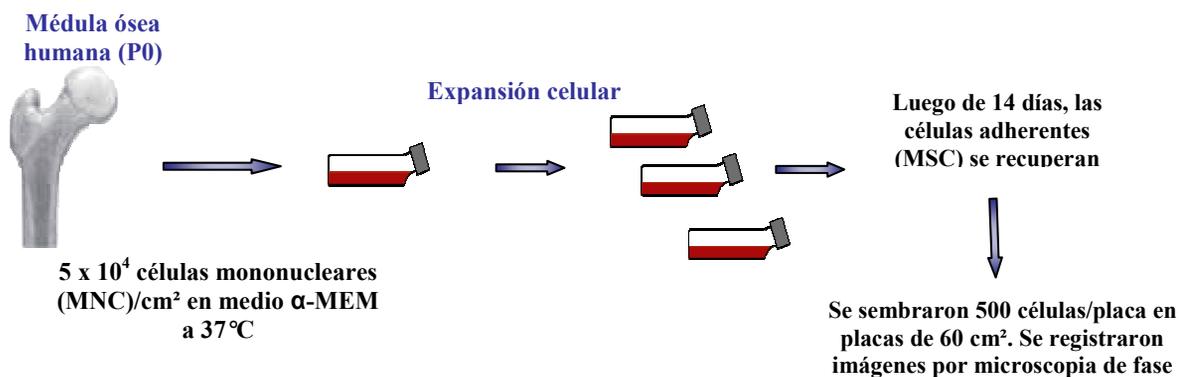


Figura 1: Esquema de la formación de células madres a partir de médula ósea humana

La esperanza terapéutica principal que se tiene en las células madre es que se puedan emplear para terapias celulares y trasplantes de tejidos, sin los problemas actuales ligados a los aloinjertos: escasez de donantes histocompatibles, necesidad de administrar drogas inmunosupresoras (ciclosporina, corticoides) con sus efectos secundarios (riesgo de infecciones, de cáncer, nefropatías, etc.). Lo ideal sería derivar tejido con la identidad histológica del propio paciente para hacer autotrasplantes.

Se está abriendo el campo de la Ingeniería Celular, que en definición de Bernat Soria es “un

nuevo campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida a la obtención de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular”.

En el presente trabajo se analizan imágenes obtenidas en distintas etapas de la evolución de cultivos de células madre mesenquimales con el objetivo de determinar los parámetros morfométricos y de textura representativos del crecimiento y de la diferenciación de estas células.

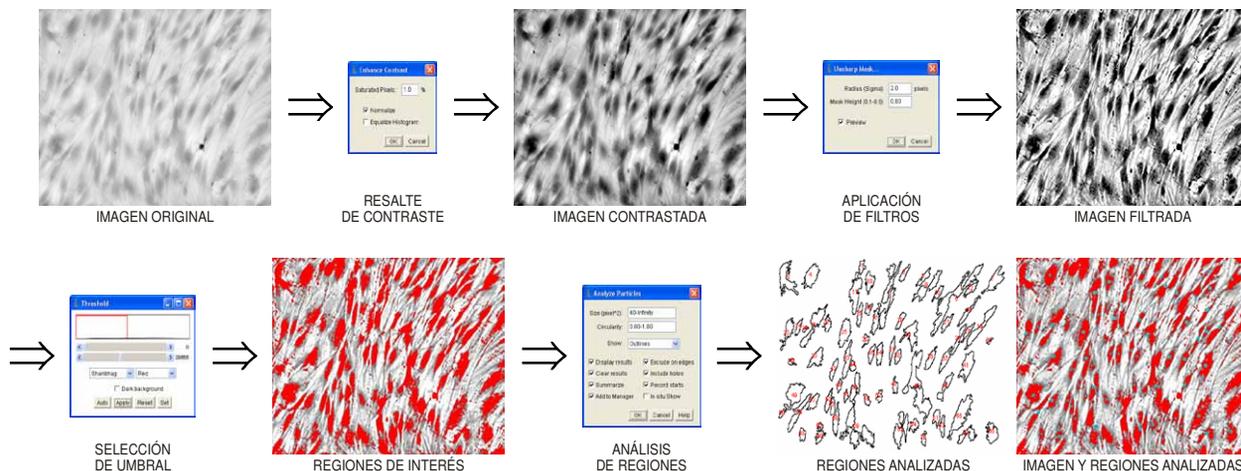


Figura 2: Procesamiento y análisis de las imágenes con el programa ImageJ.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron células madre mesenquimales (MSC), las cuales son células estromales no hematopoyéticas que representan de 0.001 a 0.01% de las células nucleadas de la médula ósea del adulto. Fueron seleccionadas por adherencia al plástico y generaron colonias discretas *in vitro* (colony-forming unit-fibroblast o CFU-F). Se las identificó por su perfil fenotípico y por su capacidad de diferenciarse en células del tejido conectivo (adipocitos, osteocitos, condrocitos). Fueron amplificadas *in vitro* considerando su potencial replicativo, el cual varía en función de diferentes parámetros, como la densidad de siembra, el tiempo de cultivo y la presión de oxígeno. En la figura 1 se presenta un esquema del procedimiento utilizado.

Para seguir la evolución del crecimiento de las células madres se tomaron imágenes por microscopía de fase utilizando luz blanca, sin ningún tipo de preparación o marcaje adicional. Las imágenes fueron almacenadas en formato TIF y para su análisis se utilizó el programa de circulación libre ImageJ y un macro para el programa GIMP de análisis textural de imágenes, específicamente desarrollado en nuestro grupo de investigación.

El procedimiento de análisis de las imágenes consistió en mejorar la imagen original resaltando el contraste y aplicando filtros para destacar las células, seleccionar las regiones de interés, aquellas correspondientes a las células, y determinar los parámetros de cada una de las regiones seleccionadas (figuras 2).

El análisis de la textura de la imagen (figuras 3, 4 y 5) consistió de cuatro pasos:

Primero, se obtiene un histograma de la escala de grises, $p_i(L_i)$, donde p_i es la frecuencia relativa y $L_i = 0, \dots, 254$, es el nivel de la escala de grises en el codificado de un byte. Segundo se busca el entorno $L_1 < L < L_2$ donde el histograma de de frecuencias relativas presenten un comportamiento lineal en el gráfico log-log, es decir:

$$\log(p_i) = a \log(L_i) + b.$$

Tercero se aplica un filtro ranura para eliminar cualquier otro comportamiento. Cuarto y último, con la imagen filtrada se calcula la suavidad:

$$R = 1 - \frac{I}{1 + \sigma / \sigma_{max}},$$

la energía:

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p_i^2,$$

y la entropía de Shannon:

$$S = - \sum_{i=1}^{L-1} p_i \log_2(p_i)$$

La razón de tan peculiar filtrado, es que este no sólo mejora el nivel de contraste, como se aprecia en la figura 4, sino que en nuestra experiencia, la diferenciación celular es mucho mejor evaluable como textura con esta metodología sin tener que apelar a complejos algoritmos de filtrado. Por otro lado con el filtro ranura se elimina cualquier comportamiento gaussiano que pueda estorbar en el análisis de la textura.

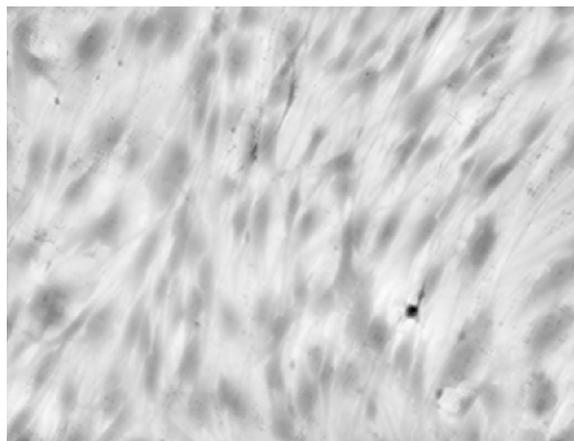


Figura 3 Imagen original sobre la que se realiza el filtrado

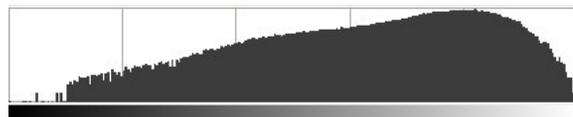


Figura 4: Obtención del histograma de frecuencias absolutas de la escala de grises, como se ve en la figura, se elije el intervalo de valores lineal en el grafo log-log para diseñar el filtro ranura.

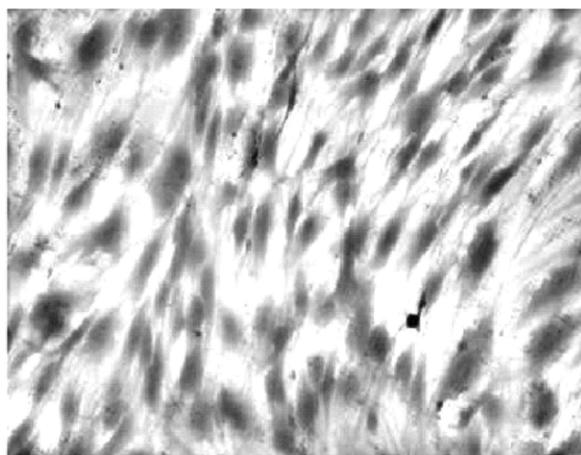


Figura 4: Imagen filtrada sobre la cual se aplica el análisis de textura

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se presentan los parámetros morfométricos de 10 objetos (células en evolución) obtenidos mediante el análisis digital de la imagen mostrada en la figura 2.

Tabla I. Valores de los parámetros morfométricos obtenidos mediante el análisis de las imágenes

| | Area | X | Y | Perim. | Angle | Circ. | Feret | Feret X | Feret Y | Feret Angle | Min Feret | AR | Round |
|----|------|-------|------|--------|-------|-------|-------|---------|---------|-------------|-----------|------|-------|
| 1 | 143 | 144,2 | 12,8 | 65,4 | 78,1 | 0,421 | 24,4 | 141 | 25 | 70,8 | 12,0 | 2,09 | 0,48 |
| 2 | 671 | 16,0 | 30,5 | 261,5 | 104,0 | 0,123 | 56,0 | 7 | 56 | 71,2 | 29,4 | 1,92 | 0,52 |
| 3 | 897 | 189,1 | 54,3 | 420,2 | 76,1 | 0,064 | 108,8 | 174 | 106 | 69,6 | 22,7 | 6,37 | 0,16 |
| 4 | 548 | 58,5 | 26,5 | 130,8 | 61,1 | 0,403 | 42,1 | 46 | 45 | 61,6 | 20,6 | 2,00 | 0,50 |
| 5 | 1306 | 299,6 | 58,9 | 474,5 | 48,5 | 0,073 | 139,9 | 261 | 116 | 50,5 | 29,9 | 6,21 | 0,16 |
| 6 | 164 | 216,2 | 23,1 | 70,3 | 56,7 | 0,417 | 30,6 | 207 | 33 | 51,6 | 8,7 | 4,04 | 0,25 |
| 7 | 484 | 370,1 | 33,2 | 158,6 | 51,9 | 0,242 | 53,4 | 348 | 53 | 51,8 | 18,6 | 2,44 | 0,41 |
| 8 | 191 | 249,9 | 28,8 | 91,0 | 47,5 | 0,290 | 37,5 | 236 | 42 | 48,2 | 9,8 | 4,13 | 0,24 |
| 9 | 516 | 255,9 | 43,2 | 197,1 | 41,1 | 0,167 | 69,4 | 229 | 65 | 42,7 | 17,6 | 4,53 | 0,22 |
| 10 | 300 | 157,3 | 34,8 | 106,2 | 85,6 | 0,334 | 35,2 | 154 | 54 | 83,5 | 16,7 | 1,96 | 0,51 |

De los resultados obtenidos se puede inferir que los parámetros morfométricos más representativos resultaron ser el área, el perímetro, la circularidad y el diámetro de Feret; y de los parámetros de textura la entropía de Shanon, la suavidad y la energía.

IV CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos permite establecer cuales son los parámetros morfométricos y de textura vinculados a la evolución temporal de las distintas células madre analizadas que permiten caracterizar el cultivo celular.

Estas experiencias contribuirían a un mejor entendimiento de la dinámica de los cultivos de células madre para su posterior aplicación médica.

Se presenta una técnica no invasiva, sencilla y eficaz para la caracterización del cultivo de las células madre mesenquimales que permitirá obtener parámetros cuantitativos de la morfología y orientación de las células en distintos estadios de la diferenciación celular a fin de mejorar la calidad de las mismas para su utilización en Ingeniería tisular.

Referencias

1. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17: 387-403. (2001)
2. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30: 896-904. (2002)
3. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*; 8:607-612. (2002)
4. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental

plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*; 297: 2256-2259 (2002)

5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147. (1999).