

Sistema de galvanotaxis para migración celular en medio de cultivo semisólido: Evaluación por métodos de procesamiento de imágenes (Parte 2)

E. Porrás-Martínez^{1,2}, H. Pérez-Rubio^{1,2}, E. Ortiz-Jácome^{1,2}, K. Moreno-Guerrero² e I. Chairez¹

¹Laboratorio de robótica médica y bioseñales, UPIBI/IPN, Ciudad de México, México

²Laboratorio de tecnología ambiental, UPIBI/IPN, Ciudad de México, México

erikaporrasm@gmail.com, hectorperezrubio25@gmail.com

Resumen— La galvanotaxis es un fenómeno de migración celular inducido por campos eléctricos. Este proceso se ha estudiado como una de las claves para regenerar tejidos y eventualmente formar órganos completos. Se han desarrollado diversos dispositivos que pueden inducir la galvanotaxis de forma controlada. Sin embargo, estos dispositivos no presentan una técnica cuantitativa para evaluar su eficiencia. Este estudio presenta un método de evaluación de migración celular basado en el método de procesamiento de imágenes. El algoritmo desarrollado se probó sobre diferentes cultivos de *Escherichia coli* crecida en medio semisólido. A partir de las técnicas de procesamiento utilizadas, se pudo establecer la velocidad promedio de desplazamiento celular como función de las características de las señales empleadas para estimular la migración celular.

Palabras clave— Galvanotaxis, Migración celular, *Escherichia coli*, Procesamiento de imágenes, Cultivo semisólido

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha estudiado el impacto que podría tener el aplicar la galvanotaxis como método para inducir el reordenamiento celular. La galvanotaxis se define como el movimiento de un organismo móvil o célula en respuesta directa a un campo eléctrico [1]. Las aplicaciones de este método electrobiológico pueden incluir curación y cicatrización de heridas [2] y direccionamiento sobre matrices tridimensionales [3], entre otros. Actualmente, se han desarrollado dispositivos estimuladores que inyectan, sobre el cultivo de células, señales eléctricas de corriente directa y, en menor medida, dispositivos generadores de señales alternas [4,5]. A estos dispositivos se les conoce como galvanotácticos.

Los métodos utilizados para evaluar la migración celular inducida por diferentes estímulos externos, se basan en el seguimiento microscópico de un único microorganismo [6], procesamiento de imágenes y detección de centroide del microorganismo por imágenes microscópicas [7], detección de trayectorias por procesos químicos [8], entre otros.

Esta forma de evaluar la migración puede producir resultados sesgados dado que no estudia el comportamiento de las poblaciones como un conjunto, sino que realiza análisis individualizados de elementos de la población, lo cual puede no caracterizar el comportamiento de la migración sobre todas las células. Este trabajo desarrolló un

método de análisis de migración celular, que retoma los principios del trabajo propuesto en [7], sin embargo se aplica a poblaciones completas. Además, integra elementos novedosos como el uso de un generador de funciones controlado por el usuario desde una interfaz gráfica (descrito en la primer parte de este trabajo) para la aplicación de un estímulo de tipo eléctrico, un sistema simple de tratamiento de imágenes y una evaluación de la migración en términos de distancia y velocidad.

El equipo de investigación desarrolló un sistema de galvanotaxis con las siguientes características:

- Generación de señales de corriente directa y corriente alterna
- Selección de diferentes formas de onda
- Direccionamiento de la corriente
- Variación de parámetros (frecuencia y amplitud)
- Estimulación directa

El aporte por esta parte del estudio consiste en realizar la evaluación de esta tecnología de estimulación, comprobando el efecto de migración inducido por los campos eléctricos bajo condiciones controladas, utilizando un algoritmo de procesamiento de imágenes que permita el registro e identificación de la migración. De esta manera, se busca desarrollar un proceso que valide los resultados de desplazamiento celular obtenidos bajo un fundamento sustentado que pueda ser replicado cuando otra clase de estímulos, o incluso de tecnología sea utilizado.

Es común que los fenómenos de galvanotaxis sean más estudiados en cultivos de células animales, pero sus procesos de crecimiento son más lentos, el cultivo de estas células es más costoso, etc. En este tenor, es pertinente desarrollar pruebas *in vitro* en organismos evolutivamente inferiores, como las bacterias, para caracterizar los comportamientos inducidos por el fenómeno galvanotáctico y posteriormente escalarlo a un nivel celular más complejo utilizando células animales, con el objetivo de formar estructuras diferenciadas pero ordenadas. Debido a la significativa cantidad de estudios sobre la movilidad de *Escherichia coli*, se eligió este microorganismo para realizar las pruebas de migración celular, en función de las características de las señales alimentadas al cultivo.

II. METODOLOGÍA

La evaluación del dispositivo galvanotáctico se realizó conforme a las etapas mencionadas a continuación.

1) *Selección del modelo biológico*: La elección del microorganismo *Escherichia coli* para validar el

funcionamiento del dispositivo se debió a sus características, tales como alta velocidad de crecimiento, motilidad y carga neta negativa en su membrana; además, de que su exigencia nutricional y de incubación es limitada.

2) *Cultivo microbiológico*: El cultivo del microorganismo se realizó considerando desde la selección del medio hasta la incubación del mismo, de manera que se garantizara el mantenimiento celular de la *Escherichia coli*, y que se evitara, en la medida de lo posible, la contaminación por agentes externos. El procedimiento de cultivo se resume en el diagrama presentado en la Fig. 1.

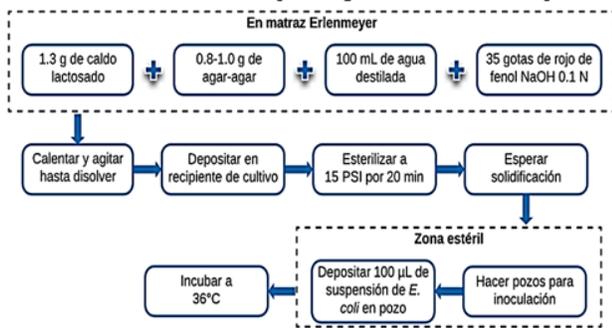


Fig. 1. Procedimiento de preparación para medio de cultivo e inoculación del mismo.

Se utilizó el caldo lactosado (*BD Bioxon*) por ser un medio específico para enterobacterias y organismos coliformes, además de poseer azúcares fermentables. A este caldo, se le adicionó rojo de fenol como indicador del crecimiento de *Escherichia coli*. Se utilizó el agar como agente gelificante para conferir la consistencia semisólida. La cantidad de agar (0.8%) se determinó a partir del nivel de solidificación del medio. Esto se realizó evaluando el crecimiento celular de *Escherichia coli* en experimentos preliminares al estudio principal de migración celular.

El inóculo se realizó depositando 100 µL de una suspensión de *Escherichia coli* dentro de un pozo, con la finalidad de fijar una posición inicial, evitar dispersión en el medio y así minimizar la posibilidad de aparición de falsos positivos de migración celular. Para generar el inóculo, se precultivó un matraz con medio líquido (caldo nutritivo) durante 24 horas para tener una densidad celular adecuada.

3) *Sistema de adquisición y procesamiento de imágenes*: Con la finalidad de registrar la migración celular, se realizó una adquisición de imágenes periódica y secuencial, con un lapso de 12 horas entre cada muestra, utilizando una cámara de alta resolución (*HD Logitech Pro C910*). Las características de esta cámara son: resolución de video 1080p a 16:9, campo visual diagonal (DFOV) 78°, distancia focal 4.3 mm, distancia de trabajo variable (8 cm usados), frecuencia de cuadro (máx.) 30 capturas por segundo. clip universal con un rango de 0-180°.

El montaje del sistema utilizado para obtener las imágenes se muestra en la Fig. 2.

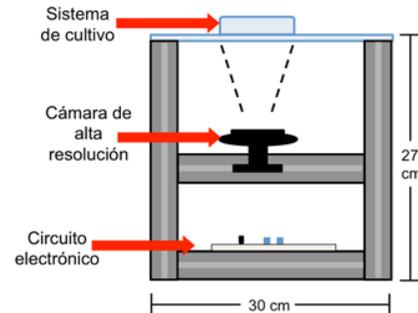


Fig. 2. Esquema del sistema de adquisición de imágenes.

Con el objetivo de diferenciar el crecimiento bacteriano del medio de cultivo, se propuso un algoritmo de procesamiento digital de imágenes, cuyo procedimiento se resume en el diagrama de la Fig. 3.

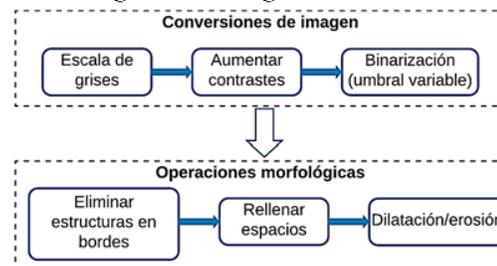


Fig. 3. Diagrama del algoritmo para procesamiento de imágenes.

El tratamiento de la imagen se realizó en primera instancia, enmascarando la imagen para conservar la zona de interés (Fig. 4, apartado a). Posteriormente, se hizo una conversión de formato RGB a escala de grises (Fig. 4, apartado b). A partir de esta imagen, se hizo un realce ajustando el contraste, de manera que se incrementara la diferencia entre las zonas de crecimiento celular y el medio de cultivo (Fig. 4, apartado c). Todos estos pasos se realizaron de manera automática con valores establecidos dentro del programa desarrollado en Matlab. El resto del procesamiento utilizó principalmente herramientas de la teoría de morfología matemática aplicada en el procesamiento de imágenes.

Para poder aplicar las operaciones morfológicas, se realizó una binarización de la imagen (Fig. 4, apartado d) a partir de un valor de umbral proporcionado por el usuario. Dicho valor podía variarse en un rango entre 0 y 255, mostrando una previsualización de la imagen en la interfaz gráfica, para permitir la selección del mejor ajuste.

Una vez obtenida la imagen en blanco (crecimiento celular) y negro (fondo/medio de cultivo), se procedió a eliminar las estructuras no deseadas asociadas a imperfecciones en la superficie del medio o pequeñas colonias de células que no hubieran migrado en el período de análisis de esa imagen en particular, aunque se mantuvo el efecto de las células que se mantuvieron en la posición de

inoculación. Se suprimieron las estructuras que tuvieran conexión con el borde y que fueran más pequeñas que la estructura principal. Posteriormente, se rellenaron los espacios entre los objetos, es decir, que los píxeles tomaran el valor de aquellos que lo rodeaban (Fig. 4, apartado e). Se aplicaron operaciones morfológicas de dilatación y erosión de imagen, para aumentar las figuras blancas o eliminarlas, dependiendo de las necesidades de procesamiento, obteniendo así la imagen final (Fig. 4, apartado f). Cabe destacar que las operaciones morfológicas también se efectuaron de forma automática, con procesos preestablecidos en el toolbox de procesamiento de imágenes de Matlab.

4) *Experimentación*: Esta sección del estudio se realizó exponiendo al modelo biológico a diferentes señales eléctricas. Se hizo una comparación en los patrones de migración al variar la forma de onda de la señal, utilizando tres tipos principalmente: senoidal, cuadrada y sierra. En última instancia, se modificó la concentración del agar, aumentando la resistencia que opone el medio de cultivo a la migración. Esto último se propuso con el objetivo de demostrar la migración inducida por el campo eléctrico, aún cuando existe una resistencia física al paso de células a través del medio de cultivo. Las condiciones de experimentación utilizadas se resumen en la Tabla 1.

5) *Validación del sistema de galvanotaxis*: El método de validación consistió en calcular el centro de masa de las regiones de crecimiento de cada una de las imágenes procesadas, sin tomar en cuenta el crecimiento del inóculo. Las coordenadas obtenidas del centroide de cada imagen, se graficaron para demostrar el recorrido de este.

TABLA 1

CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN PARA EVALUACIÓN DEL DISPOSITIVO GALVANOTÁCTICO

Características	Experimentos			
	1	2	3	4
Concentración de agar (%)	0.8	0.8	0.8	1.0
Forma de señal	Senoidal	Cuadrada	Sierra	Senoidal
Frecuencia (Hz)	10	10	10	10
Amplitud (Vpp)	10	10	10	10
Campo eléctrico (V/cm)	±0.8	±0.8	±0.8	±0.8
Tiempo de estimulación (horas)	48	48	48	48

III. RESULTADOS

A. Procesamiento digital de imágenes

Los resultados obtenidos del procesamiento de la última imagen adquirida (a las 48 horas), durante el experimento con estimulación eléctrica de tipo senoidal, se muestran en la Fig. 4, a manera de imágenes secuenciales.

Las imágenes finales, obtenidas del procesamiento, se utilizaron para evaluar la migración inducida al aplicar el estímulo eléctrico durante un tiempo establecido de 48 horas.

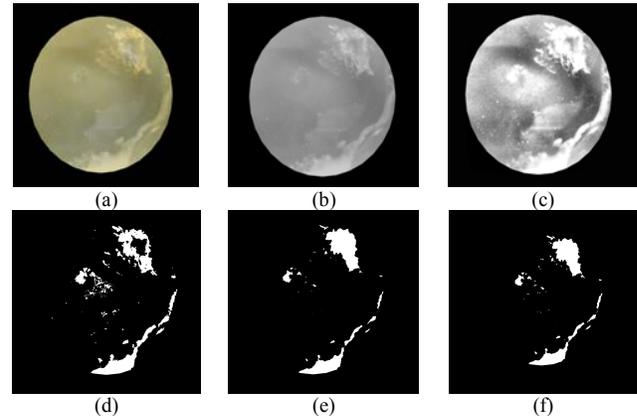


Fig. 4. Imágenes intermedias del proceso de tratamiento digital.

B. Evaluación temporal de migración por galvanotaxis

En la Fig. 5, se muestran las imágenes obtenidas del procesamiento, tomadas sobre la parte inferior del cultivo en distintos tiempos, con las condiciones del primer experimento (Tabla 1).

El inóculo se hizo en el extremo del cátodo, para observar la migración de *Escherichia coli* sobre el medio de cultivo hacia el extremo opuesto del recipiente de reacción, donde se ubica el polo positivo. Cabe mencionar que, paralelamente, se montó otro cultivo con las mismas condiciones, pero sin estímulo eléctrico, como control negativo.

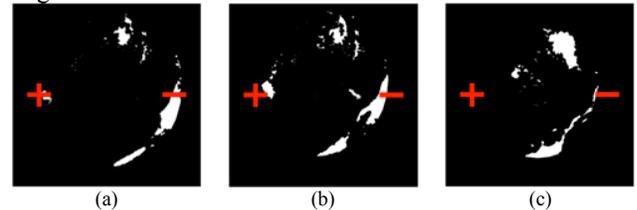


Fig. 5. Secuencia temporal de imágenes adquiridas a las 12 (a), 24 (b) y 48 horas (c) del cultivo con estímulo eléctrico de tipo senoidal.

La secuencia de imágenes de la Fig. 5 muestra un crecimiento con tendencia al ánodo conforme aumenta el tiempo de estimulación. Además, se observa que la trayectoria de migración ocurrió preferentemente sobre la periferia del medio de cultivo semisólido.

C. Comparación de migración con diferentes señales

De acuerdo con las condiciones experimentales planteadas en la Tabla 1, se utilizaron estímulos eléctricos con otras formas de onda, pero manteniendo los parámetros de amplitud, frecuencia y tiempo de estimulación.

Los resultados obtenidos a las 48 horas se presentan en la Fig. 6, donde además se comparan contra las pruebas

testigo que se montaron a la par. Se observa que existe migración en cada uno de los casos (a), (b) y (c), comparado con los cultivos a los que no se les aplicaron campos eléctricos, en los cuales el crecimiento ocurrió exclusivamente dentro del pozo de inoculación y en la periferia de este.

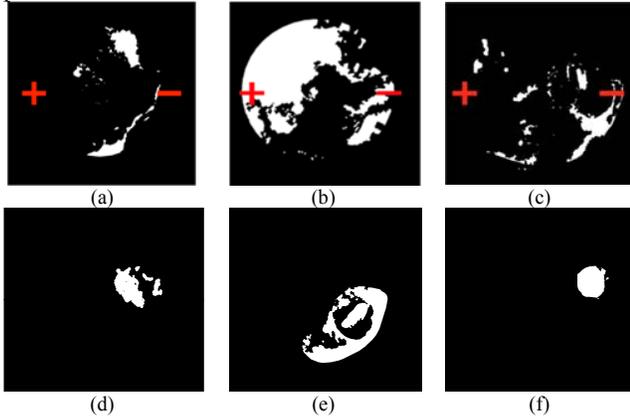


Fig. 6. Imágenes a las 48 horas, con estímulos de tipo senooidal (a), cuadrada (b) y sierra (c). Pruebas testigo sin estímulo eléctrico (d,e,f).

Además, en el caso de estimulación con señal de tipo cuadrada, se observa que existe un crecimiento más abundante y con mayor dispersión sobre el medio a comparación de las señales de tipo senooidal y sierra.

IV. DISCUSIÓN

A partir del algoritmo de tratamiento de imágenes, se demostró la existencia de migración inducida por campos eléctricos, calculando el centro de masa de las regiones de crecimiento, en cada una de las imágenes obtenidas en diferentes tiempos y graficando las coordenadas del centroide (Fig. 7).

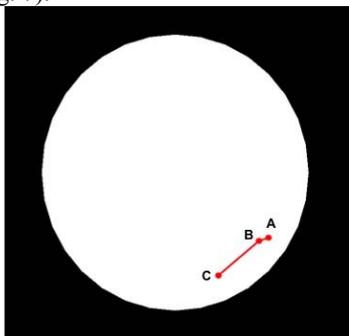


Fig. 7. Recorrido del centro de masa sobre la superficie del cultivo en experimento con estimulación senooidal.

También se calcularon las velocidades aproximadas de migración a partir de las imágenes digitales, utilizando como datos de entrada la distancia en pixeles. Del punto A de la Fig. 7 al punto B se obtuvo una velocidad de 0.137 mm/h. Del punto B al punto C, la velocidad fue de 0.372 mm/h, y tomando la trayectoria desde el punto A al punto C, 0.218

mm/h. Esta última se aproxima al promedio obtenido entre la velocidad de A-B y la velocidad de B-C. Estos valores, al dividirse por el campo eléctrico son superiores (7.5×10^{-5} mm/s/V/cm) a los reportados por Shi *et al.*, que determinó una velocidad por campo de 2.85×10^{-11} mm/s/V/cm en una población no estadísticamente significativa [9].

V. CONCLUSIÓN

La adquisición periódica y secuenciada de las imágenes del cultivo celular, así como el algoritmo de procesamiento de imágenes, permitieron la detección de la migración inducida a células de *Escherichia coli*. Se demostró que al variar la forma de onda del estímulo eléctrico al cual está sometida la bacteria, manteniendo parámetros de amplitud y frecuencia constantes, de 10 Vpp y 10 Hz (utilizando un generador galvanotáctico presentado en la primer parte de este estudio), respectivamente, se observaron diferencias en la respuesta celular de migración. Ante estímulos eléctricos con forma de onda senooidal, la bacteria presentó migración mejor dirigida, con poca dispersión en el medio. Por otro lado, la onda cuadrada, produjo que las colonias celulares migraran aparentemente más rápido, con mayor dispersión en el medio y con un aparente aumento en la proliferación celular. Este es un punto que todavía debe ser evaluado, pero la evidencia experimental obtenida parece demostrar que las variaciones del espectro frecuencial de la señal, influyen directamente en los patrones de migración y crecimiento de las células de *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ogawa, N., Oku, H., Hashimoto, K., & Ishikawa, M. (18 de Abril de 2006). A physical model for galvanotaxis of Paramecium cell. *Science Direct*.
- [2] Zimolag, E., Borowczyk-Michalowska, J., Kedracka-Krok, S., Skupien-Rabian, B., Karnas, E., Lasota, S., y otros. (2016). Electric field as a potential directional cue in homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to cutaneous wounds. *Biochimica et Biophysica*, 12.
- [3] Sun, Y.-S., Peng, S.-W., Lin, K.-H., & Cheng, J.-Y. (2012). Electrotaxis of lung cancer cells in ordered three-dimensional scaffolds. *Biomicrofluidics*.
- [4] Yuan, Y., He, M., Zou, Y.-W., & Huang, Z.-B. (2016). An Adjustable Electrical Stimulator for Cell Culture. *Journal of Circuits, Systems, and Computers*, 25 (11), 21.
- [5] Zironi, I., Boccioletti, L., Amorini, F., Castellania, G., & Gabrielli, A. (2017). A prototype electronic board to investigate galvanotaxis phenomena. *Journal of Instrumentation*, 12.
- [6] Berg, H. C. (1971). How to track bacteria. *Review of Scientific Instruments* 42 (6), 868
- [7] Ogawa, N., Oku, H., Hashimoto, K., & Ishikawa, M. (2005). Two-dimensional tracking of a motile micro-organism allowing high-resolution observation with various imaging techniques. *Review of Scientific Instruments* 76 (3).
- [8] Nogalski, M. T., Chan, G. C. T., Stevenson, E. V., Collins-McMillen, D. K., & Yurochko, A. D. (2012). A Quantitative Evaluation of Cell Migration by the Phagokinetic Track Motility Assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (70), 4165.
- [9] Shi, W., Stocker, B. A., & Adler, J. (1996). Effect of the Surface Composition of Motile *Escherichia coli* and Motile *Salmonella* Species on the Direction of Galvanotaxis. *Journal of bacteriology*.