

DETERMINACIÓN DEL ESTADO CELULAR MEDIANTE MICROMOVIMIENTO FRACTAL

Esteban Acerbo^{1,2,*}; Mariela Bellotti^{1,3}; Fabián Bonetto^{1,2}

*E-mail: esteban.acerbo@ib.edu.ar

1 Laboratorio de Cavitación y Biotecnología, Centro Atómico Bariloche, San Carlos de Bariloche, Argentina.

2 Universidad Nacional de Cuyo-Instituto Balseiro, San Carlos de Bariloche, Argentina.

3 Universidad Nacional de Rio Negro- Sede Andina Carrera de Medicina, San Carlos de Bariloche, Argentina.

Bioimpedancia - Dimensión fractal - Micromovimiento Celular

RESUMEN

- Introducción:** Aplicamos algoritmos de estimación de dimensión fractal a la señal de impedancia eléctrica temporal de cultivos celulares. Estos cultivos celulares MDCK tipo II normales fueron monitorizados mediante la técnica ECIS.
- Metodología:** Para analizar cambios en la dimensión fractal con respecto a cambios en el cultivo, analizamos la formación de un cultivo y también los sometimos a daño por corriente eléctrica y exposición a un fármaco inductor de muerte celular.
- Resultados:** Se observó que el estado del cultivo celular tiene asociado una dimensión fractal debida al micromovimiento. Este valor depende de la frecuencia de excitación y método de estimación utilizado. Por los valores estimados de dimensión fractal se logró diferenciar entre una monocapa sana y una expuesta a un fármaco, así como la distinción entre un proceso de siembra y un proceso de cicatrización inducido por corriente eléctrica.

INTRODUCCIÓN

Fractales

- Mandelbrot definió a los fractales como formas compuestas de partes que son similares al todo de alguna manera.
- La dimensión de un objeto se interpreta como la capacidad de la estructura para llenar el espacio.

Técnica de Impedancia Eléctrica Espectral (ECIS)

Se basa en el estudio no invasivo de la impedancia espectral de un cultivo celular que crece sobre una superficie biocompatible y un arreglo de microelectrodos^[1,2]. A partir de esta es posible:

- Detectar movimiento celular^[3,4].
- Caracterización del tipo y estado celular^[5].

Micromovimiento

El movimiento nanométrico realizado por las células sobre el sustrato, lo que genera cambios en la impedancia en el sistema. Presentándose como pequeñas fluctuaciones de baja amplitud y corta duración en la evolución de la señal

OBJETIVO

Obtener información del estado celular mediante las fluctuaciones de la señal de impedancia debida al micromovimiento analizandolas como una estructura fractal en el tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

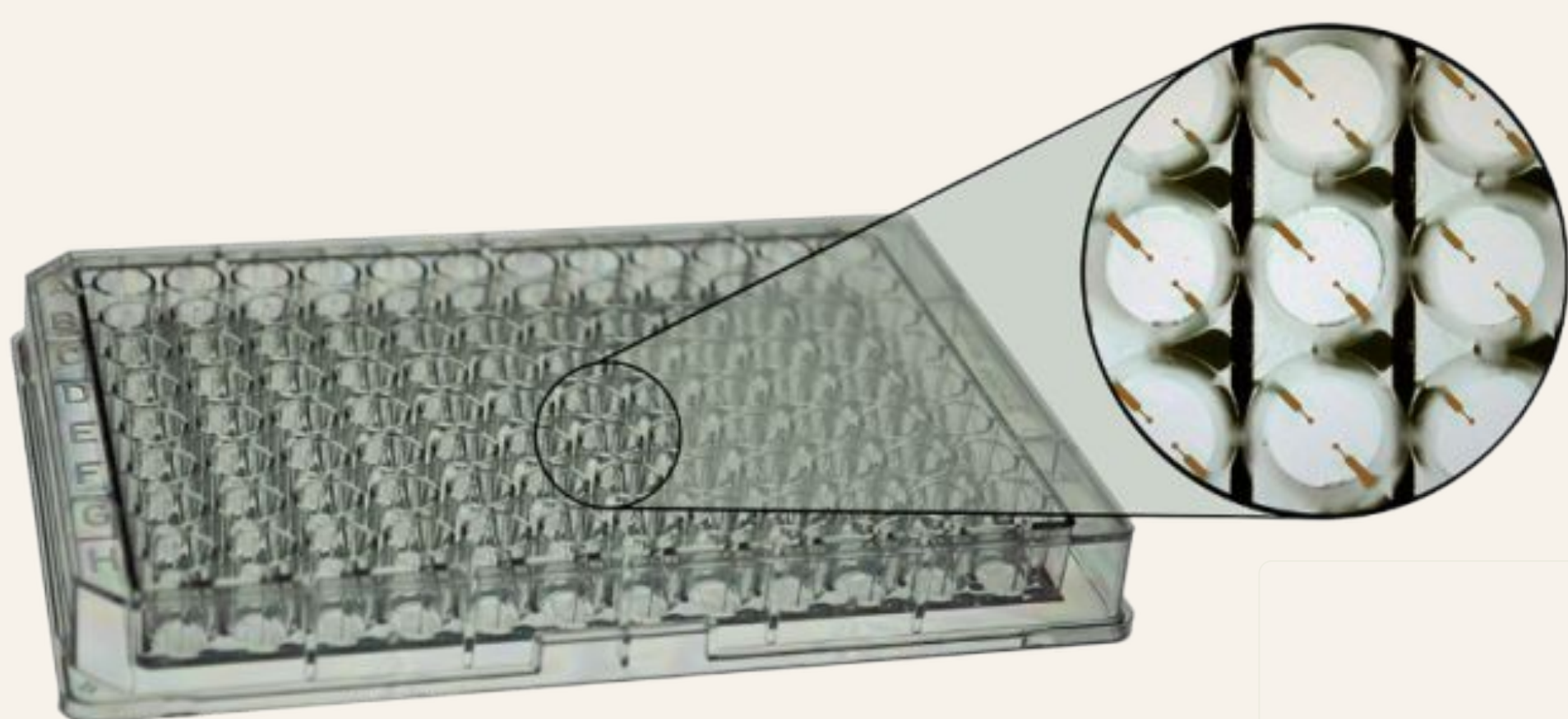


Fig 1: Electrodo comercial utilizado en el trabajo.

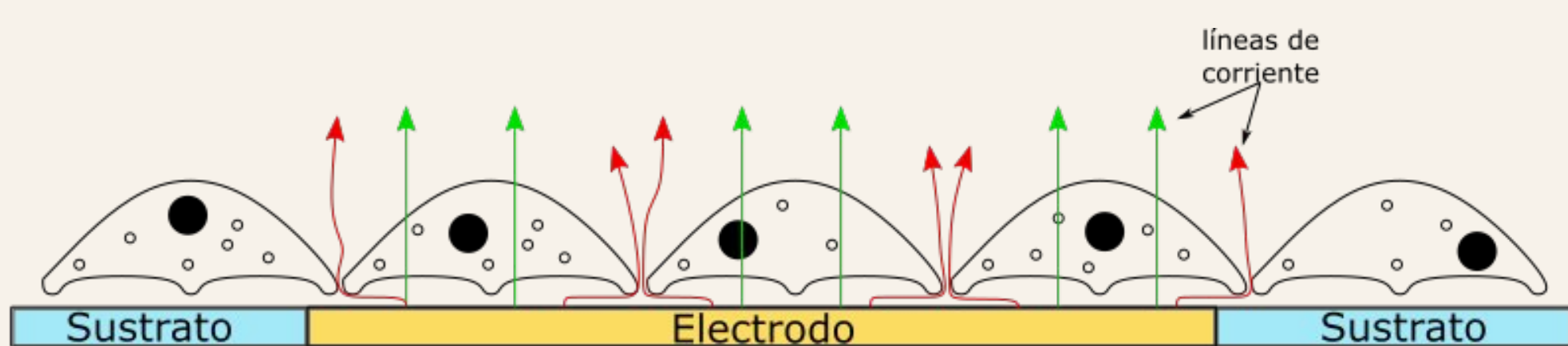


Fig 2: Esquema del paso de corriente por monocapa celular cultivada sobre electrodo.

Esquema de medición utilizado

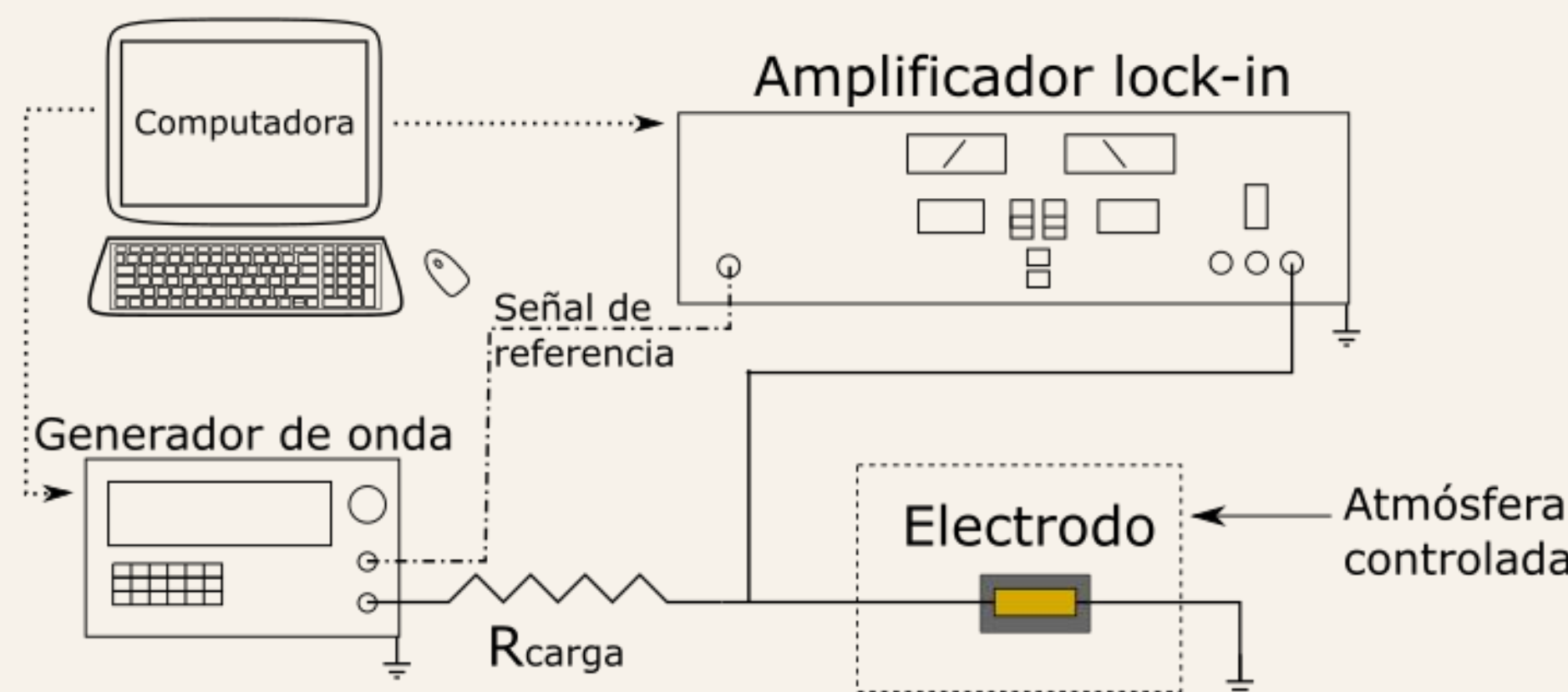


Fig 3: Esquema de medición ECIS utilizado en el trabajo.

Impedancia espectral y temporal de un cultivo celular

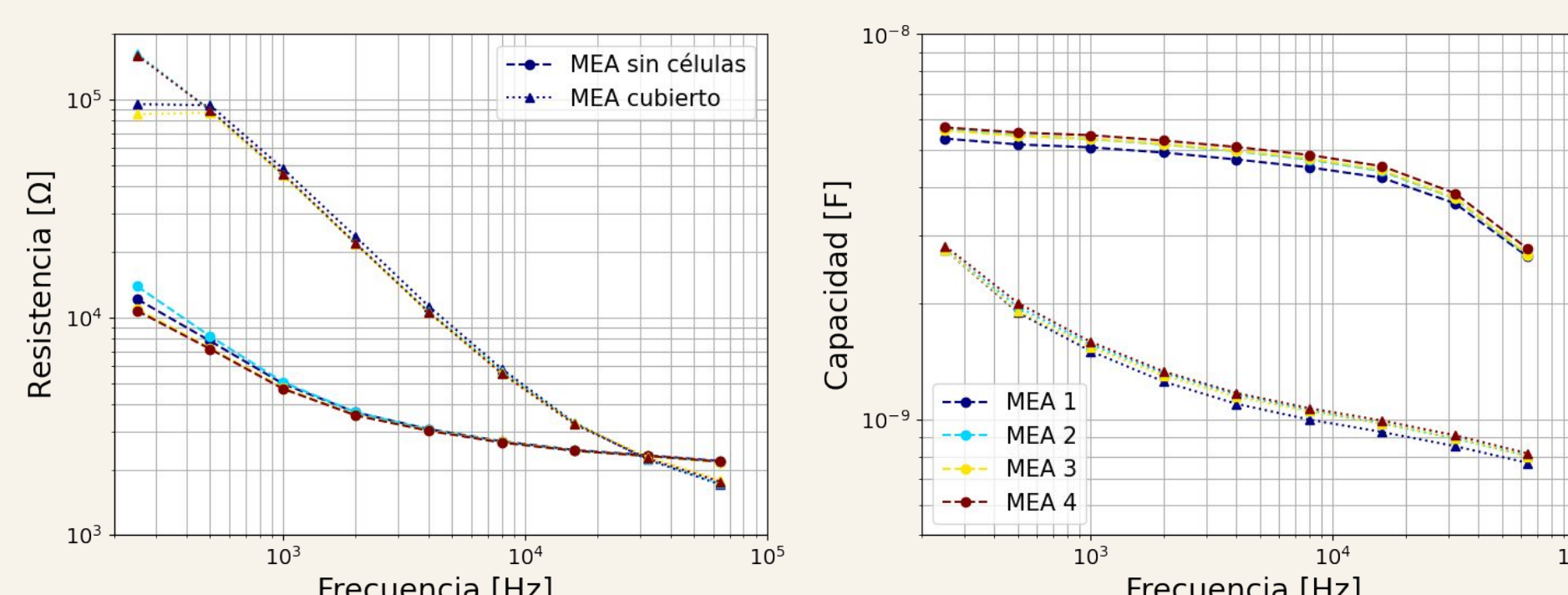


Fig 4: Impedancia espectral de cultivos celulares MDCK II.

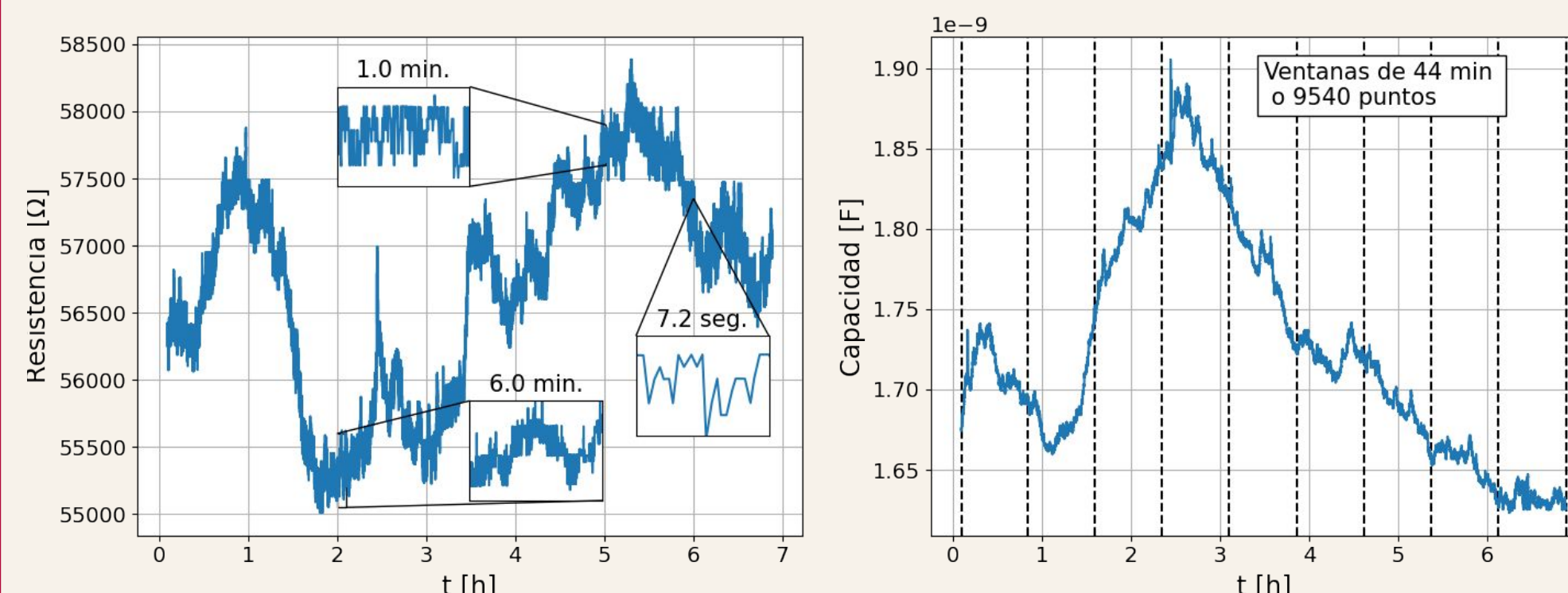


Fig 5: Evolución de la impedancia eléctrica excitando a 1000 kHz.

Algoritmos utilizados

- Higuchi
- Reescaled Range
- Multiresolution Box-counting
- Multiresolution Length-based

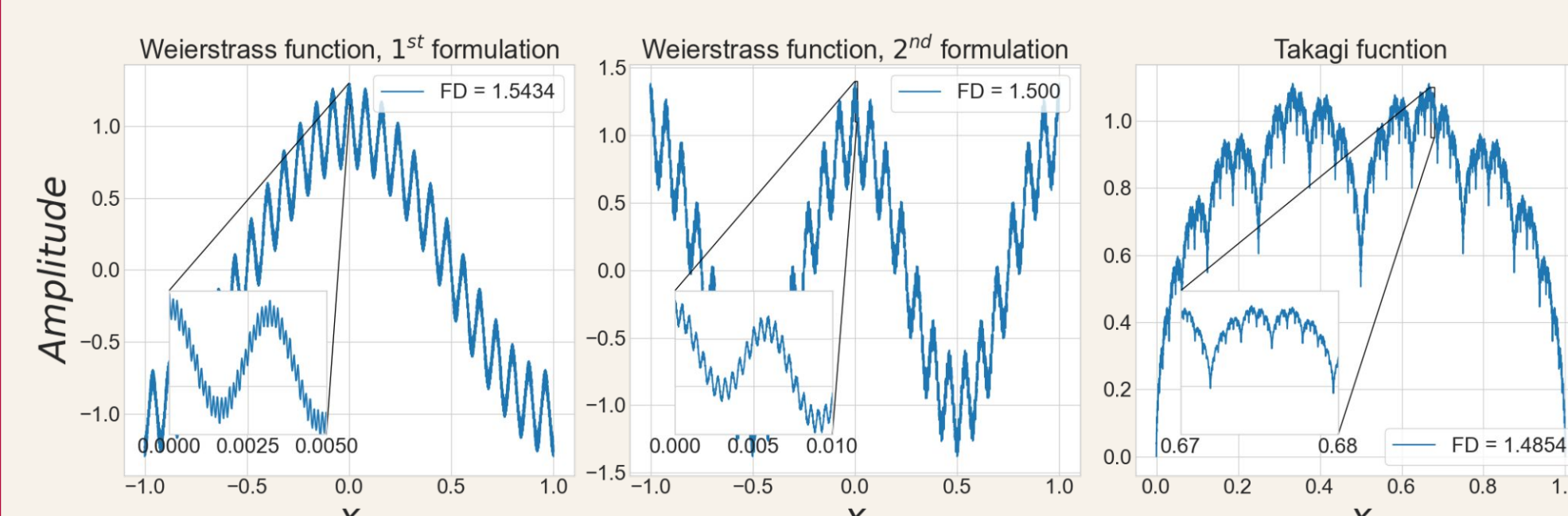


Fig 6: Funciones topológicas de dimensión fractal manipulable utilizadas para el estudio y validación de algoritmos de estimación de dimensión fractal sobre señales discretas.

Condiciones necesarias para la correcta estimación:

- Ventanas mayores a 5000 puntos medidos.
- Normalizar la señal con respecto a su frecuencia de muestreo.

RESULTADOS

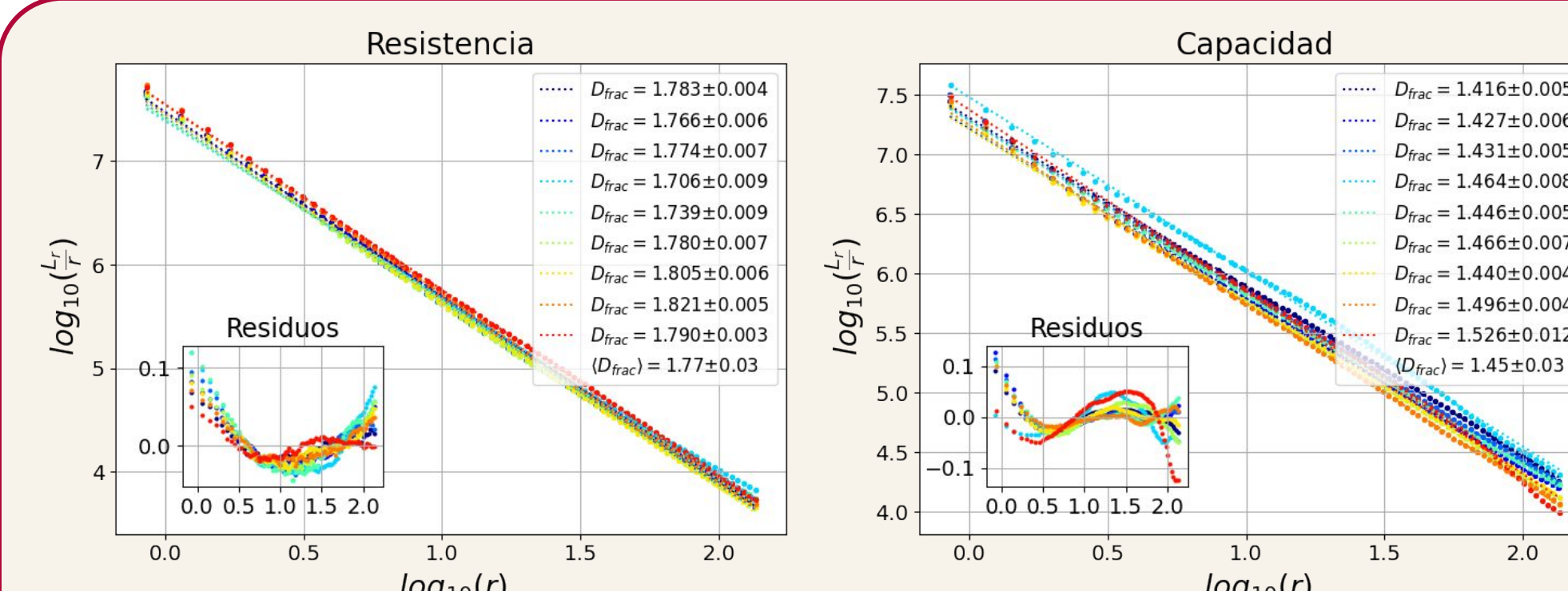


Fig 7: Ley de potencia obtenida al aplicar el algoritmo Multiresolution Length-based sobre cada segmento

Estado celular	Freq.	HL	MR. BC.	MR. LB.	RS.
MEA sin células A	BF	1.997 ± 0.001	2.012 ± 0.002	2.012 ± 0.002	1.72 ± 0.03
MEA sin células A	AF	2.000 ± 0.001	2.009 ± 0.001	2.001 ± 0.001	1.84 ± 0.02
MEA sin células B	BF	1.999 ± 0.001	2.012 ± 0.001	2.012 ± 0.001	1.75 ± 0.03
Proceso de siembra	BF	1.57 ± 0.13	1.67 ± 0.11	1.67 ± 0.11	1.72 ± 0.02
Confluente	BF	1.76 ± 0.05	1.77 ± 0.04	1.77 ± 0.04	1.65 ± 0.03
Confluente	AF	1.95 ± 0.03	1.97 ± 0.02	1.97 ± 0.02	1.61 ± 0.02
Herida eléctrica	BF	1.29 ± 0.12	1.43 ± 0.13	1.43 ± 0.13	1.70 ± 0.04
Cicatrizado (Reciente)	BF	1.68 ± 0.04	1.72 ± 0.03	1.72 ± 0.03	1.68 ± 0.03
Cicatrizado (≥ 24hs)	BF	1.48 ± 0.06	1.53 ± 0.06	1.53 ± 0.06	1.56 ± 0.04
Ensayo farmacológico	BF	1.56 ± 0.05	1.59 ± 0.05	1.59 ± 0.05	1.58 ± 0.04
Ensayo farmacológico	AF	1.71 ± 0.12	1.81 ± 0.09	1.81 ± 0.09	1.64 ± 0.04

Tabla 1: Tabla de estimaciones de dimensión fractal de la señal de resistencia en el tiempo para diferentes estados de cultivo celular.

Estado celular	Freq.	HL	MR. BC.	MR. LB.	RS.
MEA sin células A	BF	1.987 ± 0.001	2.007 ± 0.001	2.007 ± 0.001	1.79 ± 0.04
MEA sin células A	AF	1.998 ± 0.001	2.008 ± 0.001	2.008 ± 0.001	1.76 ± 0.02
MEA sin células B	BF	1.994 ± 0.001	2.009 ± 0.001	2.009 ± 0.001	1.75 ± 0.02
Proceso de siembra	BF	1.51 ± 0.06	1.64 ± 0.04	1.64 ± 0.04	1.74 ± 0.02
Confluente	BF	1.46 ± 0.04	1.44 ± 0.03	1.44 ± 0.03	1.41 ± 0.04
Confluente	AF	1.92 ± 0.06	1.95 ± 0.05	1.95 ± 0.05	1.65 ± 0.02
Herida eléctrica	BF	1.31 ± 0.12	1.42 ± 0.13	1.42 ± 0.13	1.63 ± 0.08
Cicatrizado (Reciente)	BF	1.44 ± 0.05	1.40 ± 0.04	1.40 ± 0.04	1.39 ± 0.02
Cicatrizado (≥ 24hs)	BF	1.38 ± 0.04	1.37 ± 0.04	1.37 ± 0.04	1.39 ± 0.02
Ensayo farmacológico	BF	1.48 ± 0.04	1.46 ± 0.03	1.46 ± 0.03	1.45 ± 0.02
Ensayo farmacológico	AF	1.68 ± 0.05	1.80 ± 0.04	1.80 ± 0.04	1.66 ± 0.05

Tabla 2: Tabla de estimaciones de dimensión fractal de la señal de capacidad en el tiempo para diferentes estados de cultivo celular.

CONCLUSIONES

- Se concluye que la dimensión fractal es una medida válida para determinar ciertos procesos del cultivo celular, complementando la información dada por los espectros de impedancia.
- Los valores del estado confluyente son característicos del mismo, lo que se comprobó al volver a obtenerlos tras la cicatrización eléctrica de la herida.
- Se vio que no todos los algoritmos son sensibles a los mismos procesos, y que la estimación de los algoritmos depende de la frecuencia de excitación utilizada.
- Cada algoritmo es comparativo con las estimaciones realizadas por sí mismo.

Referencias

- [1] Giaever, I., Keese, C. R. Micromotion of mammalian cells measured electrically. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88 (17), 7896-7900, 1991.
- [2] Takamasa Iwakura, Julian A. Marschner, Zhi Bo Zhao, Monika Katarzyna Świdorska, Hans-Joachim Anders, Electric cell-substrate impedance sensing in kidney research, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 36, Issue 2, February 2021, Pages 216-223.
- [3] Lo, C.-M., Keese, C. R., Giaever, I. Monitoring motion of confluent cells in tissue culture. *Experimental cell research*, 204 (1), 102-109, 1993.
- [4] Tarrantola, M., Marel, A. K., Sunnick, E., Adam, H., Wegener, J., & Janshoff, A. (2010). Dynamics of human cancer cell lines monitored by electrical and acoustic fluctuation analysis. *Integrative Biology*, 2(2-3), 139-150.
- [5] Giana, F. E. Desarrollo de una técnica basada en mediciones de impedancia eléctrica para la discriminación in vitro entre células cancerosas y no cancerosas. Tesis Doctoral, 2018.