

Dra. Rosa Noguera
Laboratorio de Patología Molecular, Dpto. Patología,
Facultad de Medicina y Odontología,
Universidad de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez, 15 46010, Valencia
Tel: 963983948 Fax: 963983226
Email: rnoguera@uv.es

BIOIMAGEN MICROSCÓPICA, BÚSQUEDA DE DIANAS TERAPÉUTICAS EN NEUROBLASTOMA

**Grupo de investigación del Laboratorio de Patología Molecular, Dpto. Patología, UV-
INCLIVA**

Objetivo. Solicitud de financiación asociada a los proyectos de bioimagen microscópica del Neuroblastoma para la optimización de los sistemas de análisis de imagen y recursos humanos.

Además de la labor diagnóstica genética utilizando los estudios de hibridación in situ fluorescente y pangenómicos en tumores pediátricos, el laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, dirigido por la Dra. Rosa Noguera Salvá, está desarrollando actualmente diversos proyectos de investigación centrados en el microambiente tumoral del Neuroblastoma, dirigidos a mejorar la estratificación de riesgo de los pacientes de Neuroblastoma y/o a encontrar nuevas dianas terapéuticas que necesitan una financiación complementaria.

1) Contextualización de la investigación actual y problemas a solventar

En los últimos años hemos trabajado con aproximadamente 1000 imágenes de unos 60Mb en tif o 10Mb en jpg por cada uno de los distintos elementos de la matriz extracelular tumoral estudiados (fibras: Gomori, Tricrómico de Masson; sustancia fundamental: azul alcian; vasos sanguíneos: CD31; vasos linfáticos: D2-40; células madre: OCT4, SOX2, CD133, CD105, S100A6; células del sistema inmune: CD4, CD8, CD20, CD45, CD11b, CD11c, CD7, CD68, CD163, granzima). Se trata de imágenes correspondientes a cilindros de 1mm de diámetro contenidos en 19 micromatrices de tejido que aúnan una veintena de cilindros extraídos de varias muestras tumorales en un mismo corte (figura 1). En total, hemos analizado más de 1000x20 marcadores = 20000 imágenes y generado el mismo número de máscaras, siendo las máscaras imágenes binarias en las que destacan en blanco los elementos que se han cuantificado, sobre un fondo negro (figura 3).

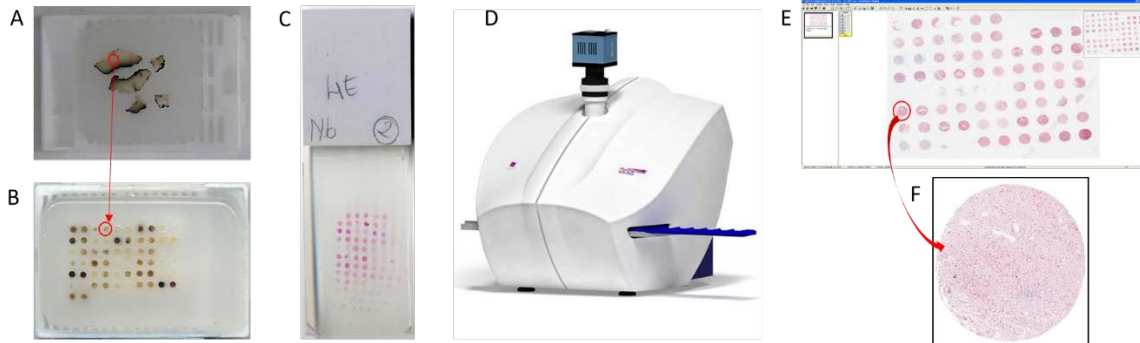


Figura 1: Proceso de obtención de imágenes para el análisis. A) Seleccionamos áreas representativas del tumor en bloque de parafina que incluimos en B) micromatrices de tejido como cilindros de tejido. C) Tras cortar y teñir el bloque de parafina con la tinción pertinente, D) digitalizamos las preparaciones con un escáner de preparaciones y extraemos imágenes individuales de los círculos correspondientes a las distintas muestras con un tamaño de aprox. 60Mb en tif o 10Mb en jpg.

Nuestros equipos, si bien con gran lentitud y con alguna limitación, nos han permitido analizar estas imágenes. No obstante, queremos dar el salto al análisis de más muestras empleando tanto micromatrices de tejido como cortes completos de las muestras, de 1 o 2 cm, es decir, con archivos de imagen mucho más grandes (figura 2).

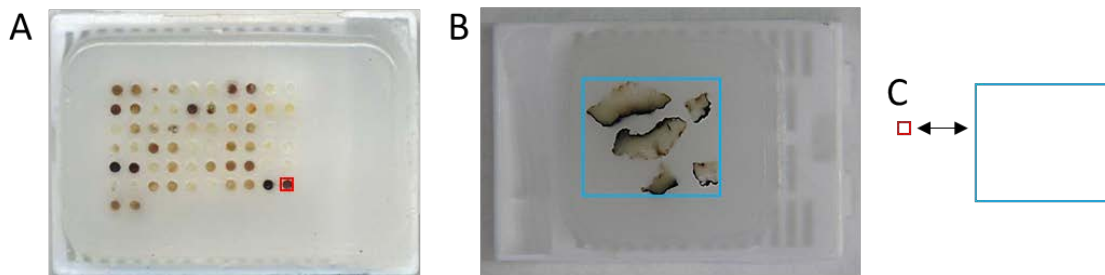


Figura 2: Diferencia en el tamaño de las imágenes a analizar. A) Imágenes provenientes de cilindros de micromatrices de tejido. B) Imágenes provenientes de cortes completos. C) Comparativa de tamaños: aprox. 58Mb/10Mb para los cilindros de una micromatriz de tejido y 20Gb/255Mb para tif/jpg.

Para analizar las muestras se requiere el uso de varios programas de análisis de imagen que necesitan mucha potencia para ejecutarse. Los programas que empleamos y algunas de sus características son los siguientes:

- Image Pro Plus: Programa de análisis de imagen comercial en el que podemos crear nuestros propios protocolos de análisis de imagen, llamados algoritmos. Utilizamos este programa para caracterizar y cuantificar fibras de la matriz extracelular ya que nos permite extraer información de densidad, tamaño y forma de los elementos de interés. Permite abrir imágenes en formato jpg y tif.
- Angiopath: Herramienta que diseñamos junto al grupo VISILAB de la Escuela de Ingenieros de la Universidad de Castilla La Mancha, para poder cuantificar y caracterizar correctamente los vasos sanguíneos de las muestras tumorales. Está programado para funcionar sólo con imágenes tif porque se requiere una muy buena calidad de imagen.
- Panoramic Viewer/Aperio ImageScope: Programas empleados para visualizar y cuantificar imágenes digitalizadas con un escáner de preparaciones (modelo Panoramic

Midi de la marca 3D Histech/Modelo ScanScope XT de la marca Aperio). Nos permite cuantificar únicamente imágenes obtenidas por estos medios. Concretamente, los empleamos para estudiar células del sistema inmune y células madre/glicosaminglicanos. Tienen el inconveniente de no permitir exportar las máscaras que, en este caso, son imágenes superpuestas a las originales, destacando aquellos elementos que se han considerado positivos y negativos. Necesitamos estas máscaras para poder superponerlas con las obtenidas del análisis de otros marcadores y así colocalizar los distintos elementos de la matriz extracelular entre sí (figura 3). Tras asesorarnos con expertos en imagen, hemos llegado a la conclusión de que la única opción para obtener estas máscaras sería disponer de un monitor de muy alta resolución o 4k para hacer pantallazos con el tamaño y la resolución suficientes como para poder superponer estas máscaras con las provenientes de los demás sistemas.

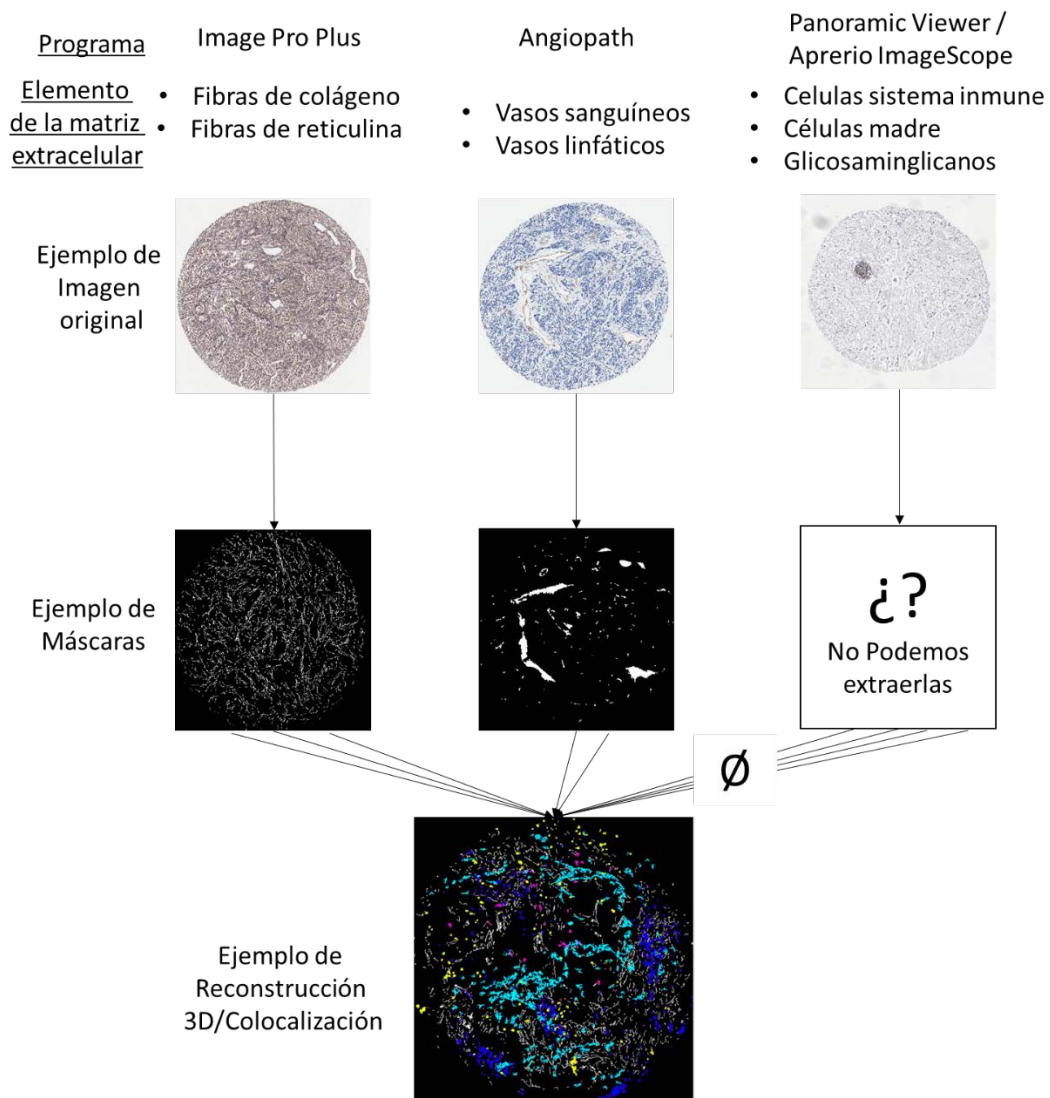


Figura 3: Obtención de máscaras correspondientes a cada marcador, en función del programa de análisis de imagen que utilizemos. No podemos extraer las imágenes del programa Panoramic Viewer si no es con un pantallazo, y por eso necesitamos un monitor de alta resolución, o 4K.



- Photoshop: Programa usado cotidianamente que aquí empleamos para distintas funciones como rotar imágenes para orientarlas correctamente, seleccionar colores para destacarlos, eliminar fondos, superponer imágenes, etc...
- Visor de imágenes de Windows/ACDsee: Empleamos estos programas para visualizar imágenes y renombrar imágenes dentro de una carpeta.

Actualmente, estamos trabajando en diversos proyectos subvencionados por entidades públicas y privadas. Estas ayudas cubren únicamente parte de la financiación solicitada y necesaria para completar los objetivos propuestos. Excepcionalmente y de manera muy restrictiva cubren gastos de contratación de personal. Todos estos proyectos implican el almacenamiento, la visualización y el análisis de un gran volumen de imágenes de patología digital de alta resolución.

Respecto a la visualización y el análisis de las imágenes microscópicas, actualmente contamos con ordenadores muy limitados que apenas permiten abrir simultáneamente una o dos imágenes en formato tif. De hecho, salvo en determinadas ocasiones, procuramos almacenar nuestras imágenes en formato jpg, a pesar de la evidente pérdida de calidad e información en las imágenes, dado que no tenemos medios suficientes para almacenarlas, visualizarlas ni analizarlas de otra manera. Por ejemplo, estos datos dan una idea de las limitaciones de nuestro equipo más potente¹:

- Apertura de una imagen tif/jpg de una muestra que utilizaremos para un estudio piloto de superposición de marcadores en 3D, de aprox. 400Mb/20Mb (aprox. 1/3 de una imagen de un corte completo):
 - o con Photoshop: 1 minuto/unos segundos.
 - o con Visor de Imágenes de Windows: casi 2 minutos/unos segundos.
 - o Con nuestro principal programa de análisis de imagen, Image Pro Plus: El ordenador no tiene capacidad para abrirla. Debemos trabajar con jpg. → archivo jpg de aprox. 20Mb: unos segundos, pero hemos perdido calidad de la imagen. Aun así, el procesado de esta segunda imagen dura de 2 a 3 minutos en función del tamaño de la imagen. Configurar los algoritmos se convierte así en una labor muy tediosa ya que hemos de comparar distintas configuraciones del algoritmo en varias muestras (figura 4).

¹ Intel Core i5 CPU 650 3.20GHz, 3.19GHz. RAM 4GB. Sistema operativo de 64 bits. Con Windows 7 Enterprise. Se trata de un ordenador bastante potente para funciones ofimáticas, pero es extremadamente limitado para trabajar con imágenes y más con las del tamaño que necesitamos.

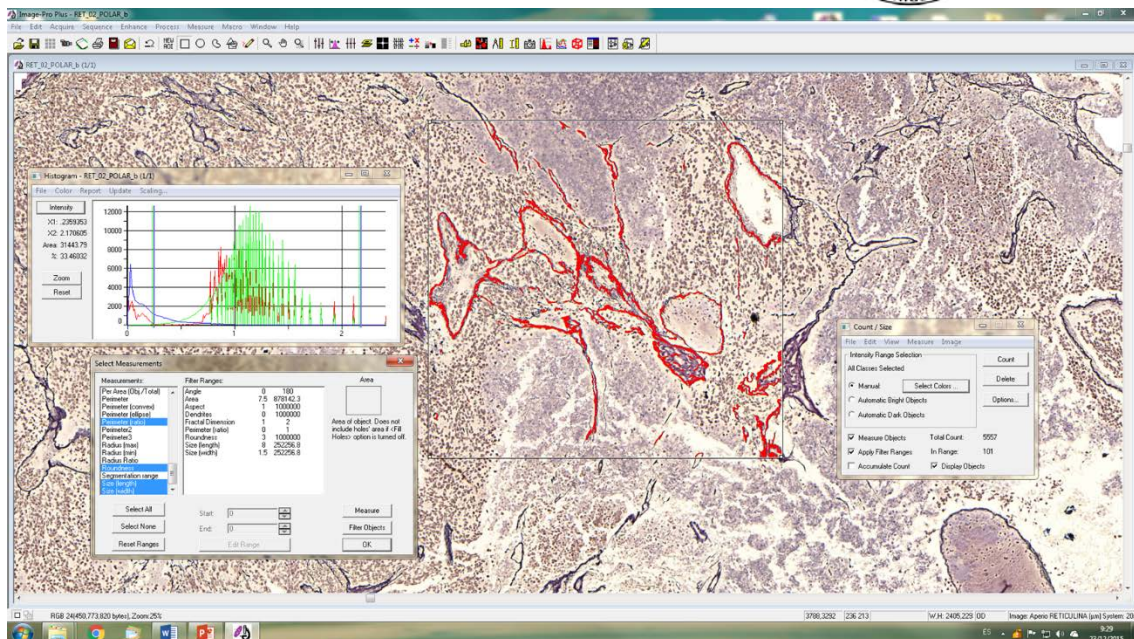


Figura 4: Procesado de una imagen teñida con Gomori para visualizar fibras de reticulina. Para este ejemplo se ha analizado el área del cuadrado central. Configurar el algoritmo implica medir varias imágenes para asegurarse de que funciona bien con distintas densidades celulares y condiciones de iluminación, entre otros aspectos. Eso implica esperar 2 a 3 minutos para ver los resultados y comprobar si la selección ha sido la adecuada, en unas 5 muestras, varias veces, para ver los efectos de los reajustes del algoritmo. Muchas veces se bloquea el programa y hay que reiniciarlo. Una vez configurado, el trabajo es menos tedioso pero aun así hay que esperar 2 a 3 minutos para poder exportar los resultados a un archivo Excel.

- Con AngioPath: Sólo podríamos abrirla en tif pero no tenemos potencia suficiente. Hasta el momento hemos trabajado con archivos más pequeños correspondientes a cilindros de micromatrices de tejido que sí podíamos analizar pero nuestros equipos no nos permiten analizar la vascularización en la muestra elegida para el estudio piloto de co-localización de marcadores.
- Apertura de una imagen tif/jpg de un corte completo (no excesivamente grande) de aprox. 20Gb/255Mb
 - Con Photoshop: 5 minutos/1 minuto.
 - con Visor de Imágenes de Windows: no podemos abrirla / casi 2 minutos.
 - Con Image Pro Plus: no podemos abrirla ni siquiera en jpg.
 - Con Angiopath: ídem que para imágenes de la muestra piloto.
- Apertura de dos o más imágenes tif de aprox. 400Mb con el visor de imágenes: muy probable bloqueo del equipo, sobre todo si tenemos abierto algún archivo Excel o Word donde recoger los resultados, con la consiguiente imposibilidad de comparar varios marcadores en una misma muestra, o varias muestras para un mismo marcador.
- Apertura de dos o más imágenes jpg de aprox. 400Mb: podemos abrirlas (a no ser que tengamos algún otro programa en uso) pero la exploración de las muestras es realmente lenta.

Para completar los proyectos de investigación es básico acondicionar el material informático y contar con personal contratado a jornada completa con retribuciones acordes con su nivel formativo.



2) Descripción de los proyectos en marcha basados en bioimagen microscópica del grupo de investigación

A continuación se muestra la información relacionada con las acciones a desarrollar en bioimagen microscópica de los proyectos de investigación que estamos llevando a cabo y los requerimientos informáticos que se derivan (se adjuntan en anexo I los resúmenes generales de los proyectos para más información):

Proyecto FIS (PI14/01008): “Estudio de la biotensegridad en los tumores neuroblásticos” (Instituto de Investigación Sanitaria Carlos III, ISCIII).

- a) Cuantificación en micromatrices de tejido: Cuantificación de fibras, sustancia fundamental, vasos sanguíneos y linfáticos y células del sistema inmune de los casos contenidos en 6 micromatrices de tejido no incluidas en los estudios anteriores. Las células madre también se analizarán en las 19 micromatrices iniciales. → Necesitamos monitores 4k y adecuar incremento salarial de personal para extraer las máscaras.
- b) Análisis de cortes completos: Cuantificación de todos los marcadores de matriz extracelular estudiados en cortes completos de 12 muestras tumorales. → Necesitamos ordenadores más potentes y adecuar incremento salarial de personal para analizar cortes completos.
- c) Combinación de imágenes para co-localización de marcadores → Necesitamos a adecuar incremento salarial de personal para co-localización de marcadores.

NOTA: Este proyecto se inició en enero de 2015 y finaliza en diciembre de 2017 con una financiación de 122815€. No contempla financiación de personal investigador ni de material informático. Entre los gastos de ejecución se incluyen análisis genómicos.

Ayuda a proyecto de investigación en cáncer infantil 2015: “Búsqueda de dianas terapéuticas en los puntos de contacto de la célula tumoral en el neuroblastoma infantil con su matriz extracelular” (Fundación Asociación Española Contra el Cáncer, FAECC).

- a) Cuantificación del estado (distribución, arquitectura y abundancia) de la vitronectina con una doble inmunotinción utilizando los anticuerpos anti-vitronectina y anti extradominio A (EDA) de la vitronectina en las muestras tumorales obtenidas tras experimentación animal. Se utilizará el programa Panoramic Viewer si conseguimos extraer las máscaras o el programa Image pro plus. → Necesitamos monitor 4k y adecuar incremento salarial de personal.
- b) Cuantificación objetiva del estado (distribución, arquitectura y abundancia) de las fibras de reticulina, colágeno I y glucosaminoglucanos con histoquímica (tinción de Gomori, tricrómico de Masson y azul alcian, respectivamente) en las muestras tumorales obtenidas tras experimentación animal. Se caracterizarán con el programa Image Pro-plus. → Necesitamos ordenadores más potentes y adecuar incremento salarial de personal para analizar cortes completos.
- c) Determinación de la topología y organización de vitronectina, reticulina, colágeno I y glucosaminoglucanos usando el análisis matemático de la Teoría de grafos. Necesitamos extraer las máscaras resultantes del análisis de cada marcador en las distintas muestras para capturar información sobre la organización relativa de diferentes marcadores de las



biopsias. El método utilizado para la obtención de estas imágenes (cortes finos consecutivos) permite el solapamiento de diferentes marcadores en una misma imagen compuesta. Así, es posible extraer información de disposición relativa de los marcadores y coincidencia en el espacio. → Necesitamos adecuar incremento salarial de personal para co-localización de marcadores.

NOTA: Este proyecto, se inició en septiembre de 2015 y finaliza en agosto del 2018. Financia un total de 150000€ básicamente para cubrir gastos de experimentación con animales y tres contratos de jóvenes investigadores a tiempo parcial con (12000€ por persona).

Proyecto Precipita: “Mejora del diagnóstico de tumores infantiles por bioimagen” (Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, FECYT)

- a) Análisis de marcadores de la matriz extracelular en cortes completos → Necesitamos ordenadores más potentes y adecuar incremento salarial de personal para analizar cortes completos.
- b) Reconstrucción 3D de un caso piloto o de más casos, en función del dinero recaudado. → Necesitamos y adecuar incremento salarial de personal para co-localización de marcadores.

NOTA: Desde el 24/10/2015 hasta el 23/12/2015 se han recaudado 7971€ que se ingresarán, junto con la recaudación obtenida hasta finales de enero de 2016, previsiblemente en febrero del mismo año. Este dinero se destinará en parte a adecuar el incremento salarial de personal para el diseño del modelo en 3D del Neuroblastoma.

Para la búsqueda de dianas terapéuticas en Neuroblastoma, estas tareas se asocian a las tareas de **proyectos de investigación genómicos** que se enumeran a continuación:

- Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, RTICC (RD12/0036/0020): Programa “otros tumores sólidos y pediátricos”, grupo coordinado por el Dr. Samuel Navarro Fos, Facultad de Medicina Universidad de Valencia, Valencia (ISCIII). Empezó en enero de 2013 y finaliza en diciembre del 2016 y financia, con aproximadamente 60000€ anuales, la contratación de tres investigadores a media jornada. Permite, con otros 5000€ anuales, apoyar los gastos de material fungible para análisis genómicos.
- Asociación NEN: “Análisis genético del neuroblastoma para una terapia más personalizada y eficiente”. Durante el año 2015 ha aportado 6000€ destinado a material fungible para análisis genómicos.
- Convenio de colaboración entre la UV y el INCLIVA para la regulación de la actividad del laboratorio de Patología Molecular. Los fondos obtenidos del análisis biológico de las muestras de Neuroblastoma, remitidas al Centro de Referencia Nacional de Estudios Biológicos de Neuroblastoma desde los distintos hospitales de la Red Pública de la Seguridad Social, aproximadamente 15.000€ al año, se destinan a cubrir parcialmente los gastos de material fungible para los análisis genómicos.

3) Presupuesto solicitado

Utilizamos un tiempo muy valioso a causa de la poca potencia de nuestros ordenadores, por la lentitud en los análisis y por los múltiples bloqueos de los equipos. Además, actualmente para el estudio piloto de reconstrucción en 3D, necesitamos analizar los cortes completos y no limitar la información con imágenes en jpg. Existe, por lo tanto, una necesidad y una urgencia del grupo de investigación para mejorar los equipos informáticos de que disponemos.

Así mismo, en nuestro grupo de investigación, como ocurre en gran parte de los laboratorios y centros públicos españoles de investigación, la contratación de jóvenes investigadores depende de la nobleza de las propias familias y amigos de los enfermos de crear fundaciones de patrocinio sustentadas por colaboraciones altruistas. Nuestro grupo de investigación está compuesto por 6 jóvenes investigadores, donde los contratos a tiempo parcial, indicados previamente, se sustentan en gran parte gracias a este tipo de financiación, a excepción de la Dra. Rosa Noguera y el Dr. Samuel Navarro, que son miembros de plantilla a tiempo completo.

Por todo esto y con el fin de progresar con la mayor precisión y eficacia posible en el desarrollo de los proyectos basados en imagen microscópica, solicitamos la financiación para:

- La adquisición de equipos informáticos más adecuados (se adjunta presupuestos)
 - Un monitor 4k. Se adjunta presupuesto por valor de 480€.
 - Un ordenador de sobremesa con las características y el presupuesto que se adjuntan, o similar, recomendado por miembros colaboradores dedicados al análisis de imágenes médicas. Su precio aproximado será de 3200€.
- La mejora en las condiciones de contratación: 6000€

Agradeciéndoles de antemano su atención, les saluda,



Rosa Noguera Salvá
Profesora catedrática de Histología
Coordinadora del Laboratorio de Patología Molecular
Representante de estudios biológicos del Neuroblastoma a nivel nacional y europeo.