

Sistema automatizado para el análisis de ovocitos por medio de imágenes digitales

Carolina Salas-Singh^{*}, Vicente Hernández-Covarrubias^{**}, Enrique Morales-Bojórquez^{***},
Hugo Aguirre-Villaseñor^{*,**✉}

El análisis de ovocitos puede ser muy laborioso, tardado e inexacto, si bien los contadores automáticos de partículas son eficientes; son aparatos costosos que no siempre están disponibles. Este trabajo muestra de manera breve el uso y la aplicación del programa ImageJ versión 1.51, que es un procedimiento automático para el análisis de ovocitos que utiliza un laboratorio de captura y análisis de imágenes digitales. El seguimiento de los pasos hace que el conteo sea repetible, la omisión o el cambio del orden puede variar los resultados; para evitar este problema, se desarrolló una rutina programada denominada AID, que se le puede solicitar a los autores. Su utilización permitirá obtener resultados confiables con ahorro en tiempo y en los costos asociados al análisis.

Palabras clave: reproducción, madurez, ovocitos, programa ImageJ, resultados reproducibles.

Automized system to analyze oocytes through digital images

Oocyte analysis can be laborious, time consuming and even inaccurate; automatic particle counters are efficient but are expensive and not a very common devices. This work briefly shows the use and application of ImageJ version 1.51, which is a software for oocyte analysis. The procedure requires digital images and images analysis laboratory. Following the routine steps makes the process repeatable, any omission or change in its order can alter the results; to prevent this problem, a macro routine named AID was created and it is available from the authors. The use of this macro will allow the user to obtain reliable results with time efficiency and at a low cost.

Key words: reproduction, maturity, oocytes, ImageJ software, repeatable counts.

Introducción

La reproducción es un aspecto de amplio interés en el conocimiento de la biología y la demografía de las diferentes especies. Para organismos marinos con altas fecundidades, el entendimiento de la gametogénesis asociado a su estrategia reproductiva es importante, sobre todo si las especies estudiadas constituyen un recurso en régimen de explotación comercial. Así, a lo largo del tiempo se han realizado diversos esfuerzos para el análisis

de la gametogénesis, donde la caracterización de los rasgos de los ovocitos es de particular relevancia, por ejemplo: número, tamaño, densidad, etc.; de tal forma que la reducción del sesgo en las estimaciones disminuya la incertidumbre sobre la caracterización de su biología reproductiva.

El conteo y la medición de ovocitos es relevante, ya que de esta estimación dependen análisis estadísticos más complejos. Si bien, tradicionalmente, los conteos se llevan a cabo de forma manual, tarea difícil y que requiere un tiempo considerable de observación en el microscopio, existen alternativas para realizar este procedimiento, como lo son los contadores automáticos de partículas, equipos caros y no muy comunes. Se han instrumentado métodos automáticos más sencillos y eficientes, debido al surgimiento de programas computacionales de análisis de imágenes, que han simplificado de forma significativa el proceso, como lo son Image-Pro Plus (media Cybernetics), IN Cell Analyzer (GE

* Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Ave. Joel Montes Camarena S/N, Apartado Postal 811, Mazatlán, Sinaloa, México, CP 82040.

** Instituto Nacional de Pesca y Acuacultura. Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera-Mazatlán, Ave. Camarón Sábalo S/N, Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa, México, CP 82000. ✉ Responsable de la correspondencia: hugo.aguirre@inapesca.gob.mx

*** Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC. Ave. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja California Sur, México, CP 23096.

Healthcare), Olympus Image Analysis (Olympus Corporation) y otros softwares asociados a la compra de equipos con sistema de imágenes; sin embargo, el costo de adquisición es considerable. Además, la captura de imágenes para el análisis en estos programas sigue suponiendo una gran inversión económica, debido a que se requiere un microscopio con cámara digital y un software especializado. Friedland *et al.* (2005) propusieron el uso de un escáner plano para la adquisición de imágenes de alta resolución procesadas en un programa de análisis de imágenes, haciendo el proceso más asequible y práctico.

Existen decenas de tutoriales y manuales para realizar conteos automatizados de partículas basados en imágenes digitales, que utilizan el programa computacional ImageJ, que es de distribución libre y aceptado por la comunidad científica internacional; existen estudios que destacan su accesibilidad y su sencillez, que lo hacen una herramienta ideal para contar partículas de manera eficiente y confiable (Costa y Yang 2009). El manual del programa muestra las funciones para contar partículas en una imagen; sin embargo, no explica la forma en la que se pudiera disminuir el margen de error en el conteo debido a las propiedades de cada unidad por contar, así como la calidad de la imagen que se analizará (Portiansky 2015). Así pues, es necesario tomar en cuenta variables que se presentan entre estudios; por ejemplo, el tipo de imagen (a color o blanco y negro) que se analizará, la intensidad de la iluminación y las características de las partículas por contar (redondez, transparencia, entre otras). El uso conjunto de ImageJ e imágenes obtenidas por medio de escaneo ha demostrado ser un medio eficiente y barato, para utilizarse en un laboratorio promedio que cuente con un equipo de cómputo común; así, este método ha sido aplicado para la estimación de diversos parámetros, tales como el cálculo de fecundidad con el método gravimétrico o el auto-diametral de fecundidad (Klibansky y Juanes 2008), para obtener la tasa de crecimiento de ovocitos y su relación potencial con la frecuencia de desove (Ganias *et al.* 2011), así como para el conteo y la medición de ovocitos, embriones larvas y adultos (Lessman *et al.* 2010).

Utilización del programa ImageJ

El programa ImageJ cuenta con una herramienta para grabar macros, que es sencilla y permite realizarlos para llevar a cabo diversas rutinas de forma automática y sin errores de ejecución. Sin embargo, adaptarlos a los objetivos de cada proyecto requiere que el investigador cuente con conocimientos mínimos de programación (Carpenter *et al.* 2006), además de cierta habilidad de edición que permita afinar los detalles para que la herramienta funcione y cumpla con las expectativas deseadas. El objetivo de este trabajo es presentar los pasos de un procedimiento para el conteo automático de ovocitos, con base en estudios y rutinas sugeridos por Friedland *et al.* (2005) y Klibansky y Juanes (2008), que permiten analizar imágenes digitales obtenidas desde un escáner plano de escritorio, con un equipo personal de cómputo y el software de acceso gratuito ImageJ versión 1.51.

Los equipos son de tipo estándar y comunes en todos los laboratorios; equipos de mayores capacidades también funcionan de forma adecuada. La muestra biológica debe ser obtenida desde la gónada de hembra madura, así se tomará una submuestra cuya cantidad dependerá de la especie que se estén analizando y se coloca dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml con ≈ 1 ml de agua destilada. Se agita el tubo con la submuestra, aunque se puede hacer de forma manual, se recomienda usar un vórtex para deshacer los cúmulos de huevos. Después, la muestra se pasa a una caja de Petri con líquido dispersante: 20 partes de agua destilada por una de jabón lavatrastos líquido de marca comercial, para romper la tensión superficial de la membrana de los ovocitos y separar los que aún quedan unidos y evitar su flotación. Una vez en la caja, los ovocitos se limpian con agujas de disección y/o pinzas de cualquier resto de mesenterio, tanto como sea posible. Posteriormente, se forra el fondo de la caja con un papel o lámina negra y se coloca en un escáner de escritorio, cuidando que no contenga pelusas y que sea de grano no muy grueso para evitar el ruido al analizar la fotografía. La muestra se escanea en escala de grises a una resolución de 1 200 DPI. Se obtiene una imagen binaria a ocho bits que se guarda en formato JPEG (Friedland *et al.* 2005).

Para el conteo se utilizó el programa de análisis de imágenes ImageJ versión 1.51, que se puede descargar de la liga: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.

1. Una vez instalado el programa, desde el menú se abre la pestaña archivo [*File/Open*] (Fig. 1) y se selecciona la imagen que se desea procesar.

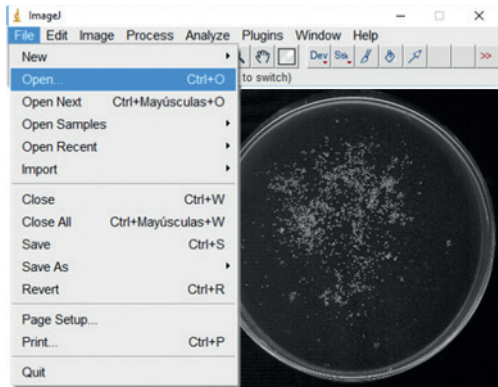


Fig. 1. Utilización del menú para seleccionar la imagen.

2. En la barra de herramientas se pulsa sobre el botón oval para recortar el campo donde están los ovocitos. Se selecciona del menú de [*Edite*] la función [*Clear Outside*] y se pulsa fuera del círculo para deselegionar la imagen (Fig. 2).

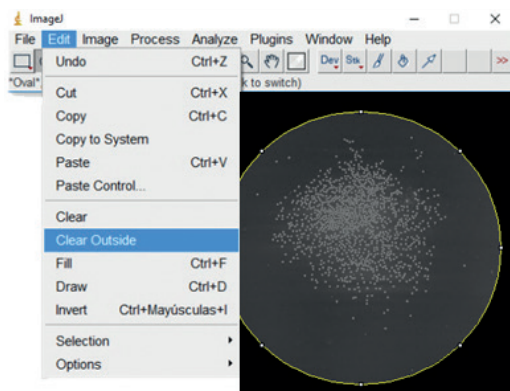


Fig. 2. Utilización de la herramienta *Clear Outside* para limpiar el excedente fuera de la imagen.

3. Del menú [*Image*] seleccionar [*Adjust*] para ajustar los valores de brillantez y contraste [*Brightness/Contrast*]; si se desea se puede seleccionar la opción de ajuste automático con el botón [*Auto*] (Fig. 3).

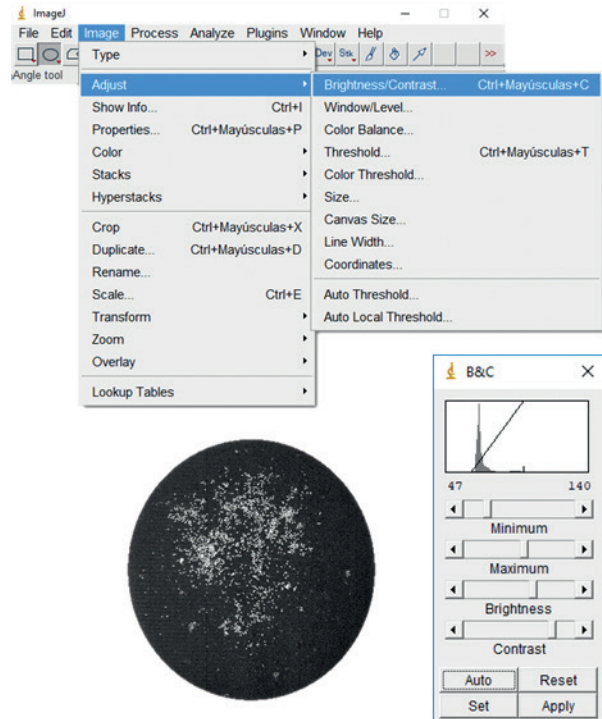


Fig. 3. Utilización del menú para ajustar los valores de brillantez y contraste.

4. Para obtener una imagen en negativo, debido al color de los ovocitos (claro contra fondo oscuro), se selecciona la herramienta [*Invert*] del menú [*Edit*]. Este paso no es necesario si las partículas por contar son oscuras contra fondo claro (Fig. 4).

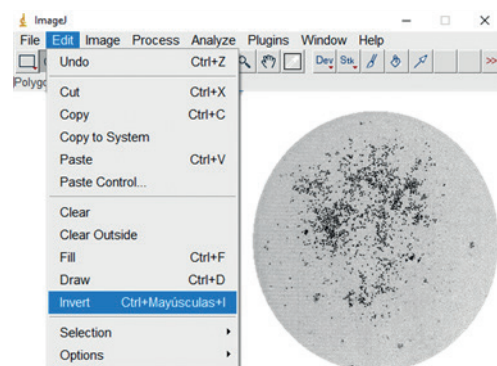


Fig. 4. Utilización del menú para cambiar la imagen a negativo.

5. Del menú [*Process*] se selecciona [*Subtract Background*]. En la ventana emergente se debe ajustar el número de píxeles necesarios para homogeneizar la iluminación de fondo,

la casilla de [*Light Background*] debe ser seleccionada si el fondo es claro (Fig. 5).

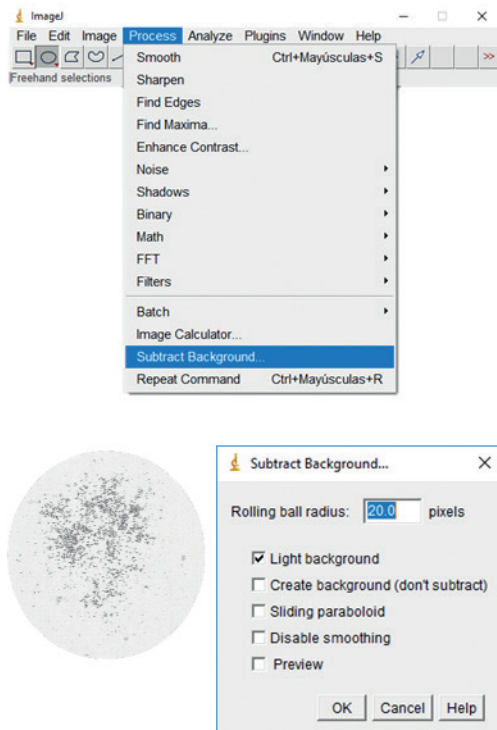


Fig. 5. Utilización del menú para homogeneizar la iluminación de fondo.

- En el menú [*Image*] seleccionar [*Adjust*] y [*Threshold*], en donde se elegirán los píxeles que representan la imagen de los ovocitos según la intensidad. No existe una herramienta para determinar si el valor de *Threshold* elegido es el correcto, éste dependerá de la apreciación del usuario. El valor se buscará en la barra inferior, donde se modificarán los contornos y el llenado de los núcleos detectados, esto puede hacerse manualmente o bien elegir el botón [*Auto*]. En la ventana emergente se seleccionará la opción *Mean*, *Black and White (B&W)*, posteriormente se buscará el valor deseado en la barra inferior y por último, se presionará el botón [*Apply*] (Fig. 6).

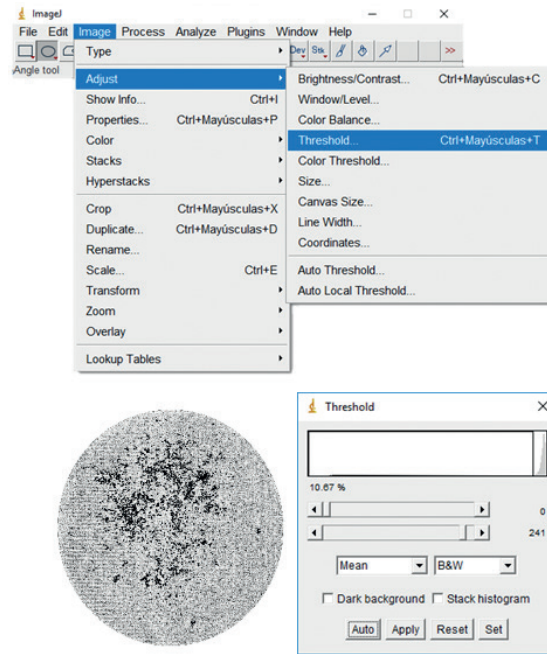


Fig. 6. Utilización del menú para ajustar los valores de Threshold.

- Presionar [*Process*], [*Noise*] y, finalmente, [*Remove Outliners*]. Esta herramienta reemplaza un píxel cuyo valor sale de la media que lo rodea; es útil para poder eliminar el grano que puede interferir en el conteo. La herramienta despliega una ventana en donde se debe especificar el *Radius* que calcula el área para determinar la media; el valor predeterminado es de dos píxeles; pero si no se conoce el valor del píxel es posible calcularlo de acuerdo con el criterio del usuario, variando la medida y verificando con la opción de previsualizado (*Preview*). La segunda casilla es *Threshold* y en ella se determinará qué tanto debe salirse de la media el píxel que deseamos reemplazar; sin embargo, si no se conoce este valor, puede dejarse el número predeterminado. La tercera casilla, *Which outliers*, es para especificar si se eliminarán partículas claras (*Light*) u oscuras (*Dark*) (Fig. 7).

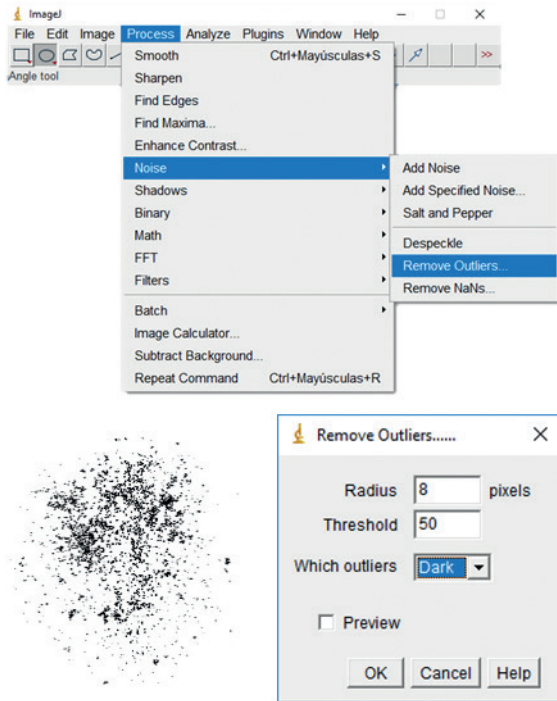


Fig. 7. Utilización del menú para quitar ruido.

- En [Process], [Binary] se seleccionará la herramienta [Watershed] que separará partículas unidas (Fig. 8).

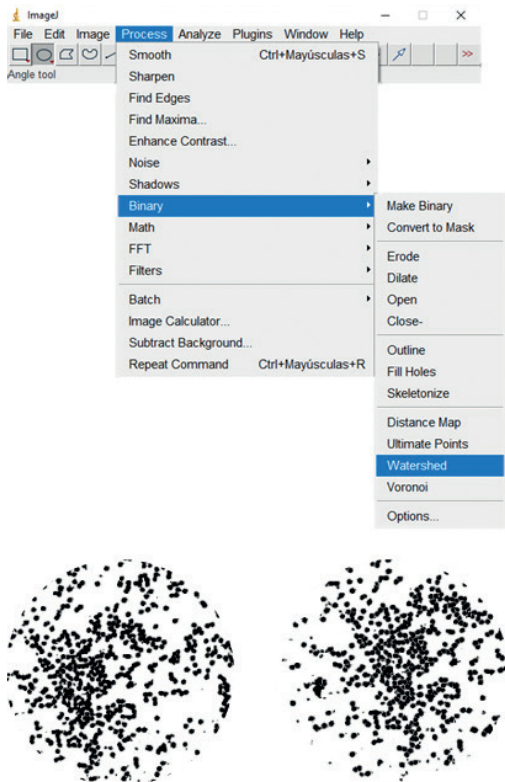


Fig. 8. Utilización del menú para separar las partículas.

- Del menú [Analyze] se seleccionará [Analyze Particles]. En la ventana emergente se pueden seleccionar los ovocitos que se contarán, especificando las medidas de área y circularidad. La primera casilla *Size (pixel²)* sirve para definir las áreas máxima y mínima de las partículas por contar; si no se tienen estos valores, se puede realizar una medida rápida seleccionando una partícula con la herramienta [Oval] y pulsando [Control+m]. En la segunda casilla: *Circularity*, se especificará la circularidad que va de 0 a 1 (siendo 1 el círculo perfecto); en la tercera casilla: *Show*, se deberá seleccionar *Overlay Masks* para que los núcleos contados aparezcan en azul y sean numerados; los núcleos que se queden fuera del conteo aparecerán en negro. En la parte inferior aparecen varios recuadros que permiten seleccionar diferentes funciones de la página de resultados que se desplegará al realizarse el conteo; en el ejemplo se seleccionaron las casillas que se requieren para los propósitos de este estudio en particular; sin embargo, cada usuario seleccionará las que más convengan a los objetivos del estudio (Fig. 9).

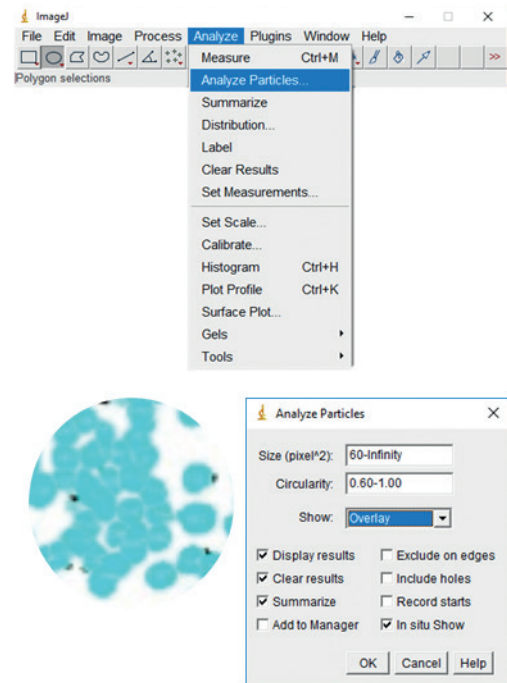


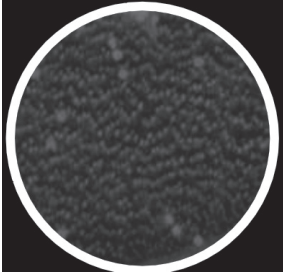
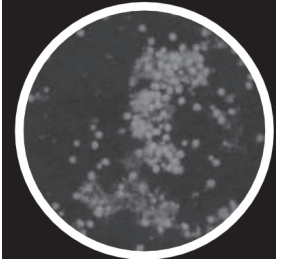
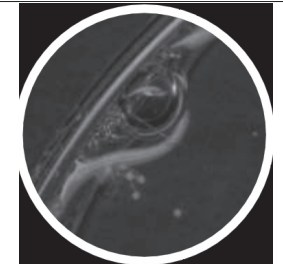
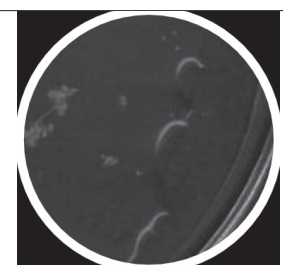
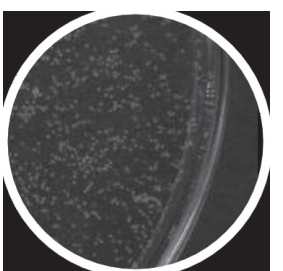
Fig. 9. Utilización del menú para contar las partículas.

Es importante invertir tiempo en la generación de buenas imágenes para evitar el exceso de

filtros y la manipulación de éstas (Tabla 1). Para evitar errores de procedimiento debido al cambio del orden u omisión en el uso del programa ImageJ, se escribió la rutina automatizada AID, que realiza todo el procedimiento evitando des-

viaciones, sesgos y equivocaciones que pudieran tener impacto negativo en los resultados. La rutina AID se puede solicitar de manera gratuita al autor responsable de la correspondencia.

Tabla 1
Recomendaciones para obtener una buena imagen digital utilizando un dispositivo escáner plano

1. Evitar fondos rugosos.	Materiales que provean texturas extrañas quedan grabadas y pueden generar ruido en el conteo.	
2. Limpiar la muestra tanto como sea posible.	Con ayuda de agujas de disección, pinzas o palillos se pueden sacar restos de mesenterio o deshacer cúmulos.	
3. Evitar burbujas.	El medio de dispersión puede generar burbujas, que pueden ser detectadas como núcleos, generando resultados poco confiables.	
4. Verter suficiente medio de dispersión.	Los huecos sin rellenar pueden ser registrados como manchas por el <i>software</i> .	
5. Ovocitos muy pegados a las orillas de la caja de Petri.	Al recortar la imagen con el <i>software</i> , se pierden y quedan fuera del conteo; sin embargo, pueden contarse a mano si así se desea.	

Ventajas de utilizar imágenes digitalizadas

Las ventajas de trabajar con imágenes digitalizadas son diversas, por ejemplo: el campo de visión completo que ofrece la imagen escaneada permite contar los ovocitos en una sola emisión, dejando de lado la segmentación a la que se somete la muestra al contar en un microscopio o lupa; la iluminación es homogénea y se evita la generación de sombras, además se puede crear un acervo de fotografías de ovocitos sin necesidad de guardar la gónada, que se podrá volver a procesar en futuros análisis, si así se requiere.

La utilización de la rutina AID minimiza los errores de ejecución, es decir, los pasos por seguir siempre llevan la misma secuencia, lo que evita que el cambio en ésta u omisión de un paso modifique el resultado. Si se utilizan los mismos valores de ajuste y el mismo protocolo en los conteos automáticos, el error se minimiza, es decir, el resultado siempre es el mismo, independientemente del especialista que haga la medición, lo que no ocurre en los conteos manuales. La instrumentación del presente protocolo agiliza los conteos de ovocitos para poder obtener resultados en menos tiempo y con un presupuesto modesto, dado que se utilizan la infraestructura preexistente del laboratorio (escáner y PC) y un software de adquisición libre.

Es importante mencionar que el desempeño de ImageJ ha sido comparado con el de otros programas de distribución comercial y con conteos manuales (Ganias *et al.* 2010, Cai *et al.* 2011, Portiansky 2015, Silva-Nunes y Martins-Dias 2017), sin encontrar diferencias significativas entre los resultados arrojados, lo que respalda y valida su uso, aceptado por la comunidad científica. En la revisión de Google Académico, el manual del usuario, ImageJ user guide (Ferreira y Rasband 2012), ha sido citado en 386 trabajos, mientras que el programa presenta aproximadamente 244 000 resultados.

Agradecimientos

Al INAPESCA por el financiamiento de las investigaciones de los proyectos Escama Marina y Biología Reproductiva del Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Mazatlán; así

como a Roberto Paredes Mellado, Yolene Rosalía Osuna Peralta, Susana Cristabel Rafael Aguilar, Pedro Miguel Medina Osuna, Diego Armando Osuna Bernal, Juan Antonio Mauricio Payán y a Emilio Romero Beltrán por su apoyo técnico.

Literatura citada

- Cai Z, N Chattopadhyay, WJ Liu, C Chan, JP Pignol, RM Reilly. 2011. Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: comparison with manual counting. *International Journal of Radiation Biology* 87(11): 1135-1146. DOI: 10.3109/09553002.2011.622033
- Carpenter AE, TR Jones, MR Lamprecht, C Clarke, IH Kang, O Friman, DA Guertin, JH Chang, RA Lindquist, J Moffat, P Golland, DM Sabatini. 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7(10): R100. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r100
- Costa CM, S Yang. 2009. Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software. *Annals of Botany* 104(5): 1005-1010. DOI: 10.1093/aob/mcp186
- Friedland KD, D Ama-Abasi, M Manning, L Clarke, G Kligys, RC Chambers. 2005. Automated egg counting and sizing from scanned images: rapid sample processing and large data volumes for fecundity estimates. *Journal of Sea Research* 54(4): 307-316. DOI: 10.1016/j.seares.2005.06.002
- Ganias K, C Nunes, T Vavalidis, M Rakka, Y Stratoudakis. 2011. Estimating oocyte growth rate and its potential relationship to spawning frequency in teleosts with indeterminate fecundity. *Marine and Coastal Fisheries* 3(1): 119-126. DOI: 10.1080/19425120.2011.555729
- Klibansky N, F Juanes. 2008. Procedures for efficiently producing high-quality fecundity data on a small budget. *Fisheries Research* 89(1): 84-89. DOI: 10.1016/j.fishres.2007.09.005
- Lessman CA, MR Taylor, W Orisme, EA Carver. 2010. Use of flatbed transparency scanners in zebrafish research: versatile and economical adjuncts to traditional imaging tools for the *Danio rerio* laboratory. *Methods in Cell Biology* 100: 295-322. DOI: 10.1016/b978-0-12-384892-5.00012-8.
- Portiansky EL. 2015. Análisis automatizado de neuronas de la médula espinal mediante la utilización de tres programas de análisis de imágenes. *Analecra Veterinaria* 35(2): 30-34.

Silva-Nunes JP, AA Martins-Dias. 2017. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar

and wound-healing assays. *BioTechniques* 62(4): 175-179. DOI: 10.2144/000114535.

Recibido: 4 de septiembre de 2018

Aceptado: 15 de octubre de 2018