

Análisis automatizado de neuronas de la médula espinal mediante la utilización de tres programas de análisis de imágenes

Automatic Spinal Cord Neuronal Analysis Using Three Different Image Analysis Software Packages

Portiansky EL

Laboratorio de Análisis de Imágenes. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata. Av. 60 y 118. (1900) La Plata. Argentina.
Correo electrónico del autor: imagelab@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La detección automatizada de elementos libres (microorganismos, células, minerales, etc.) no reviste la misma complejidad que la que presenta el reconocimiento y posterior análisis morfométrico de elementos inmersos dentro de un contexto, tal como células particulares dentro de un tejido. En el presente informe técnico se muestran alternativas para la identificación de neuronas presentes en la sustancia gris de un segmento de la médula espinal de rata, utilizando tres programas distintos de análisis de imágenes digitales. Se comparan los resultados y se discuten las ventajas y diferencias del procedimiento realizado con cada uno de estos programas.

Palabras clave: Identificación de células, neuronas, análisis de imágenes.

Abstract: Automated detection of free elements (microorganisms, cells, minerals, etc.) does not have the same complexity as that necessary to recognize and subsequently morphometrically analyse elements involved in a context such as particular cells within a tissue. In this technical report, alternatives for the identification of neurons in the gray matter of a rat spinal cord segment using three different digital image analysis software packages are described. The results are compared and the advantages and differences of the performed procedures are discussed.

Keywords: Identification of cells, neurons, image analysis.

Introducción

Existen decenas de tutoriales que muestran cómo contar partículas en una imagen digital (Cheng 2011; Bruhemaayush 2012; Foley 2013). Más aún, existen programas macro y complementos (*plug-ins*) específicamente diseñados para el recuento de elementos con determinadas características, que sólo operan sobre determinado tipo de imágenes (Kuo y Byun 2011). Para el uso de estos últimos también existen tutoriales de acceso libre (CELT 2011). La gran mayoría de los tutoriales utiliza el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para su demostración, ya que es de distribución libre y aceptado por la comunidad científica internacional. Este programa cuenta con un manual, donde sólo se explican las funciones de la aplicación para el recuento de partículas, pero no cómo lograr los resultados deseados. La mayoría de los ejemplos que se aprecian en los tutoriales están orientados al reconocimiento de células aisladas o de partículas diminutas dentro de células. Esto presenta la ventaja de la relativa sencillez en la identificación de las estructuras, lo que permite el posterior recuento y caracterización morfométrica.

En muchas circunstancias, es necesario identificar células particulares presentes en un determinado tipo de tejido. Para ello, se recurre a la tinción diferencial utilizando técnicas histoquímicas (Portiansky *et al* 2006), inmunohistoquímicas (Fontana *et al* 2009) o inmunofluorescentes (Portiansky *et al* 2011). Si bien la forma más apropiada para la identificación específica de un tipo celular es mediante la utilización de técnicas que involucren la utilización de anticuerpos, no siempre se consiguen los efectos deseados (Nishida *et al* 2015). En estos casos, la identificación de las poblaciones celulares se realiza por particularidades en el color y/o la intensidad de tinción y por sus características morfométricas.

Como se mencionara previamente, ImageJ es un programa universalmente reconocido que cuenta con herramientas para la identificación de partículas y su posterior análisis. Existen otros programas, de carácter comercial, que también permiten la identificación, recuento y análisis de elementos presentes en imágenes digitales. En el presente informe técnico se muestran los procedimientos necesarios para la identificación de neuronas de un segmento de la médula espinal de la rata, utilizando una misma imagen en tres programas de análisis diferentes.

Descripción metodológica

Software utilizado

*ImageJ, (v.1.49n, *National Institutes of Health*, EE.UU.), para una plataforma de 64 bits. Este programa es de distribución gratuita y se puede descargar

a través de la página web: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>

*cellSens Dimension (v. 1.6, *Olympus Corporation*, Japón). Programa comercial.

*ImagePro plus (v. 6.3.1, *Media Cybernetics*, EE.UU.). Programa comercial.

Captura de la imagen

El segmento C6 extraído de la médula espinal de una rata macho clínicamente sana, de 5 meses de edad, fue sumergido en una solución criopreservante, luego de su perfusión con una solución salina de paraformaldehído al 4 %, hasta su utilización. Se realizaron cortes coronales del mencionado segmento utilizando un micrótopo de vibración (Leica VT 1000S, Alemania). Los cortes fueron montados sobre portaobjetos y teñidos mediante la técnica del violeta de cresilo, coloración utilizada para el reconocimiento de estructuras nerviosas (Suvarna *et al* 2012).

Para la captura de la imagen se utilizó el programa cellSens, ya que controla la platina motorizada (Prior H101AFI, EE.UU.) montada sobre un microscopio de investigación (Olympus BX53, Japón). La imagen digital fue capturada mediante una cámara digital (Olympus DP71, Japón) también controlada mediante el mismo *software*. Para la composición de una imagen que contuviera la totalidad del segmento, al utilizar un objetivo de 40X (NA 0,75), se activó la función *Multiple Image Alignment* (MIA), en modo automatizado, lo que permitió el desplazamiento de la platina motorizada en un área de 5,5 mm². De esta manera, se capturaron, de manera secuencial en X e Y, aproximadamente 140 imágenes, las que fueron alineadas para reproducir la totalidad de la muestra. Previo a la captura de las imágenes, se tuvo particular precaución en establecer una iluminación de la muestra de manera tal de generar el mayor de los contrastes entre el tejido, las células y el fondo de la misma, para evitar posteriores requerimientos de procesamiento de la luz.

Secuencia de eventos para la cuantificación y medición de neuronas

A continuación se muestran las animaciones realizadas mediante AdobeTM Captivate 7 (*Adobe Systems Incorporated*, EE.UU.), correspondientes a la identificación, recuento y análisis morfométrico de las neuronas presentes, utilizando los programas ImageJ ([link 1](#)), ImagePro Plus ([link 2](#)) y cellSens Dimension ([link 3](#)).

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando ImageJ se realizaron los siguientes pasos:

1. Calibración espacial de la muestra, basada

en la barra incluida dentro de la imagen.

2. Establecimiento del umbral de color (segmentación) para su posterior binarización.
3. Binarización.
4. Selección de los parámetros a ser medidos.
5. Establecimiento de los límites de valores para los parámetros seleccionados.
6. Recuento.
7. Almacenamiento de los datos en un administrador de regiones de interés (*ROI Manager*).
8. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando ImagePro Plus se realizaron los siguientes pasos:

1. Si la imagen hubiese sido capturada mediante este software, probablemente ya hubiese estado calibrada espacialmente de acuerdo con el objetivo utilizado, ya que este programa tiene la capacidad de controlar el microscopio. De no estarlo, se deberá proceder como en el punto 1 del listado correspondiente a ImageJ.
2. Segmentación de los objetos. Para ello se seleccionan los límites de color de los objetos problema (neuronas).
3. Selección de los parámetros a ser medidos y establecimiento de sus límites.
4. Recuento.
5. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando cellSens Dimension se realizaron los siguientes pasos:

1. Al estar la imagen capturada mediante este software, no fue necesario calibrarla. De lo contrario, hubiese sido necesario proceder como en el punto 1

del listado correspondiente a ImageJ.

2. Selección de los parámetros a ser medidos.
3. Establecimiento de los límites de valores para los parámetros seleccionados.
4. Segmentación de los objetos. Para ello se seleccionan los límites de color de los objetos problema (neuronas).
5. Recuento.
6. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Los parámetros para la identificación de las neuronas, así como el rango de valores elegidos, fueron seleccionados sobre la base de trabajos previamente publicados (Portiansky *et al* 2004; Portiansky *et al* 2011). Para la selección de los objetos a ser cuantificados, en todos los casos se utilizó el método de segmentación por color. Con ImageJ, se utilizó el sistema de color HSB (*Hue, Saturation, Brighthness*), que es un sistema llamado "cilíndrico" por su forma de representación (Portiansky 2013). Con los programas comerciales se utilizó el sistema RGB (*Red, Green, Blue*). En ambos casos se utilizó el sistema de gotero, en el que el profesional selecciona las intensidades de color que considera que se corresponden con las estructuras a analizar. También puede utilizarse el histograma de la imagen para conseguir el mismo propósito. En este último caso hubiese sido necesario establecer el rango de cada uno de los colores del RGB, a diferencia del HSB que selecciona los colores sólo con el canal H.

Independientemente de la forma en que el software selecciona los colores, en los tres programas se utilizó un método intuitivo de selección y, por lo tanto, el criterio de selección fue similar en todos los casos. La figura 1 muestra el efecto producido al realizar la segmentación del mismo sector de la imagen con cada uno de los programas. Allí se observa que el área de color superpuesto sobre los objetos seleccionados es similar en todos los casos.

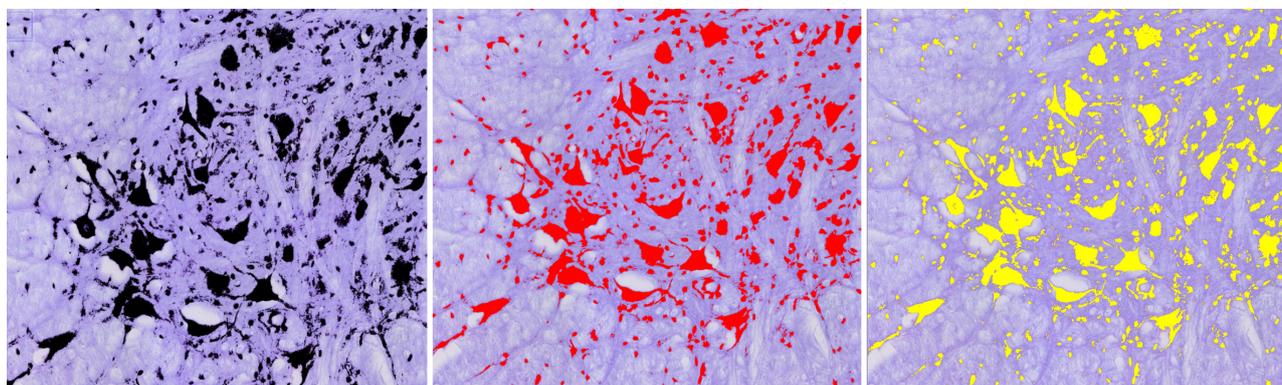


Figura 1. Efecto de la segmentación producida mediante ImageJ (izquierda), ImagePro Plus (centro) y cellSens Dimension (derecha), sobre una misma imagen del sector medular, teñido con violeta de cresilo.

La utilización del ROI Manager con ImageJ permite manejar de manera individual cada uno de los objetos encontrados. De esta manera, el operador puede seleccionar manualmente aquellas células que considere que deban o no ser incluidas en el recuento o la medición.

En el video correspondiente al programa ImagePro Plus se observa que es posible separar dos neuronas (*splitting*), consideradas como únicas al realizar el recuento automatizado. Con los programas comerciales es posible separar los objetos manualmente. Con los tres programas se puede realizar una separación automatizada basándose en el filtro Watershed (Portiansky 2013).

Discusión y conclusiones

Los tres programas de análisis permitieron resolver el desafío de reconocer las neuronas por su aspecto morfológico o por su color. Cada situación requirió, sin embargo, de una selección particular en cuanto a los rangos de valores que debieron elegirse para obtener los resultados más apropiados. Esto es válido tanto para la muestra seleccionada en el presente trabajo, como para cualquier otra muestra en la que se pretenda seleccionar objetos con determinadas características. Independientemente de cuál sea el *software* elegido, el punto crítico consiste en capturar la imagen con el mayor de los contrastes para lograr una segmentación inicial que evite el procesamiento posterior. De esta manera, se identifican los objetos y el fondo de manera independiente, hecho que facilita la posterior segmentación y análisis (Portiansky 2013).

ImageJ es un programa de análisis digital de imágenes de dominio público, diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía *plug-ins* Java y *macros* (Collins 2007). Es utilizado por cientos de investigadores y los resultados obtenidos mediante este programa son aceptados universalmente. Si bien no tiene un ambiente de trabajo propio, las funciones y aplicaciones que presenta o que se le pueden adicionar, hacen de ésta una herramienta de alto valor laboral. Por su parte, los otros dos programas analizados, que son de origen comercial, tienen su propio ambiente de trabajo. Esto implica la ventaja de poder manejar imágenes y funciones relacionadas con ellos, de manera aislada de otros utilitarios de la computadora. Sin embargo, en estos programas, las actualizaciones de las funciones sólo pueden ser provistas por los propios fabricantes del producto. Por otro lado, la versatilidad de estos programas permite que el mismo usuario diseñe la forma en que se presenta la información y la distribución de los menús. Si bien ImageJ provee programas (*drivers*) de manejo de algunas cámaras de video, la gran ventaja de los

programas comerciales es que permiten controlar los componentes motorizados del microscopio de manera integral, junto a los objetivos y filtros de fluorescencia. De esta manera, se asegura que la intensidad de luz en el momento de la captura, así como el contraste entre los objetos y el foco de la imagen, sean los apropiados para el propósito planteado.

Si bien con los programas comerciales analizados se pudieron evitar ciertos pasos intermedios que fueron requeridos por ImageJ para analizar la imagen utilizada en el presente trabajo, tales como la transformación a una imagen monocromática y su posterior binarización, no siempre se obtienen los resultados esperados. Cada caso particular requiere de un análisis exhaustivo de las condiciones apropiadas, previo al procedimiento de captura de gran cantidad de muestras, ya que lo que se presupone ideal para una muestra puede no serlo para otra.

El conocimiento de la composición celular de una región específica del sistema nervioso es relevante para la comprensión de la funcionalidad de los sistemas neurobiológicos (Miller *et al* 2014). La identificación de neuronas, como de muchas otras células presentes dentro de un tejido, requiere de un conocimiento particular de su estructura. Existen diversos tipos de neuronas que difieren en su morfología según el órgano nervioso considerado (Ramón Cajal, 1899). Si bien dentro de los tejidos cada neurona es una célula individual, que se contacta con otras células o estructuras mediante sus prolongaciones, no siempre puede individualizarse en la forma en que se visualizan en los cultivos celulares. Por otro lado, las neuronas presentan diversos tamaños dentro de un mismo tejido. Particularmente, en la médula espinal coexisten neuronas de 10 μm de diámetro, presentes en la Lámina I, con motoneuronas de 300 μm de diámetro, localizadas en la Lámina IX (Portiansky *et al* 2004). Esto implica que deben realizarse varios cortes finos y seriados o tomar series de imágenes en pila de un corte grueso para poder medir a estas células dentro de un mismo contexto. De esta manera, habrá mayor posibilidad de contabilizar neuronas que hayan sido correctamente identificadas.

La secuencia de pasos realizada por los programas comerciales permitiría inferir que los procedimientos realizados para obtener los resultados presentados podrían ser más prácticos o menos laboriosos en comparación con los requeridos por ImageJ. No obstante, esto no asegura la precisión de los datos obtenidos. Para confirmar dicha aseveración es necesario confrontar los resultados obtenidos por cada uno de ellos.

En este trabajo se presentó la secuencia de eventos necesarios para la identificación, cuantificación y análisis morfométrico de neuronas presentes

en un segmento de la médula espinal. Esta misma metodología podría ser utilizada para otros segmentos del órgano, otros órganos nerviosos y hasta otros tejidos, cuando el objetivo principal consista en identificar poblaciones celulares que tengan alguna característica diferencial con el resto de las células del mismo tejido, ya sea ésta tanto de tipo tintorial como morfométrica.

Declaración de conflicto de intereses

El autor declara que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PICT-2012-0574 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) dependiente del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCyT). El autor agradece al Dr. F. Nishida por el aporte de la imagen utilizada en el presente trabajo.

Bibliografía

- Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 2013. Londres: Churchill Livingstone Elsevier.
- Bruhemaayush. 2012. Learn nanoparticle analysis using Image-J in 10 minutes. <https://www.youtube.com/watch?v=js9ECPuoOwA>. Accedido el 26/3/2015.
- Celt. 2011. Automated cell counting in ImageJ. Keene State College. https://www.youtube.com/watch?v=PqHFsmS1_JY. Accedido el 26/3/2015.
- Cheng I. 2011. How to count cells using ImageJ. https://www.youtube.com/watch?v=8c68qIz_ftw. Accedido el 26/3/2015.
- Collins T.J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 2007; 43: 25-30.
- Foley K. 2013. Counting cells with ImageJ. <https://www.youtube.com/watch?v=D1qBaFwuF4E>. Accedido el 26/3/2015.
- Ferreira T, Rasband W. 2012. ImageJ user guide. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/index.html>. Accedido el 26/3/2015.
- Fontana PA, Barbeito CG, Goya RG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Impact of very old age on the expression of cervical spinal cord cell markers in rats. *J Chem Neuroanat.* 2009; 37: 98-104.
- Kuo T, Byun J. 2011. ITCN: Image-based tool for counting nuclei. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/itcn.html>. Accedido el 26/3/2015.
- Miller DJ, Balam P, Young NA, Kaas JH. Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. *Front Neuroanat* 2014. 8:36. doi: 10.3389/fnana.2014.00036.
- Nishida F, Zanuzzi CN, Martínez A, Barbeito CG, Portiansky EL. Functional and histopathological changes induced by

intraparenchymal injection of kainic acid in the rat cervical spinal cord. *Neurotoxicol.* 2015;49: 68-78

Portiansky EL. Análisis multidimensional de imágenes digitales. 2013. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

Portiansky EL, Barbeito CG, Goya RG, Gimeno EJ, Zuccolilli GO. Morphometry of cervical segments grey matter in the male rat spinal cord. *J Neurosc Meth.* 2004;139: 217-29.

Portiansky EL, Barbeito CG, Flamini MA, Gimeno EJ, Goya RG. Presence of binucleate neurons in the spinal cord of young and senile rats. *Acta Neuropathol.* 2006;112: 647-9.

Portiansky EL, Nishida F, Barbeito CG, Gimeno EJ, Goya RG. Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats. *PLoS One.* 2011;6: e22537.

Ramón Cajal. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. 1899. 2 tomos. Madrid: Nicolás Moya.