

## Aplicación del Analizador Digital de Imágenes a la medición de parámetros morfométricos en túbulos seminíferos de testículos de *Liolaemus wiegmanni*<sup>2</sup>.

CI Merkis<sup>1</sup>, Dra; D Zubeldía, Mic, MA Koncurat, Ms Sc.

Area de Microscopía Electrónica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional Río Cuarto, Estafeta Postal N°9, Río Cuarto, 5800, Argentina.

(Recibido: 30 enero, 2000; aceptado: 23 marzo, 2001)

### Resumen

*Los ciclos reproductivos de las especies de reptiles de zonas no tropicales como el lagarto Liolaemus wiegmanni se caracterizan por poseer una sola temporada reproductiva anual limitada por un periodo de hibernación corto. El objetivo de este trabajo fue diseñar un “macro” a través de un analizador digital de imágenes, que permita medir el área de los túbulos seminíferos y el grosor medio del epitelio germinativo de los testículos de los lagartos. El macro consta de cinco secciones principales: toma de imágenes, preprocesamiento, segmentación, medición de parámetros seleccionados y por último los resultados obtenidos en pixel (unidad mínima de pantalla) son convertidos a micrómetros (unidad métrica). En conclusión, este método permite medir el área y grosor medio del epitelio germinativo de los túbulos seminíferos con un alto grado de automatización, procesamiento de un gran número de imágenes con un mínimo error y rápida obtención de los resultados.*

*Palabras clave:* Analizador Digital de Imágenes, macros, túbulos seminíferos, lagartos.

### Introducción

En especies que hibernan es importante conocer las características del ciclo reproductor de los machos, tales como su duración y estacionalidad; la variación de la longitud, volumen y peso de los testículos; variación de los cuerpos grasos y la duración de la espermatogénesis. Para el estudio de ésta última se analiza la variación en la altura del epitelio germinal y de los tipos celulares, a fin de poder determinar el modelo reproductivo de la especie (1,9,10). Existen grandes inconvenientes en la medición de la altura del epitelio germinal, ya que la mayoría de las veces solo se cuenta con la reglilla del ocular del microscopio óptico para realizar tales determinaciones, lo que dificulta poder determinar un verdadero modelo

reproductivo de la especie a estudiar (11,4).

El analizador digital de imágenes es un equipo que permite estudiar numerosos parámetros morfométricos y estereológicos, en donde a través de un alto grado de automatización, se procesa un gran número de muestras con un mínimo error y rápida obtención de los resultados (2,3,5,6,7). La automatización se logra ideando programas, denominados “macros”, que contemplan una secuencia de acciones u órdenes establecidas por el operador. El objetivo de este trabajo fue diseñar un “macro” a través de un analizador digital de imágenes que permita medir el área de los túbulos seminíferos y el grosor medio del epitelio germinativo de los testículos de lagartos *Liolaemus wiegmanni* en diferentes estadios reproductivos.

<sup>1</sup> Email: cmerkis@ayv.unrc.edu.ar

<sup>2</sup> Proyecto subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. SeCyT/477

### **Materiales y métodos**

*Animales.* 31 especímenes de *Liolaemus wiegmanni* machos, juveniles y adultos, capturados a 5 Km de la localidad de Laguna Oscura (33°50'–64°50'), Departamento Río Cuarto, Provincia de Córdoba, Argentina fueron depositados en la colección herpetológica de la Orientación de Zoología de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Las muestras se recolectaron del 12 de setiembre de 1993 al 27 de diciembre de 1994.

*Preparación de las muestras.* A los especímenes se les extrajeron los testículos y epidídimo y se fijaron en formol al 10%. Se deshidrataron con alcohol al 96%, 3 baños de 15 minutos cada uno, luego 3 de 15 minutos cada uno en alcohol al 100% y por último por benceno/xilol 3 veces, 15 min cada vez. Las muestras se incluyeron en parafina, 2 baños de 2 horas cada uno en estufa a 57-58°C, con la muestra en posición vertical hasta que la parafina solidificó. Se montaron en tacos de madera y se cortaron con un micrótopo automático (Jum 2065, Leika), obteniendo cortes de 5 a 10 mm de grosor cada uno. Se colorearon con Hematoxilina-Eosina y se observaron con un microscopio óptico (Axiophot, Zeiss).

*Análisis Digital de Imágenes.* Los cortes de epitelio germinativo testicular fueron evaluados a través de un analizador digital de imágenes (Kontron imaging system, VIDAS), el cual consta de: una CPU con el programa Vidas25 con placa de adquisición de imágenes, dos monitores (uno para manipulación del programa y el otro para visualización de la imagen); un mouse indicador de la posición exacta dentro de la imagen y un sistema de conexión realizado a través de una cámara de video Philips CCD a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss). Para la medición de las variables a estudiar: área de los túbulos seminíferos y grosor medio del epitelio germinativo se realizó con el analizador de imágenes un programa, es decir una secuencia de acciones denominada "macro" que constó de cinco secciones principales: toma de imágenes, segmentación, preprocesamiento, medición de los parámetros seleccionados y conversión de los resultados de pixel a micrómetros.

*Definición de estadios espermatogénicos.* Para definir los diferentes estadios reproductivos se utilizó la tabla propuesta por Ballinger y Nietfeldt (1) que determina 8 estadios: Estadio "0": testículo diferenciado; Estadio "1": crecimiento testicular; Estadio "2": espermatogénesis temprana; Estadio "3":

espermiogénesis temprana; Estadio "4": espermiogénesis; Estadio "5": testículo reproductivo; Estadio "6": testículo post-reproductivo y Estadio "7": testículo inactivo.

*Análisis estadístico.* Los datos fueron evaluados mediante un test ANOVA.

### **Resultados**

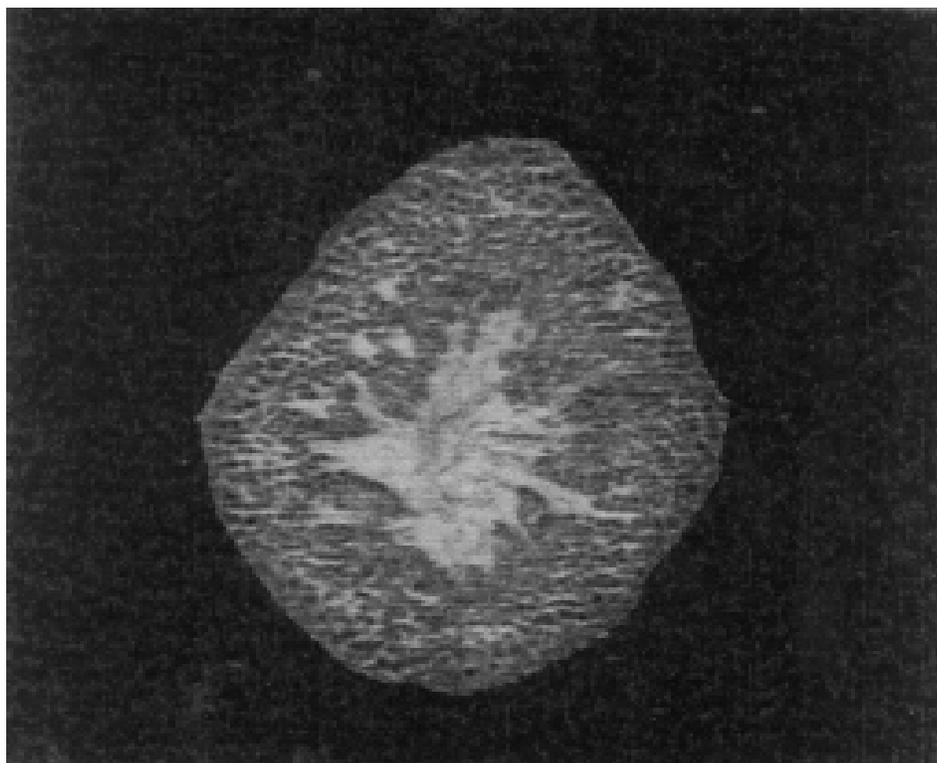
La Figura 1, toma de imágenes del preparado histológico del túbulo seminíferos de *Liolaemus wiegmanni* en un estadio reproductivo, corresponde a la primera sección de la macro realizada. Fue capturada con la cámara de video y posteriormente transferida a uno de los monitores mediante la placa de adquisición.

El promedio de 12 imágenes de los túbulos seminíferos obtenidos como anteriormente se describiera, se observa en la Figura 2. La imagen resultante se realiza para aportar la mejor claridad a la imagen mediante el ajuste interactivo del rango de grises y fue grabada para su posterior análisis. La segunda sección de la macro, el preprocesamiento, consistió en marcar por medio del mouse el perímetro externo del epitelio germinativo del túbulo seminífero. Se seleccionó como objeto de estudio el área incluida dentro del perímetro y la imagen obtenida representa el área total (Figura 3). En la tercera sección se realizó la segmentación, que consistió en transformar la imagen del objeto hasta ahora definido en rangos de grises, en imagen binaria o blanco y negro (Figura 4). Posteriormente se marcó el perímetro interno del epitelio germinativo que demarca la luz tubular, seleccionando como objeto el grosor medio del epitelio germinativo, con lo cual se obtuvo un único objeto, el epitelio germinativo en forma de anillo. Dicho paso lo realiza el equipo en forma automática por lo cual no se dispone de figura. El cuarto paso fue la medición de los parámetros morfométricos seleccionados: área tubular y grosor medio del epitelio germinativo del túbulo. Por último los resultados obtenidos en pixel (unidad mínima de pantalla) fueron transformados a micras, en función de un factor de corrección obtenido con un portaobjeto provisto de reglilla (5+ 100/100, Zeiss).

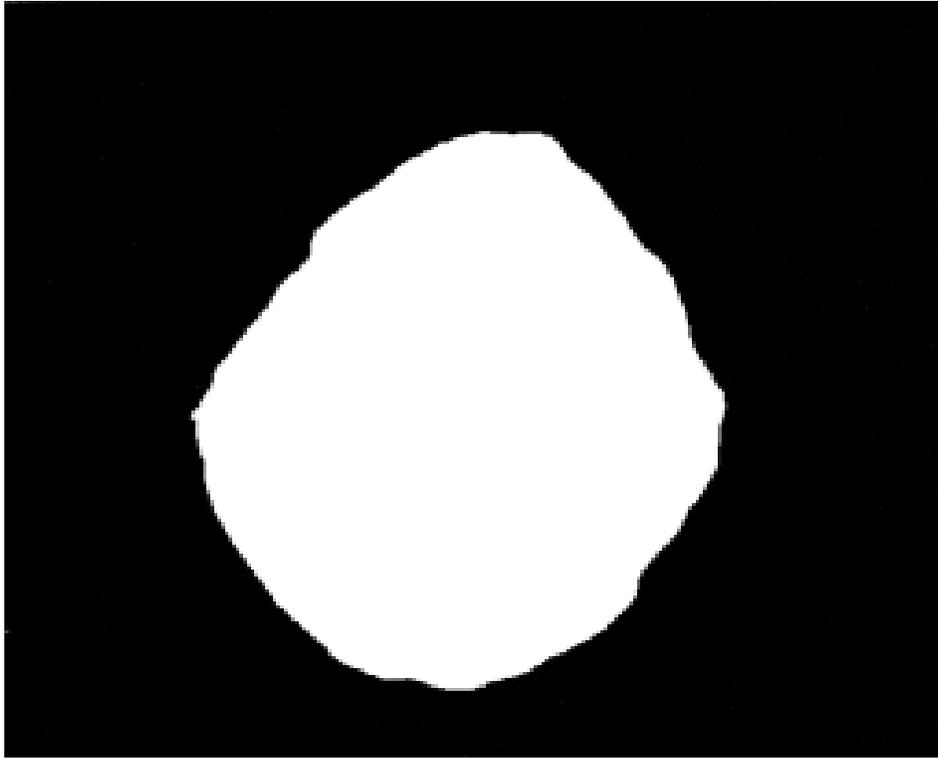
La macro realizada nos permitió medir por cada portaobjeto analizado 25 túbulos seminíferos tomados en forma aleatoria y al azar. La variación de la altura del epitelio germinal en los diferentes estadios reproductivos se resumió en la Tabla 1. La altura del epitelio germinal durante la espermiogénesis varía en



**Figura 1.** Imagen promedio de túbulo seminífero de *Liolaemus wiegmanni* captada por la cámara de video adicionada al microscopio óptico (400x)



**Figura 2.** Imagen obtenida al seleccionar en forma interactiva, el perímetro del epitelio germinativo de los túbulos seminíferos del lagarto *Liolaemus wiegmanni* a fin de obtener el área total.



**Figura 3.** Imagen binaria del área total del túbulo seminífero del lagarto *Liolaemus wiegmanni*.

los distintos estadios reproductivos, tendiendo a aumentar hacia el Estadio "5":  $8,00 \pm 1,79$  mm a partir del cual los valores decrecen (7,8).

### Discusión

Importantes estudios sobre patrones de cambios histológicos del ciclo testicular se han realizado sobre el ciclo reproductivo de los lagartos neotropicales. La cuantificación de la variación histológica de gónadas y ductos en los diferentes estados de actividad reproductiva por micromorfometría provee la confirmación de la relación entre los cambios morfológicos en cada estado y su actividad. Por otro lado, en concordancia con Fay et al., 1985 (5) observamos que los estudios realizados a través de observaciones y mediciones histológicas utilizando las reglillas de los oculares de los microscopios originan un aumento significativo del error estadístico. Numerosos autores utilizan los métodos anteriormente mencionados, haciendo entonces, una simple diferencia de carácter cualitativo de los túbulos seminíferos durante los diferentes estadios espermatogénicos (11,1,4). Las variaciones de morfometría y apariencia histológica de las estructuras sexuales del macho a través de su ciclo reproductivo estacional muestran que los tractos son estadísticamente diferentes en los diferentes estados

reproductivos en las distintas especies de lagartos evaluadas. Nuestro grupo de trabajo propuso en 1996 (7), la utilización del analizador digital de imágenes para subsanar todos los inconvenientes que acontecen con la utilización de las reglillas oculares.

Tal como se ha visto en la Tabla 1 la altura del epitelio germinal varía en los diferentes estadios reproductivos, tendiendo a aumentar hacia el estadio "5" cuando los testículos presentan su máxima actividad; luego los valores decrecen (7,8). Así, la altura del epitelio espermático se incrementa progresivamente con la actividad espermatogénica y declina abruptamente en el estadio reproductivo "7" cuando ocurre la regresión testicular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos afirmar que el método propuesto por nuestro grupo de trabajo, permite la realización de mediciones de variables morfológicas, con significación estadística, entre los diferentes estadios reproductivos y con un alto grado de automatización. Este tipo de estudio es válido para aplicar en otras especies y además permite procesar un gran número de imágenes con un mínimo error y rápida obtención de los resultados.

**Tabla 1.** Distintos estadios reproductivos espermatogénicos y la variación de la altura del epitelio germinal durante la espermatogénesis.

Estadio reproductivo	n	Altura epitelio(x±ds)µm
1 (Crecimiento testicular)	1	No hay luz
2 (Espermatogénesis temprana)	3	4.83 ± 2.36
3 (Espermiogénesis temprana)	3	4.67 ± 1.31
4 (Espermiogénesis)	3	7.00 ± 1.08
5 (Testículo reproductivo)	4	8.00 ± 1.79
6 (Testículo post-reproductivo)	16	6.47 ± 2.13
7 (Testículo inactivo)	1	6.50 x 10 <sup>4</sup>

### Summary

*Use of image digital analyzer to measure morphometric parameters in seminiferous tubules of Liolaemus wiegmanni. The reproductive cycles of reptile species from non tropical areas like the lizard Liolaemus wiegmanni are characterized by having only one annual reproductive season limited by a short hibernation period. The objective of this study was to design a macro through an image digital analyzer to measure the seminiferous tubules area and the average thickness of the germinal epithelium. This macro is formed by five sections: imaging, processing, segmentation, parameter measurements and finally the obtained results in pixels are transformed in micrometers. In conclusion, this methods allows to measure the area and thickness of the germinal epithelium with a high degree of automatization, processing a great number of images with minimal error and rapid results.*

*Key words:* Digital Image Analyzer , lizard, macro, seminiferous tubules

**Agradecimientos.** A la Orientación de Zoología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en particular a los Profesores Ricardo Martori y Liliana Aun y al Biólogo Carlos Añazggo.

### Referencias

- Ballinger RE y J W Nietfeldy. Ontogenetic stages of reproductive maturity in the Viviparous Lizard, *Sceloporus jarrovi* (Iguanidae). *J Herpetol.* 1989; 23, 282-292.
- Bartels P H, J Layton y R L Shoemaker. Digital Microscopy. Computer/assisted image analysis cytology. Greenberg ed. Karger, Basel, 1984.
- Baxes G A Digital Image Processing: a practical primer. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 1984.
- Dubois W y G Callard. Culture of intact Sertoli/Germ cells units an disolated Sertoli cell from *Squalus testis*: Evidence of stage-related functions in vitro *J. Exp. Zool* 1991; 258:359-372.
- Fay F S, K E Fogarty y M Coggins. Analisis of molecular distribution in single cells using a digital imaging microscope. In: *Optical Methods In Cell Physiology* .P. De Weer and B. M. Salzberg, eds. Wiley, New York, 1985.
- Inoué S. Video microscopía. Plenum Press, New York. 1993.
- Merkis, C., Zubeldía, D., Añazggo, C. y Koncurat, M. Aplicación del analizador digital de imágenes, VIDAS, a la medición de parámetros morfométricos en túbulos seminíferos de testículos de *Liolaemus wiegmannii*. Memorias de la XII Reunión Nacional de Comunicaciones Herpetológicas. Río Cuarto, Argentina. 1996.
- Orlandini, S., Aun, L. y Martori, R. Estudio del ciclo espermatogénico en *Liolaemus saxatilis*. Memorias de la XII Reunión Nacional de Comunicaciones Herpetológicas. Bariloche, Argentina, 2000.
- Ramirez Pinilla, MP, Reproductive and fat body circle of the oviparous lizard *Liolaemus scapularis*. *J. Herpetol.* 1994; 28:521-524.
- Trauth S.E. Testicular cycle and timing of reproduction in the collared lizard (*Crotaphytus collaris*) in Arkansas. *Herpetologica.* 1979; 35(2) 184-188.
- Wrobel, H M Kebler y M Schimmel. Quantitative evaluations of the tubular epithelium in the testis of the Fallow deer (*Dama dama*). *Reprod. Dom. Anim.* 1993; 28:1-13.