

UN MÉTODO DE BAJO COSTO PARA EL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE ESCAMAS

J. LANCELOTTI¹, C. RIVA ROSSI², M. ARGUIMBAU³

1. Centro de Investigaciones de Puerto Deseado, Universidad Nacional de la Patagonia Austral. jlancelotti@yahoo.com.ar

2. Centro Nacional Patagónico (CONICET), Chubut. 3. Universidad Nacional de la Patagonia, Chubut

RESUMEN

El análisis de escamas mediante inspección ocular y mediciones directas demanda muchas horas de labor, además de resultar profundamente tedioso. En la actualidad existen sofisticadas herramientas para la cuantificación automatizada de los patrones de fijación de calcio en escamas y otolitos que combinan instrumentos ópticos con cámaras de video digitales y con software para análisis de imágenes específicamente diseñado para interpretar las clásicas bandas encontradas en estas estructuras. Sin embargo, el costo de los instrumentos y software ofrecidos comercialmente es muy elevado y está fuera del alcance del típico presupuesto que maneja un grupo de investigación ecológica en nuestro país. En este trabajo se logró desarrollar una herramienta eficiente y económica para el estudio del crecimiento a partir del análisis de escamas. Las técnicas desarrolladas permiten efectuar conteos de *annuli* y *circuli*, como así también realizar todas las mediciones que permiten posicionar estas estructuras en las escamas, brindando la posibilidad de desarrollar una amplia gama de análisis referidos al crecimiento. Los elementos utilizados están generalmente disponibles en un laboratorio típico (computadora y planilla de cálculo), pueden construirse a un bajo costo (prensa térmica de escamas), o pueden obtenerse en forma gratuita por medio de Internet como por ejemplo el software Scion (Scion corporation, USA, adquisición libre en www.scioncorp.com) para el análisis de imágenes.

Palabras clave: escamas, análisis, crecimiento, *circuli*, software.

INTRODUCCIÓN

El análisis de los patrones de fijación de calcio en escamas permite reconstruir la historia de crecimiento de los peces (Endo *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1996; Koo, 1962, Lancelotti, 2002) y caracterizar aspectos importantes de su biología, tales como los eventos reproductivos y las migraciones (Friedland y Haas, 1994). Sin embargo, el análisis de las escamas mediante inspección ocular y medición manual demanda muchas horas de labor, además de resultar una tarea profundamente tediosa. En la actualidad, existen herramientas que combinan instrumentos ópticos con cámaras de video y con software para análisis de imágenes específicamente diseñado para analizar en forma automatizada el patrón periódico de las bandas encontradas en estas estructuras. Sin embargo, el costo de los instrumentos y software disponibles comercialmente es muy elevado y está fuera del alcance del típico presupuesto que maneja un grupo de investigación ecológica en nuestro país. En este trabajo se presenta una técnica económica y eficiente que permite analizar los patrones de fijación de calcio en las escamas. Se incluye una sección al final de este trabajo con detalles técnicos del protocolo desarrollado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material e impresión en acetato

Las escamas se limpian bajo lupa con una solución de agua y detergente para eliminar restos de tejido e impurezas. Una vez limpias las escamas son pegadas en una tarjeta de papel engomado, el cual se monta sobre una lámina de acetato. El conjunto tarjeta-acetato se coloca entre dos planchas de acero en una prensa térmica (Figura 1a), manteniéndose a una temperatura de 110 °C durante 30 minutos hasta obtenerse una impresión de las escamas sobre el acetato (Figura 1b). Este sistema facilita la lectura, clasificación y archivo de las escamas, incluyéndose en cada tarjeta tres escamas para 10 individuos diferentes.

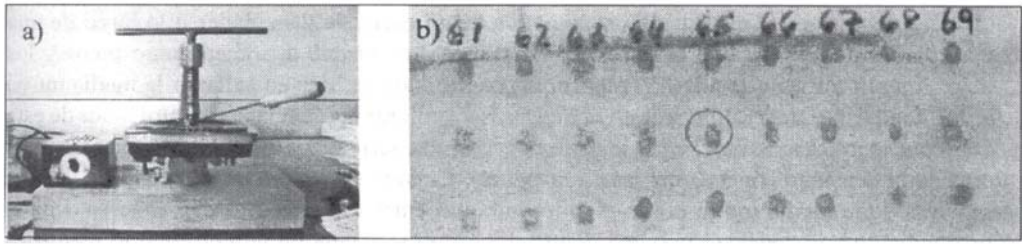


Figura 1. a) prensa térmica utilizada para generar las impresiones de las escamas en el acetato. b) tarjeta de acetato con escamas impresas (el círculo rojo señala una de las escamas impresas).

Generación del perfil de fijación de calcio

Una vez obtenida la impresión, las escamas se visualizan en un lector de microfichas (Figura 2). De cada escama proyectada en la pantalla se obtiene una fotografía con una cámara digital.

Las mediciones se realizan sobre las fotos digitales utilizando software específico para análisis de imágenes. El programa mide la intensidad de luz (la densidad de los píxeles) a lo largo de una transecta trazada sobre el eje longitudinal de la escama, guardando la información obtenida como un archivo de datos numéricos (valor numérico del color de píxeles a lo largo de la transecta, (donde el color blanco absoluto y negro absoluto toman los valores extremos) (Figura 3). Debe colocarse una escala como referencia sobre la pantalla del lector de microfichas para transformar las medidas realizadas sobre las imágenes ampliadas a su valor real (Figura 2).

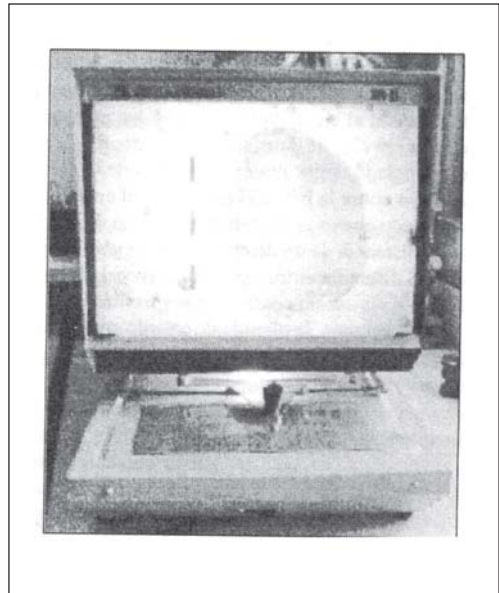


Figura 2. Lector de microfichas proyectando una escama. A la izquierda de la escama puede verse una escala utilizada para transformar las mediciones hechas sobre las imágenes ampliadas a su valor real.

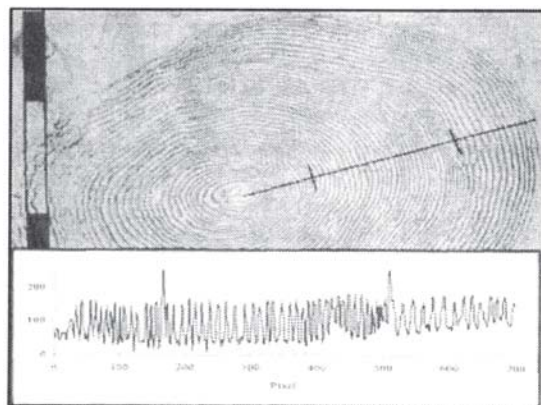


Figura 3. Imagen digital de una escama. La línea negra corresponde a una transecta trazada a lo largo del eje longitudinal. Las dos líneas transversales a la transecta determinan la ubicación de los anuli identificados visualmente y marcados sobre la fotografía. El gráfico ubicado en la parte inferior corresponde al perfil de densidades de píxeles a lo largo de la transecta obtenido utilizando los programas Scion o Image.

La Figura 4 muestra una visión esquemática de un perfil de densidades a lo largo de una imagen digital de una escama (línea negra continua). Los *circuli* aparecen como picos y los espacios intercirculi como valles. El algoritmo desarrollado se basa en calcular la media móvil de la densidad (línea negra punteada en la Figura 3) y explorar las desviaciones alrededor de esta media. Para identificar los *circuli* el algoritmo recorre la serie de datos correspondientes a los valores de la densidad (flechas negras en la figura). Cuando encuentra un conjunto de valores por encima de la media móvil busca el valor máximo entre ese conjunto de valores. Al píxel correspondiente a la densidad máxima dentro del grupo le asigna un número que lo identifica como *circuli* (círculos negros). El algoritmo continúa recorriendo la serie de datos hasta encontrar un nuevo valor por encima de la media móvil, entonces repite el proceso anterior. Al llegar al último valor de la serie de datos, todos los *circuli* encontrados a lo largo de la transecta y su posición quedan identificados.

Para identificar los *annuli* se utiliza un mecanismo semejante. Como se explicó más arriba los *annuli* se marcan con anterioridad en forma manual en las fotografías mediante una línea transversal al eje de la transecta. A los píxeles pintados de negro el procesador de imágenes le asigna el valor de densidad "0", apareciendo en el perfil como un valle profundo y claramente diferenciado de las marcas naturales de la escama. El algoritmo determina la posición de cada *annulus* sobre la base del primer píxel en cada uno de estos "valles".

Dado que cada píxel tiene asociada una distancia con respecto al punto inicial de la transecta, la distancia de un determinado *circulus* o *annulus* es estimada por la del píxel que lo identifica. La distancia entre dos *circuli* sucesivos se calcula como la diferencia entre la distancia al centro de la escama entre el *circulus* más alejado y el más próximo al centro de la escama.

En resumen, la planilla de cálculo analiza el perfil de densidades y permite calcular el número y posición de cada *annulus*, el número y posición de cada *circulus* y la distancia entre pares de *circuli*.

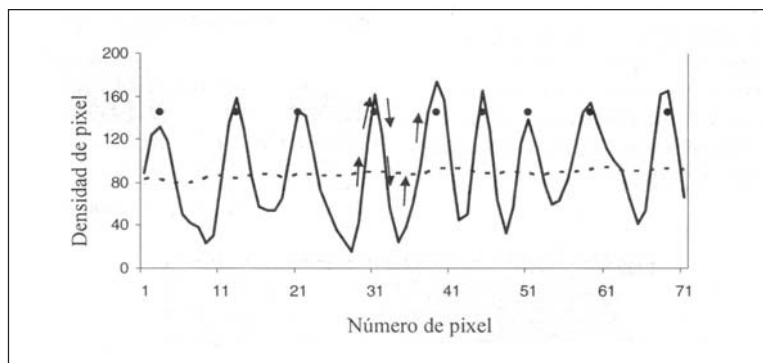


Figura 4. Representación esquemática de un perfil de densidades de imagen digital de una escama.

DISCUSIÓN

Las técnicas desarrolladas permiten efectuar conteos de *annuli* y *circuli*, como así también realizar todas las mediciones que permiten posicionar estas estructuras en las escamas, brindando la posibilidad de desarrollar una amplia gama de análisis referidos al crecimiento en peces. Los elementos utilizados están generalmente disponibles en un laboratorio típico (computadora y planilla de cálculo), pueden construirse a un bajo costo (prensa térmica de escamas), o pueden obtenerse en forma gratuita por medio de Internet. Los lectores de microfichas son cada vez menos utilizados por las bibliotecas y pueden obtenerse con relativa facilidad y a bajo costo. El

elemento más sofisticado utilizado es una cámara digital (costo U\$S 200-800). Las técnicas y protocolos aquí desarrollados ya están siendo utilizados por varios proyectos relacionados del Laboratorio de Salmónidos del Cenpat. A su vez, estas técnicas pueden adaptarse fácilmente a laboratorios que posean una cámara de video conectada a una lupa y a una computadora mediante una plaqueta gráfica.

DATOS TÉCNICOS

- La prensa térmica se fabricó a partir de una vulcanizadora de gomería, a la cual se le adaptó un termostato que permite mantener un valor de temperatura constante durante las impresiones.
- El lector de microfichas es semejante al utilizado en la mayoría de las bibliotecas (32X).
- Cámara de fotos digital (en este trabajo se utilizó una Sony Mavica, modelo MVC-FD95). Las fotografías se tomaron en un cuarto oscuro, con un tiempo de exposición = 0,4 segundos, apertura de diafragma = 11, utilizando la modalidad blanco y negro.
- Software específico para análisis de imágenes: Image J, Image Processing Analysis in Java y Scion Image corporation, USA, adquisición libre en <http://rsb.info.nih.gov/ij/> y www.scioncorp.com respectivamente.
- La planilla de cálculos y macros desarrollados para el conteo y medición de *circuli* y *annuli* puede obtenerse escribiendo un correo electrónico al primer autor.
- El programa Image J tiene ciertas ventajas respecto al Scion Image:
 - Permite trabajar con imágenes de formato JPG (formato en que generalmente se obtienen las fotografías digitales), mientras que en el Scion Image hay que hacerlo con imágenes TIFF, lo que requiere mayor espacio de memoria de almacenamiento.
 - El archivo de datos correspondiente al perfil de densidades tiene asociada la distancia de cada píxel mientras que en el caso del programa Scion Image este valor se obtiene mediante una conversión posterior en la planilla de cálculo.
 - Los datos obtenidos se pueden copiar desde la pantalla activa y pegar en la planilla de cálculo directamente. Utilizando el programa Scion Image es preciso generar un archivo adicional para guardar los resultados correspondientes a un perfil.
 - Operacionalmente ambos programas son semejantes.

AGRADECIMIENTOS

A Miguel Pascual por dirigir este trabajo y por el diseño de la planilla de cálculo.

BIBLIOGRAFÍA

- Endo, Yoshinori; Watarai, Osamu; Igarashi, y Mitsuru. 1998. Age determination of salmon (*Oncorhynchus keta*) using scale pattern analysis. *J. Sch. Mar. Sci. TechnolTokai. Univ.* 46: 1-15.
- Friedland, K. D. y R. E. Haas. 1994. Patterns of post-smolt growth and early maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Copenhagen-Denmark 22.
- Kato, T. 1996. Relationship between the growth of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) and the *circulus* number, scale and central plate radii. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* Japan 1996. 25: 1-15.
- Koo, T. S. Y. 1962 a. Age designations in salmon. pages. 37 - 48. In Ted S. Y. Koo, editor. Studies of Alaska red salmon. *Univ. Wash., Publ. Fish.*, N.s. 1.
- Lancelotti, J. 2002. Estudio de los patrones de crecimiento en trucha arco iris a partir del análisis de escamas. Seminario de Licenciatura. Universidad Nacional de La patagonia. 56 pp.