

# Un análisis de imagen por segmentación de la histopatología producida por la acrilamida en el pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Hernández C., Álvarez M <sup>\*1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Microscopia, Instituto Anatómico “José Izquierdo” Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, Caracas-República Bolivariana de Venezuela.1012.

**Resumen:** Los sistemas de análisis de imágenes han permitido la implementación de técnicas de histomorfometría para cuantificar con precisión las irregularidades arquitectónicas y la complejidad de las estructuras histológicas en condiciones normales, así como en situaciones de daño tisular inducido. El objetivo del trabajo fue cuantificar los efectos histológicos producidos por la acrilamida en el modelo de vertebrado *Danio rerio* adulto expuesto durante 8 días a la concentración de 0.85 mM de un alqueno como la acrilamida. Se aplicó un proceso de segmentación de imágenes a través del programa de dominio público ImageJ. Fiji, sobre preparaciones histológicas de tejido renal, intestinal y hepático, aplicando umbrales de intensidad y diseñando contornos alrededor de las áreas de interés ubicadas en imágenes máscaras binarias de 8-bit. Esta fue obtenida a partir de la transformación de la imagen original contrastada con hematoxilina y eosina. Los datos obtenidos fueron incorporados al programa estadístico GraphPad Prims. 7 para su cuantificación y representación gráfica. Los espacios internos de las Capsulas de Bowman en el tejido renal registraron un mayor tamaño promedio en comparación con el tejido control, mientras que en el tejido intestinal se registraron vacuolas citoplasmáticas de mayor tamaño promedio en comparación a las vacuolas registradas en el tejido hepático, con un valor de  $****p < 0,0001$ , altamente significativo en contraste con los respectivos controles. Concluimos que con la segmentación fue posible caracterizar a la histopatología inducida por la acrilamida como un efecto tejido-dependiente, resultando más sensible el tejido renal y el intestinal en comparación con el tejido hepático.

**Palabras claves:** Analisis de imagen, segmentación, acrilamida, toxicidad diferencial, pez cebra

**Abstract:** *An image analysis by segmentation of histopathology produced by acrylamide in the adult zebrafish (Danio rerio)*

Image analysis systems have allowed the implementation of histomorphometry techniques to precisely quantify architectural irregularities and the complexity of histological structures in normal conditions, as well as in situations of induced tissue damage. The aim of this work was to quantify the histological effects produced by acrylamide in the vertebrate model *Danio rerio* adults exposed for 8 days to the concentration of 0.85 mM of an alkene such as acrylamide. Segmentation was performed on histological preparations of renal, intestinal and hepatic tissue, through the use of the public domain program ImageJ Fiji, applying intensity thresholds and designing contours around the areas of interest located in binary 8-bit mask images. This was obtained from the transformation of the original image contrasted with hematoxylin and eosin. The data obtained were incorporated into the GraphPad Prims statistical program 7 for quantification and graphic representation. The internal spaces of the Bowman Capsules in the renal tissue registered a larger average size compared to the control tissue, while in the intestinal tissue cytoplasmic vacuoles of larger average size were recorded compared to the vacuoles recorded in the liver tissue, with a value of  $****p < 0,0001$ , highly significant in contrast to the respective controls. We conclude that with segmentation it was possible to characterize the histopathology acrylamide-induced as a tissue-dependent effect, with renal and intestinal tissue being more sensitive compared to liver tissue.

**Keywords:** Image analysis, segmentation, acrylamide, differential toxicity, zebrafish.

## Introducción

La histopatología como campo de investigación se ha ido enriqueciendo con la incorporación de los sistemas automatizados de análisis de imágenes de células y tejidos, lo que ha incrementado la atención y la conciencia de que la patología científica y el diagnóstico requieren de enfoques novedosos para realizar análisis cuantitativos (Griffin y Treanor, 2017; Aeffner et al, 2019). Los sistemas de análisis de imágenes han permitido incorporar técnicas de histomorfometría para cuantificar con precisión las irregularidades arquitectónicas y la complejidad de las estructuras histológicas en condiciones normales, así como en situaciones de daño tisular inducido (Wienert et al, 2012). Así, la expresión numérica de la arquitectura nuclear y/o citoplasmática, ha proporcionado una mejor información para comprender a los sistemas biológicos, así como también conocer la posible progresión de algunas patologías a través de suministrar resultados cuantitativos y un valor agregado al análisis cualitativo de la clásica caracterización histológica manual (Xing F et al, 2019). El objetivo del trabajo fue realizar un análisis de imágenes por segmentación de la histopatología en peces cebras adultos (*Danio rerio*) sometidos durante 8 días a la concentración de 0.85 mM de un alqueno tipo-2 como la acrilamida (ACR). La ACR, es un agente químico de procesado (Masson et al, 2007), altamente tóxico (Hernández et al, 2019., Lopachin, 2012), por lo que en las últimas décadas ha sido considerada como un agente contaminante de alto riesgo y un verdadero problema de Salud Pública, ya que su presencia en productos de consumo alimenticio masivo, ya ha sido reportada (Semla et al, 2017); sin embargo, la cuantificación de las señales de su toxicidad a nivel de la microarquitectura tisular inducidas por este agente en modelos experimentales, hasta donde se conoce ha sido poco considerada. Cabe destacar que el pez cebra (*Danio rerio*) es un teleosteo de pequeño tamaño, natural de las regiones tropicales y con una alta homología genómica con el humano (Goldsmith y Jobin, 2012). Esta característica, particularmente a nivel de tejidos como el renal, el intestinal y el hepático, entre otros, hacen que el pez cebra sea un modelo atractivo y prometedor para múltiples bioensayos debido a la facilidad de manejo y la relación costo-beneficio en comparación con otros modelos de experimentación (Cornet et al, 2017). La susceptibilidad de los tejidos en cuestión a la acción de agentes tóxicos, ha hecho que el pez cebra adulto sea utilizado para pruebas de toxicidad-protección con agentes naturales como posibles candidatos fármacos hematoprotectores (Alvarez et al, 2017a; Alvarez et al, 2017b).

## Materiales y metodos

### *Obtención y preparación de los peces.*

Los peces cebras adultos de cepa silvestre (wt) fueron obtenidos de alevines desarrollados y mantenidos bajo patrones adaptados a las condiciones del laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Los peces fueron acondicionados en acuarios de vidrio de 120 cm de largo, 50 cm de profundidad y 30 cm de alto, provisto de filtro interno de carbón activado y un aireador para la oxigenación del agua, a temperatura de 26°C y pH 7,2, y alimentados, tres veces al día, con alimento en hojuelas para peces (Kantal S.A. Venezuela).

### *Tratamiento Acrilamida.*

Los bioensayos se realizaron por triplicado. Grupos de 7 peces adultos fueron sometidos durante 8 días a una concentración tóxica de ACR de 0,85 mM, estimada previamente. Cabe destacar que la concentración de 0,85 mM ha sido obtenida a partir de una concentración madre de 7 mM

\*e-mail: alvarezmenator@gmail.com

incluida por otros autores (Komoike y Matsuoka, 2019) dentro del rango de toxicidad de la ACR y generadora de adupto de hemoglobina. Luego de una serie de ensayos con distintas concentraciones en un rango entre 0.21 mM y 7 mM se obtuvo como  $CT_{50} = 0,85 \pm 0,18$  mM. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los peces fueron sacrificados de acuerdo a las normas del comité de bioética de la institución y siguiendo anotaciones de otros autores (Monte y Zoltán, 2012).

**Procesamiento de muestras.**

Los diferentes órganos, particularmente riñón, intestino e hígado, fueron extraídos y fijados en paraformaldehído frío al 4% durante 24 horas y procesados para ser incluidos en parafina. Los respectivos bloques de las muestras, controles y tratadas con ACR, fueron cortadas en secciones histológicas de 5µm, para ser sometidas a las tinciones con Hematoxilina y Eosina.

**Adquisición de las imágenes**

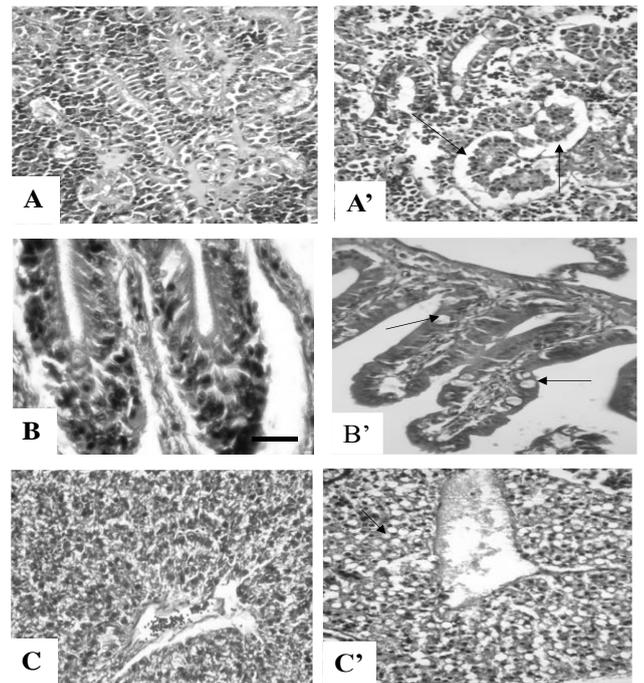
Las imágenes digitales de los cortes histológicos seriados de muestras controles y tratadas con ACR, fueron adquiridas a través de un sistema de captura digital, Capture IC.22. Imaging Source, incorporado a un Microscopio Olympus BX50, bajo objetivo 10x y 100x de inmersión en número de 5 cinco imágenes por corte.

**Segmentación**

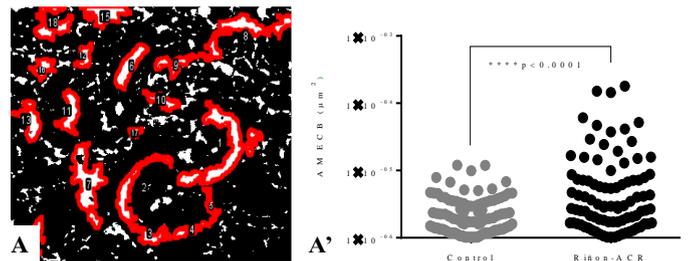
El procesamiento de segmentación utilizado consistió en la aplicación del umbral de color a la imagen original teñida con hematoxilina y eosina, para luego realizar la transformación del producto obtenido, en una imagen binaria de 8-bit, blancos-grises-negro, o mascara. Sobre esta imagen binaria se delimitaron las regiones de interés; particularmente; el Espacio de la Capsula de Bowman (ECB), en el tejido renal, así como las regiones correspondientes a los espacios vacuolares en el tejido intestinal y hepático. Esto fue realizado a través de la definición de bordes o contornos alrededor de estas áreas, mediante el uso de gradientes de escala de grises, aplicando umbrales de intensidad de pixeles, para luego estimar el Área Media del Espacio de la Cámara de Bowman (AMECB) y el Área Vacuolar Media (AVM). Para todo ello se procedió a través del menú del programa ImageJ Fiji. Los datos numéricos en µm<sup>2</sup> fueron obtenidos y analizados con un test no paramétrico y fueron representados en una gráfica de media geométrica de eje lineal de acuerdo al Programa estadístico GraphPad Prism 7.0.

**Resultados**

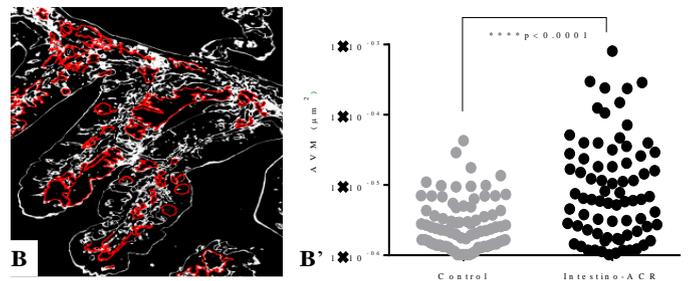
El contraste entre las imágenes binarias de los distintos tejidos renal, intestinal y hepático control (Fig.1A, 1B, 1C) y los respectivos tratados con ACR (Fig.1A', 1B' y 1C'), puso en evidencia, un significativo incremento en los ECP, en el tejido renal, así como un incremento de vacuolización en el tejido intestinal y el hepático. La selección por contorno de las áreas de interés en el tejido renal, delimitada por el contorno de fuertes líneas rojas en la denominada mascara de la imagen original (Fig.2A), permitió cuantificar la mayor área entre los ECB, al comparar los valores de AMECB de los controles y tratados (Fig.2A'), con diferencias cuantitativas y altamente significativas \*\*\*\*p<0,0001. Por su parte, la selección de las áreas de interés en tejido intestinal, delimitada igualmente por el contorno de fuertes líneas rojas en la denominada mascara de la imagen original (Fig.3B), permitió mostrar una mayor presencia de vacuolas citoplasmáticas en la región de los enterocitos de las vellosidades de dicho tejido al contrastar los valores de AMV de controles y tratados (Fig.3B'), con diferencias cuantitativas e igualmente estadísticamente significativas \*\*\*\*p<0,0001. Finalmente, la selección de las áreas de interés en el tejido hepático, visualizada en la denominada mascara de la imagen original (Fig.4C), permitió mostrar una mayor presencia de vacuolas citoplasmáticas en dicho tejido al comparar los valores de AMV control y tratado (Fig.4C'), con diferencias cuantitativas e igualmente altamente significativas \*\*\*\*p<0,0001.



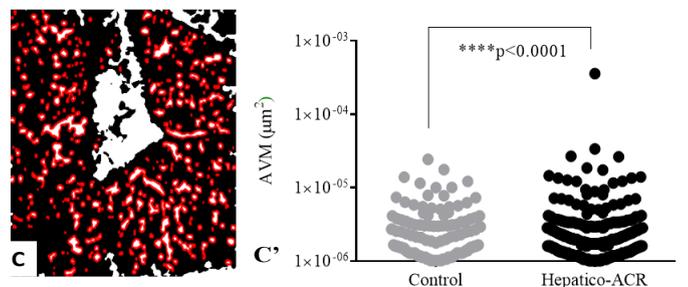
**Figura 1:** Imágenes transformadas 8-bit de cortes de tejido renal, intestinal y hepático de pez cebra adulto controles (A; B; C) y tratados con ACR (A', B', C'). Las imágenes originales teñidas con H&E. Se destaca en riñón mayor espacio de la Capsula de Bowman (ECB) (flechas), así como gran presencia de vacuolas en los tejidos intestinal y hepático (flechas). Barra = 1,45 µm.



**Figura 2:** Segmentación y delimitación de contornos de los espacios de la Capsula de Bowman (ECB) en el tejido hepático tratado con ACR. Mascara del corte original (A). Cuantificación del Área Media de los ECB (A').



**Figura 3:** Segmentación y delimitación de contornos de vacuolas en el tejido intestinal de pez cebra adulto tratado con ACR Mascara del corte original (B) Cuantificación significativa de las diferencias del Área Vacuolar Media (AMEV) (B').



**Figura 4:** Segmentación y delimitación de contornos de vacuolas en el tejido hepático de pez cebra adulto tratado con ACR Mascara del corte original (C). Cuantificación significativa de las diferencias del Área Vacuolar Media (AMEV) (C').

## Discussion

Con los datos obtenidos en este estudio se puso en evidencia que efectivamente la acrilamida causa efectos adversos en los tejidos analizados; renal, intestinal y hepático de pez cebra adulto, demostrado principalmente a través de la evidente pérdida de la microarquitectura de estos tejidos, probablemente debido a un aumento significativo de la peroxidación lipídica, disminución de los niveles de glutatión y disminución de las actividades de la catalasa y la superóxido dismutasa, principales mecanismos de acción de la acrilamida que han sido reportados por otros autores (Mohamed, 2012). Sin embargo, no solo se verificó la acción tóxica de la acrilamida sobre estos tejidos particulares, sino que la cuantificación del daño tisular, obtenida a través del análisis de imágenes binaria en escala de grises, aportó un valor agregado al análisis cualitativo. Esto a través de la incorporación de datos numéricos, con cifras estadísticamente significativas, que permitieron establecer la expresión; AMECB-Riñón >AVM-Intestino >AVM-Hígado. De dicha expresión, se pudo concluir que el daño tisular ejercido por la ACR podría ser un efecto tóxico con características de tejido-dependiente, estableciéndose así que los tejidos renal y hepático podrían ser caracterizados como los tejidos con una mayor sensibilidad hacia la acción de la ACR, en comparación con el tejido hepático; la existencia de tejidos con una mayor o menor sensibilidad a la ACR, hace posible establecer características que hasta donde conocemos no habían sido claramente definidas. Por otra parte, cabe destacar que el proceso de segmentación utilizado como protocolo para el análisis de imágenes, resultó un método simple para la cuantificación de cambios en la microarquitectura tisular, utilizando solo la denominada “imagen máscara” correspondiente a la expresión de una huella de la imagen original, con una alta precisión y validación como ha sido reportado en otros estudios histopatológicos (Xu J et al, 2011). Dicho proceso de segmentación, ha sido caracterizado como una de las etapas de relevancia en el análisis de imágenes de microscopía, ya que permite colocar las áreas de interés en un primer plano, diferenciándolas de las regiones de bajo interés, que quedan incrustadas en zonas de píxeles de fondo. Este umbral de intensidad de píxeles es definido automáticamente mediante la función de umbral del software de código abierto ImageJ Fiji, que utiliza información mínima y detecta las regiones de interés independientemente de su forma (Russell RA, 2009). Dicha característica permite la aplicación de este procedimiento de segmentación en un amplio espectro de estructuras histológicas en condiciones normales, así como en condiciones de daño tisular inducido, ya que evita el sesgo de la segmentación independiente de las características de la forma. En este contexto cabe destacar que la segmentación de las imágenes digitales de los tejidos analizados de pez cebra adulto, permitió incorporar datos cuantitativos como un valor agregado al análisis cualitativo del daño tisular inducido por la ACR. Con dicha incorporación se podría establecer un posible índice del grado histopatológico para la acción de este alqueno tipo-2, con el cual poder realizar un seguimiento progresivo de la toxicidad de este importante agente químico de procesado.

## Agradecimientos

A la Licenciada Lourdes Perdomo por el trabajo de histotecnología realizado. Al Dr. Alexis Rodríguez Acosta y a la Licenciada Amanda Álvarez por la revisión del texto.

## Bibliografía

1. Aeffner, F., Zarella, M. D., Buchbinder, N., Bui, M. M., Goodman, M. R., Hartman, D. J., Lujan, G. M., Molani, M. A., Parwani, A. V., Lillard, K., Turner, O. C., Vemuri, V., Yuil-Valdes, A. G., & Bowman, D. Introduction to Digital Image Analysis in Whole-slide Imaging: J Pathol Inform. 2019; Vol 24 (10):15-20.
2. Alvarez M, Guadarrama R, Arias M, Perdomo L, Navarro. Interacción fluoruro de sodio con *Moringa oleifera* en sangre periférica de pez cebra *Danio rerio*. RETEL. 2017a; Vol 49: 38-49.
3. Álvarez M, Vanessa G, Arias M, Perdomo L, Navarro. Acrilamida y *Amaranthus dubius* L en células sanguíneas de pez cebra *Danio rerio*. RETEL. 2017b; Vol 49: 28-37
4. Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, Dyballa S, van Doornmalen E, Rutjes H, Savy T, D'Amico D, Terriente J. Ze GlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. Int J Mol Sci. 2017; Vol 18 (4):864-882.
5. Goldsmith JR, Jobin C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:817341.
6. Griffin J, Treanor D. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? Histopathology. 2017; Vol 70 (1):134-145.
7. Hernández, C, Álvarez, M, Perdomo, L, Rodríguez-Acosta. Hemotoxicity activity caused by acrylamide on the peripheral erythrocytes of Zebrafish (*Danio rerio*). RETEL. 2019; Vol 59: 64-75.
8. Komoike, Yuta, and Masato Matsuoka. “In vitro and in vivo studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish.” Journal of hazardous materials. 2019; Vol. 365: 430-439.
9. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. Environ Health Perspect. 2012; Vol 120 (12):1650-1657.
10. Stephen J. Powers, Donald S. Mottram, Andrew Curtis & Nigel G. Halford. Acrylamide levels in potato crisps in Europe from 2002 to 2016. Food Additives & Contaminants: Part A. 2017; Vol 34 (12): 2085-2100.
11. Mohamed Sadek K. Antioxidant and immunostimulant effect of Carica papaya linn. Aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. Acta Inform Med. 2012; Vol 20 (3):180-185.
12. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and Euthanasia in zebrafish. ILAR J. 2012; Vol 53 (2):192-204.
13. Russell RA, Adams NM, Stephens DA, Batty E., Jensen K., Freemont PS Segmentación de imágenes de microscopía de fluorescencia para el análisis cuantitativo de la arquitectura nuclear celular. Biophys J. 2009; Vol 96: 3379-3389.
14. Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. Physiol Res. 2017; Vol 66 (2):205-217.
15. Wienert S, Heim D, Saeger K, Stenzinger A, Beil M, Hufnagl P, Dietel M, Denkert C, Klauschen F. Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. Sci Rep. 2012; Vol 2: 503-509
16. Xing F, Xie Y, Shi X, Chen P, Zhang Z, Yang L. Towards pixel-to-pixel deep nucleus detection in microscopy images. BMC Bioinformatics. 2019; Vol 20 (1):472-484.
17. Xu J, Janowczyk A, Chandran S, Madabhushi A. A high-throughput active contour scheme for segmentation of histopathological imagery. Med Image Anal. 2011; Vol 15 (6):851-862.