

Escuela de Verano – Práctico 11- Segmentación, Forma y Topología

Enero 2013, Mauricio Cerda

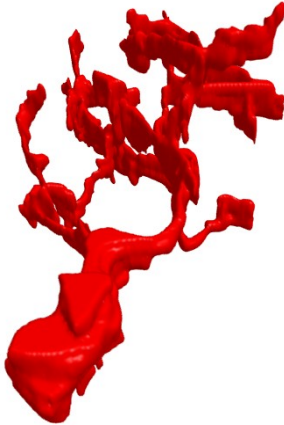


Figura 1. Parapineal neurons obtained from focal electroporation in the Tg(foxd3:GFP) zebrafish. Surface mesh we obtained after manual segmentation (Palma et al., unpublished data).

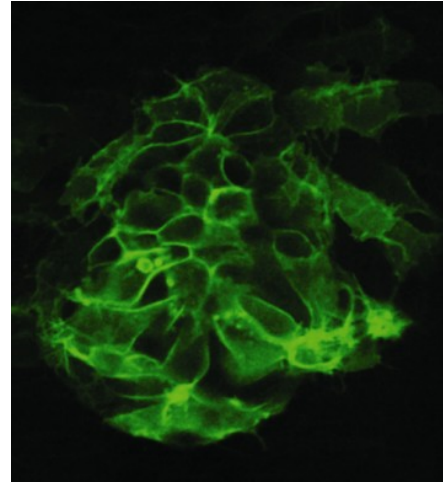


Figura 2. Pineal complex from transgenic zebrafish *flh:EGFP* Lemus et al. 2012.

El objetivo de este trabajo práctico es realizar una caracterización de dos estructuras en pez cebra. Una primera estructura a describir son neuronas del órgano parapineal, donde buscaremos caracterizar el árbol dendrítico. Luego de esto estudiaremos cómo se origina este órgano a partir de un grupo de células del complejo pineal, describiendo la evolución celular individual y grupal.

1. **Segmentación 3D.** Sobre los stacks de neuronas (carpeta C:\RSI\SummerSchool2013\neurona1\568nm_equalized\ y neurona2\568nm_equalized\), se aplicarán distintos filtros para generar imágenes binarias (blanco/negro) que representen a las regiones de interés (blanco) sobre el fondo (negro). Para ello utilizaremos el software OpenSource ImageJ, con los plugin: "Skeleton 3D" e "ImageJ 3D Viewer".
 - a) El stack tiene un ruido de fondo, redúzcalo usando un filtro de mediana en el menú "Process/Filters/Median".
 - b) La estructura de la neurona tiene diferentes irregularidades que pueden dificultar la segmentación, utilice un filtro pasa bajos (Gaussiano) para reducir este problema y lograr una objetos más uniformes usando el menú "Process/Filter/Gaussian Blur 3D".
 - c) En el stack hay objetos brillantes que no corresponden a la neurona a analizar, para evitar este problema realice un proyección en Z de su stack ("Image/Stacks/Z Project"), y cree utilizando la herramienta de

polígono un ROI, aproximado al contorno de la neurona. Para ello, cree primero una selección con la opción "Edit / Selection / Create Selection". Mantenga esta ventana abierta, y prosiga con el stack donde aplico el filtro Gaussiano.

- d) El siguiente paso es binarizar el stack, originalmente en escala de grises, mediante la opción "Image/Adjust/Threshold". Verifique tener seleccionada la opción "Dark background". Esta opción permite obtener el fondo negro y el ROI blanco. En la ventana de "threshold" seleccione un umbral y presione "Apply".
- e) Antes de proseguir con el stack, utilizaremos la selección creada en el paso (c). Para ello, teniendo marcado el stack, seleccione "Edit / Selection / Restore Selection". Ahora invierta la selección ("Edit / Selection / Make Inverse") y pinte de negro ("Edit / Fill").
- f) Utilice los filtros binarios para rellenar cavidades "Process / Binary / Fill Holes" y "Process / Binary / Open", para mejorar la segmentación según estime conveniente.
- g) Visualice la estructura 3D utilizando el plugin ImageJ 3D Viewer ("Plugins / 3D / ImageJ3DViewer"), y seleccione la opción de visualización "Surface".

2. **Parámetros 3D.** Luego de realizar la segmentación, buscamos calcular el *skeleton* de la estructura para describirla en términos de número de nodos, cantidad de bifurcaciones, y largo dendrítico total. Para ello siga los siguientes pasos:

- a) Primero guarde su stack binario bajo otro nombre, pues el skeleton reemplazará el stack original segmentado. Posteriormente en el stack 3D, calcule el skeleton ("Plugins/Skeleton/Skeletonize 2D/3D"), esta operación puede demorar algunos minutos. Visualice el resultado análogamente al paso 1g.
- b) Calcule los parámetros de la estructura ("Plugins/Skeleton/Analyze Skeleton"), seleccionando la opción "Show detailed info". Esta opción entregará un stack 3D con voxeles de colores indicando si estos pertenecen a un segmento, bifurcaciones o voxeles terminales. De la misma manera, obtendrá una ventana "Results"

P1: En la tabla de resultados, hay múltiples skeletons reportados. Observando el skeleton resultante en 3D ¿A qué atributo este problema?, cómo podría solucionarlo? Corrija su segmentación hasta obtener sólo algunos skeletons como resultado. _____

P2: Reporte los parámetros de número de nodos, cantidad de bifurcaciones, y largo dendrítico total y realice el mismo trabajo para la neurona 2, ¿Qué diferencias se observan entre ambas estructuras?, ¿podría esto entregar indicios de la ubicación de la neurona en el órgano parapineal?, _____

3. **Visualización.** En este ejemplo, la segmentación ya se encuentra disponible para doce tiempos (26h y 38h). Un primer paso en la cuantificación es visualizar el volumen completo a partir de un conjunto de imágenes. Para ellos abra el stack “_stack.sav” (carpeta C:\RSI\SummerSchool2013\021210_flh_TL_chicas\) y visualice el modelo de esferas en IDL (“3D Balls Model”), el modelo de ejes principales (“3D Principal Axis (obj)”) y el modelo de surface 3D (“3D Surface Mesh Model”) . Recuerde que:

- a) En la ventana **s_Stack** puede cargar sesiones de trabajo (archivos “.sav”) correspondientes a distintos experimentos. Utilizando el botón “**View (off)**”/“**View (on)**” se activa/desactiva la ventana de imagen **s_2DView**.
- b) Seleccionando un tiempo, puede abrir la ventana de segmentación (“Analyse/ Segmentation Windows”) y acceder desde **s_Seg** usando el menú “Analyse “->”ROI Object Window” a la ventana de parámetros/visualización.
- c) Pueden construir modelos gráficos 2D/3D usando el botón “Add Graphic Model |->” en la ventana de visualización y seleccionando un modelo. Para visualizarlo el (o los) modelos gráficos seleccione el botón “X-Axis” y luego el menú “|-> Object Param Histogram / X-Data Histogram Window “.

P3: ¿Qué modelo grafico, de los 3 indicados, es el más conveniente para representar estas células?

4. **Parámetros para poblaciones.** A partir del mismo stack del paso anterior, buscamos saber si existe alguna diferencia significativa en 4 parámetros: elongación de las células, volumen de las células, compactación (dispersión de centroides), y alineación (de ejes principales). A continuación se indica cómo recuperar cada parámetro dentro de IDL. Recuerde que:

- a) El parámetro de elongación se puede calcular con el ROI-Param 3D “3D Object Moments of Morphology”, en el sub-parámetro “3D ev Elongation”.
- b) El parámetro de volumen se puede calcular desde el ROI-Param 3D “3D Object Volume”, en el sub-parámetro “3D Volume [xA^3]” (en micrones^3).
- c) El parámetro de dispersión de centroides se puede calcular del ROI-Param 3D “3D Object Moments of Morphology”, en el sub-parámetro “3D center Distance”.
- d) El parámetro de alineación del primer eje principal se puede calcular del ROI-Param 3D “3D Object Moments of Morphology” , en el sub-parámetro “3D Alignment with Major Axis”.

P4: Al comparar los dos tiempos, ¿Qué parámetros se mantienen similares y cuales varían?
