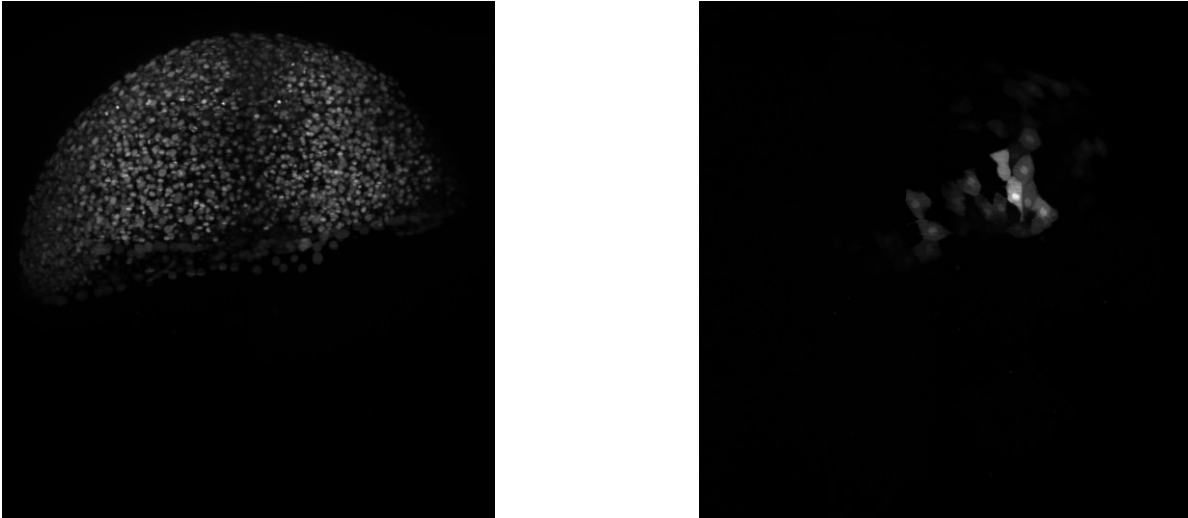


## Escuela de Verano – Práctico 12- Tracking

Enero 2013, Víctor Castañeda, Mauricio Cerda



**Figura 1.** Movimientos celulares durante la gastrulación en pez cebra. En la figura izquierda se muestran los núcleos de cada célula expresando H2A-mCherry, en la figura derecha se muestra las células de la EVL dorsal (dEVL) en el transgénico *Tg(crestin:GFP)*. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía *light sheet multi-view*. Gentileza de Eduardo Pulgar, Philipp Keller y Miguel Concha (material no publicado).

***El objetivo de este práctico es cuantificar parámetros de migración celular durante la gastrulación en pez cebra. Primero, los núcleos serán segmentados con la finalidad de obtener variables del movimiento celular de las dEVL usando tracking basado en distancia. Luego se identificarán patrones de movimiento aparente usando flujo óptico 2D.***

1. **Segmentación 2D.** Sobre el stack 2D, realizaremos primero una segmentación usando la idea de que los núcleos son una región localmente más brillante y que el canal 2 permite seleccionar un subconjunto de núcleos en el canal 1. Cargue el stack de imágenes `_stack0.sav` (Options->OpenStack->"C:\RSI\SummerSchool2013\lightsheet\_epulgar") y realice las siguientes operaciones para obtener una primera aproximación a la segmentación de los núcleos.
  - a) Desde el menú seleccione "Analyze->Segmentation Window".
  - b) Presione el botón "View (off)" para visualizar las imágenes.

- c) Aplique un umbral de Ostu para el canal 0 (células dorsales de la EVL). Para ello presione: “Add Segmentation Method -> Single Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_ThresholdOtsu”
- d) Aplique un umbral de segmentación para los núcleos de las células. Para esto agregue filtros en el cluster 0, del canal 1 siguiendo los siguientes pasos:
  - i. Seleccione “Add Segmentation Method-> Single Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_1stDeviationKernel” y ajuste el parámetro “Pixel Radius” a 7 pixeles.
  - ii. Seleccione “Add Segmentation Method -> Single Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_Threshold”
  - iii. Seleccione “Add Segmentation Method -> Single Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_OpenClosedAdvanced”, usando los parámetros “Open 1.0” y “PixelNeighbor 2.0”.
  - iv. Por último, seleccione “Add Segmentation Method -> Single Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_SizeSelect”, con las opciones “<= 120 y >=30, Exclusive 1.0”.
- e) Fusione la segmentación de los núcleos de las células (canal 1) con lo las células (canal 0). Para esto agregue un cluster (Add new Cluster) en el canal 0. Luego seleccione “Add Segmentation Method -> Multiple Image Seg. Method -> c\_sImageFilter\_LogicalFilter” con la opción “1st\_time” deseleccionada, “1st\_channel=0”, “1st\_cluster=0”, con “2nd\_time” deseleccionada, “2nd\_channel=1”, “2nd\_cluster=0” y el último parámetro seleccionado en 2.0 indicando una operación lógica AND entre dos clusters. Agregue un filtro “C\_OpenCloseAdvanced” para eliminar pequeñas impurezas (con las opciones Open y pixel neighbor 2.0).

**P1: ¿Qué problemas tiene la segmentación realizada?, ¿puede Ud. seguir visualmente en el tiempo los núcleos del canal 2 en el canal 1 (núcleos)?**

- 
2. **Tracking 2D.** Luego de realizar la segmentación, realizaremos el seguimiento de los núcleos de las células usando tracking 2D basado en distancia. Para ello abra el stack de imágenes ya segmentadas que se le provee en el archivo “\_stack2\_.sav” (Options->OpenStack->”C:\RSI\SummerSchool2013\lightsheet\_epulgar”), luego:
    - a) Abra la ventana de segmentación “Analyze -> Segmentation Window”, luego la ventana de ROI’s en “Analyze -> ROI Object Window”, y la ventana de tracking en “Analyze -> ROI Track Window”
    - b) Agregue el parámetros que describe las trayectorias, que serán utilizados para seleccionar algunas trayectorias en “Add ROI-Parameter Object-> Add 2D ROI Parameter Object -> C\_sROIParam\_ObjTrackParameters”.
    - c) En la ventana de ROI’s seleccione el sub-parámetro “Track VSL”.

- d) Ahora visualizaremos las trayectorias coloreadas siguiendo el parámetro VSL. Para ello, agregue el modelo grafico de visualización de trayectorias con “Add Graphic Model-> Add 2D Graphic Model -> 2D Track Path”.
- e) Active la visualización con la opción “X-Axis |-> Object Param Histogram -> X-data Histogram Window”.
- f) Ahora seleccionaremos las 5 trayectorias más largas para visualizar mejor los datos. Para esto, active el slider 1 (rojo) en la ventana “s\_Histogram” presionando click-derecho, luego “Options -> Slider 1”. En el histograma seleccione las 5 primeras trayectorias arrastrando el mouse de derecha a izquierda.
- g) Para visualizar mejor, eliminaremos todas las trayectorias salvo las 5 seleccionadas. Esta operación se realizar usando el menú “Parameters -> Apply Selected Parameter Filter” y repitiendo la activación de la visualización del paso e).

**P1: Dados los parámetros de tracking, ¿Qué trayectoria promedio tiene las células dorsales de la EVL?, ¿Qué velocidad instantánea es la más alta reportada (VCL)?, ¿Qué puede concluir?**

---

---

**P2: El tracking funciona correctamente para algunas trayectorias, ¿qué problema ocurre en el resto de las células que pertenecen a las dEVL y que no aparecen como trayectorias largas?**

---

---

3. **Flujo óptico.** En este ejemplo, la segmentación ya se encuentra disponible en el stack “\_stack3\_sav” (“C:\RSI\SummerSchool2013\lightsheet\_epulgar”), y buscamos identificar grupos de células con movimientos con una orientación diferente. Para ello, calcularemos primero flujo óptico de algunos pares de imágenes y mediremos la orientación del movimiento. Para esto, siga los siguientes pasos:

- a) Seleccionando un tiempo, puede abrir la ventana de segmentación (“Analyse/ Segmentation Windows”). Los parámetros de los diferentes cluster ya se encuentran configurados, pero Ud. deberá seleccionar cada tiempo para generar los archivos de resultados “C:\RSI\SummerSchool2013\lightsheet\_epulgar\\_of\hs\_ms” .
- b) Repita el paso anterior para los tiempos: 0, 50, 100, y 150. Guarde el resultado para referencia posterior con un foto de pantalla.

**P3: Respecto a la ventana de flujo óptico (ventana con flechas en diferentes colores), ¿presentan los núcleos un campo vectorial uniforme? De no ser así, ¿a qué variación en las imágenes lo puede atribuir?**

---

---

4. **Identificación de grupos.** Ya realizada la segmentación y calculado el flujo óptico haremos histogramas de la orientación de movimiento de cada pixel segmentado. Para esto, siga los siguientes pasos:

- a) Abra el archivo matlab "C:\RSI\SummerSchool2013\lightsheet\_epulgar\\_of\ analisisDireccion.m". Ejecute el programa (botón verde), esto entregara un gráfico de roseta (histograma angular) del movimiento de los pixeles segmentados para un cierto tiempo. Obtenga 4 graficos para los tiempos 0, 50, 100 y 150, cambiando el parámetro "time" dentro del script matlab. Guarde los resultados.
- b) Usando imageJ, determine el punto de la imagen que definirá los cuadrantes superior e inferior, y anótelos en la variable "cutPosition", por ejemplo cutPosition = 500. Repita el paso anterior, notar que ahora se obtienen 2 graficos por tiempo correspondiente a la parte superior e inferior de la imagen.

**P4: En el primer gráfico de roseta, ¿cuántos grupos diferentes existen?, Al comparar con el mismo gráfico realizando una división en 2 cuadrantes, ¿cambia el resultado?, ¿cómo se podría explicar?**\_\_\_\_\_

---

---

**P5: ¿Qué tipo de movimientos morfogénéticos de la gastrulación de pez cebra logra identificar? ¿Estos movimientos diferentes ocurren de manera simultanea o pueden ser separables temporalmente?. Identifique las regiones del embrión donde estos movimientos ocurren.**

---

---