

Cómo extraer una región de interés en un canal mediante segmentación en otro canal guía *

Mariel Rosas

Daniel Prieto

Depto. de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Este documento provee un método para obtener datos de un canal, segmentando una estructura anatómica en otro, a partir de datos multidimensionales de microscopía confocal. Para ello realizamos una segmentación semiautomática con TrakEM2.

Keywords: confocal, microscopía, TrakEM2, segmentación

Introducción

A menudo debemos extraer información de una estructura que podemos reconocer anatómicamente con un marcador, pero el dato que queremos extraer se encuentra en otro canal, donde no podemos delimitar estructuras (Fig. 1). El problema es sencillo cuando se trabaja con un único plano, pero cuando se trabaja con múltiples planos y canales el procesamiento manual se vuelve inviable. Dentro de la aplicación de FIJI(Schindelin et al. 2012) dado que en la sección de TrakEM2(Cardona et al. 2012) para trabajar con imágenes de varios canales hay seguir una serie de pasos para poder separar una región interés pero seleccionando un área de otra imagen, se hizo este material de apoyo para poder realizarlo. En este caso utilizamos un grupo de imágenes apiladas (diferentes planos en el eje z) tomadas en un microscopio laser confocal. Los preparados fueron marcados con Faloidina conjugada a un fluorocromo para segmentar una región determinada de interes, y luego recuperar la misma región en un segundo (aunque pueden ser mas) canal. El segundo canal, en nuestro caso, esta marcado con anticuerpos anti-histona H3 fosforilada, corresponde a células proliferantes.

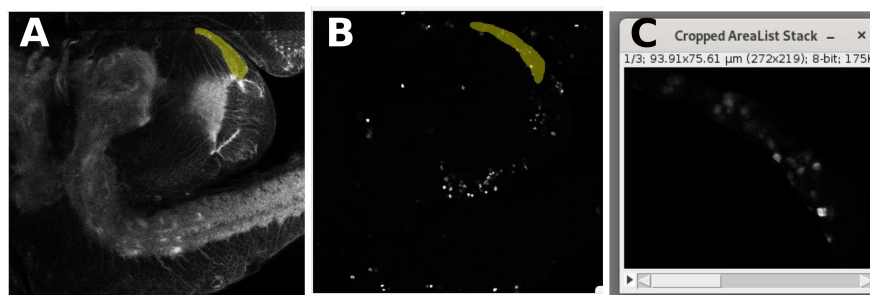


Figure 1: A. Canal utilizado para segmentar. B. Canal de interés. C. volumen segmentado resultante en el canal de interés.

*Replication files are available on the author's Github account (<http://github.com/danielprieto>). **Current version:**2.1; **Correspondence:** marielrosasaidaa@gmail.com, dprieto@fcien.edu.uy. This document has been written in Rmarkdown using the template designed by Steven Miller available at <https://github.com/svmiller/svm-r-markdown-templates>

Metodo

Si tenemos archivos con stacks multicanal, conviene separar los canales y guardarlos por separado. Sugerimos utilizar el formato OME-TIFF, y una nomenclatura conveniente.

1. Para elegir las (2) pilas de imágenes a segmentar: **File>Open>archivo en OME-TIFF**.
2. Para entrar a TrakEM2: **File>New>TrakEM2**, aquí aparecerá un cuadro para elegir donde guardar el archivo.
3. Ya dentro de dicha sección se hará **CLICK DER** sobre la imagen negra: **>Import >Stack**, se elegirá el canal que se quiera usar como guía de selección en el cuadro emergente (Fig.2) presionando: **Ok > Ok> Yes**.

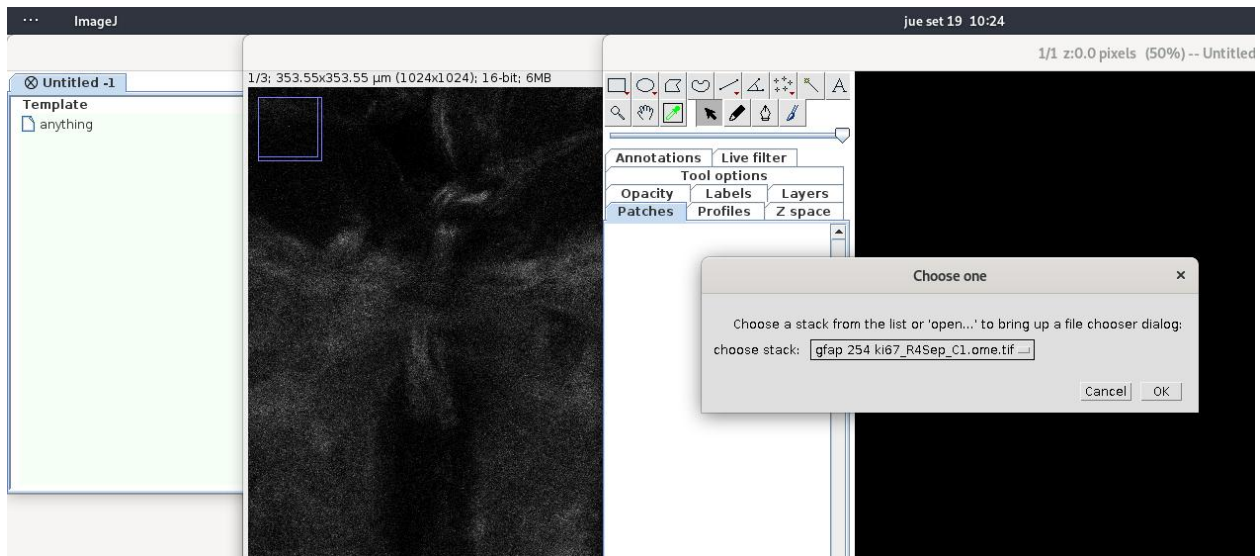


Figure 2: Cuadro emergente para seleccionar el canal de guía.

4. Seleccionar en Anything CLICK DER > **Add new chid** > **Area_list**, y sobre la ventana de Project Objects CLICK DER > **New anything** > **New area_list** (Fig.3).

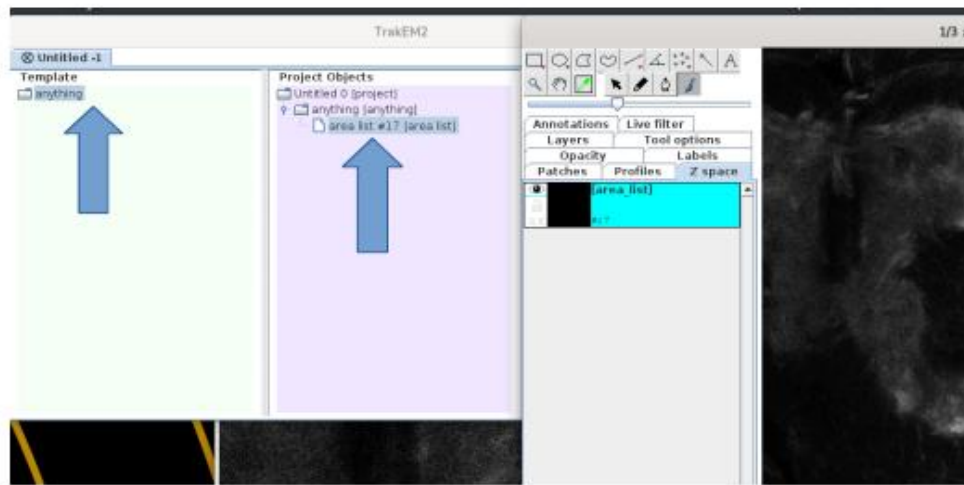


Figure 3: Las flechas celestes muestran el cuadro emergente de TrakEM, con las ventana de Anything (izq) y la de Project Objects (der).

5. Se volverá a la pantalla inicial y se importará el canal (o canales) de interés, con CLICK DER > **Import** > **Stack**, siempre en el Patches. Aparecerá un cuadro emergente (Fig.4) para elegir dicho canal, presionar: **OK** > **OK** > **YES**. En Patches tiene que quedar en la posición 1 en todas las capas la imagen que se usará como guía.

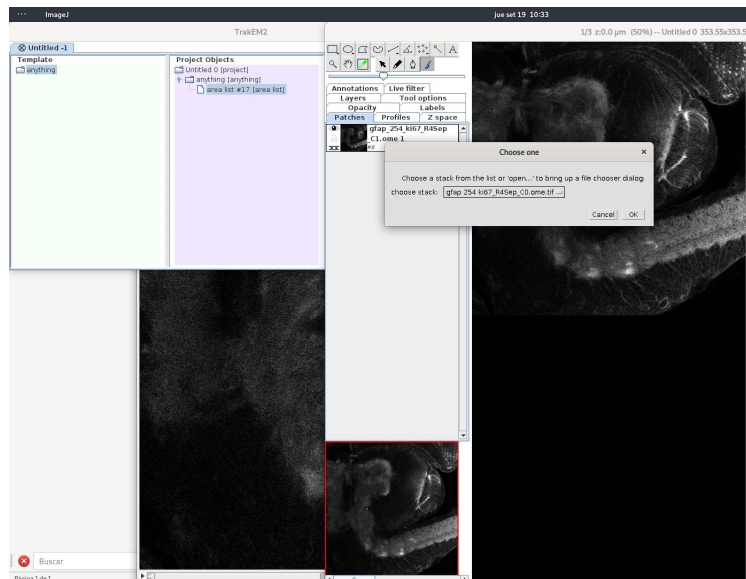


Figure 4: Se debe estar posicionado en Patches y en el primer canal de la imagen de guía.

6. Para alinear la imagen nueva con la imagen anterior, nos posicionamos en Patches **CLICK DER>Properties** y en el cuadro emergente (Fig.5) se posicionará la imagen en **>x=0** , **y=0**.

Nos posicionamos sobre ésta y con **CLICK DER Move > Move to top**, se recorrerá todas las capas.

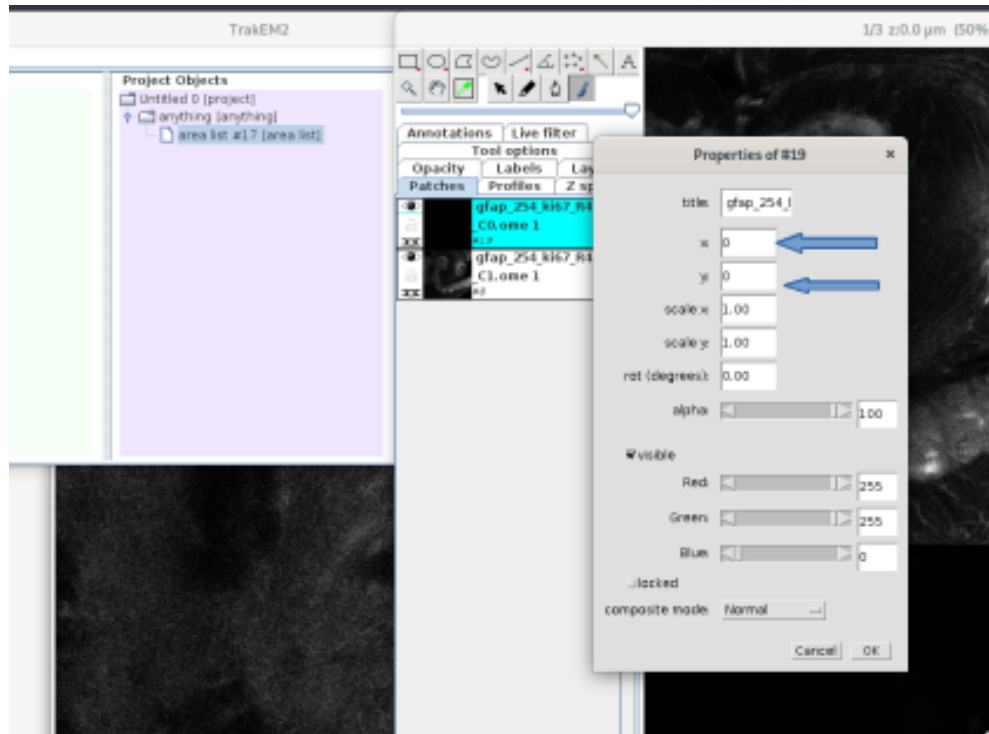


Figure 5: Las flechas azules muestran valores de x e y.

7. Se procederá a hacer la segmentación del área que se quiera utilizar como guía para hacer la interpolación en algunas de las capas. Siempre se tendrá que estar posicionado con el area_list seleccionada, y con el pincel del panel de herramientas superior activado, con MAYUS+CLICK IZQ se rellenará el área seleccionada, con ALT+CLICK IZQ se borrará la selección (Fig.6).
8. Con **CLICK DER** sobre la pantalla se seleccionará **Area >Interpolate all gaps**.
9. Para recortar el área segmetnada en base a la selección guía y extraerla de forma individual: posicionados en Patches se **desencadenará** todas las capas la imagen que se utilizó como guía, y en Z space se **desencadenará** el area_list (Fig. 7).



Figure 6: La flecha verde muestra el píxel que se deberá tener seleccionado para comenzar la segmentación, la flecha celeste muestra el área de segmentación en la imagen guía y la flecha roja muestra que se debe estar con el area list seleccionada.

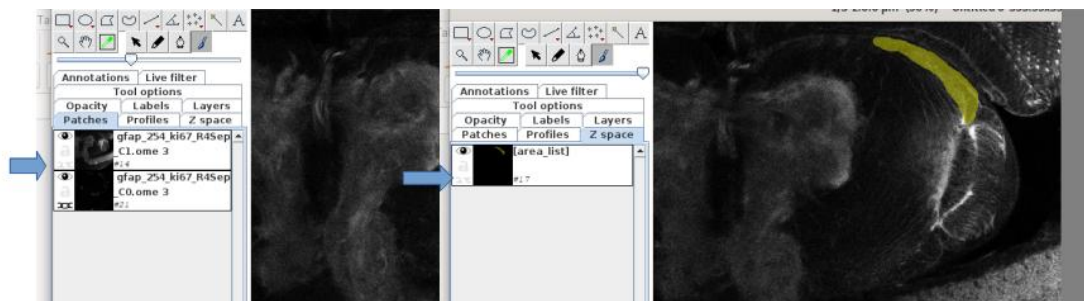


Figure 7: Ambas flechas celestes muestran el lugar donde se deberán desecandernar las capas de la imagen, en dentro de Patches, y dentro de Z space

10. Volviendo a Patches se eliminará las imágenes de la guía de segmentación: posicionados sobre ella **CLICK DER >delete** (en todas capas), desapareciendo como muestra la Fig. 8 el canal utilizado como guía, y apareciendo el canal de interés con el área segmentada en color amarillo.

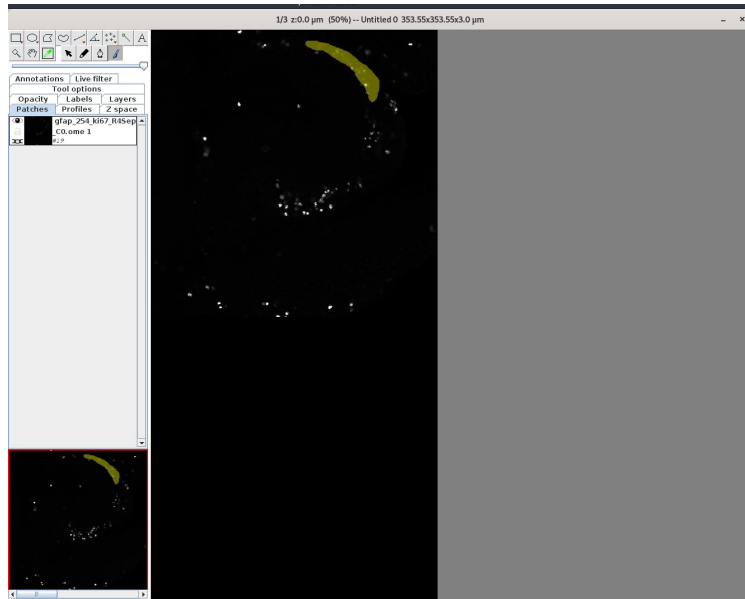


Figure 8: Canal de interés con area segmentada.

11. Posicionados en Z space con **CLICK DER >Plugins >Area_list crop > Create > Valou=0** (Fig.9) el programa recortará la imagen segmentada.

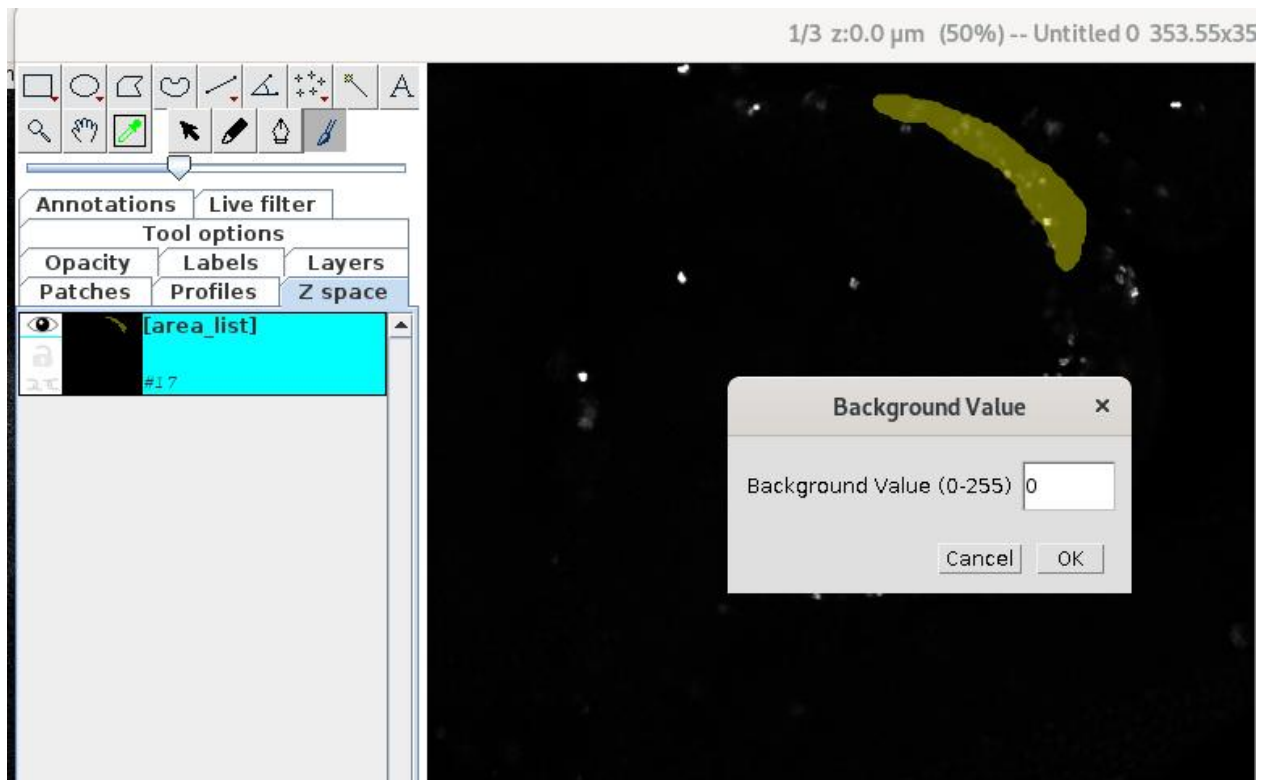


Figure 9: Cuadro emergente para indicar el color del fondo del volumen resultante, en este caso se prefiere color negro, por tanto el valor=0.

12. Aparecerán dos cuadros emergentes, uno con el volumen segmentado en el canal que nos interesa trabajar, y el otro como cuadro de diálogo con información de dicho volumen (Fig.10).



Figure 10: Cropped AreaList Stack es el volumen segmentado y Log es el cuadro de dialogo con información de dicho volumen o stack.

Luego, sobre esta nueva pila de imágenes puede realizarse el analisis que nos resulte más conveniente.

Referencias

- Cardona, Albert, Stephan Saalfeld, Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Stephan Preibisch, Mark Longair, Pavel Tomancak, Volker Hartenstein, and Rodney J Douglas. 2012. "TrakEM2 software for neural circuit reconstruction." *PloS One* 7 (6): e38011. doi:[10.1371/journal.pone.0038011](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038011).
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. doi:[10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).