



Universidad Politécnica de Madrid

Facultad de Informática

Tesis de Máster

***Segmentación automática de
ramificaciones y espinas
dendríticas a través de muestras
obtenidas mediante microscopía
confocal***

Autor: Laura Fernández Soria
Tutores: José María Peña Sánchez
Ángel Merchán

Madrid, Septiembre 2011

*Segmentación automática de ramificaciones y espinas dendríticas a través de muestras obtenidas mediante
microscopía confocal*

Laura Fernández Soria

Madrid, Septiembre 2011

Tutores:

José María Peña Sánchez (jmpena@fi.upm.es)

Ángel Merchán (amerchan@fi.upm.es)

La composición de este documento se ha realizado con L^AT_EX.
Diseño de Oscar Cubo Medina.

Índice

Índice	I
Índice de figuras	V
Acrónimos y abreviaturas	VII

PARTE I INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1 Introducción y objetivos	3
1.1 Introducción	3
1.2 Objetivos	5
1.3 Estructura del documento	5

PARTE II ESTADO DE LA CUESTIÓN

2 Introducción a la Neurociencia	9
2.1 Neurociencia	9
2.2 El sistema nervioso	11
2.3 La neurona	12
2.4 Espinas dendríticas	14
2.4.1 Estructura y morfología	14

2.4.1.1	Ultraestructura	15
2.4.1.2	Tipos de espinas	15
2.4.2	Desarrollo	15
2.5	Realidad biológica	17
3	Obtención y tratamiento de los datos biológicos	21
3.1	Material fijado	21
3.1.1	Obtención del tejido	21
3.1.2	Inyecciones intracelulares	21
3.1.3	Análisis Morfológico	23
3.2	Microscopía	24
3.2.1	Microscopía electrónica	24
3.2.2	Microscopía óptica	25
3.2.2.1	Microscopía de fluorescencia	25
3.2.2.2	Microscopía confocal	26
3.3	Neurolúcida	26
3.4	ESPINA ESPina Interactive Neuron Analyzer	29
 PARTE III ESTUDIO DEL PROBLEMA Y PROPUESTA		
4	Estudio del problema	33
4.1	Datos de entrada	33
4.2	Deconvolución de la imagen	38
4.3	Visualización datos de entrada	39
4.4	VTK	40
4.4.1	vtkImageThresholding	40
4.4.2	vtkImageGaussianSmooth	40
4.4.3	vtkContourFilter	41
4.4.4	vtkImageIslandRemove	41

4.5	ITK	41
4.5.1	Segmentación basada en el Crecimiento de Regiones	42
4.5.1.1	Connected Threshold Image Filter	42
4.5.1.2	Curvature Flow Image Filter	43
4.6	Algoritmos de Esqueletonización	43
4.6.0.3	Binary Thinning Image Filter	45
4.7	Algoritmo Marching Cubes	45
4.7.1	Implementaciones del algoritmo Marching Cubes en VTK	46
4.8	Algoritmo Rayburst	47
5	Propuesta de solución	51
5.1	Visualización de los datos de entrada	51
5.2	Deconvolución	51
5.3	Umbralización	52
5.3.1	Connected Threshold Growing Seed	52
5.3.2	ITK Connected Threshold	52
5.4	Esqueletonización	52
5.5	Segmentación de espinas y ramificaciones dendríticas	53
5.6	Pipeline del proceso	54

PARTE IV CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

6	Conclusiones	61
7	Líneas futuras	63
	Bibliografía	65

Índice de figuras

1.1	Representación de una columna cortical	4
2.1	Laboratorio de ranas de Galvani	10
2.2	Corte transversal semi-esquemático de una circunvolución cerebelosa de mamífero.	11
2.3	Dibujo de una neurona realizado por Santiago Ramón y Cajal	13
2.4	Dibujo esquemático de los tipos de espinas dendríticas	16
2.5	Esquema de los tres modelos de espinogénesis existentes	16
2.6	Imagen EPFL.	18
3.1	Imagen de una neurona tomada con el microscopio confocal inyectada intercelularmente con <i>Lucifer Yellow</i>	22
3.2	A. Dendrita apical B. Dendritas basales S. Soma	23
3.3	Imagen de un microscopio electrónico	25
3.4	Imagen de un microscopio confocal	26
3.5	Imagen de un fichero de Neurolúcida	27
3.6	Diagrama esquemático de la estructura de árbol proporcionada en los ficheros	28
3.7	Interfaz de ESPINA	30
4.1	Stack de 39 secciones de 16 bits	34
4.2	Esquema de representación matricial de una imagen en escala de grises	35
4.3	Volumen de una muestra en escala de grises	36

4.4	Esquema de representación matricial de una imagen de color RGB	37
4.5	Stack de 42 secciones en modo de color RGB	38
4.6	Imagen procedente del stack de 42 secciones en modo de color RGB convertida a escala de grises	38
4.7	Resultado de la ejecución del filtro. En la izquierda la imagen original, y a la derecha fijando una semilla y valores de umbral entre 150 y 180 [López, 2006]	42
4.8	Resultado de la ejecución del filtro	43
4.9	Marching Cube [Lorensen and Cline, 1987]	45
4.10	Casos de cubos triangulados [Lorensen and Cline, 1987]	48
4.11	Casos de ambigüedades que pueden provocar agujeros en la superficie [Lang et al., 2011]	49
4.12	Ejemplo de generación de una isosuperficie de una espina usando Marching Cubes a la izquierda y la variante Marching Cubes 33 a la derecha [Lang et al., 2011]	49
4.13	Estimación del volumen y área de una espina dendrítica usando Rayburst	49
4.14	Esquema de procesamiento utilizando Rayburst tras la obtención de las ramificaciones de las neuritas	50
5.1	Stack de microscopía confocal sin aplicar la técnica de deconvolución	52
5.2	Comparativa de imágenes sin aplicar deconvolución (izquierda) y con la técnica apli- cada (derecha)	53
5.3	Ejemplo de aplicar el plugin de ImageJ Connected Threshold Growing Seed	54
5.4	Ejemplo de aplicar el filtro de ITK Connected Threshold	55
5.5	Imagen binarizada y posible esqueleto	55
5.6	Área sementada con valores de intensidad no binarizados	56
5.7	Área sementada con valores de intensidad no binarizados	56
5.8	Pipeline propuesto para el proceso completo	57

Acrónimos y abreviaturas

IBM International Business Machines

CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas

UPM Universidad Politécnica de Madrid

RGB Red Green Blue

NIH National Institutes of Health

ASC American Standard Code

ASCII American Standard Code for Information Interchange

EPFL L'École Polytechnique Fédérale de Lausanne

Parte I

Introducción y objetivos

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1. Introducción

El órgano más importante de nuestro cuerpo y que se encarga de controlar todo nuestro organismo es el cerebro. El cerebro es el responsable de nuestras emociones, comportamiento, memoria, de controlar y coordinar nuestro movimiento, de la cognición y de nuestra capacidad de aprendizaje. Con la intención de comprender en detalle el funcionamiento de nuestro cerebro, en estas y otras tareas, se planteó el proyecto Blue Brain

Actualmente, se desconocen cuales son las alteraciones o motivos que producen enfermedades como la depresión, la esquizofrenia o el Alzheimer. Por todo ello, uno de los objetivos del proyecto Blue Brain, será el alcanzar la posibilidad de explorar soluciones a problemas de salud mental y enfermedades neurológicas.

El origen del proyecto data del año 2005, cuando L'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Suiza, y la compañía IBM anunciaron un acuerdo de colaboración entre ambos para crear un modelo funcional del cerebro utilizando el superordenador Blue Gene. En 2008, la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) se incorporó al proyecto Blue Brain cuando este trabajo se lanzó a nivel internacional. Más tarde, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), también se sumó a esta iniciativa, de forma que ambos sellaron la colaboración entre dicha universidad y el Instituto Cajal, denominándose Cajal Blue Brain. La representación española se extiende hasta una media docena de otros centros de investigación y universidades a lo largo del país.

El proyecto Cajal Blue Brain se plantea como meta, el estudio detallado del funcionamiento y estructura del cerebro. Su fin será la reconstrucción y simulación de un neocórtex humano, basándose en

la simulación de la circuitería neuronal, desde el nivel estructural y operativo más básico, la columna cortical. En la hipótesis columnar de la organización del cerebro [Mountcastle et al., 1955], [Mountcastle, 1957] una columna es la unidad funcional básica de la corteza cerebral; dicha hipótesis se basa en los trabajos experimentales que se realizaron la superficie de la corteza somatosensorial de gatos y monos. Este procedimiento les permitió a los investigadores identificar series verticales de neuronas a lo largo del recorrido de un electrodo, las cuales respondían al mismo estímulo. De esta manera, se describieron agrupamientos de células que forman columnas verticales, las cuales procesaban en conjunto información procedente de la misma fuente de estímulo. [Ballesteros-Yáñez et al., 2006]



Figura 1.1: Representación de una columna cortical

Entre la ingente cantidad de tareas y líneas de investigación que se entrelazan bajo el paraguas del proyecto, el presente trabajo se centra en uno de los aspectos más estructurales del proceso de simulación de los circuitos neuronales. Dicho aspecto, es el de construcción de los propios entramados de la circuitería por parte de las terminaciones dendríticas de las neuronas. A continuación se va a definir los objetivos planteados para este proyecto.

1.2. Objetivos

Lo que pretende este trabajo es la obtención y reconocimiento automático o semiautomático de los elementos presentes en las muestras observadas al microscopio.

En esta tesis, los datos de partida que tenemos constan de ramificaciones dendríticas que poseen espinas. El avance que se produce a la hora de disponer de herramientas que nos permitan la extracción automática de estos elementos, nos permitirá en un futuro la creación de modelos de crecimiento de neuronas realistas para poder construir circuitos de conexiones que equivalgan a los existentes en seres vivos reales.

El propósito general de este trabajo es que dado un volumen tridimensional obtenido de la visualización de una muestra biológica a través del microscopio, se pueda desarrollar algoritmos para la extracción tanto de las espinas dendríticas como del tallo de la dendrita, sin tener que recurrir a procesos manuales para su identificación. Para a partir de ahí poder desarrollar métodos que nos puedan dar información relevante, tales como volumen del elemento, distancia del cuello de la espina dendrítica o número de espinas en la ramificación por ejemplo.

1.3. Estructura del documento

Este documento está organizado en cuatro grandes bloques. Tras este primer bloque introductorio, con un enfoque global, está el bloque II, dedicado al estado de la cuestión. En ella se desarrollarán, en dos capítulos, temas fuertemente relacionados con este proyecto. Por un lado, se ha realiza una introducción a la Neurociencia y a toda la parte biológica que se tratará durante el documento. Se explicarán herramientas informáticas que actualmente se usan en la biología, y se presentarán trabajos previos similares a los de este trabajo, y sobre todo la forma actual de recuperación de los datos biológicos necesarios.

La parte III se corresponde con el estudio del problema y las posibles propuestas para su resolución. Se tratarán todos los algoritmos estudiados y se mostrarán los resultados obtenidos de la ejecución de alguno de ellos.

En la última parte y para terminar, se expondrán las conclusiones del trabajo realizado, así como las líneas futuras en este campo.

Parte II

Estado de la cuestión

Capítulo 2

Introducción a la Neurociencia

En este capítulo se va a realizar una breve introducción a aspectos biológicos, tales como una aproximación al sistema nervioso, la morfología de las neuronas, sus funciones, y tipos en determinadas partes del cerebro. Además se introducirán algunos matices sobre Neurociencia. Posteriormente se presenta una aproximación a la realidad biológica en la que nos encontramos actualmente.

2.1. Neurociencia

La Neurociencia es la ciencia que estudia el sistema nervioso. Se nutre de varias disciplinas, entre ellas, la informática. Uno de los objetivos fundamentales de la Neurociencia, es el estudio de la organización y funcionamiento del sistema nervioso, y más particularmente del cerebro. La mejor comprensión del cerebro permitiría encontrar formas para la prevención, detección e incluso tratamientos para la cura de enfermedades neurológicas, tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Depresión y Esquizofrenia entre otras.

Los comienzos de la Neurociencia datan del siglo XVIII; Luigi Galvani descubrió las capacidades eléctricas de los seres vivos cuando, por accidente, disecaba una pata de rana, y su bisturí tocó accidentalmente un gancho de bronce del que colgaba la pata. Se produjo una pequeña descarga, y la pata se contrajo espontáneamente. Mediante repetidos y consecuentes experimentos, Galvani se convenció de que lo que se veía eran los resultados de los que llamó *electricidad animal*. De esta forma, demostró que mediante la estimulación de nervio, un músculo podía contraerse [Galvani, 1791].

Años más tarde, en 1886, Camillo Golgi desarrolló un método de tinción a base de nitrato de plata para teñir neuronas. Esta técnica permitía ver las células nerviosas al completo, pero al azar, de tal forma

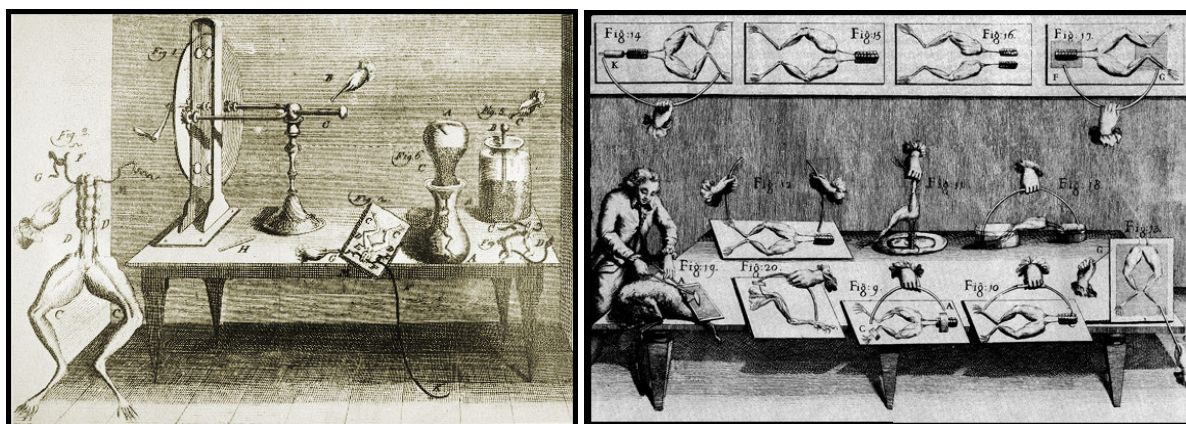


Figura 2.1: Laboratorio de ranas de Galvani

que diferentes autores veían resultados contradictorios. Empleando este método, identificó una clase de célula nerviosa dotada de unas extensiones (o dendritas) mediante las cuales se conectaban entre sí otras células nerviosas.

Este descubrimiento permitió a Wilhelm von Waldeyer-Hartz formular la hipótesis de que las células nerviosas son las unidades estructurales básicas del sistema nervioso, hipótesis que más tarde demostraría Santiago Ramón y Cajal con su *Teoría Neuronal*. Ramón y Cajal descubriría que el axón de una neurona sólo se comunica con las dendritas de otra en regiones especializadas: las sinapsis. Además propuso que una neurona determinada sólo se comunicaría con ciertas células.

Los neurocientíficos tienen la importante misión de desentrañar el misterio de la más compleja de todas las máquinas: cómo se producen hasta un trillón de neuronas, cómo crecen y se organizan en sistemas eficientes, funcionales y activos que, por lo general, permanecen operativos a lo largo de la vida de una persona [Fernández et al., 2010].

Otro de los aspectos más destacados de la Neurociencia es el estudio de los neurotransmisores, mensajeros químicos del cerebro y la acción de los fármacos sobre éstos [Carey, 1990]. El comportamiento electrofisiológico de la neurona está determinado por la presencia y distribución de las diferentes corrientes iónicas en esa célula y por la capacidad de varios neurotransmisores ya sea para aumentar o disminuir la amplitud, o para modificar las propiedades de dichas corrientes. Se cree que existen un gran número de sustancias en el sistema nervioso que son liberados por las neuronas para modificar las propiedades electrofisiológicas de otras neuronas. Muchas de estas sustancias pueden causar más de una respuesta postsináptica. La mayoría, si no todas, de estas diversas respuestas están mediadas por moléculas receptoras farmacológicamente distintas. De esta manera, una sustancia neuroactiva liberada en una neurona piramidal de la corteza cerebral puede tener un efecto muy diferente a la de la liberación del mismo neurotransmisor en una interneurona en esta zona. De hecho, el mismo neurotransmisor puede tener efectos muy diferentes o incluso opuestos, sobre las neuronas postsinápticas vecinas de la misma región

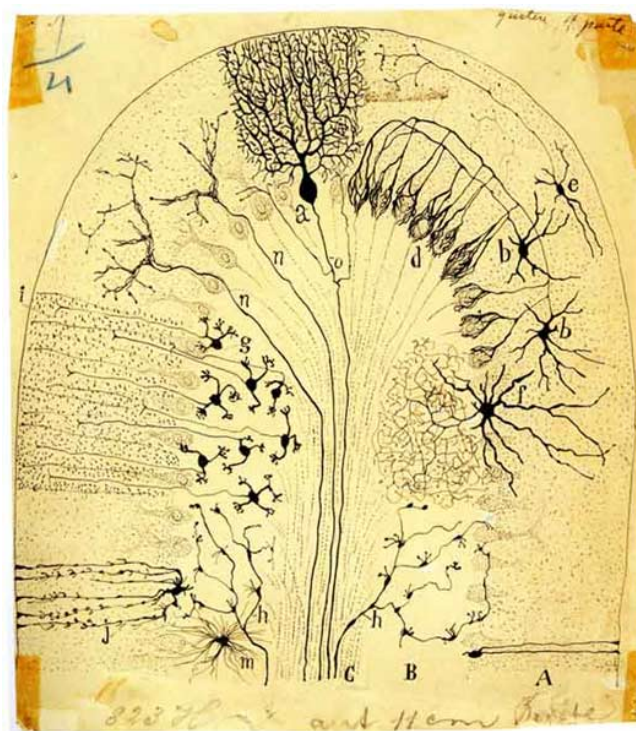


Figura 2.2: Corte transversal semi-esquemático de una circunvolución cerebelosa de mamífero.

neuronal, dependiendo de la función particular de la neurona en el circuito local [Shepherd, 2004].

2.2. El sistema nervioso

Uno de los sistemas vivos que supone un mayor reto es el sistema nervioso, en particular, las conexiones corticales. La forma en la que las neuronas (la célula más relevante del sistema nervioso) interactúan se llama conectoma, el mapa de las conexiones neuronales de un organismo vivo. El mapa del conectoma representa el circuito de conexiones del sistema nervioso, ofreciendo una descripción de gran detalle a bajo nivel de las conexiones, tanto en aspectos morfológicos como funcionales.

El sistema nervioso tiene como función principal la captación de señales del exterior y su rápido procesamiento para poder interactuar con el medio mediante el control y la coordinación del resto de órganos del cuerpo. En los seres humanos, el sistema nervioso puede dividirse en el periférico y el central, y será dentro de éste último donde localicemos el cerebro, formando parte del encéfalo. Junto al encéfalo, conformando el sistema nervioso central encontraremos la médula espinal, mientras que el sistema nervioso periférico está formado por los nervios que conectan el sistema nervioso central con los diferentes órganos.

El encéfalo constituye la mayor agrupación de células nerviosas del cuerpo, distinguiendo en él, tres

órganos, cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo. El primero, es la parte más desarrollada y responsable del instinto, aprendizaje e inteligencia.

La parte del cerebro responsable de funciones como la vista, el oído y el habla se encuentra en la corteza cerebral. Ésta se divide en cuatro secciones, lóbulo occipital, temporal, parietal y frontal. Algunas de estas regiones están asociadas con más de una función. El cerebro anterior se asocia con las más altas funciones intelectuales: el pensamiento, la planificación y resolución de problemas. El Hipocampo está implicado en la memoria. El Tálamo sirve como estación de relevo para casi todas las informaciones que llegan al cerebro. Las neuronas en el hipotálamo sirven como estaciones repetidoras de los sistemas internos de monitorización de la información que proviene del sistema nervioso autónomo y a través de los nervios y la glándula pituitaria. En la parte más superior del cerebro medio existe dos pares de pequeñas colinas, formadas por colecciones de células específicas que transmiten la información sensorial desde los órganos hasta el cerebro [Carey, 1990].

Detrás de el cerebro está situado el cerebelo que controla los músculos de fibra lisa, y el movimiento, así como los procesos cognitivos que requieren una sincronización precisa. El bulbo raquídeo ocupa la parte final del encéfalo y establece la unión con la médula espinal ayudando a controlar la respiración y el ritmo cardíaco. El encéfalo conecta con los otros órganos de la cabeza mediante los nervios craneales (sensitivos y motores).

La médula espinal recorre dorsalmente el cuerpo, protegida por la columna vertebral. Su parte central, conocida como materia gris, contiene neuronas y otras células nerviosas desprovistas de mielina. Su parte externa, denominada materia blanca, esta formada por fibras mielínicas que la recorren longitudinalmente. La médula espinal está comunicada con diferentes órganos del cuerpo mediante los nervios sensitivos que llevan a ella información que puede ser transmitida al encéfalo, y los nervios motores que transmiten estímulos a diferentes órganos [García et al., 2008].

2.3. La neurona

La **neurona** es la unidad estructural y funcional del sistema nervioso, es la unidad básica de funcionamiento del cerebro, especializada en transmitir información a otras células nerviosas, músculos o células glandulares. Anatómicamente una neurona típica está formada por un cuerpo celular que contiene el núcleo, citoplasma y todas sus prolongaciones, -fibras eléctricamente excitables- un axón y numerosas dendritas.

Las **dendritas** son proyecciones ramificadas de una neurona. Se extienden desde el cuerpo neuronal y reciben mensajes de otras neuronas y por dichas dendritas llegan los impulsos nerviosos hasta el cuerpo celular y salen de él por el axón. Normalmente el axón es mucho mayor que las dendritas y puede estar

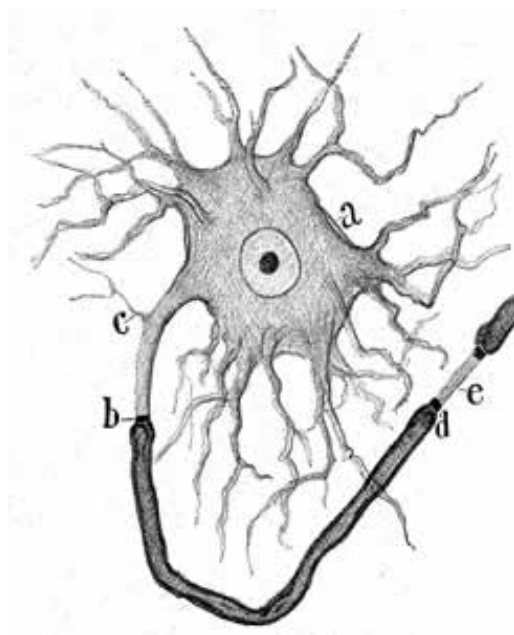


Figura 2.3: Dibujo de una neurona realizado por Santiago Ramón y Cajal

rodeado por unas células denominadas células de Schwann, que crecen alrededor de él, envolviéndolo. El citoplasma de estas células está lleno de una sustancia de naturaleza lipídica, denominada mielina. Los huecos existentes en la vaina de mielina se llaman **nódulos de Ranvier**. Las dendritas tienen unas pequeñas protuberancias membranosas llamadas **espinas dendríticas**. Estas espinas normalmente reciben la entrada de una única sinapsis de un axón. Sirven como lugar de almacenamiento de la sinapsis y ayudan a transmitir las señales eléctricas al cuerpo celular de la neurona [Wikipedia, 2010a].

Un **axón** es una fibra nerviosa, que en la mayoría de ocasiones también dan lugar a muchas ramas más pequeñas antes de concluir en las terminales nerviosas. Cuando los axones de muchas neuronas se reúnen formando haces o fascículos dan lugar a un nervio. La mayoría de los nervios viajan hasta un lugar particular del cuerpo y tiene básicamente dos tipos de fibras: las aferentes o sensoriales (que transmiten la información en forma de impulsos nerviosos desde las células receptoras de los órganos de los sentidos hasta la médula espinal o el cerebro) y las eferentes o motoras (que lo hacen desde la médula espinal o el cerebro hasta un músculo o una glándula) [García et al., 2008].

La mayoría de los axones se ramifican en su terminación en varias ramas, terminando cada una de ellas en un ensanchamiento denominado **botón sináptico** mediante el cual conecta con las dendritas o el cuerpo de celular de la neurona siguiente.

El impulso nervioso es el mensaje electroquímico que va pasando a través del axón de una neurona en dirección a las dendritas y cuerpos celulares de otras neuronas. Para producirse, las neuronas deben ser excitadas por un estímulo de cierta intensidad. El hecho de que una neurona pueda excitarse, depende

de una diferencia de carga eléctrica entre el interior y el exterior de la célula. Cuando se inicia un impulso nervioso, se produce un cambio radical en la membrana de la célula, llamado potencial de acción. Un potencial de acción es un cambio muy rápido en la polaridad de la membrana de negativo a positivo y vuelta a negativo, en un ciclo que dura unos milisegundos. Una vez, alcanzado el final del axón, estos cambios de tensión desencadenan la liberación de neurotransmisores. Éstos son liberados en las terminaciones nerviosas, difundiéndose a través del espacio intrasináptico, y al alcanzar los receptores de la siguiente neurona, y ponerse en contacto con su membrana, la excitará. La región donde se aproxima un axón a otra neurona se llama sinopsis [García et al., 2008].

Algunas enfermedades afectan la conducción saltatoria y disminuyen la velocidad de desplazamiento de un potencial de acción. La más conocida de todas estas enfermedades es la esclerosis múltiple, en la que los daños en la mielina imposibilitan el movimiento coordinado [Wikipedia, 2010d].

2.4. Espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son pequeñas protusiones membranosas que aparecen en las dendritas de distintas neuronas cubriéndolas como las hojas de un árbol. Una neurona puede contener cientos de miles de espinas. Son bastante heterogéneas tanto en forma como en tamaño, consistiendo en una cabeza pequeña conectada por un cuello delgado al tronco de la ramificación dendrítica. Las espinas se encuentran en muchas especies, desde los anélidos pasando por los primates, y son particularmente abundantes en el sistema nervioso central de los vertebrados. Su prevalencia a lo largo del tiempo y la evolución nos indican que son esenciales en la función del cerebro.

Estudios neuropatológicos han demostrado que determinadas enfermedades, que van desde la esquizofrenia hasta Alzheimer, Parkinson o trastornos como el autismo, muestran una morfología anormal de la espina dendrítica. Por otra parte, recientes estudios genéticos han identificado mutaciones en muchos genes que codifican las proteínas sinápticas, lo que lleva a sugerir que estas proteínas pueden contribuir a la plasticidad de las espinas dendríticas.

2.4.1. Estructura y morfología

Las **espinas** son receptores primarios de inputs sinápticos. De hecho, cada espina tiene una sinapsis excitatoria. Algunas espinas tienen una sinapsis excitatoria y una sinapsis inhibitoria. Además, ocasionalmente, una espina puede estar ramificada en dos terminales sinápticos. La morfología de la espina es muy diversa, y ello provoca que no esté muy claro aún cuantos subtipos de espinas podemos encontrarnos. El volumen de la cabeza de la espina refleja el tamaño de la sinapsis, sin embargo, el tamaño de la cabeza

de la espina y el cuello no están correlacionados, al igual que la longitud del cuello de la espina no está tampoco correlacionado con su diámetro.

Las diferencias entre el tamaño de la espina, y su densidad depende de los diversos tipos de células, áreas del cerebro y especies animales. De hecho, incluso dentro de una misma célula, el tamaño de las cabezas de las espinas y las dimensiones de sus cuellos pueden variar de una forma muy significativa. El tamaño de la cabeza de la espina está regulada por la distancia interespinal y, en algunos casos, también por la distancia al soma. Las espinas son particularmente pequeñas. Las *spiny neurons* reciben inputs de muchos axones diferentes. Además, algunas reciben solo un contacto sináptico de cada neurona presináptica, maximizando el numero de inputs presinápticos que integra. Debido a esto, en una primera aproximación, cada espina se puede considerar como una linea de entrada independiente.

2.4.1.1. Ultraestructura

Las espinas emergen desde las ramificaciones dendríticas, y pueden dividirse en el cuello de la espina y en la cabeza de la espina. La cabeza contiene la sinapsis, compuesta por el terminal presináptico y la densidad postináptica (PSD). Las espinas son pequeñas (normalmente, menos de 3nm de longitud desde la unión con la dendrita hasta la cabeza), con una cabeza más o menos esférica (0.5 – 1.5 nm diámetro) conectadas por un estrecho cuello (<0.5 nm diámetro) al tallo dendrítico. Estas pequeñas estructuras en miniatura no son mucho más grandes que una sinapsis.

2.4.1.2. Tipos de espinas

Las espinas dendríticas tienen una gran variedad de morfologías, de hecho la clasificación actual propuesta para clasificar los distintos tipos de espinas se basa en la morfología de las mismas. Existen los siguientes tipos básicos reflejados en la figura 2.4:

Los diferentes tipos son *thin*, *stubby*, *mushroom* y *branched*. Las espinas de tipología *thin* son las más comunes, y constan de un fino y largo cuello y una pequeña y bulbosa cabeza. Las espinas *mushroom* son aquellos con una gran cabeza y normalmente se encuentran en los ejemplares adultos. Las *stubby* están desprovistas de cuello y son particularmente prominentes durante el temprano desarrollo postnatal, aunque pueden encontrarse en el adulto. Además encontramos filopodios dendríticos, que son más largos y normalmente no tienen una cabeza clara.

2.4.2. Desarrollo

El proceso de crecimiento de las espinas se llama **espinogénesis**. Existen tres modelos diferentes, modelos no son necesariamente excluyentes entre sí. De acuerdo con el modelo de **Sotelo**, el desarrollo

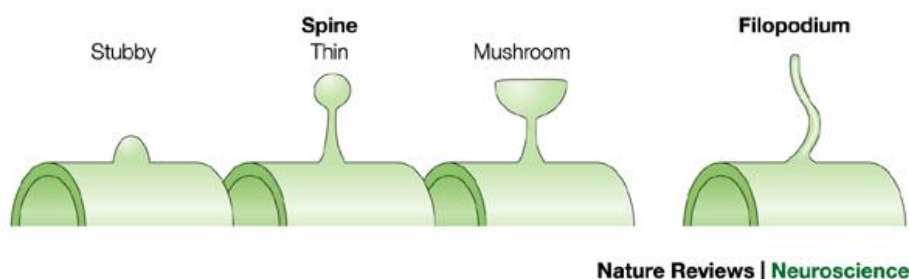


Figura 2.4: Dibujo esquemático de los tipos de espinas dendríticas

de la espina es intrínseca e independiente del terminal sináptico. El modelo de **Miller/Peters** predice el crecimiento secuencial desde los tallos dendríticos, provocados por el terminal del axón. En principio, este modelo es compatible con el modelo de Sotelo. Finalmente, el modelo **filopodial**, se deriva de la hipótesis sinaptotrófica de Vaughn. Esta hipótesis postula que los filopodios dendríticos establecen contactos sinápticos capturando un terminal de un alón y dando lugar a una espina, al igual que en el modelo Miller/Peters. A favor de este modelo está el enriquecimiento de sinapsis encontrados en filopodios, sin embargo, en contradicción tenemos el hecho de que muchas células tienen filopodios pero no desarrollan espinas, y la ausencia de sinapsis en filopodios en algunos tipos de células [Yuste and Bonhoeffer, 2004].

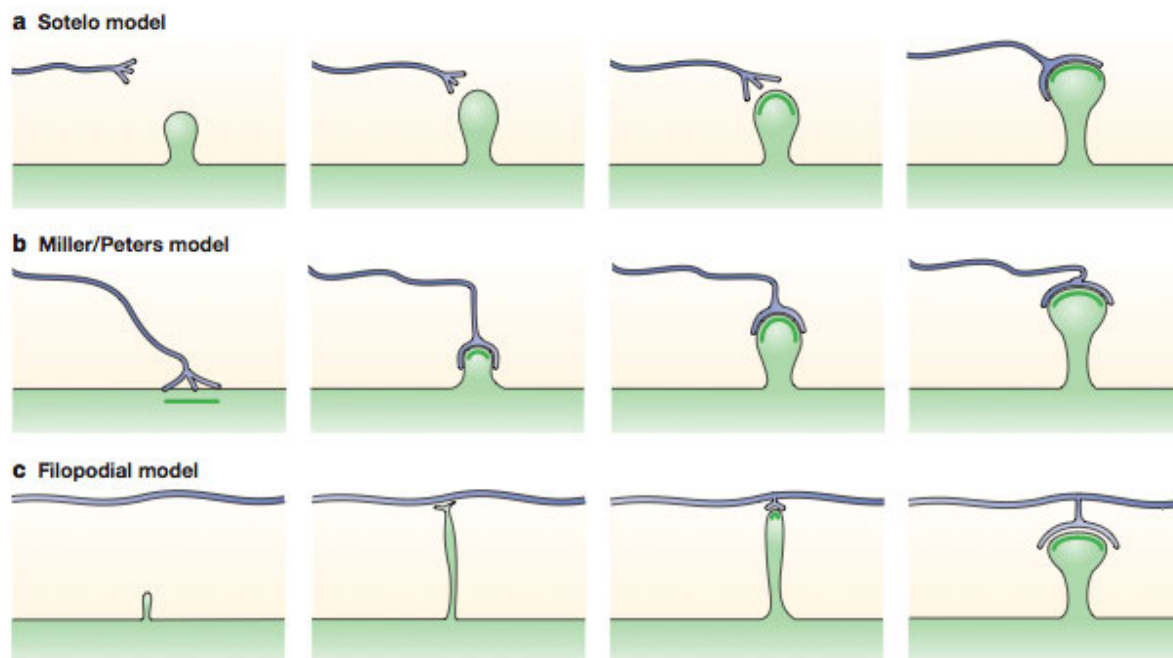


Figure 3 | Three models for spinogenesis. This diagram illustrates the essential features of the three models of spinogenesis. In the Sotelo model (a), spines emerge independently of the axonal terminal. In the Miller/Peters model (b), the terminal actually induces the formation of the spine. Finally, in the filopodial model (c), a dendritic filopodium captures an axonal terminal and becomes a spine.

Figura 2.5: Esquema de los tres modelos de espinogénesis existentes

2.5. Realidad biológica

El estudio de sistemas biológicos utilizando enfoques tradicionales in-vivo o in-vitro, ha sido la principal herramienta tanto de biólogos como de científicos médicos. Aunque este método se considera de fundamental importancia en las ciencias experimentales, cuenta con limitaciones notables, en especial cuando el objeto de estudio se centra en sistemas complejos, tales como las interacciones neuronales. La naturaleza de dichas limitaciones proviene de distintos factores: (i) un reducido control sobre ciertas condiciones ambientales; (ii) el limitado conocimiento de las funciones internas que se llevan a cabo dentro de la célula o sistema en cuestión; (iii) una ausencia total de control sobre los procesos a largo plazo o a un plazo sumamente corto; (iv) un gran número de unidades constituyentes y; (v) la existencia de una intrincada red de interacciones entre dichos constituyentes.

Para superar esas limitaciones, se proponen la simulación y la modelización de mecanismos para gestionar la complejidad inherente a estos sistemas biológicos. Estos mecanismos sacan provecho de las nuevas y avanzadas herramientas integradas en los laboratorios de investigación con la observación de sistemas vivos in vitro.

La corteza cerebral, delgada capa de materia gris que conforma el 80 % del cerebro humano, es responsable de nuestra capacidad de recordar, pensar, reflexionar, sentir empatía, comunicarse, adaptarse a nuevas situaciones y planificar el futuro. Esta capa incluye unas 10.000 millones de neuronas con casi unas cincuenta trillones de sinapsis.

El cerebro procesa la información mediante el envío de señales eléctricas de una neurona a otra, conectada cada una a miles de sus vecinos por dendritas y axones. Tal y como la hipótesis columnar de la organización del cerebro [Mountcastle et al., 1955], [Mountcastle, 1957], presentada brevemente en la introducción, en la corteza, las neuronas se organizan en unidades funcionales básicas denominadas columnas corticales. Las columnas corticales agrupan del orden de 8.000 a 10.000 neuronas con centenares de millones de conexiones sinápticas. Estas unidades tienen un funcionamiento parecido a un microcircuito en un ordenador, el cual se repite millones de veces a través de la corteza cerebral, de forma que este tipo de estructura se presta a un enfoque de modelización sistemática. Y, por tanto, el primer paso del Blue Brain, es recrear este microcircuito, hasta el nivel de precisión biológica de las neuronas.

Los datos de los que se disponen provienen de numerosos experimentos de laboratorio sobre circuitos y fragmentos de muestras de distintas regiones del cerebro de diferentes mamíferos. Son recogidos por neurólogos y se extraen por medio de microscopía electrónica y óptica (dependiendo del nivel de detalle). El elemento fundamental de estudio es, por lo tanto, la neurona, sus partes y conexiones. La adquisición de los datos de laboratorio permite obtener una información morfológica de una neurona por medio de un proceso costoso en tiempo y esfuerzo. Además hay que añadir que el número de neuronas que se

pueden obtener es limitado, pero es un dato esencial en el proceso de simulación posterior.

La simulación de una columna cortical requiere la modelización de un gran número de neuronas, la conexión de las mismas y el proceso de excitación virtual de las sinapsis. En la fase de definición de las conexiones es necesario disponer de un modelo fiable de la morfología de la neurona, su despliegue tridimensional. Para ello resulta necesario ser capaz de poblar una columna neuronal de un número determinado de neuronas de un cierto tipo que sean biológica y morfológicamente factibles.

Dentro de las dificultades de representación de una neurona, la morfología en concreto (apéndices de conexión, axón y dendritas), es uno de los aspectos clave. La obtención de neuronas completas es difícil en el laboratorio y la representación de la densidad de ramificaciones, orientaciones y extensión de las mismas es determinante en el papel funcional que desempeña.

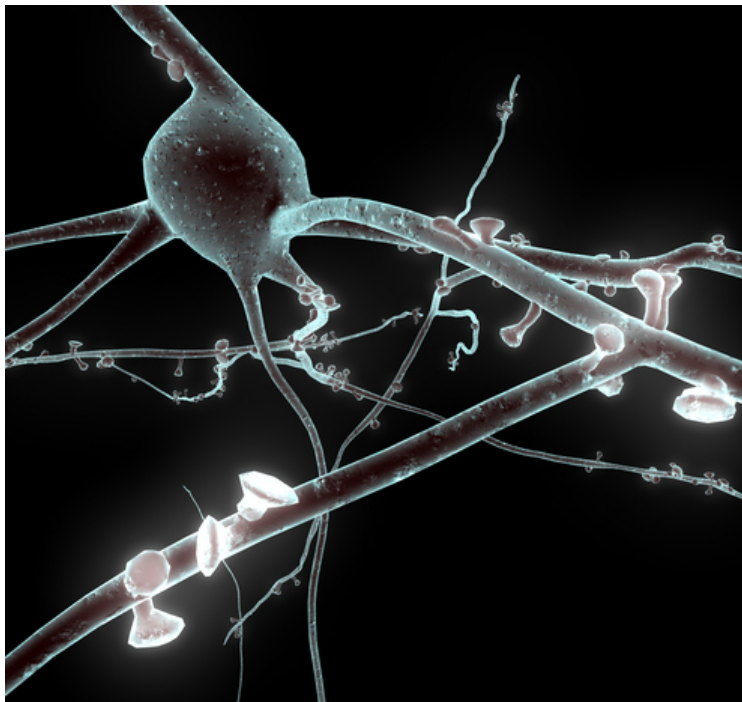


Figura 2.6: Imagen EPFL.

La construcción de modelos de neuronas es una pieza clave dentro del proyecto. En un futuro, a la hora de simular columnas neuronales, uno de los pasos previos más importantes en los que se basará el procedimiento, será el de cuantificar el número de neuronas de cada tipo que deberá haber por capa, y poblar cada una de estas capas con dichas neuronas. Este paso requiere ser capaz de, para una tipología concreta de neurona, generar diversas muestras neuromorfológicamente creíbles que puedan usarse en la simulación. Este proceso de creación de neuronas virtuales debe realizarse en base a un modelo verosímil extraído de datos experimentales, que generalice las características de las muestras de células proporcionadas y pueda generar nuevas células.

Los modelos de las redes de neuronas basadas en circuitos corticales reales, se han convertido en herramientas útiles para el estudio de determinados aspectos de la organización funcional del neocórtex. Los modelos morfológicos de las neuronas son una parte clave en estos modelos funcionales. A estos efectos, los árboles de dendritas virtuales o sintéticas, se pueden generar a través de un modelo morfológico de un determinado tipo neuronal dado, basándose en parámetros reales morfométricos obtenidos de inyecciones intracelulares sobre material fijado de neuronas individuales. En este proyecto se mostrará un nuevo método para la construcción de dendritas virtuales a través del muestreo de un modelo de ramificación que representa la morfología de las dendritas. Este método se ha contrastado utilizando dendritas basales completas de 374 neuronas piramidales de las capas II y III, en las cuales profundizaremos en los siguientes capítulos.

Las neuronas han sido proporcionadas por el laboratorio de Javier DeFelipe del Instituto Cajal. Dicho laboratorio tiene una dilatada experiencia en el análisis de la organización microanatómica y neuroquímica de la corteza cerebral, mediante la utilización de una variedad de técnicas, entre las que se incluyen inyecciones intracelulares, técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica, y métodos de reconstrucción 3D para microscopía óptica y electrónica. Estos estudios comenzaron en el Instituto Cajal en el año 1980 con el análisis de la corteza cerebral de animales de experimentación. Desde 1991, en el laboratorio de DeFelipe también se realiza el estudio neuroquímico y microanatómico de la corteza cerebral humana normal y de focos epilépticos corticales, para aportar datos sobre la organización normal de la corteza y estudiar las posibles alteraciones neuropatológicas. A partir de 2006 comenzó a centrarse en el estudio de la enfermedad de Alzheimer, y se continúan los estudios sobre la microestructura de la corteza cerebral normal. Como hemos contado en la introducción, en 2009 se inicia una nueva etapa con la participación en el proyecto Blue Brain surgiendo en España el proyecto Cajal Blue Brain, cuyos objetivos se encuadran en dos ejes principales: La microorganización anatómica y funcional de la columna neocortical y el desarrollo de tecnología biomédica. La contribución del laboratorio de DeFelipe consiste en participar en los estudios microanatómicos y funcionales de la columna neocortical y coordinar las tareas de investigación realizadas en otros laboratorios nacionales e internacionales. Esta coordinación es fundamental para establecer una base de datos homogeneizada que permite estandarizar y aprovechar al máximo los datos generados por cada grupo de investigación. [Cajal, 2010]

Capítulo 3

Obtención y tratamiento de los datos biológicos

3.1. Material fijado

En la introducción hemos hablado de los datos de entrada con los que hemos trabajado, un total de 374 neuronas pertenecientes a distintas regiones del neocortex (44 en M1, 91 en M2, 44 en S1, 71 en S2, 41 en V1 y finalmente 83 en V2). Las células fueron obtenidas de 6 áreas corticales diferentes del neocortex del ratón: área motora primaria y secundaria (M1 y M2), área somatosensorial primaria y secundaria (S1 y S2), y primaria y secundaria de la corteza visual (V1 y V2). . En este capítulo vamos a resumir como se obtiene el tejido y se prepara para poder visualizar y analizar las neuronas.

3.1.1. Obtención del tejido

En primer lugar, se perfunde el animal con 4 % paraformaldehído en 0.1 MPB utilizando previamente una inyección de pentobarbital sódico. Se extrae el cerebro y la corteza del hemisferio izquierdo se aplana entre dos láminas de vidrio [Welker and Woolsey, 1974] durante 24 horas. Se cortan secciones, de 150 μm , tangencialmente a la superficie cortical con la ayuda de un vibratomo. Al centrarse en la serie de cortes tangenciales se reconocen las diferencias entre las capas corticales, lo que permite la identificación de la sección que contiene la capa III y la inyección posterior de las células en la base de dicha capa.

3.1.2. Inyecciones intracelulares

Una vez que el tejido fijado es seccionado para observarlo al microscopio, es necesario marcar las células para poder distinguirlas.

Actualmente, se ha desarrollado un método de análisis microanatómico muy útil que consiste en la inyección intracelular de agentes químicos en neuronas en tejido fijado [Buhl and Schlote, 1987], [Elston et al., 1996]. Este método permite la visualización de la morfología completa de la neurona, además tiene la ventaja de que no es necesario mantener vivo el tejido para realizar el experimento. Brevemente, el método consiste en lo siguiente: la sección se marca con DAPI, sustancia que permite observar los núcleos celulares a través del microscopio de fluorescencia, y por tanto localizar y seleccionar aquellos que presentan las características morfológicas de las neuronas de interés. Se inyectará una sustancia fluorescente, *Lucifer Yellow*, que se difundirá a lo largo de todas las prolongaciones dendríticas de la célula. Esta inyección es posible gracias a una micropipeta de menos de 2 mm de diámetro, que penetra en el interior del cuerpo de la neurona. Esta acción permitirá la visualización de todas sus ramificaciones dendríticas y sus posibles conexiones con otras neuronas [DeFelipe, 2005].

El carácter fluorescente de esta molécula hace que el proceso de su detección sea muy sencillo, permitiendo visualizar la morfología completa de la célula, incluyendo las espinas dendríticas [DeFelipe and Fariñas, 1992].

Esta metodología permite seleccionar las regiones cerebrales que se deseen estudiar, y el tipo de neurona que se va a inyectar, células piramidales en nuestro caso. Posteriormente se puede analizar la morfología neuronal a través del microscopio de fluorescencia, u obtener una reconstrucción tridimensional a partir de secciones ópticas obtenidas en el microscopio confocal [Benavides-Piccione et al., 2005].

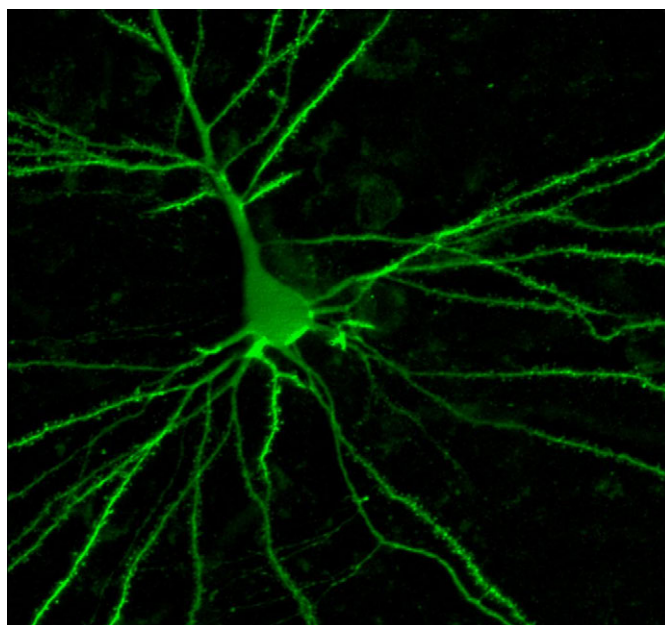


Figura 3.1: Imagen de una neurona tomada con el microscopio confocal inyectada intercelularmente con *Lucifer Yellow*

3.1.3. Análisis Morfológico

Las neuronas visualizadas pueden examinarse utilizando técnicas de análisis morfológico. En primer lugar subrayaremos que existen dos tipos de dendritas en una neurona, la dendrita apical se caracteriza por ser única en la célula y emerger desde el vértice de la célula piramidal. La proyección de la dendrita apical es opuesta a la del axón. Las dendritas basales constituyen un eje en el mismo plano de varios árboles dendríticos en la célula. En la siguiente imagen se observan al microscopio claramente estos dos tipos de dendritas en una célula piramidal [Torres et al., 2007].

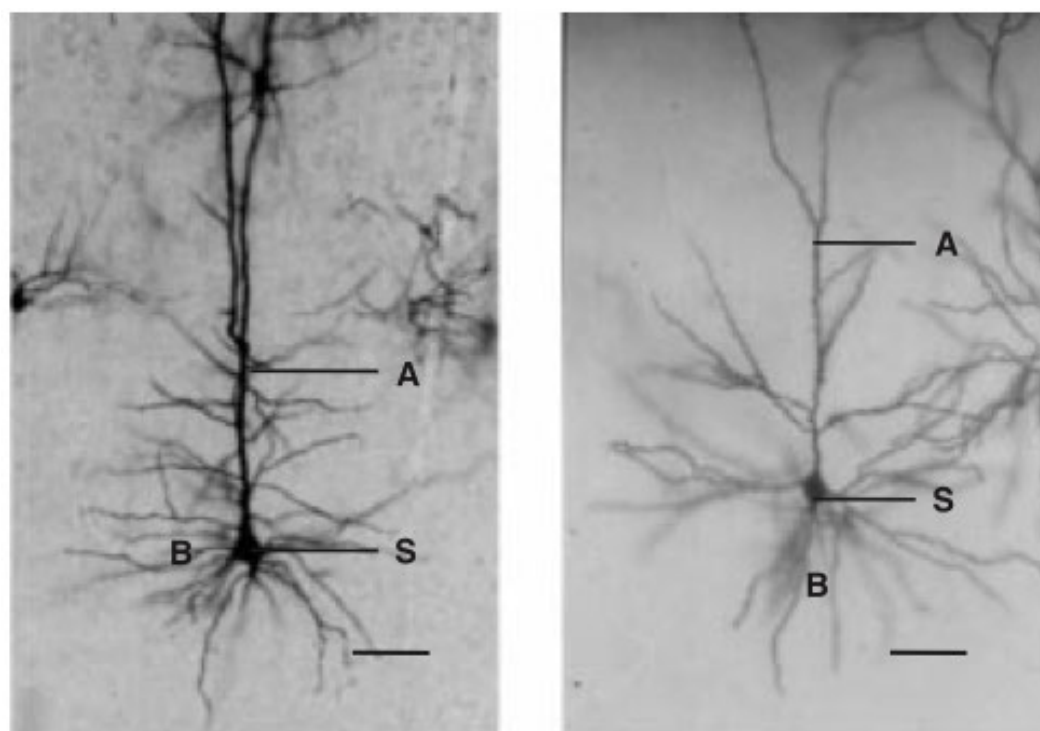


Figura 3.2: A. Dendrita apical B. Dendritas basales S. Soma

Las células que se han incluido para los análisis tenían una dendrita apical claramente distinguible, la totalidad de su eje dendrítico basal contenido dentro de la sección y todas las dendritas rellenas completamente con la inyección fluorescente.

Además, como las estructuras de las células piramidales pueden variar entre las distintas regiones corticales [Elston, 2000], sólo se incluyeron las células piramidales que fueron inyectados en la misma región en todos los casos.

Las células fueron dibujadas en 3D con la ayuda de un microscopio y el software de Neurolúcida, del cual haremos una pequeña introducción más adelante.

Algunos de los parámetros que se obtienen a través de la visualización por el microscopio son, por ejemplo, el tamaño del eje dendrítico de la célula, el cual viene determinado mediante el cálculo de la

superficie comprendida dentro de un polígono que une los puntos más distantes de las dendritas basales [Elston and Rosa, 1997], el número total de espinas dendríticas que existen en una ramificación completa, o la densidad de espinas de una dendrita calculando el número de espinas encontradas en dicha dendrita dividido entre la longitud total de la dendrita [DeFelipe, 2005]. Otros parámetros son, el índice de *Sholl* que se determina contando el número de ramas dendríticas que se entrecruzan con círculos concéntricos al soma separados del cuerpo de la célula mediante radios de aumento de 25 μm para cada célula [Sholl, 1953], o la longitud total de todas las dendritas basales en cada célula se determina con la ayuda de una tableta digitalizadora (SummaSketch III) y el software de la imagen del NIH (NIH Research Services, Bethesda, MD) [Gabriel and Hernán, 2004].

En general, una limitación importante en el análisis de la morfología de las neuronas es que es necesario el uso de secciones de tejidos relativamente finos para poder visualizar las neuronas marcadas, con frecuencia del orden de unas pocas μm , en contraste con los cientos de μm o incluso milímetros en los que puedan expandirse procesos neuronales. Así, los procesos “marcados”, a menudo están incompletos debido a que durante los procedimientos del corte del tejido algunas partes de la morfología de las neuronas se pierden dependiendo del grosor de las secciones y de la localización relativa de la neurona marcada dentro del corte. En la actualidad, este problema sólo se puede superar mediante el uso de cortes seriados reconstruyendo la neurona en 3D. Sin embargo, los procesos neuronales no siempre son fáciles de rastrear y a veces se pueden perder en un segundo plano. Estos obstáculos hacen que sea muy laborioso obtener medidas significativas de las neuronas.[Fernández et al., 2010]

3.2. Microscopía

En esta sección vamos a presentar las diferentes técnicas de microscopía que existen para realizar análisis morfológicos sobre las células inyectadas. Se diferencian dos grandes campos, la microscopía electrónica y la óptica.

3.2.1. Microscopía electrónica

La imagen se toma a partir de electrones en lugar de fotones o luz visible. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones *visibles* [Wikipedia, 2010b]. Esta técnica estaba abandonándose debido a la tediosidad para obtener las muestras, hasta la aparición del nuevo microscopio de Zeiss, Cross Beam. Este tipo de microscopio electrónico solo había sido utilizado hasta ahora en nanotecnología. Es capaz de analizar franjas de tejido neuronal de sólo 20

μ de grosor, permitiendo realizar reconstrucciones tridimensionales de las neuronas y las sinapsis nunca vistas hasta ahora. Gracias a estos avances se pretende relanzar la técnica de microscopía electrónica.

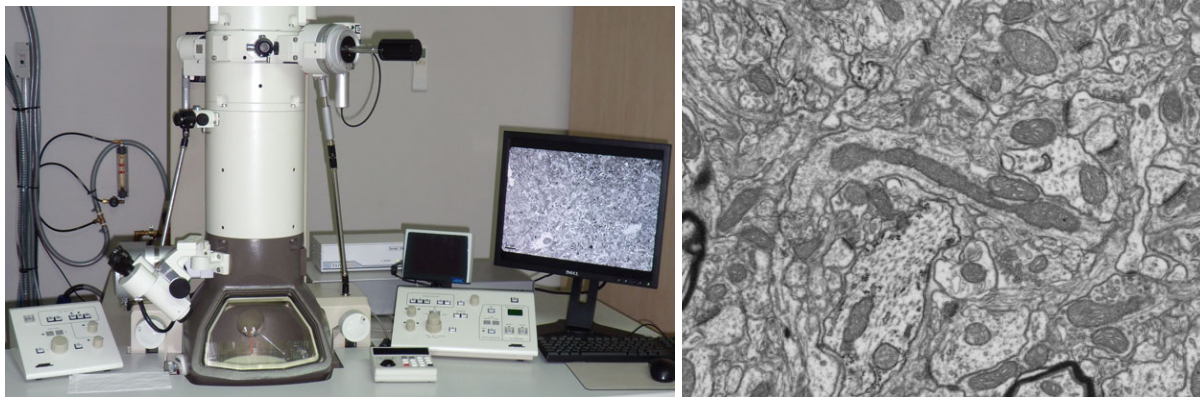


Figura 3.3: Imagen de un microscopio electrónico

3.2.2. Microscopía óptica

Un microscopio óptico es un microscopio basado en lentes ópticas, la imagen se toma a partir de fotones y a menudo se le conoce como *microscopio de luz*. Es un tipo de microscopio que utiliza la luz visible y un sistema de lentes para ampliar las imágenes de muestras pequeñas. Históricamente han sido muy populares ya que debido a utilizar la luz visible, la muestra puede ser observada directamente por el ojo humano.

La mayor parte de las muestras observadas con microscopía óptica son traslúcidas o, en el caso de ser opacas, su superficie de reflexión no se encuentra perfectamente pulida. En ambos casos la luz interacciona con la muestra a varias profundidades por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas debidas a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen. Para solucionar estos problemas han aparecido diversas técnicas como las que mostramos a continuación [Martínez-Nistal et al., 1995].

3.2.2.1. Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico que presenta algunas modificaciones para observar la fluorescencia emitida por el tejido. La fluorescencia es una propiedad que presentan algunas moléculas denominadas *fluorescentes*, que al ser iluminadas por una radiación luminosa de una determinada longitud de onda, son excitadas y liberan energía a través de la emisión de luz de una longitud de onda mayor [Ríos et al., 2007].

3.2.2.2. Microscopía confocal

La microscopía confocal se basa en el empleo de un microscopio de fluorescencia modificado que permite la obtención de imágenes confocales. Se trata de un microscopio óptico que incluye como fuente de luz un láser y un sistema electrónico que ayuda a la captación de imágenes. Emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste teniendo la posibilidad de reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un *pinhole* espacial para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal [Pawley, 2006].



Figura 3.4: Imagen de un microscopio confocal

En un microscopio confocal sólo la luz que está dentro de este plano puede ser detectada, de modo que la calidad de imagen es mucho mejor que las de campo amplio. Puesto que sólo se ilumina un punto cada vez en el microscopio confocal, se requiere una exploración (scanning) sobre un raster regular en el espécimen para obtener imágenes bi o tridimensionales [Wikipedia, 2010c].

3.3. Neurolúcida

Neurolúcida es un software científico que permite obtener ciertos datos morfológicos tridimensionales de las muestras que se analizan permitiendo reconstruir regiones del cerebro, áreas e incluso neuronas.

Los datos de las dendritas reales pueden recuperarse con Neurolúcida y almacenarse en un fichero de texto con formato American Standard Code (ASC). Este tipo de formato de ficheros es válido para los ficheros de texto con codificación American Standard Code for Information Interchange (ASCII). La codificación ASCII consiste en el conjunto de 128 caracteres numerados del 0 al 127 y que incluye números, letras, signos de puntuación y caracteres especiales como por ejemplo fin de línea.

Los ficheros que nos proporciona Neurolúcida se basan en una lista jerárquica. Cada línea de estos ficheros representa el tipo de datos más simple, un punto. Para conformar este tipo de dato, se requerirán al menos dos coordenadas (ejes x e y). Este formato de fichero soporta la morfología de la dendrita estruc-

```

;      V3 text file written for MicroBrightField products.
(Sections)
("CellBody"
 (Color RGB (255, 128, 0))
 (CellBody)
 ( 4.94 -4.96 0.00 0.21) ; 1, 1
 ( 4.73 -4.96 0.00 0.21) ; 1, 2
 ( 3.09 -5.17 0.00 0.21) ; 1, 3
) ; End of contour

( (Color Red) ; [10,1]
 (Dendrite)
 ( -5.35 -4.34 0.00 0.21) ; Root
 ( -7.82 -5.37 0.00 0.21) ; R, 1
 ( -9.67 -6.41 0.00 0.21) ; R, 2
 ( -9.87 -6.41 0.00 0.21) ; R, 3
 (
 ( -26.45 -15.98 1.97 0.21) ; R-1, 1
 ( -26.66 -16.18 1.97 0.21) ; R-1, 2
 ( -28.10 -17.42 1.97 0.21) ; R-1, 3
 (
 ( -37.56 -24.66 5.45 0.21) ; R-1-1, 1
 ( -37.97 -24.66 5.45 0.21) ; R-1-1, 2
 ( -38.17 -24.86 5.45 0.21) ; R-1-1, 3
 (
 ( -44.39 -31.01 5.45 0.21) ; R-1-1-1, 1
 ( -45.21 -31.01 5.45 0.21) ; R-1-1-1, 2
 ( -46.65 -33.08 4.55 0.21) ; R-1-1-1, 3
 Normal
 |
 ( -45.79 -29.41 2.73 0.21) ; R-1-1-2, 1
 ( -47.23 -31.07 2.73 0.21) ; R-1-1-2, 2
 ( -48.25 -32.10 2.73 0.21) ; R-1-1-2, 3
 Normal
 ) ; End of split
 |
 ( -37.35 -26.72 8.94 0.21) ; R-1-2, 1
 ( -37.56 -26.93 8.94 0.21) ; R-1-2, 2
 ( -37.76 -26.93 8.94 0.21) ; R-1-2, 3
 Normal
 ) ; End of split
 |
 ( -26.33 -13.64 3.64 0.21) ; R-2, 1
 ( -26.53 -13.64 3.64 0.21) ; R-2, 2
 ( -27.36 -13.44 3.64 0.21) ; R-2, 3
 (
 ( -45.99 -7.71 10.45 0.21) ; R-2-1, 1
 ( -49.49 -6.88 10.45 0.21) ; R-2-1, 2
 ( -49.90 -6.88 10.45 0.21) ; R-2-1, 3
 Normal
 |
 ( -44.63 -7.23 2.42 0.21) ; R-2-2, 1
 ( -44.63 -7.23 2.12 0.21) ; R-2-2, 2
 ( -45.87 -6.82 2.12 0.21) ; R-2-2, 3
 Normal
 ) ; End of split
 ) ; End of split
) ; End of tree

```

Figura 3.5: Imagen de un fichero de Neurolúcida

turada en coordenadas espaciales e información adicional como etiquetas, colores u otras características que especifique el usuario de Neurolúcida.

Además de los puntos, las propiedades son otro de los elementos que inician el bloque constructor de los ficheros proporcionados. Una propiedad es una entidad que el sistema de ficheros puede leer y escribir sin entender su significado. Esta es una de las razones por las que es posible extender el sistema de ficheros: nuevas entradas pueden ser añadidas sin tener que ajustar el fichero de entrada/salida. Las propiedades tendrán un nombre y una lista de valores, pueden también incluir colores (especificado por el triple RGB o escala de grises).

Otra de las entradas que aparecen, son las espinas. Biológicamente una espina dendrítica es el menor microcomportamiento neuronal capaz de establecer una operación completa de una sinapsis: excitadora, inhibidora, despolarización electrónica...

El número de espinas dendríticas que tiene una célula piramidal, reflejará el número de sinapsis que

recibe y su capacidad para integrar información. Sin embargo, para poder obtener información de las espinas, el grado de detalle de observación tiene que ser mucho más profundo que el que se necesita para obtener las ramificaciones dendríticas. Por lo que, los ficheros de los que dispondremos a lo largo de este trabajo no nos proporcionarán información sobre las espinas.

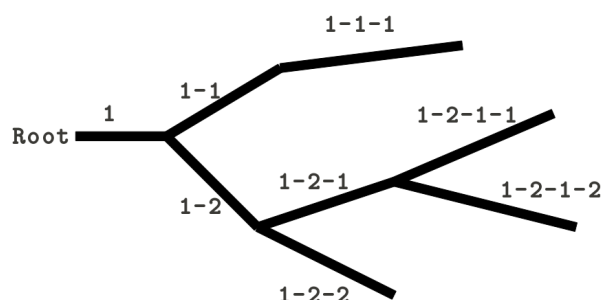


Figura 3.6: Diagrama esquemático de la estructura de árbol proporcionada en los ficheros

La figura 3.6 muestra un simple diagrama de un árbol. Las etiquetas de las ramas muestran el esquema de numeración para identificar cada una de las ramas. Las estructuras de las ramas son las más complicadas de todas las que contiene el fichero.

Un árbol comenzará emplazado en el nodo raíz, considerando un nodo como el punto donde un árbol se divide en múltiples ramas. De esta forma, la etiqueta '1-2' hace referencia al hecho de que esa rama es la segunda del nodo en el extremo de una rama etiquetada como '1'. Las siguientes ramificaciones que existen en el extremo de la rama '1-2' también comienzan por dicha etiqueta, de forma que si se ramificara en dos, obtendríamos '1-2-1' y '1-2-2'. Cada nueva rama comenzará en un nodo y las coordenadas de dicho nodo serán tanto el último punto de la rama padre, como el primero de cada rama hija, siendo esa coordenada, el punto de bifurcación.

La gramática de Neurolúcida nos especificará las subestructuras que pueden conformar la estructura general del árbol. Estas serán las siguientes:

- *Cuerpo de neurona:* Son el conjunto de puntos que identifican el soma de la neurona.
- *Dendrita:* Cada neurona tendrá un conjunto de ellas. Cada dendrita estará formada por todo el conjunto de pequeñas ramificaciones (split) desde que comienza en el soma hasta que finaliza en nodos hoja.
 - *Split:* Porción de segmento comprendida entre el inicio de una bifurcación y la siguiente, entre el soma y la primera bifurcación o entre el comienzo de una bifurcación y el fin de la dendrita.

En resumen, los ficheros de Neurolúcida representan las coordenadas tridimensionales de una neurona, mostrando los puntos del soma, sus dendritas y a su vez, las ramificaciones de éstas. De una ramificación pueden colgar cero o más ramas. Todos estos elementos no son mas que agrupaciones de coordenadas espaciales (x, y, z). Por lo tanto, una dendrita es un grafo en el que los vértices están conectados por un camino, dando lugar a una estructura de árbol.

El principal problema de Neurolúcida es que, el método de obtención de las ramificaciones dendríticas es un proceso puramente manual, por lo que, no sólo supone mucho tiempo en la obtención de los datos, si no que además al tratarse de un proceso humano, puede conllevar errores.

3.4. ESPINA ESPina Interactive Neuron Analyzer

ESPINA es una aplicación informática que permite realizar un conteo de sinapsis a partir de imágenes digitalizadas con un microscopio electrónico. Dado que las sinapsis son elementos clave en la estructura de los circuitos nerviosos, la comprensión de su ubicación, el tamaño y la proporción entre los tipos de sinapsis es extraordinariamente importante en términos de funcionalidad.

Esta herramienta realiza automáticamente la segmentación la reconstrucción del volumen tridimensional de las sinapsis en la corteza cerebral, ayudando al usuario a examinar grandes volúmenes de tejido y de forma interactiva validar los resultados proporcionados por el software.

Estas imágenes se llaman *stacks*, y el conjunto de imágenes que componen un *stack* se llaman secciones. Todas las secciones de un stack deben tener el mismo tamaño y la misma profundidad de bit. ESPINA soporta imágenes de 8 bits.

El trabajo experimental dentro del proyecto Cajal Blue Brain representa el mecanismo esencial para la obtención de datos, pero es necesario hacer hincapié en las necesidades de procesamiento de los mismos, de su extracción de una manera automática, con ausencia de errores y la generalización de toda esa información en modelos simulables.

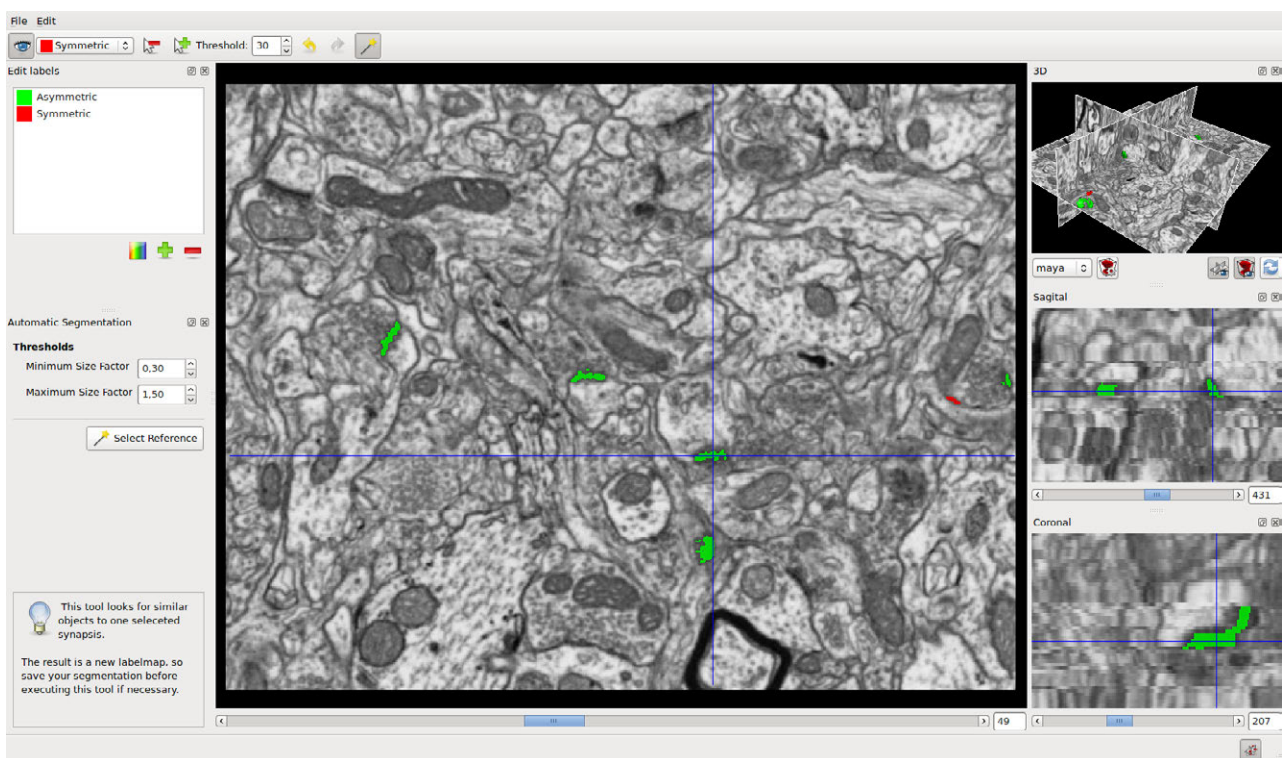


Figura 3.7: Interfaz de ESPINA

Parte III

Estudio del problema y propuesta

Capítulo 4

Estudio del problema

En este capítulo se va a realizar una breve introducción a los algoritmos estudiados para la solución del problema planteado. En primer lugar se va a realizar una breve introducción al conjunto de datos con los que vamos a trabajar y posteriormente se mostrarán los resultados que se han obtenido para tratar de llegar a una solución eficiente.

4.1. Datos de entrada

Los datos de entrada con los que vamos a trabajar son diversos. Aunque todos proceden de los resultados de la visualización de muestras al microscopio, no todos disponen del mismo formato.

Disponemos de una serie de stacks con número de secciones variables entre 38 y 42, y por otro lado, Metaimágenes. Este tipo de formato de archivo es usado en aplicaciones desarrolladas en el ámbito de la imagen médica. Su extensión suele ser .mha o .mhd, y está soportado por las librerías de ITK y VTK.

El principal problema de estos datos, es que contienen demasiado ruido y hace muy difícil la segmentación de los elementos que contienen.

En primer lugar, para poder entender las diferencias existentes entre los distintos formatos de entrada son necesarias unas nociones básicas. Un pixel es la menor unidad homogénea que forma parte de una imagen digital. Las imágenes no son otra cosa que una matriz rectangular de píxeles. Cada pixel tiene un valor (o conjunto de valores en el caso del modelo RGB), que corresponde a su color.

Para poder transformar la información numérica que almacena un pixel en un color se requiere saber el modelo de color y su brillo, además de la profundidad del color, cantidad de bits usados para representar dicho color.

El color de un pixel puede ser representado de tres maneras:

1. **Color indexado:** En este caso, el pixel posee un valor que en realidad no es un código de color, sino un índice del color real en una paleta de colores, también llamado mapa de colores o colormap. El formato GIF usa esta representación. Una paleta de colores no es más que una tabla indexada con los valores de colores a usar en la imagen.
2. **Escala de grises:** El valor del pixel en este caso es un tono de gris, donde cero indica negro y el mayor valor indica blanco.
3. **Color verdadero:** El valor del pixel es representado por un conjunto de tres valores Rojo, Verde, Azul (RGB). El modelo de color RGB (Red Green Blue) permite crear un color componiendo 3 colores básicos, dependiendo de la saturación de cada uno. Por ejemplo, el valor 0 representa que un determinado canal de color no interviene en la mezcla y, a medida que ese valor numérico aumenta, aporta más intensidad a la mezcla. Normalmente, como cada color primario se codifica con un byte, la intensidad de cada uno de los componentes se mide según una escala que va del 0 al 255. Por lo tanto, el rojo se obtiene con (255,0,0), el verde con (0,255,0) y el azul con (0,0,255), obteniendo, en cada caso un color resultante monocromático.

En primer lugar, disponemos de un stack (Figura: 4.1) de 39 secciones de tamaño $76.96\ \mu\text{m}$ de ancho y de alto (1024×1024 píxeles), una profundidad de $2.93\ \mu\text{m}$ y 16 bits por pixel. Si una imagen utiliza 16 bits por pixel, utilizará 5 bits para la representación de cada valor de rojo, verde y azul.

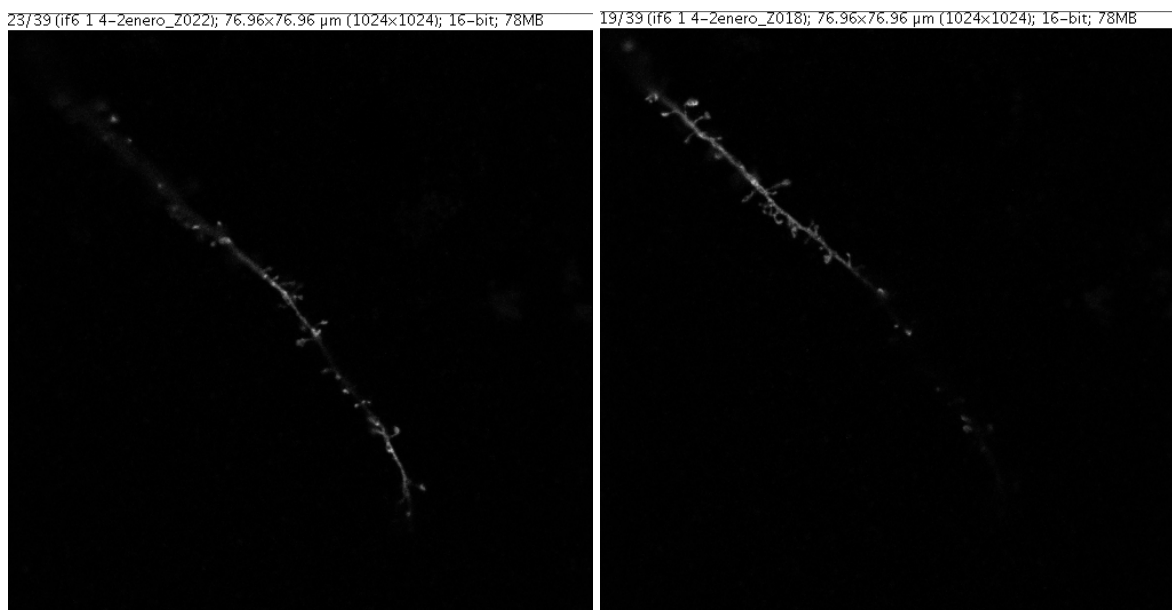


Figura 4.1: Stack de 39 secciones de 16 bits

Cada sección es una imagen Tiff, es decir, este stack estará representado por un conjunto de 39 imágenes Tiff.

También tenemos una Metaimagen (Figura 4.3), con una profundidad de 38 secciones, 8 bits por píxel, y dimensiones similares a las del stack anterior, 1024 píxeles de alto por 1024 píxeles de ancho. El hecho de que la imagen tenga las propiedades de representar cada píxel por 8 bits, da lugar a una imagen en escala de grises, es decir, que sus valores de rojo, verde y azul son iguales. Y estos valores se van incrementando, de forma que los píxeles podrán tener un rango entre 0 y 255, siendo 0 el negro y 255 el blanco, y existiendo entre esos valores 256 niveles distintos de grises.

Una imagen a escala de grises se representa por medio de una matriz bidimensional de $m \times n$ elementos en donde n representa el número de píxeles de ancho y m el número de píxeles de largo. El elemento v_{11} corresponde al elemento de la esquina superior izquierda (ver Figura 4.2), mientras que el elemento v_{mn} corresponde al elemento de la esquina inferior derecha.

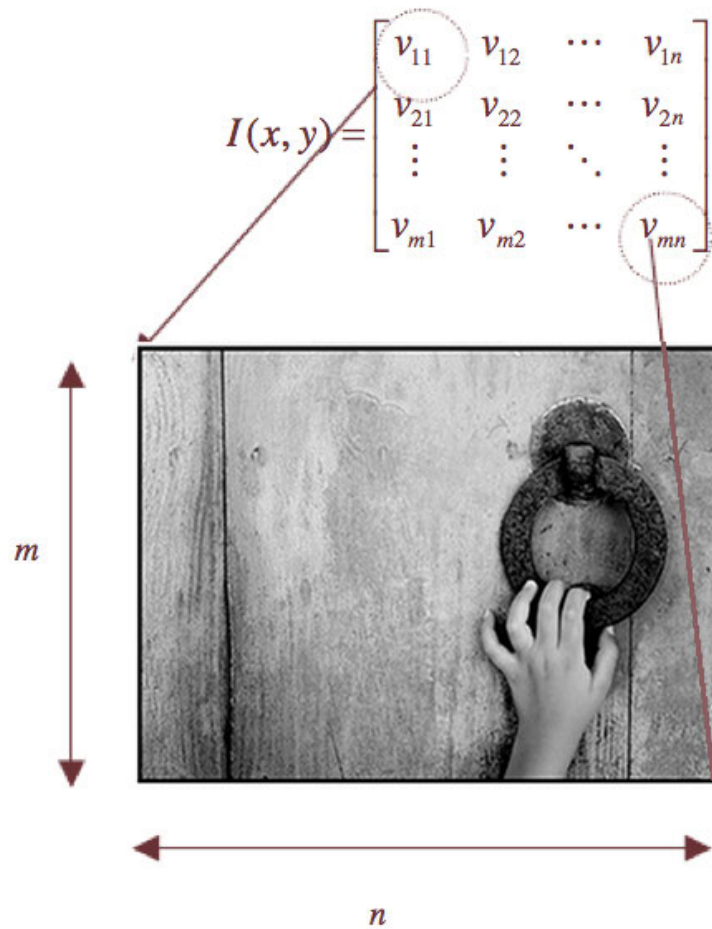


Figura 4.2: Esquema de representación matricial de una imagen en escala de grises

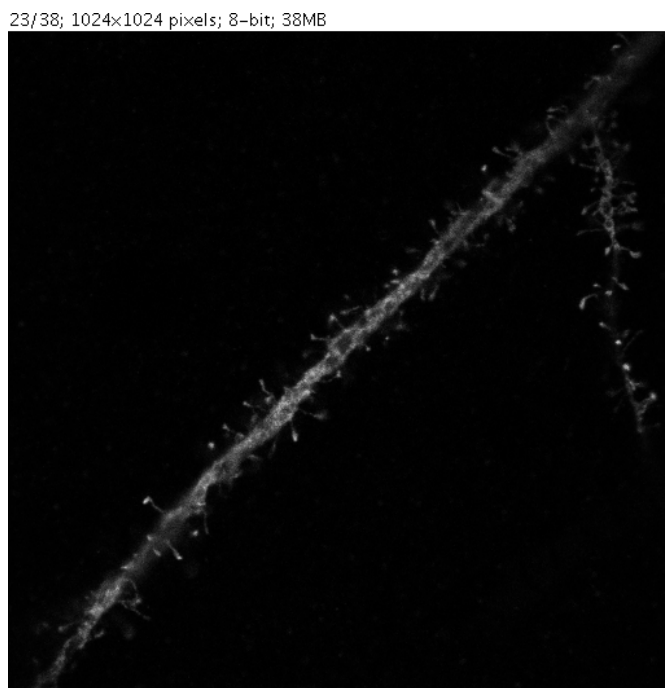


Figura 4.3: Volumen de una muestra en escala de grises

Disponemos de tres stacks de la misma muestra con diferentes intensidades. En este caso las dimensiones son 1024 píxeles de alto, 440 de ancho y 42 píxeles de profundidad. Para esta ocasión se utilizan 32 bits para representar cada pixel. Es un modelo de color (RGB) basado en la síntesis aditiva, con el que es posible representar un color mediante la mezcla por adición de los tres colores luz primarios. Cuando se utilizan 32 bits para representar un color se agrega al esquema de 256 valores para cada tono primario un cuarto canal denominado alfa que representa la transparencia. En este tipo de stacks tendremos cuatro canales, el canal alfa para la transparencia, y tres canales más para representar el rojo, verde y azul. Sin embargo, de este total de canales solamente utilizaremos el canal verde, el resto de canales estarán a 0.

Una imagen de color RGB se representa mediante una matriz tridimensional $m \times n \times p$, donde m y n tienen el mismo significado que para el caso de las imágenes de escala de grises mientras p representa el plano, que para RGB puede ser 1 para el rojo, 2 para el verde y 3 para el azul (Figura 4.4).

Por último, modificaremos uno de los stacks que acabamos de mencionar (Figura 4.5) para obtener otro de similares características (Figura 4.6).

Muchos de los algoritmos que vamos a estudiar y aplicar, trabajan con imágenes que utilizan 8 bits para representar cada pixel, por lo que a partir de un stack de los anteriores, convertiremos el modelo de color RGB a escala de grises.

Existen varios métodos para realizar esta conversión, entre ellos encontramos métodos basados en la conversión de la claridad, según el cual hace una media entre los colores más prominentes y los menos.

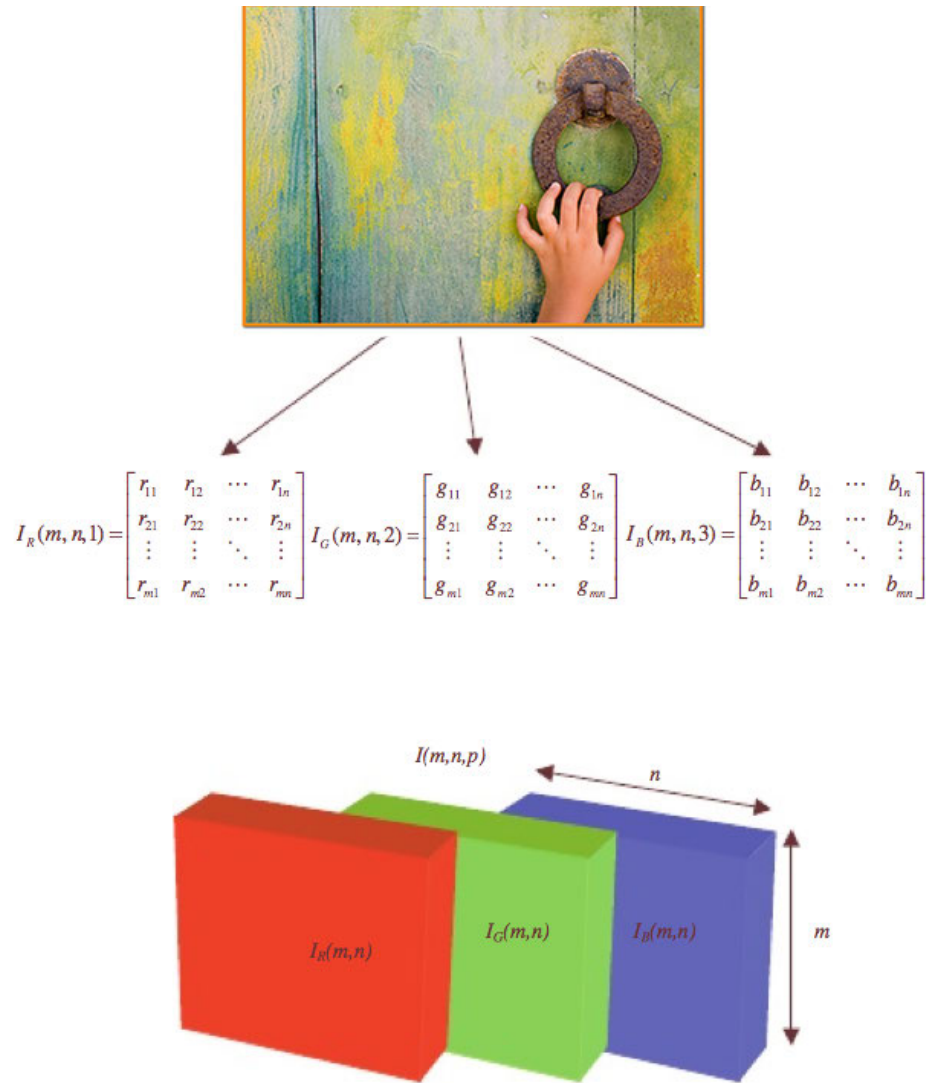


Figura 4.4: Esquema de representación matricial de una imagen de color RGB

La fórmula es la siguiente:

$$\frac{\max(R, G, B) + \min(R, G, B)}{2}$$

El método de la media, simplemente hace media de los tres valores según la siguiente formula:

$$\frac{R + G + B}{3}$$

El método de la luminosidad, es una versión más sofisticada que el método de la media. Realiza la media de valores, pero dándole un peso específico relacionado con la percepción humana a los colores. Las personas somos más sensibles al color verde que a otros, de esta forma, este color tendrá más peso específico. Ésta será la fórmula que utilizemos.

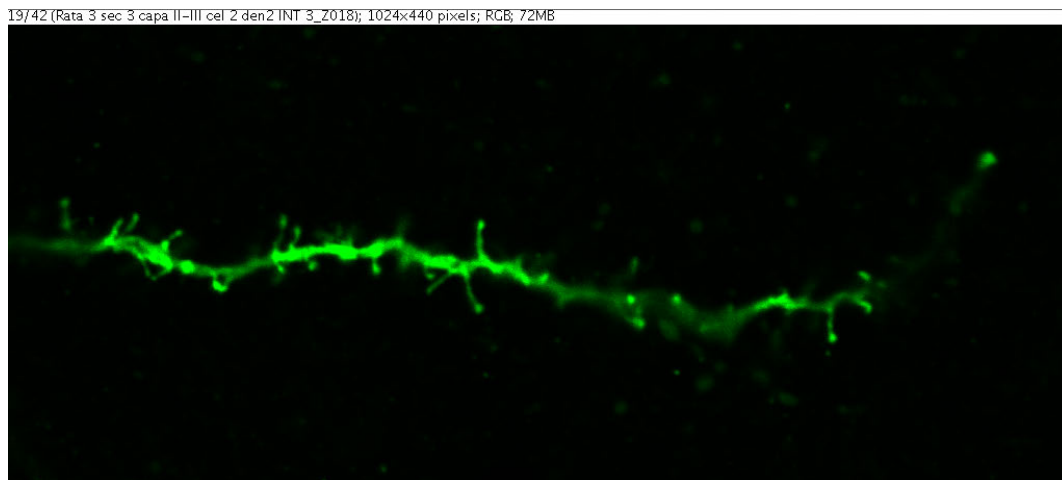


Figura 4.5: Stack de 42 secciones en modo de color RGB

La fórmula para pasar de un modelo RGB a una escala de grises es la siguiente:

$$0,21 * Rojo + 0,71 * Verde + 0,07 * Azul$$

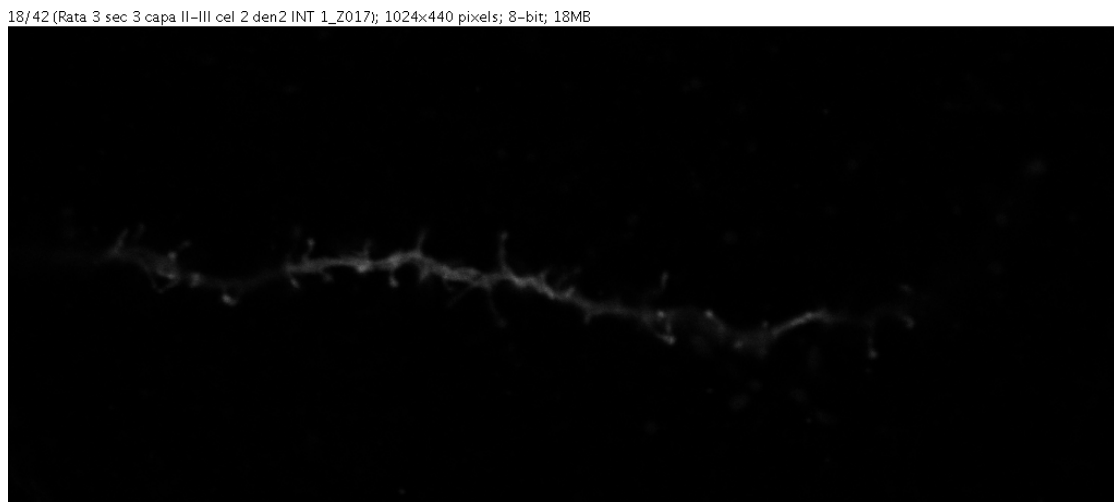


Figura 4.6: Imagen procedente del stack de 42 secciones en modo de color RGB convertida a escala de grises

4.2. Deconvolución de la imagen

La deconvolución se usa en restauración de señales para recuperar datos que han sido degradados por algún proceso físico que pueda describirse matemáticamente mediante la operación inversa, una convolución.

En microscopía, la convolución modeliza matemáticamente el proceso de formación de una imagen degradada a causa de desenfoque y ruido. El desenfoque, aún en las mejores condiciones, aparece inevitablemente en el límite de resolución del dispositivo, debido a la difracción en las lentes. Por otra parte, incluso con la mejor electrónica y gran habilidad del operador, las variaciones de flujo inherentes a las propiedades estadísticas de los fotones producen imágenes ruidosas, sobre todo en los límites de baja intensidad en que habitualmente se realiza la microscopía de fluorescencia. En otras palabras, cuando el tamaño del objeto observado es más pequeño que la resolución mínima del microscopio, se ve borroso, y para reconstruir los detalles del objeto separando las señales verdaderas de las falsas o ruido aplicaremos una técnica de deconvolución [Sarder and Nehorai, 2006].

Las técnicas de deconvolución de imágenes tridimensionales se pueden clasificar en seis grandes categorías, métodos sin vecinos, con vecinos, métodos lineales, no lineales, métodos estadísticos y métodos de deconvolución ciega. A menudo, los datos de entradas contienen iluminación no uniforme y sensibilidad desigual impuesta por la cámara [Sarder and Nehorai, 2006].

Los sistemas de microscopía de fluorescencia pueden producir dos tipos de distorsiones, una causada por el PSF (Point Spread Function) y otra por ruido aleatorio. El PSF es una aproximación a la resolución real que tiene el equipo donde se han adquirido las imágenes. Para calcularlo se toman secciones ópticas de partículas con un tamaño inferior a 0.2 mm, que es el límite de resolución teórico de la microscopía óptica. La adquisición de estas imágenes se ha de realizar en el mismo equipo y en las mismas condiciones de adquisición que la muestra que queremos analizar.

Asumiendo linealidad, la convolución del objeto y el PSF se ven afectados por el ruido y producen una imagen borrosa. La deconvolución restaura el objeto original a una resolución mejorada y una mayor relación señal ruido (SNR). El criterio de Nyquist establece la densidad mínima de datos que deben tener las imágenes para recoger toda la información de la muestra observada en el microscopio. Básicamente es el tamaño mínimo del vóxel necesario para poder capturar la toda la información del campo visualizado de la muestra, lo que permite optimizar el procesamiento de la imagen [Sarder and Nehorai, 2006].

4.3. Visualización datos de entrada

Para la visualización de las imágenes de entrada disponemos de varias posibilidades, entre ellas se destaca Mayavi, Matlab y el software ImageJ.

Mayavi es una herramienta para la visualización interactiva de datos tridimensionales con una perfecta integración con las bibliotecas científicas de Python. (<http://code.enthought.com/projects/mayavi>)

Matlab es un lenguaje de alto nivel y entorno interactivo de computación y desarrollo de aplicaciones totalmente integrado orientado para llevar a cabo proyectos en donde se encuentren implicados eleva-

dos cálculos matemáticos y la visualización gráfica de los mismos. Integra análisis numérico, cálculo matricial, proceso de señal y visualización gráfica en un entorno completo. Incluye funciones de representación de diagramas bidimensionales y tridimensionales, visualización de volumen tridimensional, herramientas para crear diagramas en forma interactiva y la posibilidad de exportar los resultados a los formatos gráficos más conocidos. (<http://www.mathworks.es/products/matlab/>)

ImageJ está escrito en Java y es multiplataforma, su código es de dominio público y está disponible sin el requerimiento de una licencia (<http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>). Consta de más de 500 plugins disponibles para la visualización, análisis y procesamiento de imágenes. Debido a los distintos tipos de entrada, precisaremos plugin para la lectura de metaimágenes, stacks y secuencias de imágenes.

4.4. VTK

VTK (Visualization Toolkit) es un sistema software *open-source*, y disponible de manera gratuita, para procesamiento, visualización y cómputo de imágenes y gráficos tridimensionales. VTK está desarrollado en C++, es multiplataforma y soporta una amplia variedad de algoritmos de visualización y avanzadas técnicas de modelación. (<http://www.vtk.org>)

Las clases de VTK pueden dividirse en los *Objetos Gráficos* que son los elementos de la escena, y todos los objetos requeridos para la renderización, y los *Objetos de Visualización* que pertenecen al flujo gráfico de datos y su principal tarea es transformar los datos de entrada en alguna representación que pueda ser renderizada [Schroeder et al., 1996].

Para la lectura de las imágenes de entrada recurriremos a las clases `vtkImageData` y `vtkReader` que nos facilitarán el acceso a los datos. A continuación, se especifican las clases estudiadas para proponer una resolución al problema.

4.4.1. `vtkImageThresholding`

Este filtro hará una binarización de la imagen, mediante un valor de umbral especificado, todo los píxeles por debajo de ese umbral pasarán a tomar valor 0, y todos los que estén por encima pasarán a valer 1. La utilidad que obtenemos de este filtro, en un primer momento, es la posibilidad de segmentar el objeto de la imagen del fondo.

4.4.2. `vtkImageGaussianSmooth`

Algoritmo que aplica un filtro Gaussiano al objeto de entrada. El principal objetivo de este método es suavizar la imagen, sin embargo en nuestro caso, el hecho de realizar el suavizado nos hará perder in-

formación muy relevante, como por ejemplo, los cuellos de las espinas en las ramificaciones dendríticas. Por este motivo, se descarta la utilización de este filtro.

4.4.3. `vtkContourFilter`

Este filtro obtiene el contorno de un polígono. Es una alternativa al algoritmo *Marching Cubes* que se explicará a continuación, para obtener la isosuperficie del objeto.

4.4.4. `vtkImageIslandRemove`

Algunas técnicas de segmentación pueden generar islas de vóxeles sin clasificar. Aplicaremos este filtro para poder eliminar los pequeños huecos que nos salgan en el objeto de salida generado.

4.5. ITK

ITK (Insight Segmentation and Registration Toolkit) es un sistema multiplataforma que proporciona a los desarrolladores una amplia gama de herramientas de software para análisis de imagen. Este conjunto de librerías de código libre está destinado a la Segmentación y Registro de datos multidimensionales. Algunas de las características de ITK son:

- Soporte del Proyecto *Visible Human*.
- Arquitectura Pipeline similar a VTK, así como procesamiento paralelo.
- Algoritmos disponibles para Segmentación y Registro de Imágenes.
- Representación de datos para imágenes multidimensionales.
- Filtros para manejar formatos especiales de imágenes.

A continuación vamos a presentar los principales algoritmos que se han estudiado para poder llevar a cabo una propuesta de solución del problema.

En primer lugar, para la lectura de los datos de entrada, teniendo en cuenta que ITK soporta imágenes con cualquier tipo de pixel y dimensión, aunque habrá que especificarlo, utilizaremos la clase `ImageFileReader`. Para guardar los resultados de los algoritmos utilizaremos la clase `ImageFileWriter`.

4.5.1. Segmentación basada en el Crecimiento de Regiones

Una de las primeras alternativas que se han planteado para la resolución del problema ha sido la segmentación por crecimiento de Regiones. Los algoritmos desarrollados dependen de los criterios de decisión para la inclusión o no de un pixel dentro de la región, el tipo de conectividad usando para determinar vecinos y la estrategia usada para visitar los píxeles vecinos.

La algoritmia basada en esta técnica comienza con una semilla que pertenece a la región en la que se encuentra el objeto que quiere ser segmentado. Esa semilla que incluirá uno o varios vóxeles (píxeles tridimensionales), avanzará evaluando si los píxeles vecinos pasan a formar parte de la región o se descartan. Este proceso continuará mientras existan vóxeles nuevos que se puedan agregar a la región.

4.5.1.1. Connected Threshold Image Filter

Este algoritmo utilizará como método para evaluar si un voxel candidato debe entrar a pertenecer a la región el valor de la intensidad dentro de un intervalo específico. El criterio está basado en un intervalo de valores de intensidad que se fija manualmente. Se facilitarán un valor superior y un valor inferior del umbral, de forma que se incluyan en la región todos los vóxeles cuyas intensidades estén dentro de dicho intervalo.

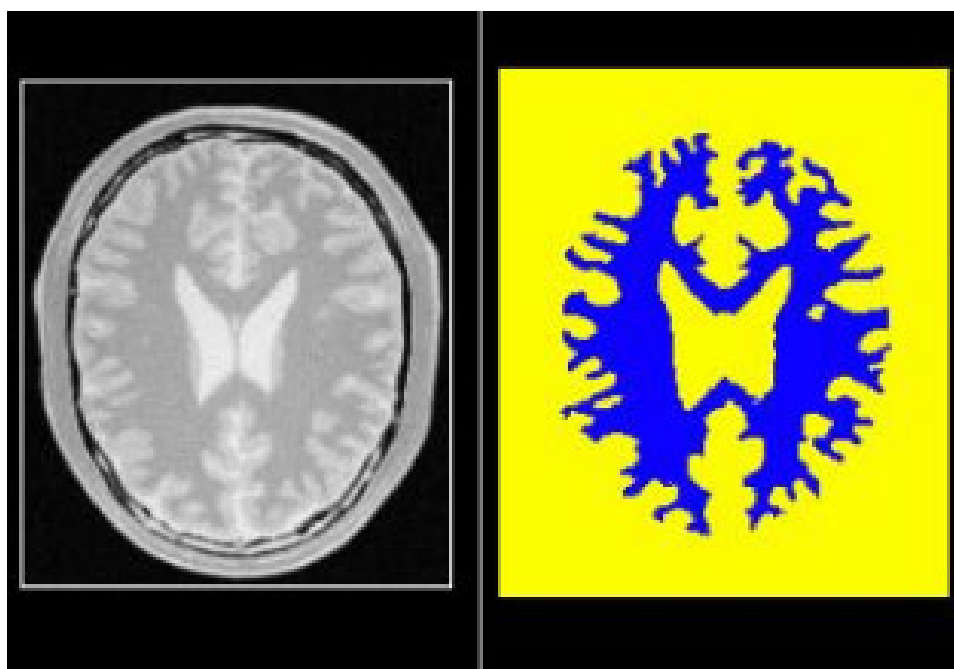


Figura 4.7: Resultado de la ejecución del filtro. En la izquierda la imagen original, y a la derecha fijando una semilla y valores de umbral entre 150 y 180 [López, 2006]

4.5.1.2. Curvature Flow Image Filter

El principal problema que vamos a tener con todos los datos de entrada será el ruido de las imágenes. Para poder aplicar cualquier algoritmo, previamente deberemos hacer un pre-procesado de la imagen. Para reducir todo este ruido debemos tener cuidado al aplicar los filtros, ya que, un filtro como el Gaussiano nos harían perder mucha información de la imagen.

La mayor ventaja que tiene este filtro es poder suavizar la imagen mientras preserva los bordes.

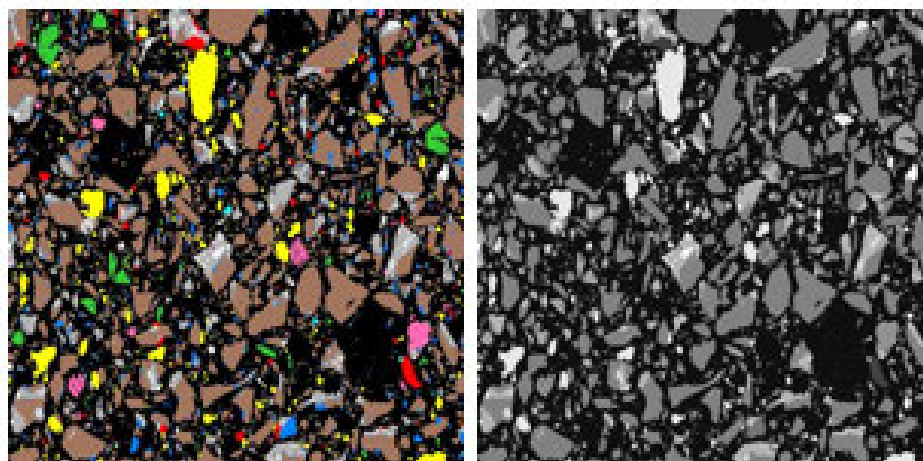


Figura 4.8: Resultado de la ejecución del filtro

4.6. Algoritmos de Esqueletonización

En el espacio tridimensional, el esqueleto de una geometría es el lugar geométrico de los centros de todas las esferas máximas inscritas, donde dichas esferas tocan el límite del objeto en más de un punto.

Los métodos planteados para la obtención del esqueleto de un volumen tridimensional pueden dividirse en tres categorías: *Adelgazamiento* topológico, Métodos basados en la transformación de la distancia, y algoritmos basados en Voronoi [Lang et al., 2011].

En el espacio discreto, existen dos métodos básicos para extraer el esqueleto de un objeto. Uno de ellos consiste en usar la transformada de la distancia. El otro método consiste en usar un procedimiento de *adelgazamiento* que borra de forma repetida los puntos que son bordes del objeto satisfaciendo una serie de condiciones geométricas y topológicos hasta conseguir un conjunto de pequeños puntos conectados [Lee et al., 1994].

Se han propuesto diversos algoritmos, presentando métodos que obtienen tanto la superficie, como la curva de los esqueletos de la imagen, evaluando la conectividad existente entre los vóxeles y sus

vecinos [Borgefors et al., 1999]. Métodos que utilizan la idea de la prevención topológica para preservar partes del esqueleto que, de lo contrario, podrían ser erosionadas; asumiendo errores como la obtención de bucles o ciclos en la estructura de grafo obtenida o incluso estructuras fragmentadas [Schmitt et al., 2004].

Otras reconstrucciones de los esqueletos se han obtenido gracias al modelo de cilindros generalizados [Binford, 1987], generando un barrido de dos dimensiones en la sección transversal a lo largo del eje del espacio tridimensional y utilizando después el Modelo de Contorno Activo, o Serpiente, [Kass et al., 1988] para el montaje del esqueleto del objeto.

Utilizando detectores de estructuras curvilíneas para extraer los bordes del objeto también puede llegar a obtenerse la línea central del esqueleto de las dendritas [Fan et al., 2009].

También existen otras propuestas para obtener una aproximación a la eskeletonización mediante un esquema basado en el gradiente de un campo vectorial y proponiendo un algoritmo de detección de puntos del esqueleto [Xiao et al., 2010].

El problema de todos estos algoritmos es que están limitados a trabajar con imágenes binarias, sin embargo, se han propuesto métodos que pueden aplicarse a imágenes tridimensionales de neuronas adquiridas mediante microscopía confocal de fluorescencia obteniendo una eskeletonización directa en escala de grises utilizando el principio de la descripción de la longitud mínima (MDL). El esqueleto tridimensional se extrae directamente de los datos de la imagen en escala de grises evitando de esta forma, los errores introducidos por la binarización de la imagen [Yuan et al., 2009].

Además de este problema, nos encontramos con un coste computacional demasiado alto en la tarea de eskeletonización en el espacio tridimensional, unido al ruido que poseen los datos obtenidos del microscopio. Debido a estos problemas, se plantean otros métodos que tienden a usar modelos paramédicos para el trazado de filamentos [Xie et al., 2011]. Relacionado con estos métodos se nos presentan otras soluciones que plantean detectar una serie de puntos en la estructura del objeto, (mediante la búsqueda de los valores máximos locales de intensidad), y construir una estructura de árbol a través de esos puntos semillas mediante la búsqueda del árbol recubridor mínimo, es decir, un subgrafo que contiene todos los vértices o semillas del grafo inicial [Xie et al., 2011].

También existen varias herramientas software entre cuyas principales prestaciones se encuentra la tarea de obtener una reconstrucción automática de neuronas, como por ejemplo, el módulo *FilamentTracer* disponible en el programa *Imaris* basado en el método hysteresis, o herramientas como *Neurolucida* de MBF Bioscience, que obtienen un trazado de la estructura de la neurona de manera semiautomática.

Para trazar la ramificación dendrítica, NeuroStudio utiliza un algoritmo llamado *voxel scooping* [Rodríguez et al., 2009].

4.6.0.3. Binary Thinning Image Filter

Este algoritmo implementado en ITK se utiliza para encontrar los ejes centrales del objeto que aparece en la imagen de entrada. La idea general es erosionar la superficie del objeto iterativamente hasta que sólo quede el esqueleto. La erosión se debe realizar de forma simétrica con el fin de garantizar la posición media de las líneas del esqueleto y de tal forma que no se pierda la conectividad del objeto.

El principal problema que tiene este algoritmo en nuestro caso, de nuevo, es el hecho de que esté implementado única y exclusivamente para imágenes binarias tridimensionales. La intención en todo momento es que se pueda aplicar un algoritmo capaz de trabajar con una escala mínima de escala de grises (8 bits) [ITK].

También existen otros algoritmos desarrollados en ITK para obtener las líneas centrales de objetos utilizando, por ejemplo, la media del flujo del salida (Average Outward Flux) como el filtro Average Outward Flux y el Medial Curve [Mellado et al., 2007].

4.7. Algoritmo Marching Cubes

La técnica de extracción de superficie más popular es el algoritmo Marching Cubes diseñado por Lorensen y Cline [Lorensen and Cline, 1987]. Dicho algoritmo genera una malla triangular de una iso-superficie definida por un capo escalar tridimensional.

El algoritmo usará una aproximación de divide y vencerás para localizar la superficie en un cubo lógico formado por 8 píxeles (un vóxel), cuatro de cada par de secciones seguidas del stack. Ver Figura

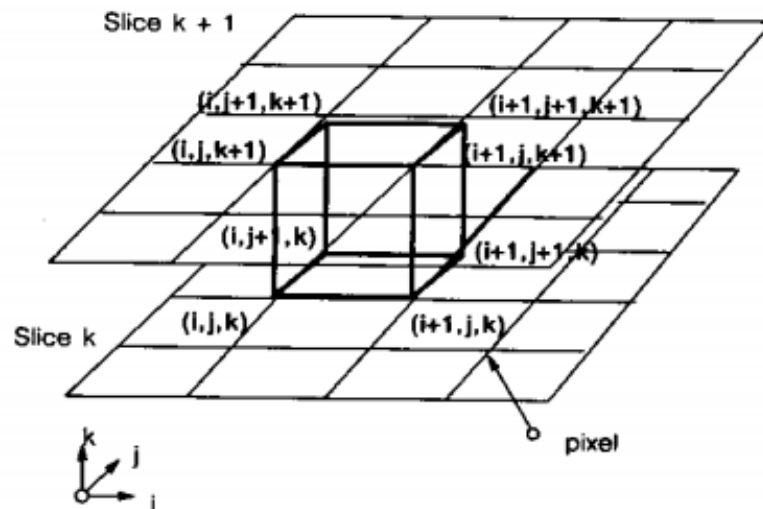


Figura 4.9: Marching Cube [Lorensen and Cline, 1987]

Marching Cubes subdivide el volumen total de la imagen en cubos de 8 píxeles vecinos cada uno, y a través de cada cubo, para cada uno de sus vértices, se determina cual está dentro de la isosuperficie y cual fuera. La forma en la que un cubo se recubre por la isosuperficie se aproxima mediante triángulos. Conectando todos los triángulos de los cubos en el límite de la isosuperficie obtendremos una representación de esa superficie.

El procedimiento que sigue el algoritmo es determinar la manera en que la superficie realiza una intersección en ese cubo, y a continuación, se mueve al siguiente. Para encontrar la intersección de la superficie en un cubo, se le asigna uno a los vértices de cada cubo cuyo valor en ese vértice exceda o iguale el valor de la superficie que estamos construyendo. Esos vértices, se encontrarán dentro de la superficie. Los vértices del cubo cuyo valores se encuentren por debajo del valor de la superficie recibirán un cero y se consideran fuera de la superficie. La superficie realiza una intersección en aquellas aristas de los cubos donde uno de los vértices está dentro de la superficie y el otro esté fuera. Debido a que hay ocho vértices en cada cubo y dos estados, fuera o dentro de la superficie. Sólo hay $2^8 = 256$ posibilidades de que una superficie pueda cortar un cubo. Podemos reducir mediante simetría esos 256 casos a 14 patrones. En la Figura xxxxx se muestran los 14 patrones para la triangulación.

Se utiliza un índice para buscar en una tabla, con esas 256 maneras de interseccionar la superficie con las aristas usando esos patrones. Mediante este índice se conoce en cual de las aristas está cortando la superficie.

El último paso del algoritmo calcula el vector normal unitario para cada vértice del triángulo, y como salida del algoritmo obtendremos un conjunto de vértices de los triángulos que nos darán lugar a un mallado tridimensional del objeto.

La principal desventaja que presenta este algoritmo son las ambigüedades que pueden aparecer en determinados casos, como por ejemplo, *agujeros* existentes en la malla triangular. No se puede garantizar una isosuperficie correcta topológicamente hablando [Lang et al., 2011].

Una extensión propuesta al algoritmo original es el Marching Cubes 33, que genera isosuperficies correctamente topologicas resolviendo ambigüedades tanto en las caras como dentro de los cubos [Lang et al., 2011].

4.7.1. Implementaciones del algoritmo Marching Cubes en VTK

El algoritmo `vtkMarchingCubes` nos permite reconstruir una superficie tridimensional aproximando el contorno del volumen de la imagen mediante el uso de patrones diseño. Este algoritmo nos permitirá especificar el valor de un umbral para extraer la superficie tridimensional del objeto. La salida que obtendremos tras aplicar este algoritmo será una malla poligonal.

La clase `vtkMarchingCubes` es una generalización de `vtkContourFilter`. `VtkContourFilter` implementa el algoritmo de Marching Cubes general, es decir, va creando la tabla de casos a medida que identifica de que tipo de objetos se trata. El caso de `vtkMarchingCubes`, está optimizado para usar Structured Points [VTK]

4.8. Algoritmo Rayburst

El algoritmo de muestreo Rayburst [Rodriguez et al., 2006], [Rodriguez et al., 1997] utiliza imágenes en escala de grises procedentes de muestras de microscopía láser confocal. Dicho algoritmo utilizará el original en escala de grises en lugar de imágenes segmentadas para la estimación volumétrica de los objetos.

Rayburst emite un núcleo multidireccional de rayos desde un punto interior de la superficie de un sólido hasta que se cumpla el criterio de parada, en este caso que el valor de la intensidad de los vóxeles que van atravesando los rayos se encuentren dentro de un intervalo fijado previamente. Obtendremos la estimación de los diámetros de las estructuras tubulares a las que dan lugar las ramificaciones dendríticas y una medición de la volumetría y la superficie de las espinas dendríticas.

Tiene dos rutinas principales, 2D y 3D. La rutina 3D funciona como un globo que se infla en el interior de una estructura para medir su volumen. El problema de este método es que los rayos sólo pueden viajar en una línea recta desde el origen y por lo que limita las formas que se pueden medir (polígonos convexos).

La rutina 2D se utiliza para medir diámetros dentro de las estructuras tubulares (realiza una estimación de diámetros dendríticos). Por lo tanto, Rayburst es básicamente para medir diámetros, o el volumen y el área de una malla poligonal.

Para que el algoritmo funcione entre otros parámetros hay que especificarle un umbral. El valor de este parámetro variará entre 0.0 y 255.0 ya que este es el rango dinámico de una imagen de 8 bits. Si por ejemplo, nuestro fondo tiene una intensidad de valor 10, y la estructura una intensidad de 100, el valor del umbral deberá determinarse entre ambos. Entre todos los métodos que existen para determinar el umbral, se recomienda el método ISODATA [Gonzalez and Woods., 2002] para obtener un umbral óptimo para los datos. El algoritmo necesita saber en que valor tiene que parar cada rayo, ya que no permite el uso de un umbral dinámico.

Utilizaremos Rayburst tras conocer el esqueleto de nuestro objeto, es decir, una vez estén trazadas las neuritas, y determinando el umbral óptimo en cada punto a lo largo de la ramificación.

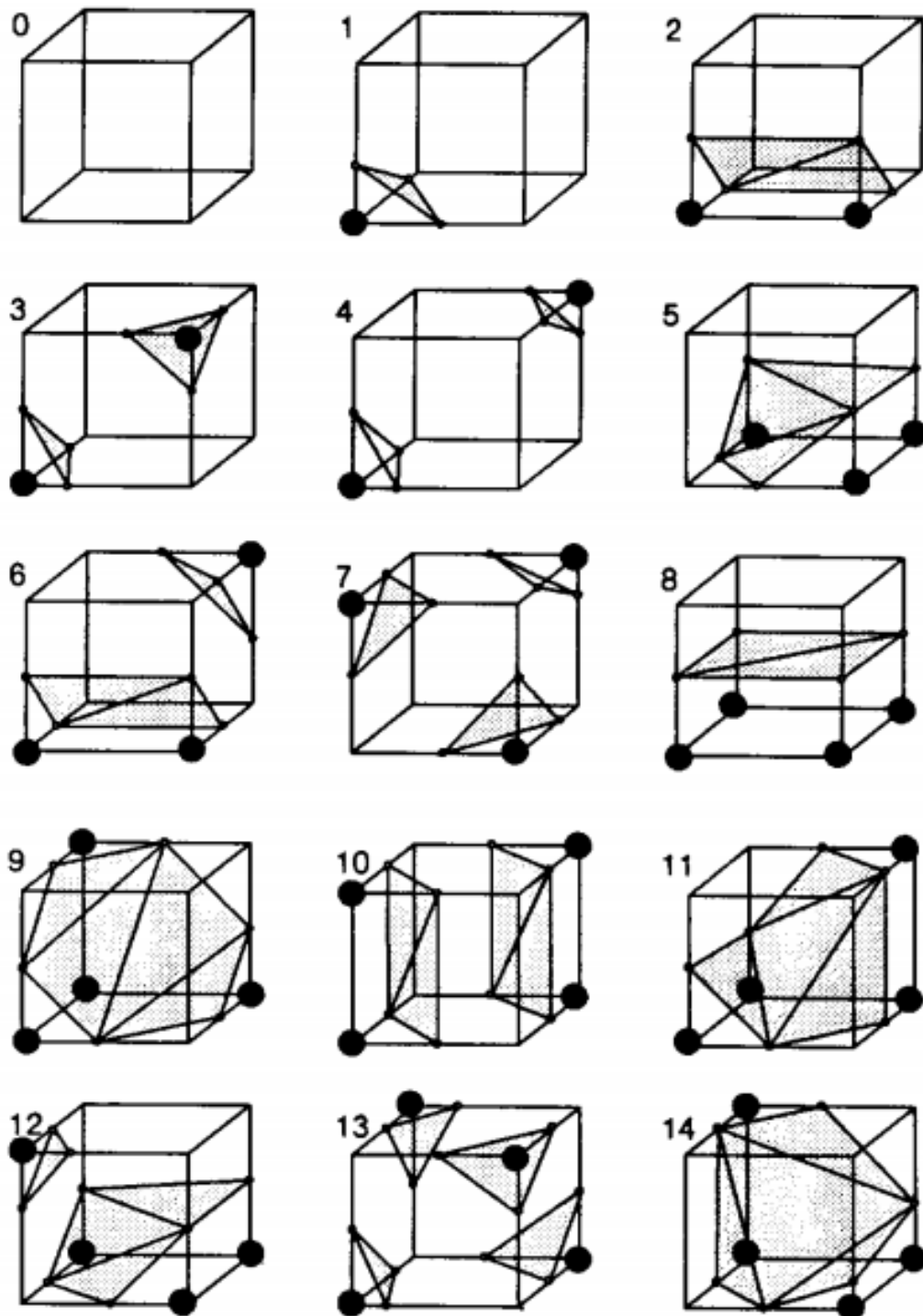


Figura 4.10: Casos de cubos triangulados [Lorensen and Cline, 1987]

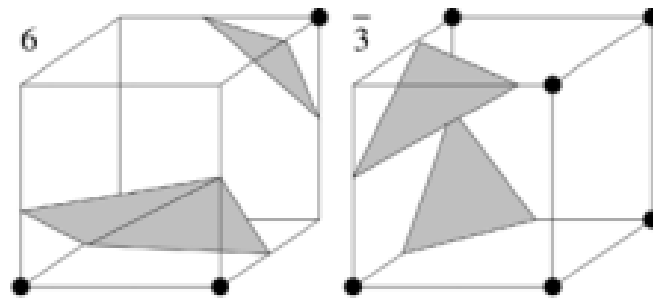


Figura 4.11: Casos de ambigüedades que pueden provocar agujeros en la superficie [Lang et al., 2011]

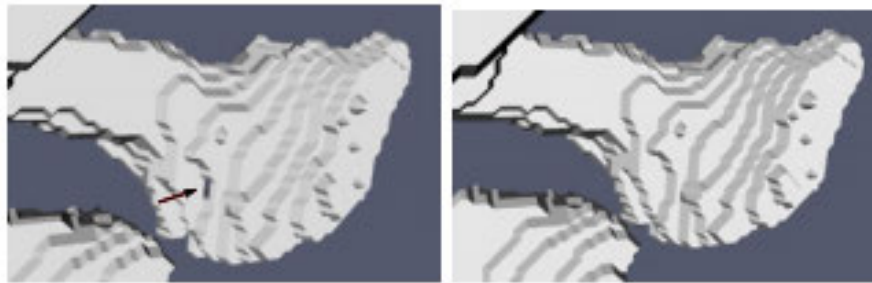


Figura 4.12: Ejemplo de generación de una isosuperficie de una espina usando Marching Cubes a la izquierda y la variante Marching Cubes 33 a la derecha [Lang et al., 2011]

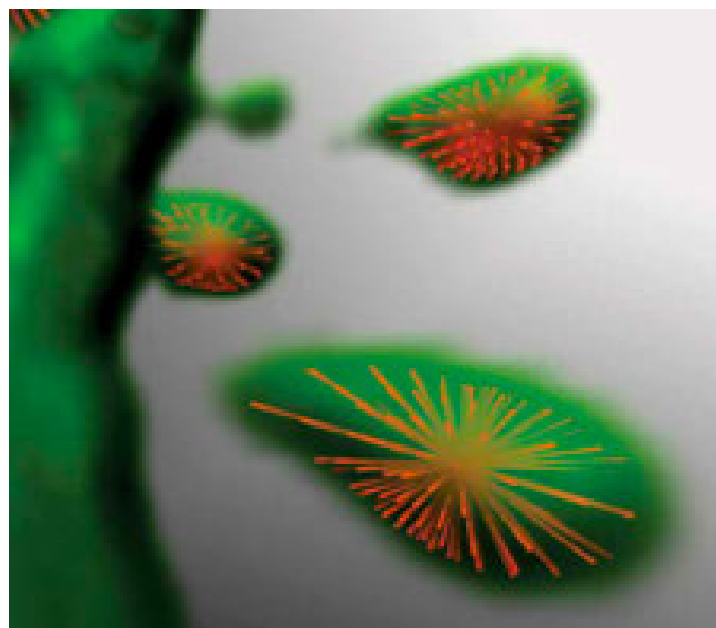


Figura 4.13: Estimación del volumen y área de una espina dendrítica usando Rayburst



Figura 4.14: Esquema de procesamiento utilizando Rayburst tras la obtención de las ramificaciones de las neuritas

Capítulo 5

Propuesta de solución

En este capítulo se van a plantear una serie de soluciones para la resolución del problema planteado. Se mostrarán los resultados obtenidos y las posibles mejoras en trabajos futuros.

5.1. Visualización de los datos de entrada

Se han desarrollado scripts para la visualización de los datos de microscopio con muestras de ramificaciones dendríticas.

Se ha desarrollado un script en Python para poder visualizar los stacks en Mayavi. Este script recorre los valores de las intensidades almacenados en las matrices de las imágenes y visualiza aquella intensidad que sea más alta en profundidad, es decir, según el eje z.

Para poder visualizar las metaimágenes necesitaremos recurrir a un plugin del software ImageJ. En este caso, no tendremos las secciones separadas del stack, si no, el volumen tridimensional directamente.

5.2. Deconvolución

La técnica de deconvolución que hemos utilizado es *Blind Deconvolution*, en la que primero estimaremos el PSF con la imagen obtenida por el microscopio y los datos de éste. De esta forma obtendremos una imagen mucho más nítida que la original.

Existen software disponibles, tanto comerciales como gratuitos, proporcionando ésta técnica, incluso el software de ImageJ nos proporciona un plugin para ello, sin embargo, los mejores resultados los hemos obtenido que el paquete software Autodeblur de Autoquant.

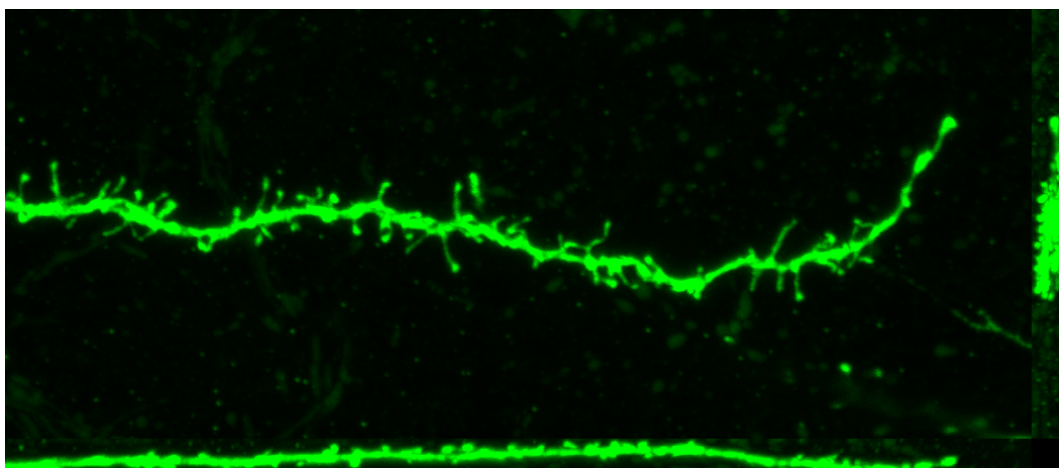


Figura 5.1: Stack de microscopía confocal sin aplicar la técnica de deconvolución

5.3. Umbralización

Fijando una semilla y un intervalo de valores para determinar el umbral, obtendremos una binarización de la imagen mediante los algoritmos que se mencionan a continuación.

El principal objetivo de aplicar éste método es limpiar la imagen. Es decir, conseguir proporcionar un umbral lo suficientemente alto como para que dentro de la región segmentada esté toda la información que necesitamos sin perder zonas de interés, como por ejemplo, los cuellos de las espinas dendríticas. Al obtener esa región será más fácil obtener el esqueleto del objeto, ya que su búsqueda se reducirá a la zona de interés y no a todo el stack.

5.3.1. Connected Threshold Growing Seed

Plugin proporcionado por ImageJ que nos ha proporcionado los mejores resultados. Se fija una semilla y a partir de esa posición la región a segmentar va creciendo.

5.3.2. ITK Connected Threshold

Algoritmo de ITK que nos ha proporcionado peores resultados que el anterior, aunque se plantea seguir refinando su uso para utilizarlo en este mismo trabajo.

5.4. Esqueletonización

En este punto, hemos obtenido de un volumen o de un stack de imágenes una región acotada de interés en la que tenemos delimitado el objeto. Todos los procesos anteriores estaban destinados a pre-

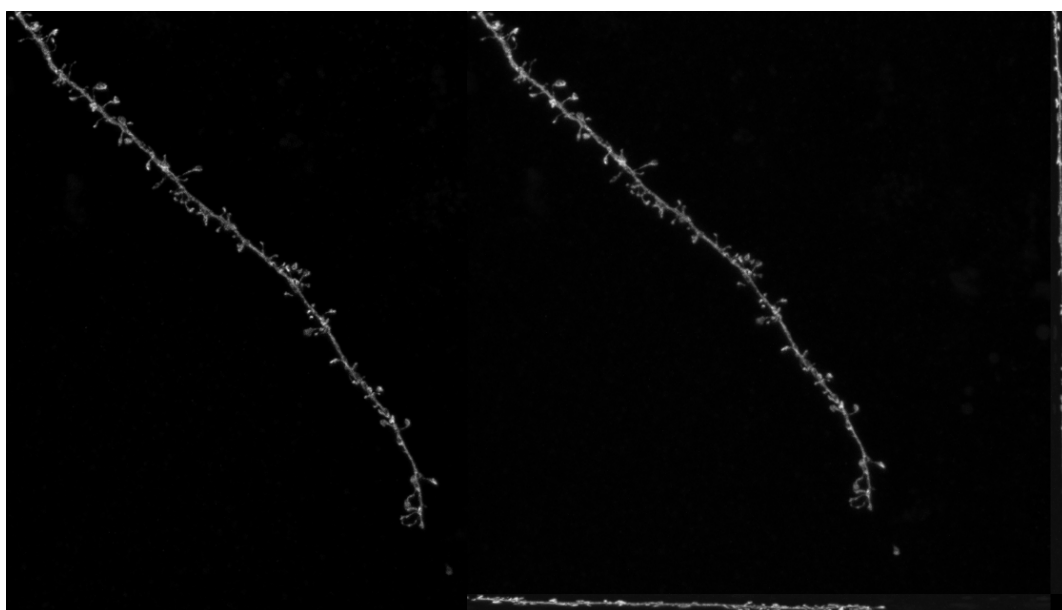


Figura 5.2: Comparativa de imágenes sin aplicar deconvolución (izquierda) y con la técnica aplicada (derecha)

procesar la imagen, a partir de este momento, intentaremos llegar a nuestro objetivo, la segmentación automática de las espinas dendríticas y de las ramificaciones.

El principal problema que tienen los algoritmos de esqueletonización es que trabajan con imagen binarias, y aunque las salidas que obtenemos tras aplicar las técnicas de umbralización son de este tipo, si trabajásemos con ellas acumularíamos errores para obtener la segmentación.

Se aplicará un algoritmo de esqueletonización a la imagen devuelta por la umbralización que al menos, trabaje en escala de grises.

5.5. Segmentación de espinas y ramificaciones dendríticas

Habiendo obtenido de un stack, una región acotada de interés en la que se encuentra una ramificación dendrítica y sus espinas, sin ser necesaria la binarización de dicha imagen y obteniendo el esqueleto del objeto se plantea el uso del algoritmo Rayburst para delimitar que vóxeles pertenecerían al tallo dendrítico.

Una vez obtenida la región de interés cuando realizamos el pre-procesamiento de imagen, se propone no binarizar la imagen para no acumular errores, debido a que la salida de la umbralización es de este tipo, multiplicaremos la imagen original y la imagen con el área de interés segmentada, y de ésta forma recuperaremos los valores de intensidad perdidos. Esto ocurre porque al binarizar la imagen solo dispon-

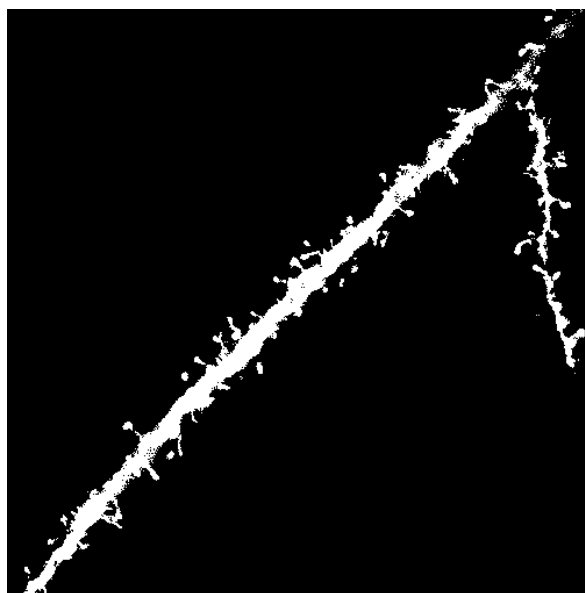


Figura 5.3: Ejemplo de aplicar el plugin de ImageJ Connected Threshold Growing Seed

dremos de valores 0 (área de no interés) y 1(área que contiene el objeto). Los resultados que obtenemos se muestran en las figuras 5.7 (plugin de ImageJ) y 5.6 (filtro de ITK)

El motivo de que en la Figura 5.7 se aprecie mayor claridad, es debido a que la binarización que obtiene el plugin de ImageJ ajusta los valores a 0 y 255 en lugar de a 0 y 1.

Aplicando Rayburst y consecuentemente segmentando el tallo dendrítico, se propone una operación OR de la imagen umbralizada con valores de intensidades reales, junto con la imagen del tallo dendrítico segmentado, para, de esta manera, recuperar que vóxeles no comparten ambas imágenes y obtener la segmentación de todas las espinas dendríticas del stack.

5.6. Pipeline del proceso

A continuación se muestra una propuesta de pipeline para conseguir la automatización del proceso de segmentación de espinas dendríticas a través de muestras observadas con microscopía confocal.

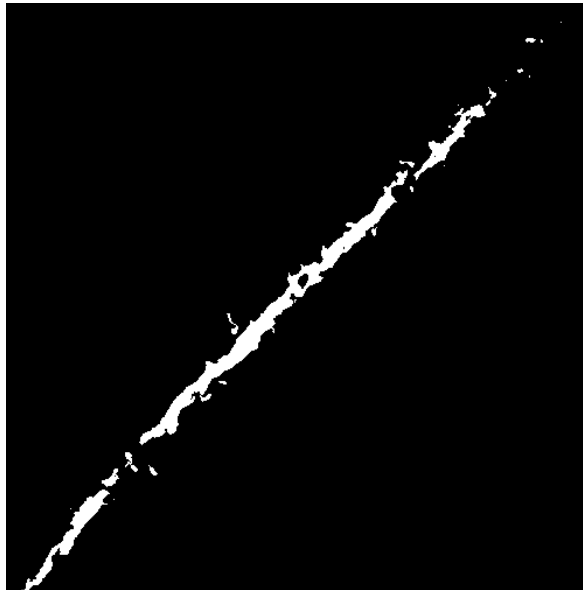


Figura 5.4: Ejemplo de aplicar el filtro de ITK Connected Threshold

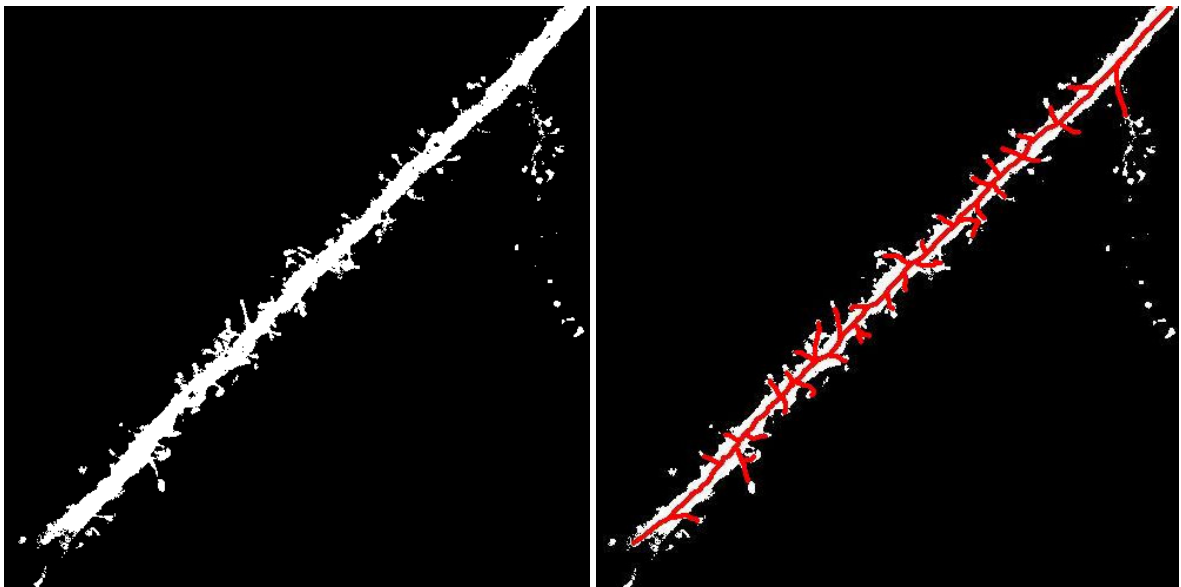


Figura 5.5: Imagen binarizada y posible esqueleto

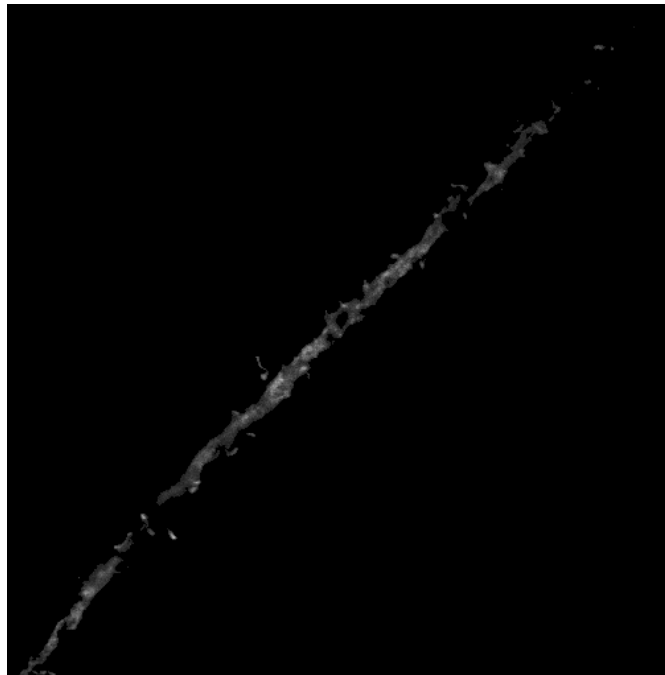


Figura 5.6: Área sementada con valores de intensidad no binarizados

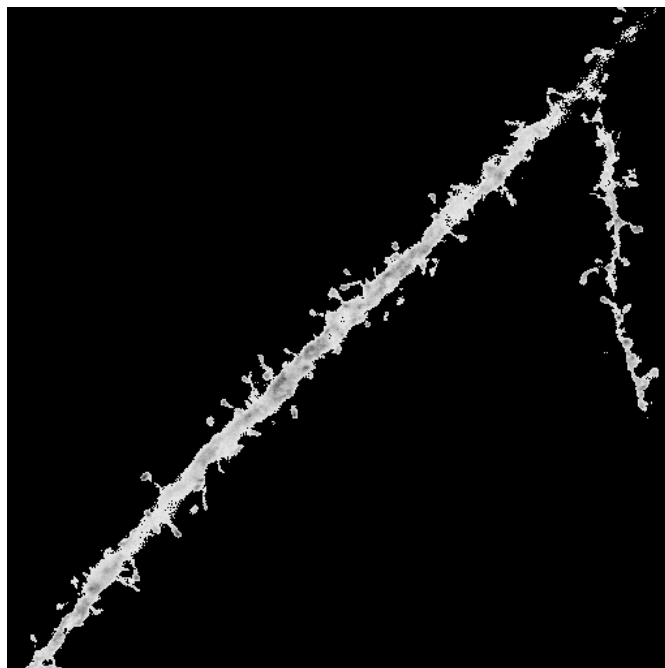


Figura 5.7: Área sementada con valores de intensidad no binarizados

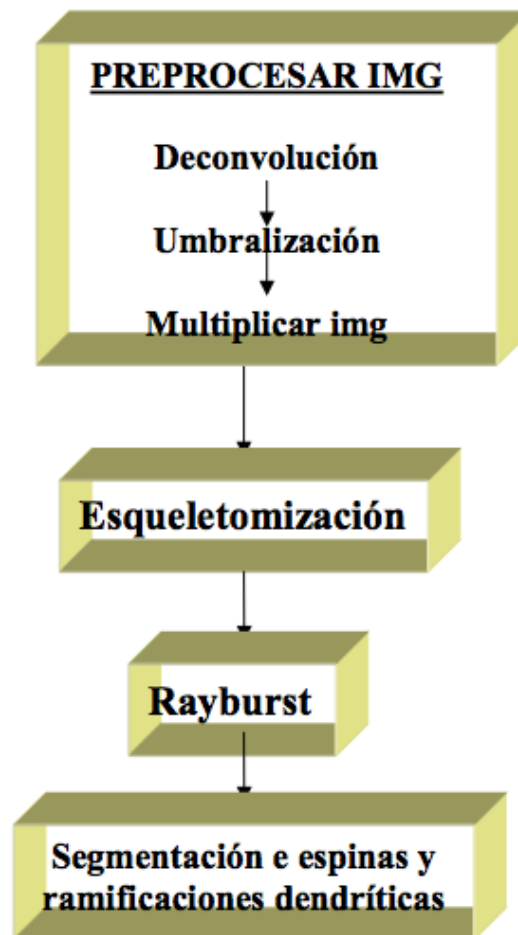


Figura 5.8: Pipeline propuesto para el proceso completo

Parte IV

Conclusiones y líneas futuras

Capítulo 6

Conclusiones

En primer lugar, hacer referencia a que se han cumplido los objetivos del trabajo presentado, realizar una importante aproximación al estudio y desarrollo de algoritmos para su utilización en muestras de ramificaciones dendríticas con espinas teñidas con *Lucifer Yellow* observadas al microscopio de fluorescencia.

Se ha obtenido buenos resultados en la visualización mediante *Mayavi* de los datos de muestra con el script desarrollado en *python*, aunque la aplicación de técnicas de contorno aplicadas después no fueron óptimas debido al ruido de las imágenes.

Al aplicar las técnicas de deconvolución se ha observado como ha mejorado la resolución y el contraste de las imágenes, por lo que se considerará en adelante, parte del posible módulo de preparación de los datos de entrada.

El uso de las librerías de ITK y VTK son excelentes para el desarrollo de aplicaciones ligadas al campo de la medicina. Se ha conseguido obtener resultados prometedores mediante el uso y combinación de alguno de estos algoritmos.

Para la visualización tridimensional de los stacks se recurrirá al algoritmo *Marching Cubes*, el cual se presenta como la mejor alternativa, una vez que la imagen esté limpia, para recuperar su mallado y de esta forma poder obtener datos como por ejemplo, volumen de los elementos, forma, tamaño...

Para obtener el esqueleto del objeto de la muestra, se tratarán algoritmos tanto de esqueletonización y se probarán nuevas técnicas, como el método Watershead, para la comparación de resultados.

El mayor problema que se plantea es en primer lugar, pre-procesar la imagen para eliminar todo el ruido que posee, y una vez que la calidad de los stacks sea la necesaria, combinar técnicas de esqueleti-

zación para recuperar el tallo dendrítico, junto con otras técnicas vistas como los umbrales adaptativos o el algoritmo *Rayburst* para poder recuperar las espinas dendríticas.

Capítulo 7

Líneas futuras

Existen dos líneas de investigación y desarrollo interesantes respecto a este proyecto. Una de ellas se centra en la continuación de la labor de investigación, y la otra es referente a las posibles mejoras de los algoritmos, como de los resultados obtenidos.

Una de las mejoras más importante que puede producirse es conseguir automatizar el proceso para la obtención de neuronas. Hasta el momento se trata de un proceso puramente humano, que puede conllevar errores o incluso diferentes criterios a la hora de la toma de una decisión. Gracias a esta automatización, podrían desaparecer los casos de las dendritas aisladas que durante el proceso se han tenido que ir eliminado en concordancia a los criterios que se han desarrollado.

Al realizar la segmentación de las espinas, algunos cuellos se pierden debido a las dificultades de la tinción y al ruido de los datos. Sería importante poder recuperar esa parte de los datos y en el caso de que no fuera posible, autogenerarlos mediante algoritmos de curvas o similares.

Debido a que la obtención de resultados aceptables con datos obtenidos mediante microscopía electrónica se plantea como una ardua tarea, existe la opción de realizar estos procedimientos con microscopía electrónica.

Alejándonos un poco de las posibles mejoras de los módulos desarrollados, uno de los aspectos más interesantes que se nos plantean ahora es el proceso de Neurogénesis, conocido como el proceso por el cual las neuronas se generan. Hasta este punto nuestro objetivo principal ha sido el de conseguir segmentar los distintos elementos existentes en las muestras para su recuperación y su estudio. Una vez que esa recuperación sea totalmente factible, una línea que se plantea es la creación de modelos de crecimiento de estas espinas dendríticas, es decir, conseguir llevar a cabo el proceso de simulación de la espinogénesis. En un primer momento sin tener en cuenta condiciones ambientales ni elementos que

pudieran influir en ese desarrollo, y en adelante, para profundizar en este aspecto podrían incorporarse factores a los modelos generados, tales como incorporación de estructuras y parámetros tridimensionales, elementos de la microanatomía como las espinas o incluso condiciones químicas y físicas de crecimiento.

Bibliografía

- I. Ballesteros-Yáñez, R. Benavides-Piccione, G.N. Elston, R. Yuste, and J. DeFelipe. Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*, 138:76–101, 2006. [Citado en pág. 4.]
- R. Benavides-Piccione, J.I. Arellano, and J. DeFelipe. Catecholaminergic innervation of pyramidal neurons in the human temporal cortex. *Cerebral Cortex*, 15:1584–1592, 2005. [Citado en pág. 22.]
- T. O. Binford. Generalized cylinder representation. In *Encyclopedia of Artificial Intelligence*, pages 321–323, Berlin, Heidelberg, 1987. John Wiley and sons. [Citado en pág. 44.]
- G. Borgefors, I. Nyström, and G. Sanniti. Computing skeletons in three dimensions. *Pattern Recognition*, 32:1225–1236, July 1999. [Citado en pág. 44.]
- E.H. Buhl and W. Schlote. Intracellular lucifer yellow staining and electron microscopy of neurones in slices of fixed epileptogenic human cortical tissue. *Acta Neuropathol*, 75:140–146, 1987. [Citado en pág. 22.]
- Instituto Cajal. Microorganización de la corteza cerebral normal y alteraciones de los circuitos. Website, 2010. <http://www.cajal.csic.es/departamentos/defelipe-orqueta/defelipe-orqueta.html>. [Citado en pág. 19.]
- J. Carey. *Brain Facts. A primer on the brain and the nervous system*. Society for Neuroscience, 1990. [Citado en págs. 10 y 12.]
- J. DeFelipe. *Cajal y sus dibujos: ciencia y arte*, chapter 18, pages 213–230. Saned, 2005. [Citado en págs. 22 y 24.]
- J. DeFelipe and I. Fariñas. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol*, 39:563–607, 1992. [Citado en pág. 22.]

- G.N. Elston. Pyramidal cells of the frontal lobe: All the more spinous to think with. *Journal of Neuroscience*, 20:1–4, 2000. [Citado en pág. 23.]
- G.N. Elston and M.G.P. Rosa. The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer iii of functionally related cortical visual areas. *Cerebral Cortex*, 7:432–452, 1997. [Citado en pág. 24.]
- G.N. Elston, M.G.P. Rosa, and M.B.Calford. Comparison of dendritic fields of layer iii pyramidal neurons in striate and extrastriate visual areas of the marmoset: A lucifer yellow intracellular injection study. *Cerebral Cortex*, 6:807–813, 1996. [Citado en pág. 22.]
- J. Fan, X. Zhou, JG Dy, Y. Zhang, and ST Wong. An automated pipeline for dendrite spine detection and tracking of 3d optical microscopy neuron images of in vivo mouse models. *Neuroinformatics*, 7, June 2009. [Citado en pág. 44.]
- J. Fernández, J.M. Peña, L. Fernández, R. Benavides-Piccione, and J. DeFelipe. A model for generating synthetic dendritic pyramidal cell morphologies. 2010. [Citado en págs. 10 y 24.]
- D. Gabriel and J. Hernán. Sobre la organización columnar de la corteza cerebral. *Revista colombiana de psiquiatría*, 33:403–409, 2004. [Citado en pág. 24.]
- L. Galvani. *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Instituti Scientiarum, 1791. [Citado en pág. 9.]
- M. García, L. Carrilo, J. Furió, and M.A. García. *Biología y Geología*. ECIR, 2008. [Citado en págs. 12, 13 y 14.]
- R. Gonzalez and R.E. Woods. *Thresholding*. In *Digital Image Processing*. Pearson, 2002. [Citado en pág. 47.]
- ITK. Binary thinning image filter. Website. http://www.itk.org/Doxygen/html/classitk_1_1BinaryThinningImageFilter.html. [Citado en pág. 45.]
- M. Kass, A. Wittkin, and D. Terzopoulos. Snakes: Active contour models. *International Journal of Computer Vision* 1, 4:321–331, 1988. [Citado en pág. 44.]
- S. Lang, P. Drouvelis, E. Tafaj, P. Bastian, and B. Sakmann. Fast extraction of neuron morphologies from large-scale sbfsem image stacks. *J Comput Neurosci*, 2011. [Citado en págs. vi, vi, 43, 46 y 49.]
- Ta-Chih Lee, Rangasami L. Kashyap, and Chong-Nam Chu. Building skeleton models via 3-d medial surface/axis thinning algorithms. *CVGIP: Graph. Models Image Process.*, 56:462–478, November 1994. ISSN 1049-9652. doi: 10.1006/cgip.1994.1042. URL <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=202862.202867>. [Citado en pág. 43.]

- William E. Lorensen and Harvey E. Cline. Marching cubes: A high resolution 3d surface construction algorithm. *SIGGRAPH Comput. Graph.*, 21:163–169, August 1987. ISSN 0097-8930. doi: <http://doi.acm.org/10.1145/37402.37422>. URL <http://doi.acm.org/10.1145/37402.37422>.
[Citado en págs. vi, vi, 45 y 48.]
- Job Acevedo López. Desarrollo de aplicaciones médicas utilizando las bibliotecas itk y vtk. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias de la Computación. Benemerita Universidad Autónoma de la Puebla, 2006.
[Citado en págs. vi y 42.]
- A. Martínez-Nistal, A. Sampedro, and J.R. de los Toyos. *Técnicas de Fluorescencia en Microscopía y Citometría*. Universidad de Oviedo. Servicio de Publicaciones, 1995. ISBN 84-7468-850-7.
[Citado en pág. 25.]
- X. Mellado, I. Larrabide, M. Hernández, and A. Frangi. Flux driven medial curve extraction. *The Insight Journal*, 2007.
[Citado en pág. 45.]
- V.B. Mountcastle. Modality and topographic properties of single neurons in cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol*, 20:408–434, 1957.
[Citado en págs. 4 y 17.]
- V.B. Mountcastle, A.L. Berman, and P.W. Davies. Topographic organization and modality representation in first somatic area of cat's cerebral cortex by method of single unit analysis. *Am J Physiol*, 183:646, 1955.
[Citado en págs. 4 y 17.]
- J.B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 2006.
[Citado en pág. 26.]
- Alfredo Rodriguez, Douglas B Ehlenberger, Dara Dickstein, Patrick R Hof, and Susan L Wearne. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE*, 3, 1997.
[Citado en pág. 47.]
- Alfredo Rodriguez, Douglas B Ehlenberger, Patrick R Hof, and Susan L Wearne. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nat. Protocols*, 1(4):2152–2161, 2006.
[Citado en pág. 47.]
- A. Rodríguez, D.B. Ehlenberger, P.R. Hof, and S.L Wearne. Three-dimensional neuron tracing by voxel scooping. *Journal of Neuroscience Methods*, 184:169–175, 2009.
[Citado en pág. 44.]
- M. Ríos, R. Cabestrero, and F. Maestú. *Neuroimagen. Técnicas y procesos cognitivos*. Masson, 2007. ISBN 9788445817766.
[Citado en pág. 25.]
- P. Sarder and A. Nehorai. Deconvolution methods for 3d fluorescence microscopy images. *Signal Processing Magazines*, 23:32–45, 2006.
[Citado en pág. 39.]

S. Schmitt, J.-F. Evers, C. Duch, M. Scholz, and K. Obermayer. New methods for the computer-assisted 3D reconstruction of neurons from confocal image stacks. *Neuroimage*, 23:1283 – 1298, 2004.

[Citado en pág. 44.]

William J. Schroeder, Kenneth M. Martin, and William E. Lorensen. The design and implementation of an object-oriented toolkit for 3d graphics and visualization. In *Proceedings of the 7th conference on Visualization '96*, VIS '96, pages 93–ff., Los Alamitos, CA, USA, 1996. IEEE Computer Society Press. ISBN 0-89791-864-9. URL <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=244979.245018>.

[Citado en pág. 40.]

G.M. Shepherd. *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, 2004.

[Citado en pág. 11.]

D.A. Sholl. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat*, 87: 387–406, 1953.

[Citado en pág. 24.]

O. Torres, G.E. Yepes, and J.E. Gómez. Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia: Un estudio con la técnica de golgi. *Biomédica*, 27:605–613, 2007.

[Citado en pág. 23.]

VTK. Vtk marching cubes. Website. <http://www.vtk.org/doc/nightly/html/classvtkMarchingCubes.html>.

[Citado en pág. 47.]

C. Welker and T.A. Woolsey. Structure of layer iv in the somatosensory neocortex of the rat: Description and comparison with the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 158:437–453, 1974.

[Citado en pág. 21.]

Wikipedia. Dendritic spine. Website, 2010a. http://en.wikipedia.org/wiki/Dendritic_spine.

[Citado en pág. 13.]

Wikipedia. Microscopio electrónico. Website, 2010b. http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electrónico.

[Citado en pág. 24.]

Wikipedia. Microscopio confocal. Website, 2010c. http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_confocal.

[Citado en pág. 26.]

Wikipedia. Potencial de acción. Website, 2010d. http://es.wikipedia.org/wiki/Potencial_de_acción.

[Citado en pág. 14.]

Liang Xiao, Xiaosong Yuan, Zack Galbreath, and Badrinath Roysam. Automatic and reliable extraction of dendrite backbone from optical microscopy images. In *Proceedings of the 2010 international confe-*

rence on Life system modeling and simulation and intelligent computing, and 2010 international conference on Intelligent computing for sustainable energy and environment: Part III, LSMS/ICSEE'10, pages 100–112, Berlin, Heidelberg, 2010. Springer-Verlag. ISBN 3-642-15614-2, 978-3-642-15614-4. URL <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1888593.1888607>. [Citado en pág. 44.]

J. Xie, T. Zhao, T. Lee, E. Myers, and H. Peng. Anisotropic path searching for automatic neuron reconstruction. *Medical Image Analysis*, 2011. [Citado en pág. 44.]

X Yuan, J.T. Trachtenberg, S.M. Potter, and B. Roysam. Computing skeletons in three dimensions. *Neuroinform*, 7:213–232, 2009. [Citado en pág. 44.]

R. Yuste and T. Bonhoeffer. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, 5:24–34, 2004. [Citado en pág. 16.]