

# Comparación de diferentes técnicas de segmentación de células en cultivos neuronales

Llucia Coll<sup>1</sup>, Azahara Civera-Tregón<sup>3,4</sup>, Janet Hoenicka<sup>3</sup>, Francesc Palau<sup>4,5</sup>, Raúl Benítez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería de Sistemas, Automática e Informática Industrial, Universidad Politècnica de Catalunya, Barcelona, España, [raul.benitez@upc.edu](mailto:raul.benitez@upc.edu), <sup>2</sup> Centro de Investigación en Ingeniería Biomédica, CREB-UPC,

<sup>3</sup>Neurogenética y Medicina Molecular, Instituto de Investigación Sant Joan de Déu, Barcelona, <sup>4</sup>CIBERER, Barcelona,

<sup>5</sup>División de Pediatría, Universidad de Barcelona

## Resumen

*Durante la sinapsis neuronal tienen lugar una serie de fluctuaciones de la concentración de calcio en el citosol de las neuronas. Para poder estudiar estas fluctuaciones es necesario identificar las diferentes estructuras que se observan en cultivos neuronales como somas, neuritas y ramificaciones secundarias. En este estudio comparamos diferentes métodos de segmentación y estimación del volumen de las diferentes regiones que forman un cultivo neuronal. En particular, se comparan dos métodos de segmentación con diferentes variaciones: el cálculo de mínimas distancias euclídeas y de fracciones direccionales.*

## 1. Introducción

Las neuronas son células excitables y como tales tienen la capacidad de generar un potencial de acción al ser estimuladas por encima de un cierto umbral de excitación. Durante la despolarización neuronal, se abren los canales de calcio aumentando la concentración de este en el citosol de la célula. Para poder cuantificar fenómenos de dinámica de calcio en cultivos de neuronas es necesario utilizar técnicas de segmentación que permitan identificar las neuronas y sus correspondientes subestructuras.

La segmentación celular a partir de imágenes de fluorescencia supone un reto debido a la falta de definición del contorno de las neuronas en cada imagen individual. Es necesario por tanto disponer de una secuencia de imágenes de fluorescencia para poder identificar.

En la actualidad, existen muchos enfoques de como segmentar y extraer regiones de interés de imágenes, sean médicas o no, ya que son los elementos básicos de procesamiento de imagen para poder realizar un análisis de extracción de características. Por lo que se sabe, no hay ninguna línea definida que pueda separar las partes que forman las neuronas, por lo que no se puede afirmar que exista un método óptimo para la segmentación de las mismas. En este contexto, el presente trabajo realiza un estudio comparativo de técnicas de segmentación de la literatura más reciente.

## 2. Materiales y métodos

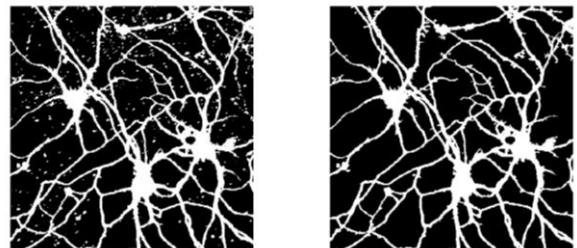
El estudio analiza cuatro secuencias de vídeo obtenidos a partir de microscopía confocal de fluorescencia de cultivos neuronales bajo estimulación externa. La frecuencia de muestreo es de 7 fotogramas por segundo y para la tinción de la muestra se ha utilizado el indicador fluorescente de calcio Fluo-4, caracterizado por una elevada intensidad de emisión de fluorescencia incluso en bajas concentraciones.

De las secuencias se extraen los fotogramas y se proyectan en tres imágenes representativas de la secuencia experimental: la imagen media *Imed*, la imagen desviación estándar *Istd* y la imagen máxima *Imax*, sobre las que se aplicarán diferentes técnicas de segmentación.

A dichas imágenes representativas se les aplican diferentes técnicas de binarización por umbral y a la imagen binaria resultante se le aplican diferentes métodos de segmentación.

Las imágenes originales son convertidas a escala de grises y pre-procesadas mediante una mejora de contraste basada en re-histogramación. Posteriormente, se eliminará el ruido persistente mediante la eliminación de las regiones de píxeles conexas de menor tamaño, como se puede apreciar en la Figura 1.

La imagen binaria resultante es segmentada utilizando dos técnicas de la literatura reciente [3,4] que permiten identificar las diferentes subestructuras celulares como el soma, neuritas y las ramificaciones de las neuritas. A continuación se detallan cada una de las dos técnicas de segmentación.

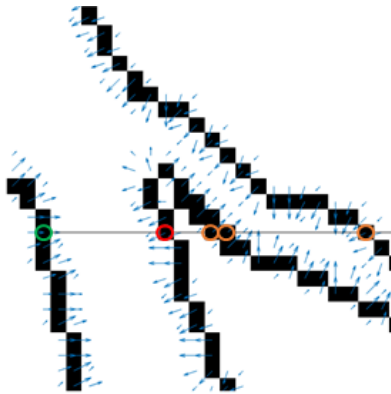


**Figura 1.** Imagen binaria con y sin ruido asociado a regiones conexas de pequeño tamaño

## 2.1. Mínimas distancias euclídeas

La primera técnica de segmentación es conocida como método de segmentación por mínimas distancias euclídeas, una aproximación en 2D de la técnica utilizada en un estudio reciente [3]. Esta está basada en la diferencia de grosor de las diferentes partes, estimada a partir de la distancia normal entre puntos cercanos de ambos lados de la membrana permitiendo distinguir entre estructuras con una mayor distancia promedio (soma) de otras con un grosor más reducido (axón, neuritas).

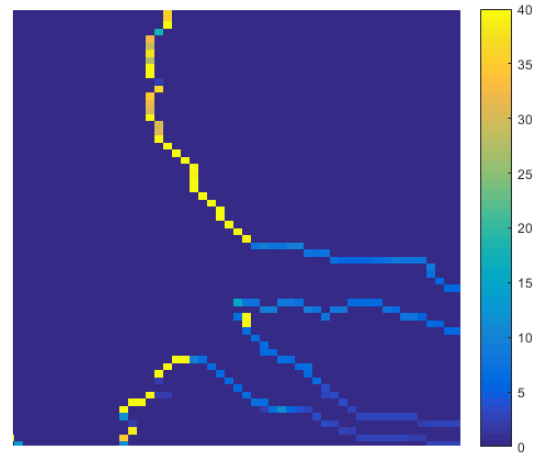
En primer lugar, se obtiene el gradiente para detectar el contorno de la neurona y definir un vector normal en cada punto del contorno, cuya dirección determinará la orientación seguida para establecer el segundo punto necesario para el cálculo de las distancias. El operador Sobel con tamaños 3x3 y 5x5 es utilizado para obtener el gradiente, mediante la convolución con la imagen en cuestión y obteniendo dos resultados distintos.



**Figura 2.** Magnitud (contorno) y dirección (vector) del gradiente. Recta trazada para el cálculo de distancia.

El algoritmo desarrollado para la búsqueda de los puntos está descrito en la Figura 2 y consiste en trazar una recta desde cada punto del contorno (círculo verde) en la dirección del gradiente local. De todos los puntos de intersección entre la recta y los contornos del cultivo (círculos naranja), se elige el más cercano al punto original (círculo rojo). A continuación se determina la distancia euclídea entre ambos puntos y se utiliza como estimador del grosor local de la subestructura.

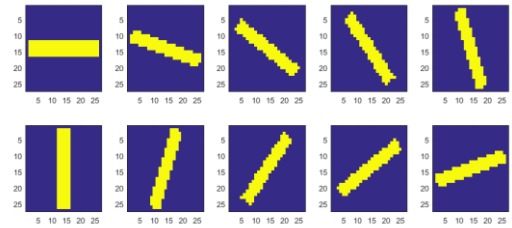
A partir del histograma de distancias, los valores más elevados se asignan a el soma y los inferiores a estructuras más estrechas (Figura 3). Posteriormente, se realiza una reconstrucción morfológica de las estructuras con el objetivo de crear las diferentes máscaras de las regiones de interés (ROI).



**Figura 3.** Distribución de las distancias euclídeas

## 2.2. Fracciones direccionales

El segundo método para esta estimación es el llamado Fracción Direccional [4], basado en la cuantificación del grado de isotropía local de una imagen, dada una cierta escala y localización. Estas, definen los diferentes filtros generados con que se convoluciona la imagen, en este caso los representados en la Figura 4.

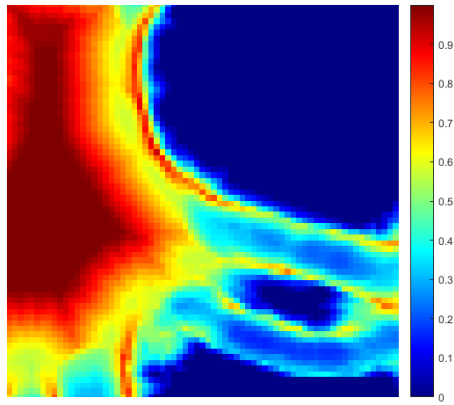


**Figura 4.** Conjunto de filtros utilizados en la convolución

El cociente entre la mínima y máxima de las convoluciones es la definición de esta ratio direccional

$$D_j f(p) = \frac{\min_l [|f * \varphi_{j,l}(p)|]}{\max_l [|f * \varphi_{j,l}(p)|]}$$

El valor atribuido al grado de isotropía, ratio direccional (representado en la Figura 5), es el que determina la clasificación, siendo el más próximo a 1 el perteneciente a estructuras más grandes y uniformes, en este caso los somas.



**Figura 5.** Distribución espacial de las fracciones direccionales

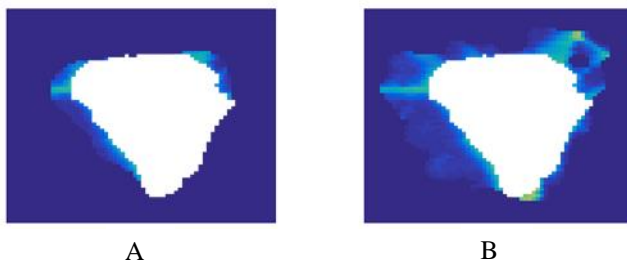
En este caso, para construir la máscara que determina las ROIs, se utiliza el método de Fast Marching [4,5], haciendo crecer las detecciones según el mapa de velocidades definido por la misma ratio direccional.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Validación

Para la validación de cada combinación de métodos se utiliza el *Dice Similarity Coefficient* (DSC) [6], que cuantifica el rendimiento de la segmentación a partir del cálculo de solapamiento entre la imagen segmentada y una de referencia validada.

En la Figura 6, se pueden observar dos cálculos de DSC para la misma referencia validada. En el primer caso, se trata de la imagen media, segmentada con el método Otsu y aplicando fracciones direccionales (DSC=0.8671); la segunda, la imagen desviación estándar, segmentada con el método Bradley y aplicando mínimas distancias con un Sobel 5x5 (DSC=0.7029).



**Figura 6.** Aplicación del Dice Similarity Coefficient en diferentes segmentaciones para el mismo soma. A) DSC=0.8671. B) DSC= 0.7029

En la Tabla 1 se puede observar la media de los mejores resultados para la segmentación de somas. A partir de estos, se observa que las combinaciones realizadas con la imagen media Imed presentan mejores valores en

comparación con los de la imagen variabilidad Istd (DSC 78.36% - 76.28%). Ambos valores, así como en la mayoría de los valores de DSC para las diferentes combinaciones, son superiores a 0.7, mínimo valor aceptado en imágenes médicas [7].

| Método       | DSC           | Std(DSC)      | CPU time(s)   |
|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Imed+Otsu+d5 | <b>0.7411</b> | 0.0014        | 185.8139      |
| Imed+Otsu+d3 | 0.7408        | <b>0.0003</b> | 112.0339      |
| Imed+Otsu+FD | <b>0.7836</b> | 0.0046        | 8.2347        |
| Istd+Otsu+FD | 0.7628        | 0.0074        | <b>1.3990</b> |

**Tabla 1.** Resultados con mayor DSC promedio para las diferentes técnicas de segmentación (FD: Segmentación por fracciones direccionales, d3/d5: segmentación por distancias con gradiente calculado con un filtro Sobel de tamaño 3x3 o 5x5)

La imagen máxima Imax, ha sido descartada de la comparación en la parte de preprocesado de la imagen al presentar una persistencia de ruido demasiado relevante.

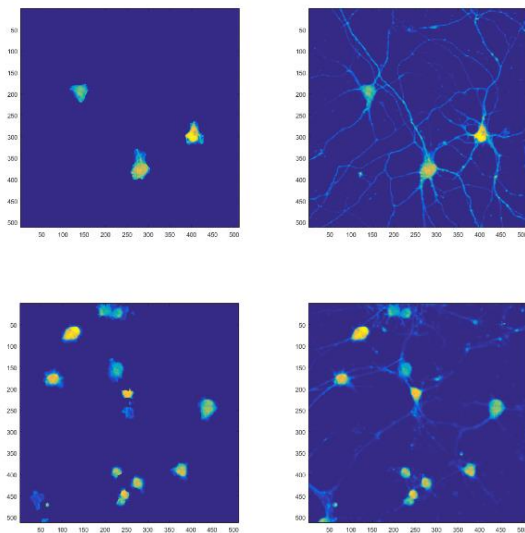
La binarización por Otsu presenta un mejor rendimiento general que la de Bradley (DSC 78.36% vs. 75.86%), debido principalmente a que ésta última incrementa la variabilidad de los resultados entre diferentes experimentos en un 14.3%.

También observamos que la utilización de un operador Sobel 3x3 en el cálculo del gradiente reduce la variabilidad entre experimentos (0.03%), con respecto a la utilización de un filtro Sobel 5x5 (0.14%).

De forma general, el uso de fracciones direccionales proporciona mejores resultados frente a las distancias euclídeas (78.36% vs. 74.06%), así como un tiempo considerablemente menor de CPU (8.23s – 112.03s) debida a la simplicidad de ejecución del algoritmo.

Algunos ejemplos de la segmentación de somas son los representados en la Figura 7, en la que se pueden apreciar las diferencias existentes entre diferentes secuencias experimentales.

Por lo que respecta a la parte de detección de las estructuras más finas como neuritas y otras ramificaciones, presenta una mayor eficacia el método de segmentación por distancias euclídeas respecto a las fracciones direccionales, ya que cuanto más delgada es una estructura más difícil es calcular la isotropía local.



**Figura 7.** Ejemplos de la segmentación de somas con sus respectivas imágenes representativas de procedencia.

## 4. Conclusiones

La separación de un cultivo neuronal en sus diferentes partes es una tarea que a menudo se realiza de forma subjetiva al no existir suficientes características morfológicas para caracterizar el soma y distinguirlo de neuritas y ramificaciones. A pesar de las limitaciones en el número de experimentos analizados, la conclusión principal de este estudio es que la mejor forma de segmentar subestructuras neuronales en cultivos de neuronas consiste en aplicar un umbral global (Otsu) a la imagen media *Imed* y aplicar el método de mínimas distancias euclídeas para detectar las diferentes regiones de interés del cultivo. Si el objetivo es, en cambio, detectar los somas y limitar el tiempo de procesamiento, la opción más adecuada es aplicar el método de fracciones direccionales.

## Referencias

- [1] Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol 9(1), pp 62-66, 1979.
- [2] Bradley, D., Roth G. Adaptive thresholding using the integral image. *Journal of Graphics Tools*, vol 12(2), pp 13-21, 2007.
- [3] Luengo-Sanchez S, Bielza C, Benavides-Piccione R. A univocal definition of the neuronal soma morphology using Gaussian mixture models. *Front. Neuroanat*, vol 9(137), 2015.
- [4] Kayasandik C.B, Labate D. Improved detection of soma location and morphology in fluorescence microscopy images of neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, vol 274, pp 61-77, 2016.
- [5] Sethian, J.A. *Level Set Methods and Fast Marching Methods*, 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge University Press, 1999.
- [6] Warfield S.K, Zou, K.H. Statistical validation of image segmentation quality based on a spatial overlap index. *Acad. Radiol.*, 11(2), pp 178-189, 2004.

- [7] Dawant B.M, Margolin R.A, Palmer A.C, Zijdenbos, A.P. Morphometric analysis of white matter lesions in mr images: method and validation. *IEEE Trans Med Imagin*, pp 716-724, 1994.