

Concentração de marcação histológica em uma região específica de um tecido – *ImageJ* e *Python*

Laura Damasceno de Campos

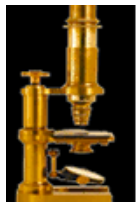


INSTITUTO
SANTOS DUMONT

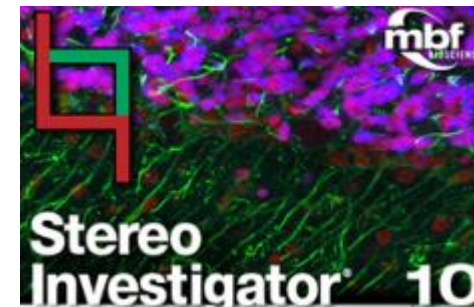
ENSINO E PESQUISA

Contextualização

- Linha de pesquisa não definida;
- Necessidade atual – Orientador;
- Morfometria x Estereologia:



ImageJ
Image Processing & Analysis in Java



- **ImageJ**

- É um programa de processamento de imagem, desenvolvido na linguagem Java. Trata-se de um software de domínio público e sua principal vantagem é a possibilidade de visualizar em tempo real o resultado de diferentes técnicas de processamento de imagens através de uma interface gráfica.

- **Stereo Investigator**

- Fornece estimativas precisas e imparciais do número, comprimento, área e volume de células ou estruturas biológicas em uma amostra de tecido.

- **Por que, então, não utilizar o Stereo Investigator?**

- Depende do objetivo.

Artigo

- Utilizar uma metodologia semelhante ao realizado neste artigo:

Received: 18 April 2020 | Revised: 14 May 2020 | Accepted: 19 May 2020
DOI: 10.1111/jnc.15101

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Neurochemistry JNC WILEY

Diverse GABAergic neurons organize into subtype-specific sublaminae in the ventral lateral geniculate nucleus

Ubadah Sabbagh^{1,2} | Gubbi Govindaiah² | Rachana D. Somaiya^{1,2} | Ryan V. Ha⁴ | Jessica C. Wei⁵ | William Guido³ | Michael A. Fox^{1,4,6,7}

¹Center for Neurobiology Research, Prather Biomedical Research Institute at Virginia Tech Carilion, Roanoke, VA, USA
²Graduate Program in Translational Biology, Medicine, and Health, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA
³Department of Anatomical Sciences and Neurobiology, University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA
⁴School of Neuroscience, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA
⁵NeuroSURF, Prather Biomedical Research Institute at Virginia Tech Carilion, Roanoke, VA, USA
⁶Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA
⁷Department of Pediatrics, Virginia Tech Carilion School of Medicine, Roanoke, VA, USA

Correspondence: Michael A. Fox, Center for Neurobiology Research, Prather Biomedical Research Institute at Virginia Tech Carilion, 2 Riverside Circle, Roanoke, VA 24016, USA. Email: mafx1@vtc.vt.edu

Funding Information: National Eye Institute, Grant/Award Number: EY012716, EY012222 and EY005046; National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Grant/Award Number: NS105141 and NS115495; National Institutes of Health, Grant/Award Number: EY012222, EY005046, NS105141, NS115495 and EY012716

Abstract

In the visual system, retinal axons convey visual information from the outside world to dozens of distinct retinorecipient brain regions and organize that information at several levels, including either at the level of retinal afferents, cytoarchitecture of intrinsic retinorecipient neurons, or a combination of the two. Two major retinorecipient nuclei which are densely innervated by retinal axons are the dorsal lateral geniculate nucleus, which is important for classical image-forming vision, and ventral LGN (vLGN), which is associated with non-image-forming vision. The neurochemistry, cytoarchitecture, and retinorecipient connectivity in vLGN remain unresolved, raising fundamental questions of how it receives and processes visual information. To shed light on these important questions, used in situ hybridization, immunohistochemistry, and genetic reporter lines to identify and characterize novel neuronal cell types in mouse vLGN. Not only were a high percentage of these cells GABAergic, we discovered transcriptionally distinct GABAergic cell types reside in the two major laminae of vLGN, the retinorecipient, external vLGN (vLGNe) and the non-retinorecipient, internal vLGN (vLGNi). Furthermore, within vLGNe, we identified transcriptionally distinct subtypes of GABAergic cells that are distributed into four adjacent sublaminae. Using trans-synaptic viral tracing and in vitro electrophysiology, we found cells in each these vLGNe sublaminae receive monosynaptic inputs from retina. These results not only identify novel subtypes of GABAergic cells in vLGN, they suggest the subtype-specific laminar distribution of retinorecipient cells in vLGNe may be important for receiving, processing, and transmitting light-derived signals in parallel channels of the subcortical visual system.

KEYWORDS

circuit, GABAergic, geniculate, retina, thalamus, visual

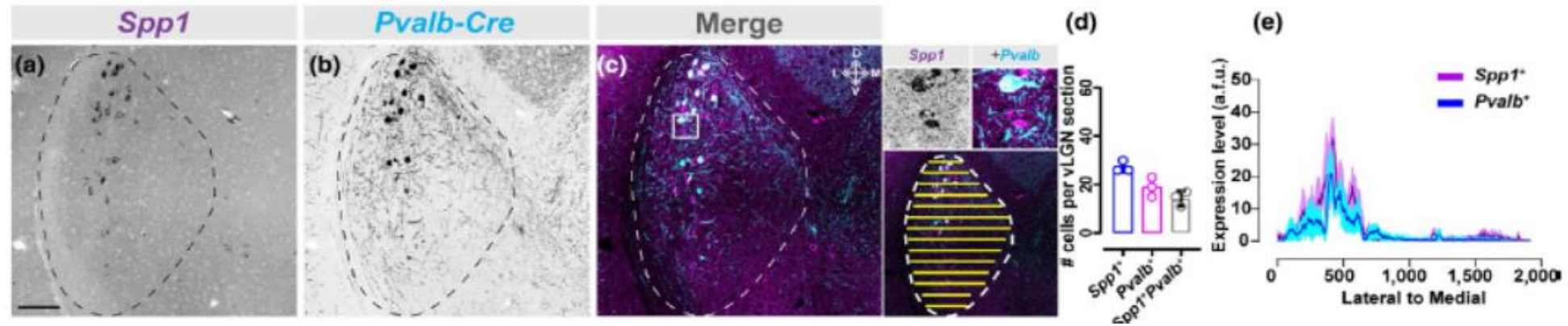
Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; CTS, choline toxin subunit 1; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; dLGN, dorsal lateral geniculate nucleus; EPSC, excitatory postsynaptic current; GABA, gamma-aminobutyric acid; GFP, green fluorescent protein; IGL, intergeniculate leaflet; IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization; LGN, lateral geniculate nucleus; OT, optic tract; PSD, paired-pulse depression; RGC, retinal ganglion cells; RBD, research resource identifier; SC, superior colliculus; SCN, suprachiasmatic nucleus; vLGN, ventral lateral geniculate nucleus; vLGNe, external vLGN; vLGNi, internal vLGN; YFP, yellow fluorescent protein.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2020 The Authors. Journal of Neurochemistry published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry

Journal of Neurochemistry. 2020;00:1–18.
wileyonlinelibrary.com/journal/jnc | 1

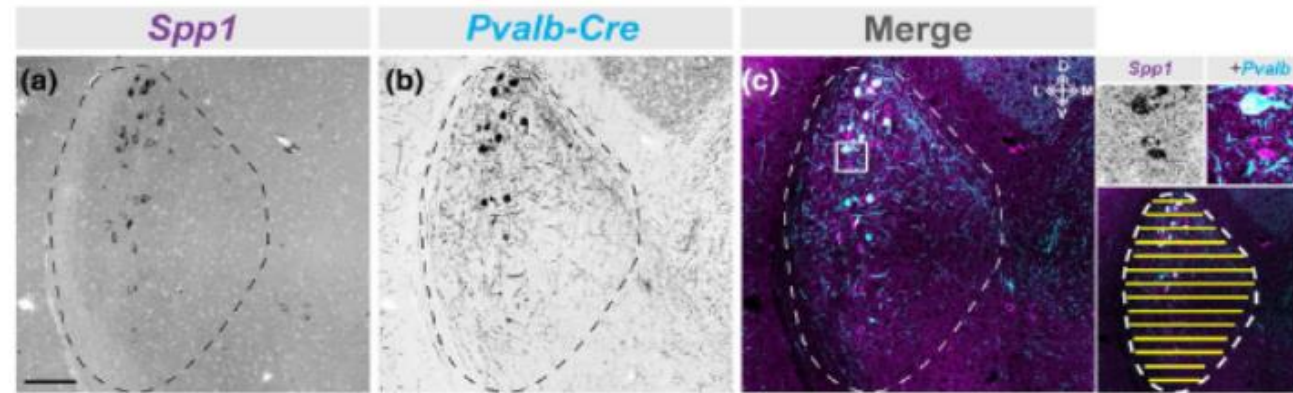
Objetivo

Quantificar a distribuição espacial da expressão do marcador de tipo de célula em todo o vLGN (núcleo geniculado ventral lateral).



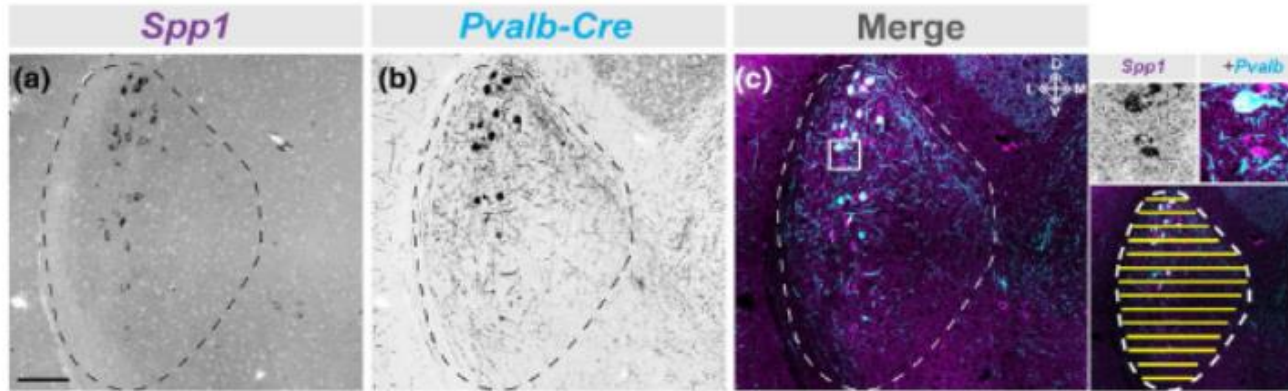
- Resume a ideia central do método utilizado;
- Descobrir se existe uma concentração de marcação histológica (por exemplo, um tipo particular de neurônios) em uma região específica de um dado tecido.

O que foi realizado



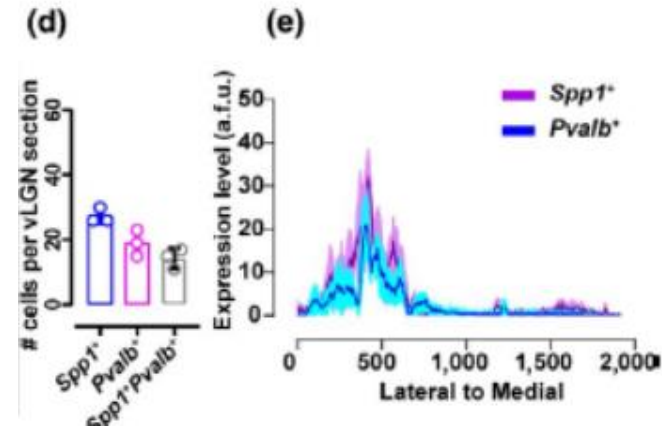
- Desenvolveu-se um script de varredura de linha personalizado, que é executado em ImageJ;
- Em (a) e (b): neurônios distintos se organizam em uma sublâmina de vLGN;
- Em (c) tem-se essa sublâmina com a sobreposição dos neurônios;
- Ilustração da abordagem de varredura de linha automatizada usada para quantificar a expressão espacial;
- Sobreposição do vLGN com linhas igualmente espaçadas;
 - Por que fazer automatizado? Para evitar o viés do usuário.

Como funciona o script



- Limiarização;
- Para determinar a curvatura do vLGN em uma imagem específica, solicita-se que o usuário desenhe uma linha ao longo do trato óptico adjacente ao vLGN;
- Desenha-se automaticamente linhas de comprimento e número definidos, guiados por essa curva, e é plotado a intensidade do sinal nas coordenadas x de cada linha.

O que retorna



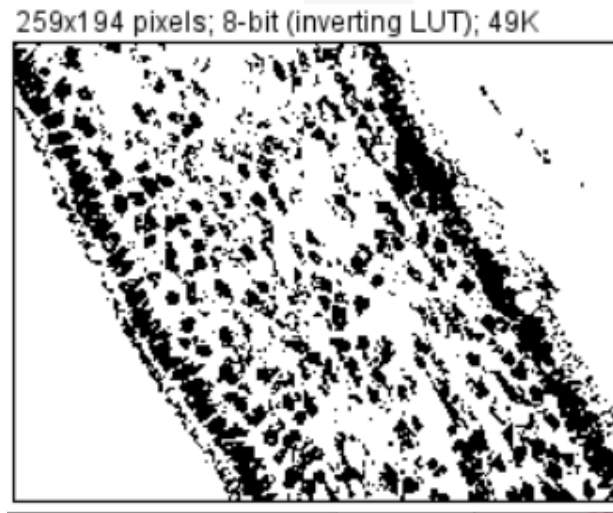
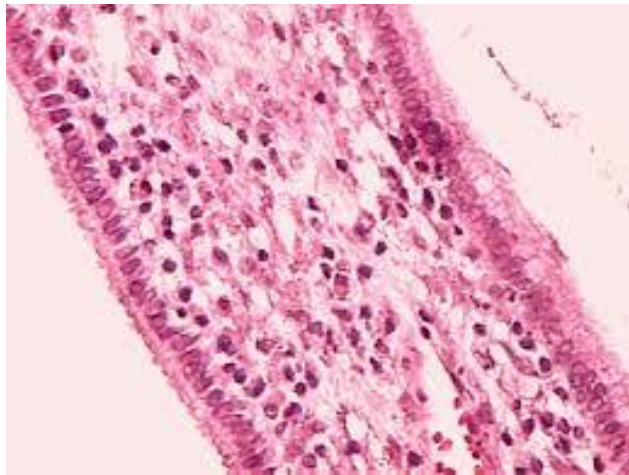
- Em (d) tem-se a quantificação de neurônios, que geram um ou ambos *SPP1* e *Pvalb* ARNm (que são os tipos de neurônios analisados);
- Em (e) consta a análise de varredura de linha da distribuição espacial dos neurônios;
- Essas intensidades podem então ser calculadas para determinar onde há uma concentração específica daquele neurônio no vLGN.

Ideal

- Buscar desenvolver um código que tenha uma funcionalidade semelhante ao script desenvolvido no artigo;
 - O professor desenvolveu um semelhante, porém fazendo dois códigos: um em ImageJ e outro em Python (o editor de scripts do ImageJ oferece suporte a muitas linguagens diferentes).
- O objetivo passou a ser:
 - Fazer um código unificado e, para fins desta disciplina, utilizar o Python sem ser por meio do ImageJ.

Passo a passo

1. Escolhi uma imagem histológica qualquer;
2. No ImageJ, abri a imagem, limiarizei e fiz o contorno da área que queria observar;
3. Como resultado o programa irá abrir duas janelas.

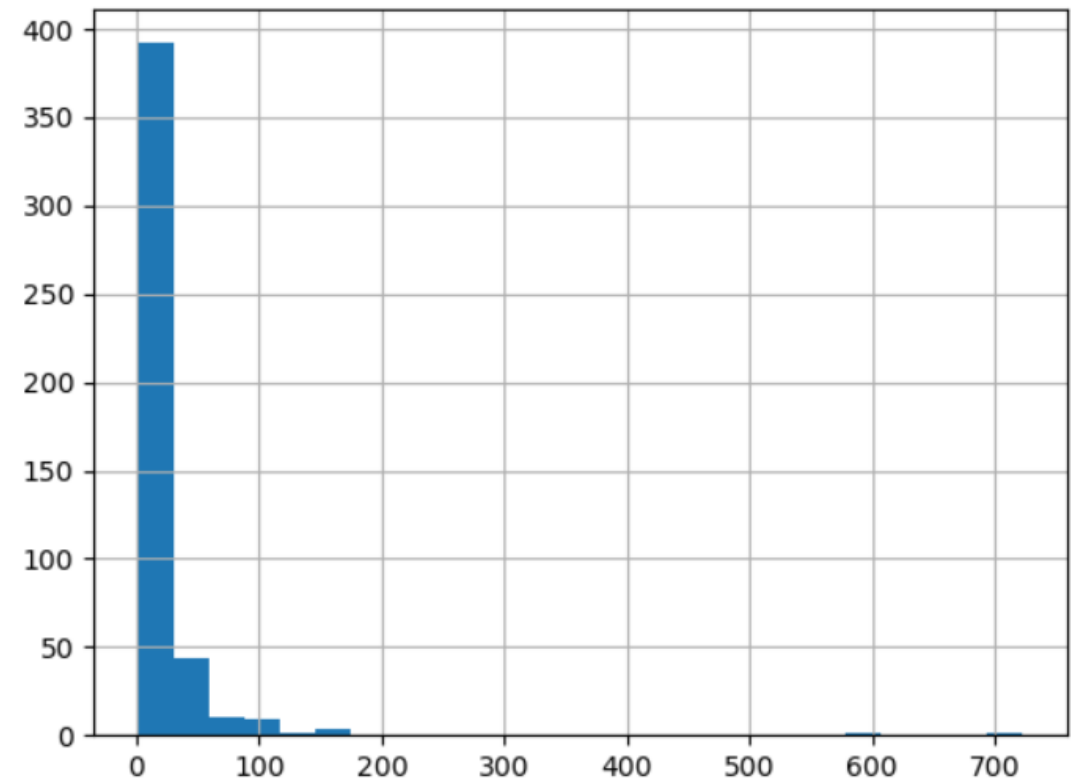


Results					
File Edit Font Results					
	Area	Mean	XM	YM	
1	57	255	24.289	6.342	
2	1	255	144.500	1.500	
3	4	255	50.250	2.750	
4	23	255	122.717	6.543	
5	4	255	144.250	4.750	
6	1	255	17.500	4.500	
7	1	255	34.500	4.500	

Código

```
1 import matplotlib.pyplot as plt
2 import pandas as pd
3 import statistics
4
5
6 a = pd.read_excel('Resultados ImageJ.xlsx')
7 print('Arquivo importado com sucesso.')
8
9 print(a.head())
10 print(a['Area'].value_counts())
11 fig = a['Area'].hist(bins=25)
12 plt.show()
```

```
14 print('Media: ', a['Area'].mean())
15 print('DP: ', statistics.stdev(a['Area']))
16 print('Mediana: ', statistics.median(a['Area']))
17 print('Maximo: ', max(a['Area']))
18 print('Mínimo: ', min(a['Area']))
19
20 class Experimento:
21     def __init__(self, data):
22         self.media = data.mean()
23         self.desvpad = statistics.stdev(data)
24         self.mediana = statistics.median(data)
25         self.max = max(data)
26         self.min = min(data)
```



#Programa

```

28     def salvarResultados(self, arquivo, tipo):
29         if tipo == 'txt':
30             arquivo += '.txt'
31             temp = open(arquivo, 'w')
32             temp.write('Media: ' + str(self.media) + '\n')
33             temp.write('Mediana: ' + str(self.mediana) + '\n')
34             temp.write('DP: ' + str(self.desvpad) + '\n')
35             temp.write('Maximo: ' + str(self.max) + '\n')
36             temp.write('Minimo: ' + str(self.min) + '\n')
37             print('Arquivo Salvo com resultados.')
38             temp.close()

```

```

40         elif tipo == 'csv':
41             data = dict()
42             data['Media'] = [self.media]
43             data['Mediana'] = [self.mediana]
44             data['DP'] = [self.desvpad]
45             data['Maximo'] = [self.max]
46             data['Minimo'] = [self.min]
47             dataframe = pd.DataFrame(data)
48             arquivo += '.csv'
49             dataframe.to_csv(arquivo)
50             print('Arquivo Salvo com resultados.')
51

```

```

52         elif tipo == 'excel':
53             data = dict()
54             data['Media'] = [self.media]
55             data['Mediana'] = [self.mediana]
56             data['DP'] = [self.desvpad]
57             data['Maximo'] = [self.max]
58             data['Minimo'] = [self.min]
59             dataframe = pd.DataFrame(data)
60             arquivo += '.xlsx'
61             dataframe.to_excel(arquivo)
62             print('Arquivo Salvo com resultados.')
63         else: print('Tipo não identificado.')

```

```

68     escolha = input('Deseja salvar arquivo de saída? ')
69     if escolha == 'sim':
70         nomeArquivo = input('Digite o nome do arquivo de saída: ')
71         while True:
72             tipoSaida = input('Informe o tipo de arquivo que deseja salvar de saída [txt, csv ou excel]: ')
73             if tipoSaida in ['csv', 'excel', 'txt']:
74                 break
75
76         experimento.salvarResultados(nomeArquivo, tipoSaida)
77

```

Referências

- FERREIRA, Tiago. RASBAND, Wayne. **ImageJ User Guide**. Fiji 1.46, 2012.
- **Diverse GABAergic neurons organize into subtype-specific sublaminae in the ventral lateral geniculate nucleus.** Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.15101>>. Acesso em: 19 de setembro de 2020.
- **Tutorial Image J.** Disponível em: <https://www.if.ufrj.br/~pef/producao_academica/dissertacoes/2014_Fernanda_Pantoja/fernandapantoja_matinstruc_2.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

Obrigada!

laura.campos@edu.isd.org.br

 institutosantosdumont.org.br

 contato@isd.org.br

   [isdnarede](#)



MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO

