

Como extraer una region de interes en un canal mediante segmentacion en otro canal guia *

Mariel Rosas

Daniel Prieto

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

Este documento provee un metodo para obtener datos de un canal, segmentando una estructura anatomica en otro, a partir de datos multidimensionales de microscopia confocal. Para ello realizamos una segmentacion semiautomatica con TrakEM2.

Keywords: confocal, microscopia, TrakEM2, segmentacion

Introduccion

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

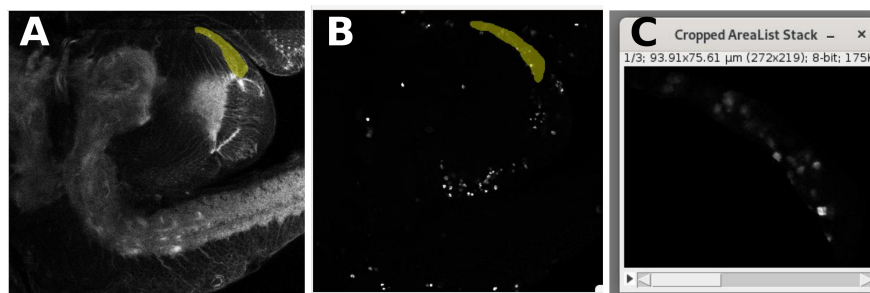


Figure 1: A. Canal utilizado para segmentar. B. Canal de interes. C. volumen segmentado resultante en el canal de interes.

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

Metodo

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

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

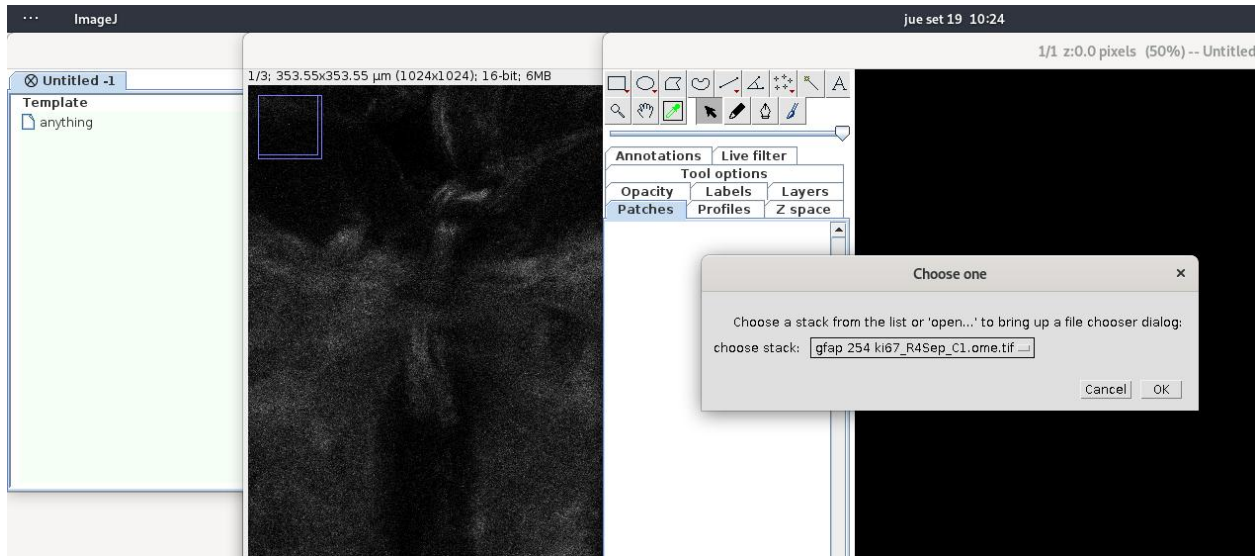


Figure 2: Esta imagen necesita un pie de figura

4. Seleccionar en Anything CLICK DER >Add new chid> Area_list, sobre la ventana de Project Objects >New anything> New area_list.

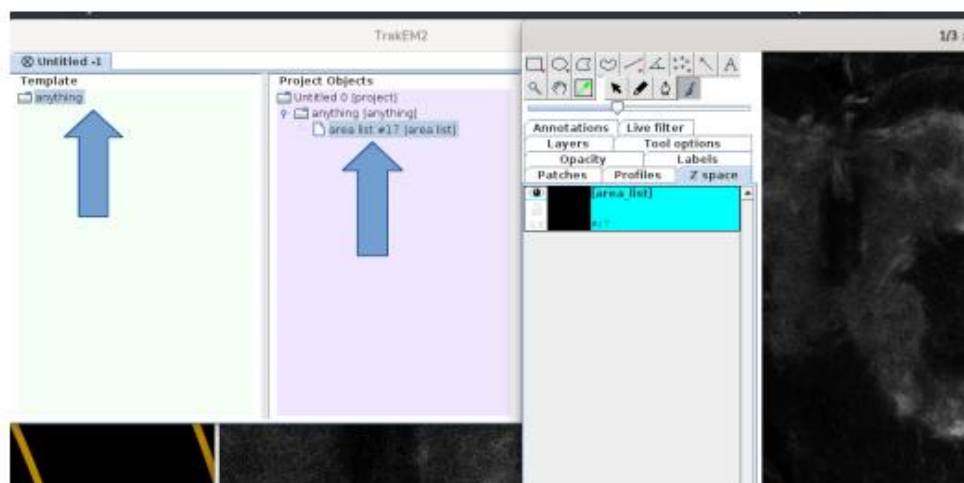


Figure 3: Esta imagen necesita un pie de figura

5. Se volverá a la pantalla y se importará el otro canal >Import >Stack, siempre en el Patches: OK> OK> YES.

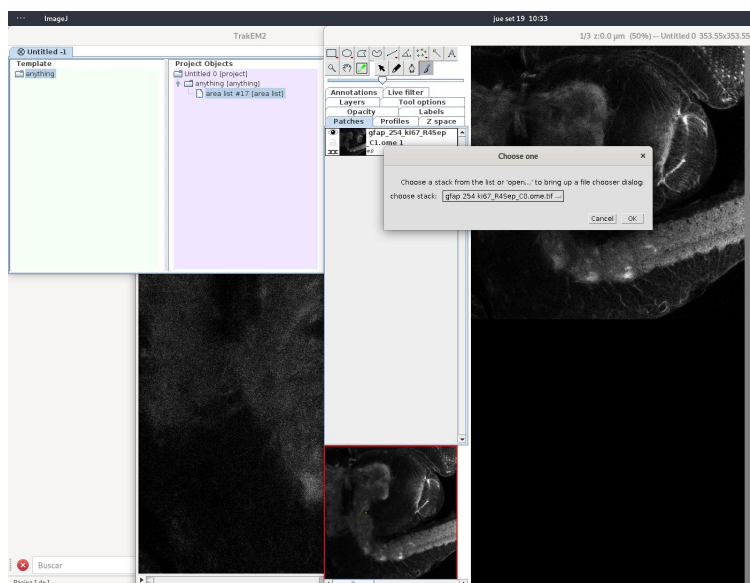


Figure 4: Esta imagen necesita un pie de figura

6. Para alinear la imagen nueva con la imagen anterior, nos posicionamos en Patches **CLICK DER>Properties** y en el cuadro que surge se posicionará la imagen en $x=0$, $y=0$. En Patches tiene que quedar en la posición 1 en todas las capas la imagen que se usará como guía. Nos posicionamos sobre ésta y con **CLICK DER Move > Move to top**, se recorrerá todas las capas.

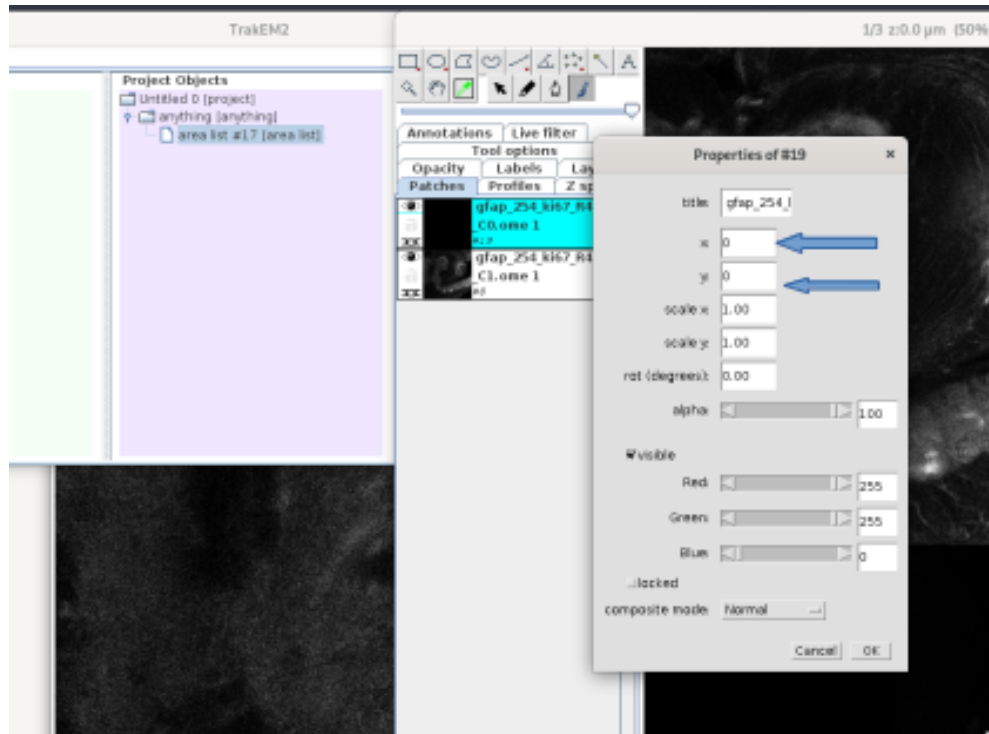


Figure 5: Esta imagen necesita un pie de figura

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

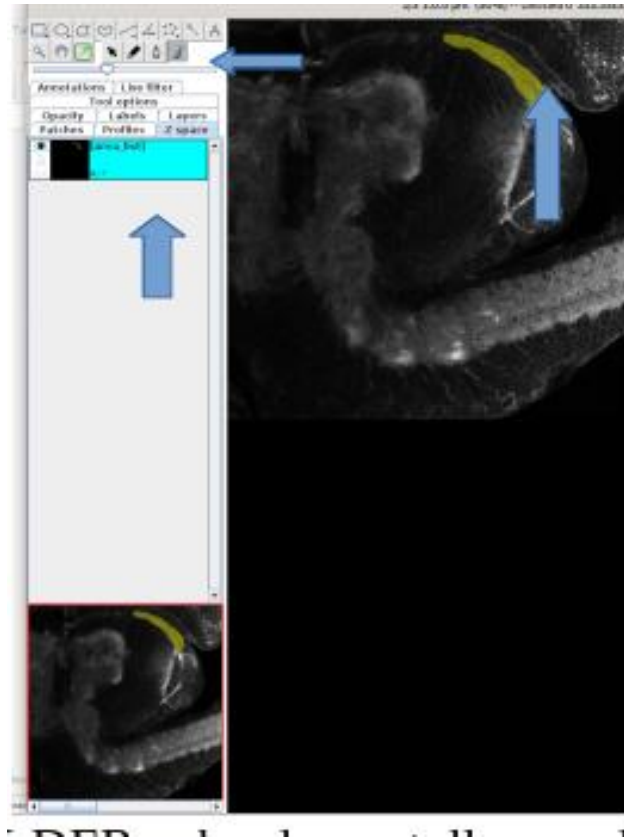


Figure 6: Esta imagen necesita un pie de figura

10. Volviendo a Patches se eliminará las imágenes de la guía de selección: posicionados sobre ella CLICK DER >delete (en todas capas).

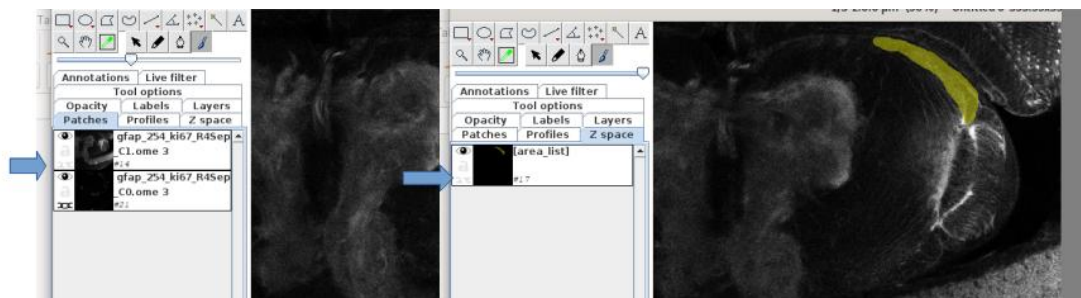


Figure 7: Esta imagen necesita un pie de figura

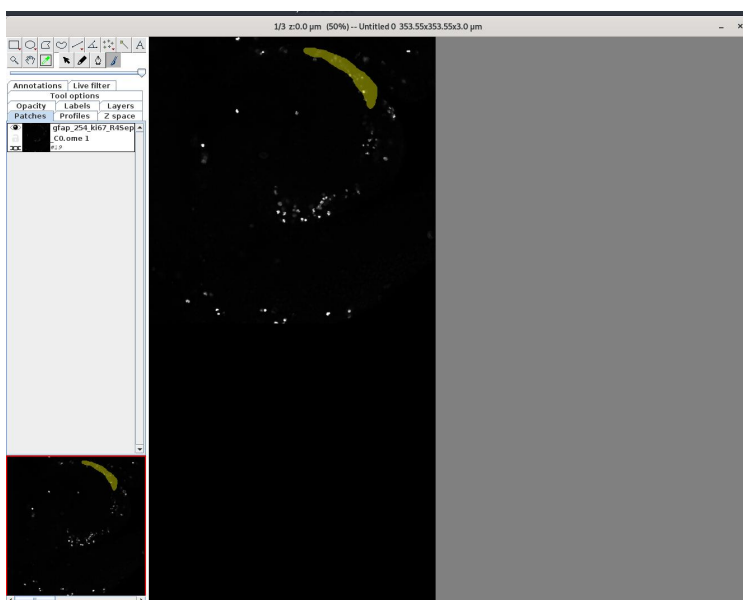


Figure 8: Esta imagen necesita un pie de figura

11. Posicionados en Zspace con **CLICK DER >Plugins >Area_list crop > Create > Valou=0**

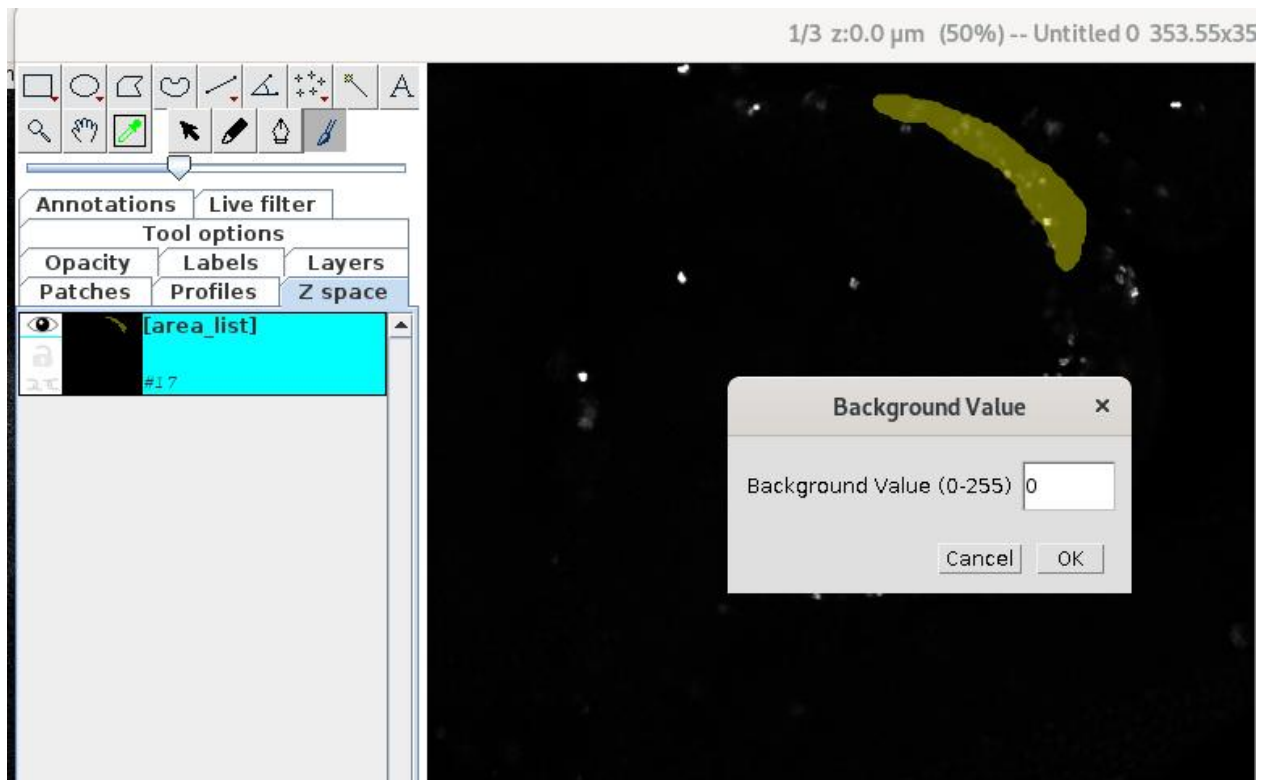


Figure 9: Esta imagen necesita un pie de figura

12. Aparecerán dos cuadros, uno con el area seleccionada pero con la imagen que nos interesa trabajar, y el otro como cuadro de dialogo con informacion de la imagen



Figure 10: Esta imagen necesita un pie de figura

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

Referencias

Cardona, Albert, Stephan Saalfeld, Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Stephan Preibisch, Mark Longair, Pavel Tomancak, Volker Hartenstein, and Rodney J Douglas. 2012. "TrakEM2 software for neural circuit reconstruction." *PloS One* 7 (6): e38011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038011>.

Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.