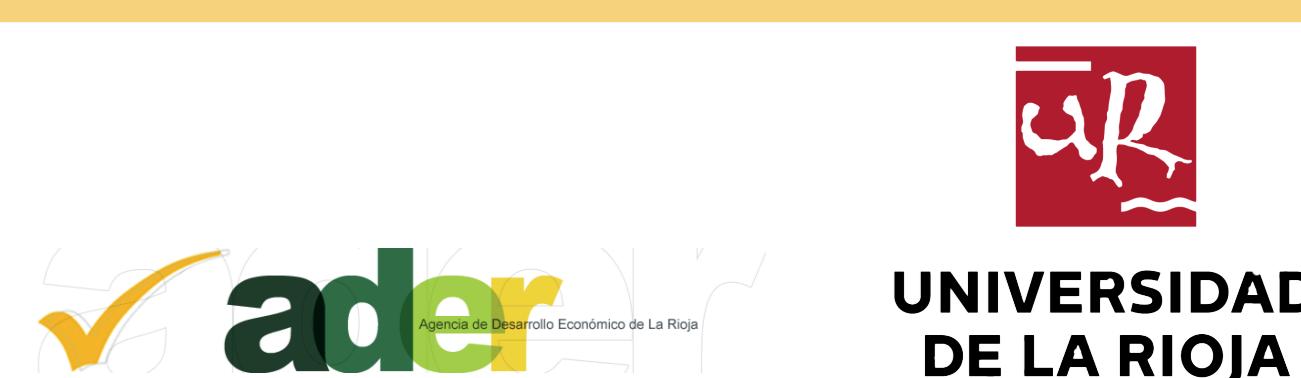


SynapCountJ: un software para el estudio de la densidad sináptica

Gadea Mata^{1,2}, Germán Cuesto^{1,3}, Miguel Morales¹, Julio Rubio², Jónathan Heras²



1. Laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural – CIBIR – Logroño – La Rioja
2. Grupo Psicotrip – Departamento de Matemáticas y Computación – Universidad de La Rioja
3. Departamento de Ciencias Fisiológicas I – Universidad de Barcelona – IDIBAPS



Resumen

SynapCountJ es un software cuyo objetivo consiste en identificar y cuantificar la densidad sináptica a partir de imágenes de inmunofluorescencia. Los algoritmos subyacentes de este programa están basados en técnicas homológicas para el procesamiento de imágenes digitales.

Esta extensión para *ImageJ* trata de resolver problemas como el marcaje inespecífico, la eliminación del ruido de la imagen cercando el área de trabajo a la estructura de la neurona, y unificar criterios a la hora de trabajar con estas imágenes.

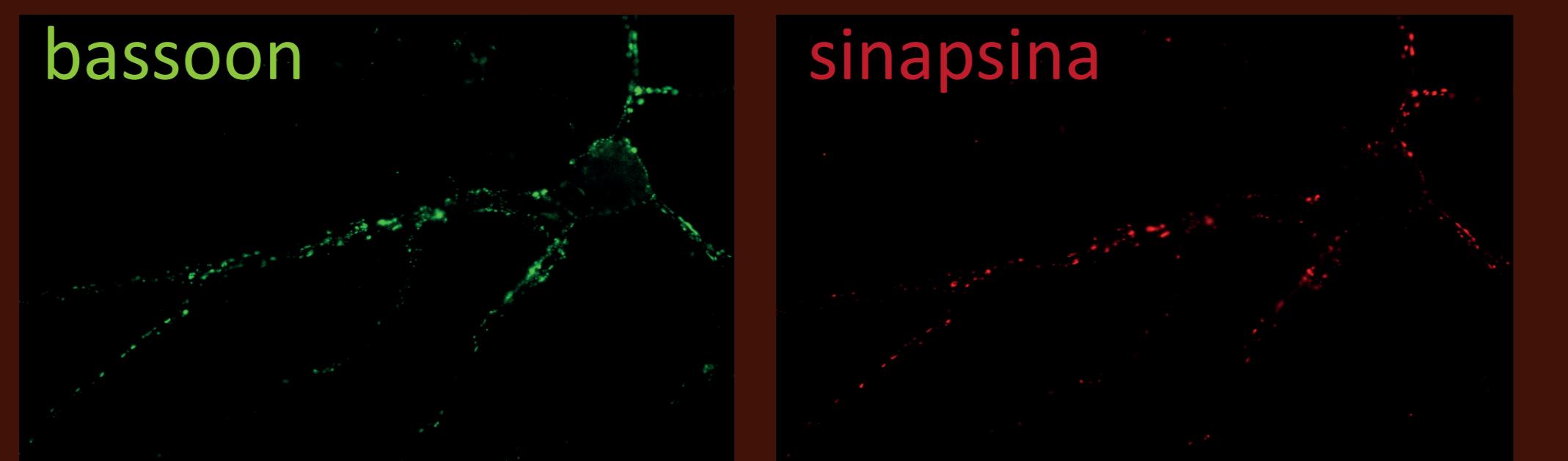
SynapCountJ pretende ofrecer una solución automática al conteo de sinapsis. Ha sido implementado en Java y puede ejecutarse en *Windows* (*Xp/Vista/7*), *Mac OS X* y *Linux*.



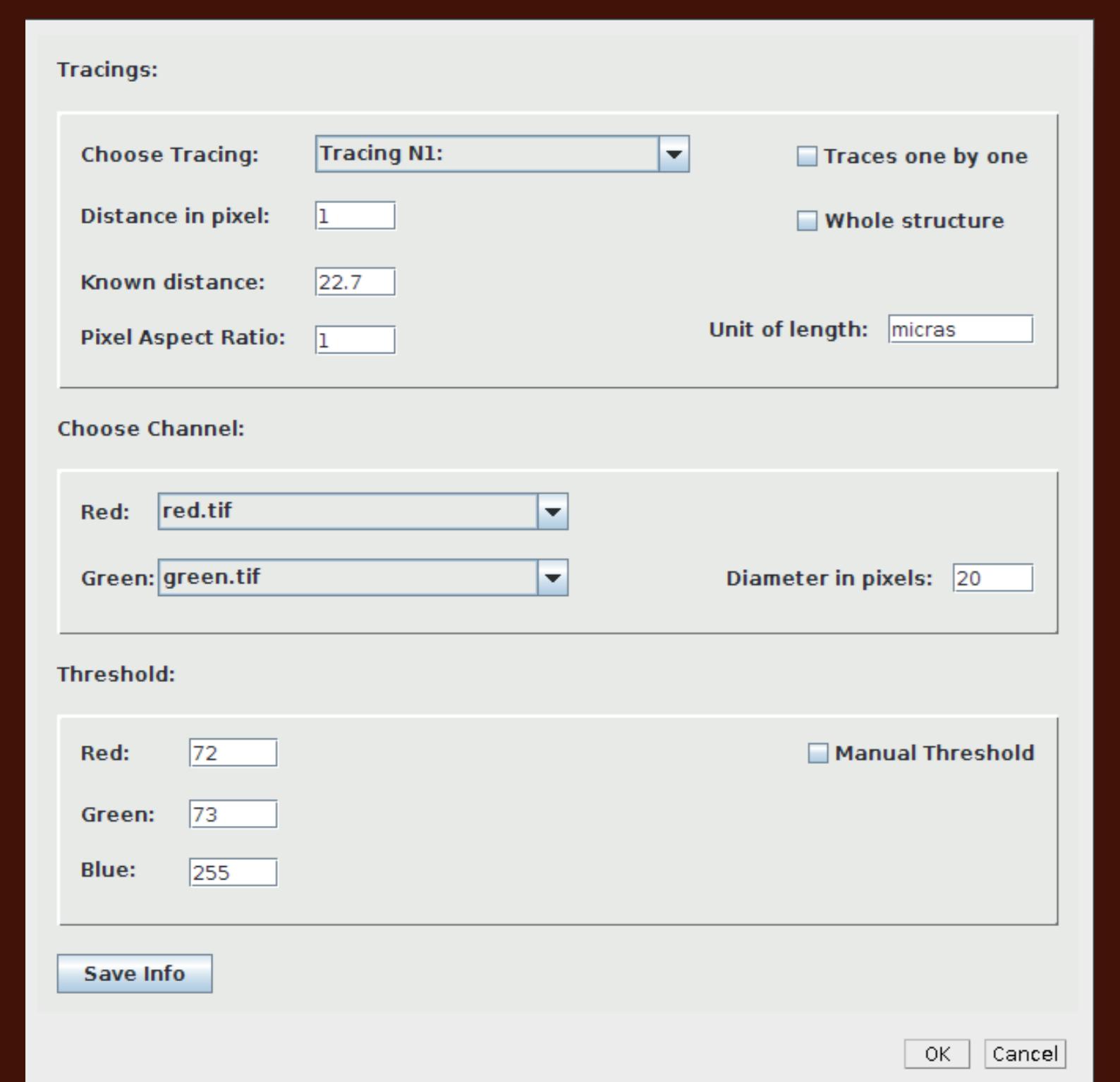
SynapCountJ

A. Tratamiento individual de una neurona

Partimos de las imágenes obtenidas al fotografiar una neurona marcada con los anticuerpos bassoon y sinapsina.

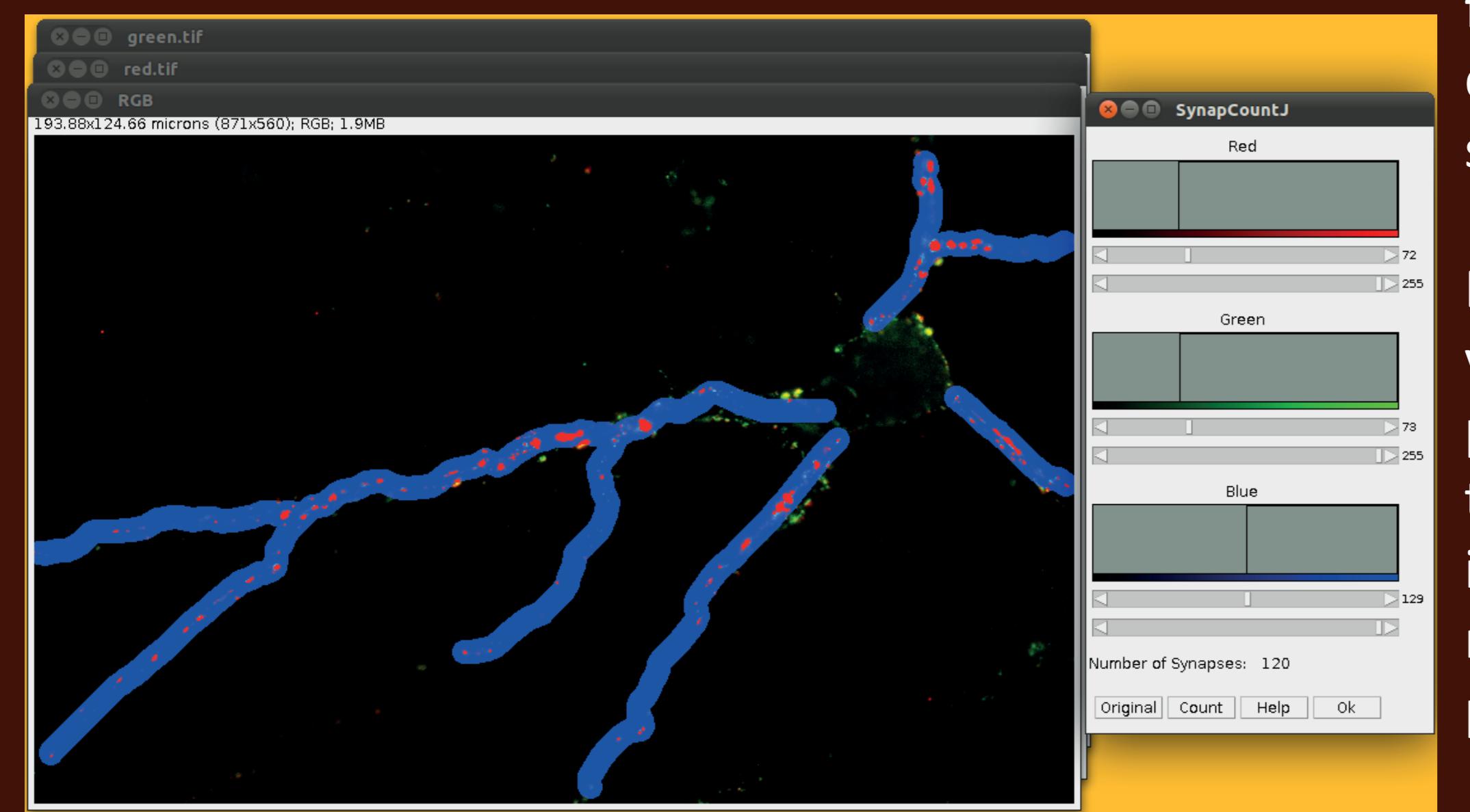


PASO 1: en este primer paso se delimitan las áreas de la neurona en las que se va a realizar el conteo de las sinapsis. De esta manera evitamos las zonas que no son de interés (eliminamos el *background*). Para ello usamos el plug-in *NeuronJ* [1].



PASO 2: en este punto se puede elegir si realizar un conteo global sobre todo el área de la neurona o si se realiza individualmente por dendritas.

Además el proceso requiere introducir información como los datos de la escala y el grosor medio del área a analizar. Esta medida determina el área donde se realiza el conteo (zona marcada de azul).



PASO 3: *SynapCountJ* solapa las dos imágenes y la estructura (área escogida). El plug-in identifica los puntos de tonalidad blanquecina como candidatos a ser sinapsis.

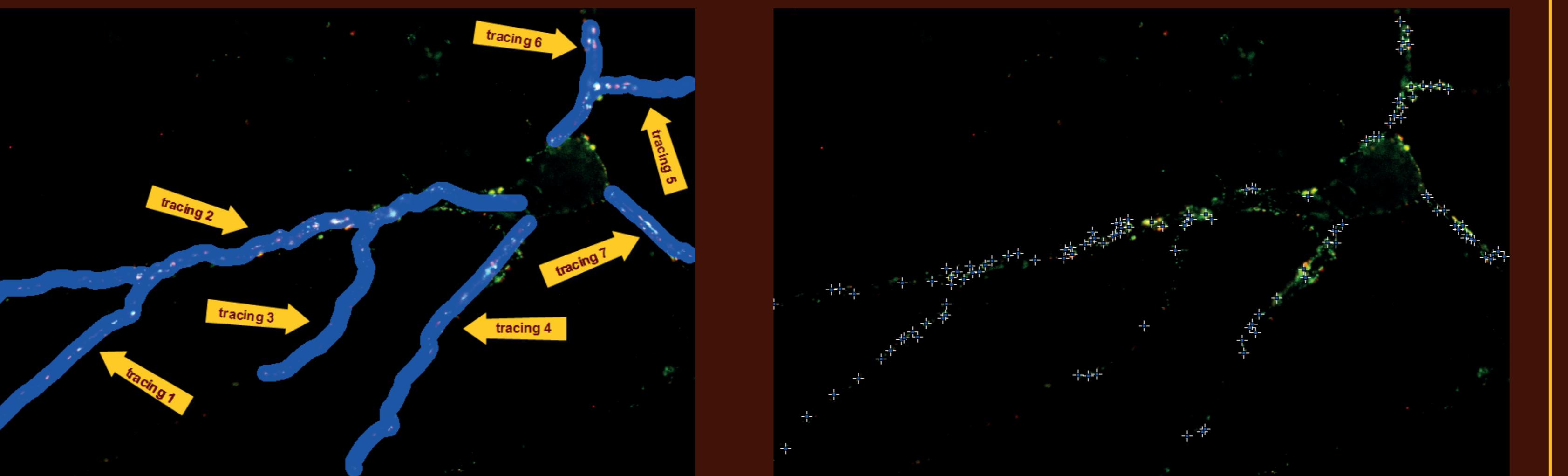
El plug-in permite modificar los valores de color de rojo y verde, para modificar el umbral de detección y obtener una primera imagen de los puntos que serán marcados (de color rojo) para su posterior conteo.

SynapCountJ actualiza en cada caso la cantidad de sinapsis que se han calculado para cada valor.

PASO 4: *SynapCountJ* devuelve una tabla con los resultados obtenidos

Label	Length in pixels	Length in micras	Synapses	Density	Red	Green	
1	Tracing N1:	307.8794	6988.8630	20	0.2862	72	73
2	Tracing N2:	725.3956	16466.4790	48	0.2915	72	73
3	Tracing N3:	242.2956	5500.1108	7	0.1273	72	73
4	Tracing N4:	375.0996	8514.7612	17	0.1997	72	73
5	Tracing N5:	193.9476	4402.6116	15	0.3407	72	73
6	Tracing N6:	83.2153	1888.9459	8	0.4235	72	73
7	Tracing N7:	119.1410	2704.5010	16	0.5916	72	73
8	Total Neuron	2046.9724	46466.2726	120	0.2583	72	73

y dos imágenes, una en la que se muestra el área analizada y otra en la que aparecen marcadas las sinapsis (cruces en azul y blanco).

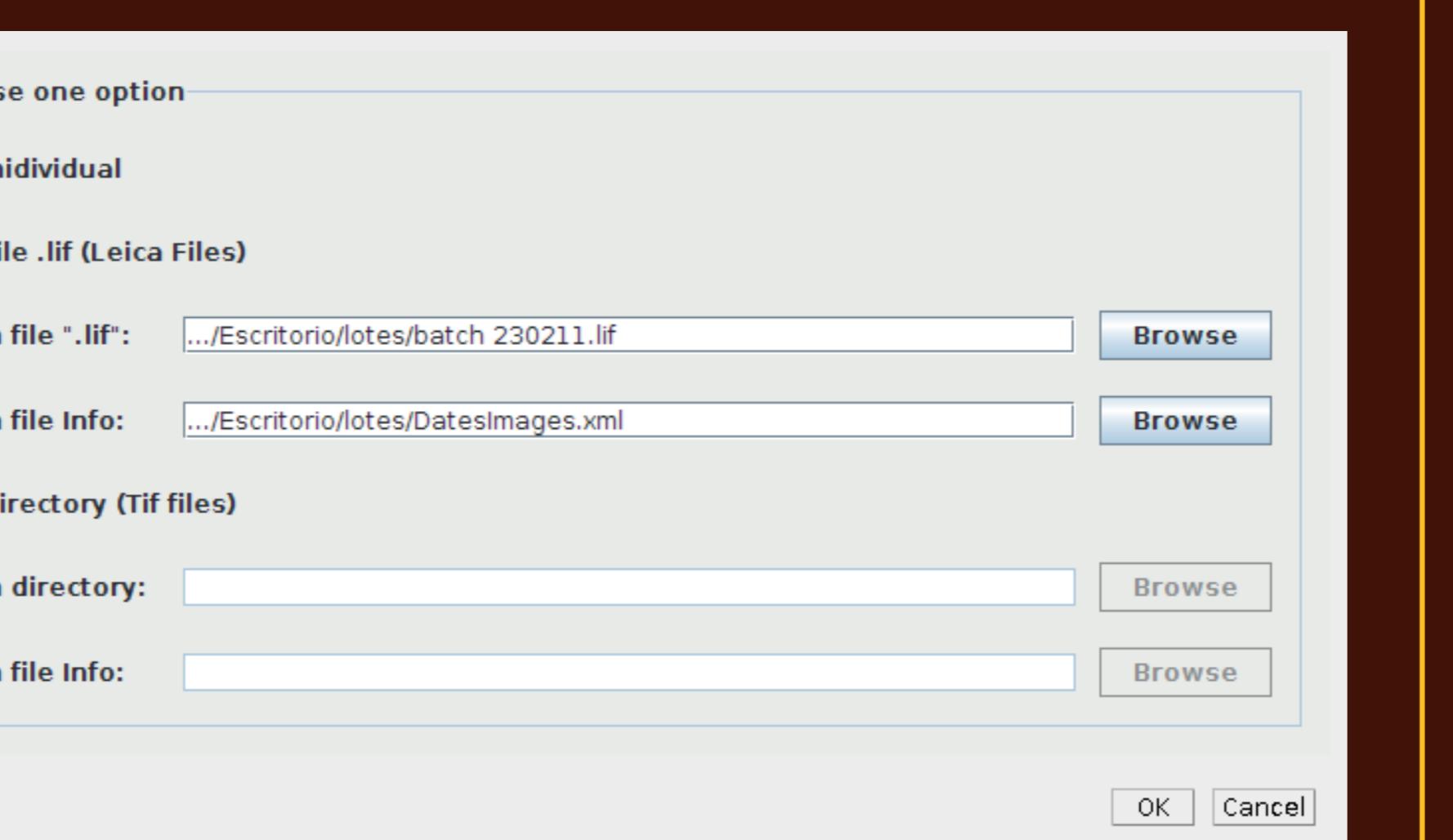


B. Tratamiento por lotes

A partir de los datos de umbral obtenidos con el método individual el programa genera un fichero con información que se puede aplicar para el tratamiento de fotografías en serie.

SynapCountJ puede leer archivos *.tif* organizados por carpetas (bajo los nombres ‘red’, ‘green’ y ‘tracing’) o directamente de un archivo *.lif* (extensión con la que trabajan los microscopios confocales *Leica*).

Para trabajar con archivos *.lif* es necesario tener instalado el plug-in *Bio-Formats* [2].



Label	Length_in_pixels	Length_in_micras	Synapses	Density	
1	Total Series002	3911.0846	88781.6202	220	0.2478
2	Tracing N1:	943.5925	21419.5503	76	0.3548
3	Tracing N2:	372.2664	8450.4463	19	0.2248
4	Tracing N3:	109.3606	2482.4856	17	0.6848
5	Tracing N4:	187.1695	4248.7466	29	0.6626
6	Tracing N5:	134.5342	3052.9526	10	0.3274
7	Tracing N6:	1196.8698	27168.9445	50	0.1840
8	Tracing N7:	546.2561	12400.0125	8	0.0645
9	Tracing N8:	301.7864	6850.5508	16	0.2336
10	Tracing N9:	119.2493	2706.9581	2	0.0739
11	Total Series005	4570.3928	103747.9160	251	0.2419
12	Tracing N1:	546.4246	12403.8386	43	0.3467
13	Tracing N2:	1189.6228	27004.4375	62	0.2296
14	Tracing N3:	1046.6659	23759.3167	69	0.2904
15	Tracing N4:	858.8209	19495.2344	45	0.2308
16	Tracing N5:	131.1682	2977.5175	5	0.1679
17	Tracing N6:	797.6904	18107.5713	31	0.1712

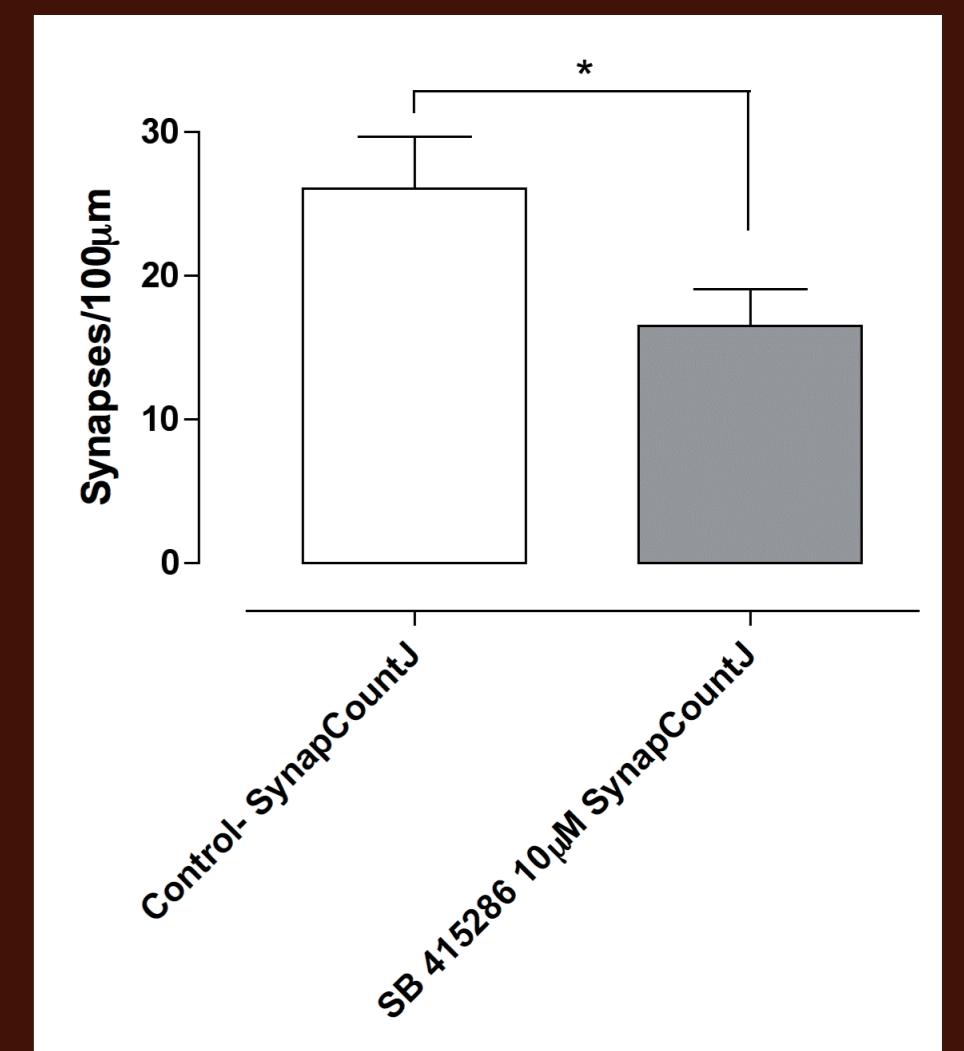
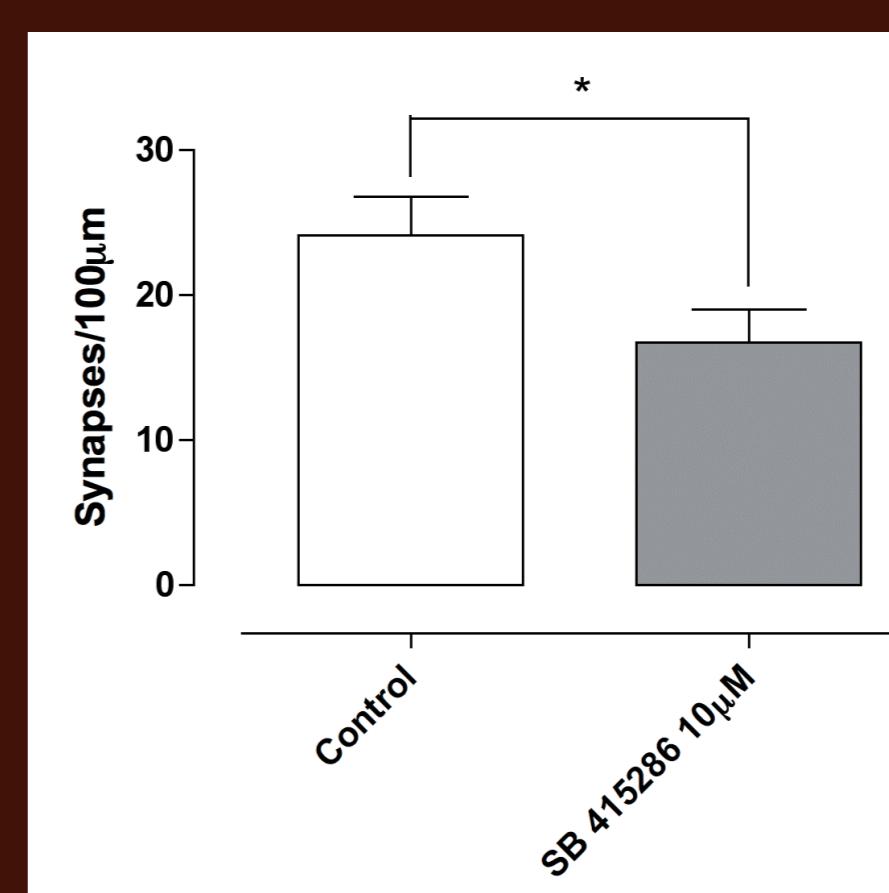
Como resultado se obtiene una tabla con la información de cada una de las neuronas tanto total como de cada una de sus dendritas.

Resultados Experimentales

Se ha realizado un estudio comparativo para poder valorar los resultados obtenidos con *SynapCountJ*.

Se emplearon neuronas de hipocampo de rata en cultivo (12 días *in vitro*). Los cultivos se trataron con un inhibidor químico de *GSK3* (*SB415286*). En total se analizaron 13 fotografías individuales.

En las siguientes gráficas podemos ver cómo realizando la identificación y el conteo de manera manual se obtiene una media de 24.12 sinapsis en el control y 16.74 sinapsis en el tratamiento. Así mismo los resultados obtenidos mediante el *plug-in* son similares, se han localizado 26.03 sinapsis de media en el control y 16.50 sinapsis en el tratamiento.



A pesar de las diferencias en el conteo, el porcentaje de inhibición medido con ambos procedimientos, es el mismo, un 36% de manera manual y un 36.6% de modo automático. Demostrando su eficacia el uso de *SynapCountJ* para contar sinapsis supone una reducción considerable del tiempo invertido en el conteo manual.

Conclusiones y trabajo futuro

SynapCountJ permite la automatización del conteo de sinapsis a partir de imágenes de inmunofluorescencia en cultivo.

El *plug-in* no sólo se limita al conteo de sinapsis en neuronas en desarrollo, también se ha probado en la unión neuromuscular de *Drosophila*, viendo así que este método se puede aplicar a cualquier estudio de imágenes que contenga dos marcadores sinápticos y una estructura determinada.

El siguiente paso es trabajar en mejorar la usabilidad del *plug-in* así como incorporar un post-procesamiento manual al resultado obtenido.

Nuestro futuro objetivo es conseguir la automatización completa de este método y para ello es necesaria la identificación automática de la morfología de la neurona, en este punto intervienen los algoritmos topológicos con los que intentaremos reducir la información de la imagen, para trabajar únicamente con lo necesario.

En un siguiente trabajo este tipo de método quiere adaptarse a la localización y clasificación de espinas dendríticas *in vivo*.

El *plug-in*, gratuito y de código abierto, se encuentra en:

<http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:utilities:synapsescountj:start>

Sugerencias a: gmata.ext@riojasalud.es

Referencias

1. *NeuronJ*: <http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>
2. *Bio-formats*: <http://www.loci.wisc.edu/software/bio-formats>