

Análisis de axones en crecimiento mediante la función Granulométrica de Tamaños

Mariela A. Gonzalez †‡, Virginia L. Ballarin ‡, Melina Rapacioli †, A. R. Celín †, V. Sánchez # y V. Flores †,#

† Grupo Interdisciplinario en Biología Teórica, Departamento de Cs. Bioestructurales, Universidad Favaloro.

Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis”, U.B.A.

‡ Lab. de Procesos y Medición de Señales, Depto. de Electrónica, Universidad Nacional de Mar del Plata / CONICET

Resumen— El análisis del comportamiento de las fibras nerviosas en desarrollo (neuritogénesis) en cultivos de neuronas o de explantos de tejido neural es una estrategia común en neurobiología del desarrollo. El estudio de las neuritas en desarrollo plantea dificultades ya que su delgadez y escaso contraste frecuentemente impiden resolver con precisión su forma, número, longitud y orientación espacial.

El objetivo de este trabajo es aplicar la función granulométrica de tamaños a neuritas en crecimiento, en cultivos de explantos de tejido neural en desarrollo, con el objeto de caracterizar de manera automática la forma, el tamaño y la orientación espacial de los axones en desarrollo.

Los resultados muestran que la función granulométrica de tamaños permitió caracterizar la presencia y orientación de los axones así como cuantificar el grado de inclinación de éstos en la muestra. Los algoritmos desarrollados cuantifican automáticamente esta inclinación facilitando el análisis de estas imágenes, lo cual es importante debido al gran número de imágenes que es necesario procesar para realizar este tipo de estudio.

Palabras clave—neuritogénesis, procesamiento digital de imágenes, morfología matemática, función granulométrica de tamaños.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio del comportamiento de los axones en medios de cultivo es una estrategia de uso común en el análisis de factores que regulan la generación de axones, el crecimiento dirigido de los mismos y la elaboración de vías y circuitos neurales durante el desarrollo del sistema nervioso central [1][2]. Las neuritas en desarrollo (axones y dendritas) son estructuras dinámicas, delicadas, con rasgos morfológicos difíciles de registrar y cuantificar. Las características de los axones en desarrollo: forma, grosor, longitud, orientación espacial etc. en general son descriptas cualitativamente debido a las dificultades de su registro y cuantificación. Sin embargo el análisis estadístico de las características de los axones en crecimiento requiere del registro y cuantificación de características relevantes desde el punto de vista del desarrollo [3]. Ello hace necesario el desarrollo de softwares que permitan poner de relieve con precisión todas o al menos algunas de las características mencionadas.

El objetivo de este trabajo es aplicar algoritmos de procesamiento digital de imágenes a muestras de cultivos de tejido neural en desarrollo para caracterizar de manera automática la forma, el tamaño y la orientación de los axones en crecimiento.

Las imágenes de cultivos de tejido neural están compuestas por un fondo de gran contenido de ruido, una

iluminación no homogénea, cuerpos de neuronas y axones que difieren en forma, color, textura, tamaño, orientación, etc. Estas características dificultan la obtención de una imagen binaria [4].

Las técnicas convencionales de procesamiento de imágenes para el análisis de formas de objetos requieren de una imagen binaria y del cálculo posterior de factores de redondez, de forma, área, etc. [4][5]. A diferencia de las técnicas estándar, las técnicas morfológicas están basadas en conceptos de geometría, álgebra, topología y teoría de conjuntos, con el fin de caracterizar propiedades estructurales en imágenes [6]-[10]. La idea central de estas técnicas es examinar las estructuras geométricas en una imagen por superposición con pequeños patrones localizados. De todas las técnicas de análisis que posee la morfología matemática, la herramienta más adecuada para discriminar formas es la función granulométrica de tamaños [11][13].

Este trabajo propone el cálculo de la función granulométrica de tamaños con elementos estructurantes de diversas formas y tamaños y el posterior análisis de su estadística con el fin de cuantificar el número y orientación de los axones en las imágenes.

II. MATERIALES

Para evaluar los resultados de la aplicación de la función granulométrica de tamaños en la cuantificación del número y orientación de axones, en una primera etapa se usaron imágenes sintéticas y, en una segunda etapa, imágenes correspondientes a diversos patrones de crecimiento de axones adquiridas mediante un microscopio.

Para la primera etapa se generaron 30 imágenes sintéticas, 10 con fondo blanco, 10 con fondo gris claro y 10 con fondo gris oscuro. En ellas se dibujaron rectángulos de distinto grosor con orientaciones de 0° , 45° , 90° , y 135° . También se varió el número de rectángulos de cada imagen. En la Fig. 1 se pueden apreciar algunas imágenes sintéticas.

En la segunda etapa se analizaron 16 imágenes de axones en crecimiento. En algunas de ellas el crecimiento está orientado, en otras los axones no crecen con una orientación definida y también se utilizaron imágenes sin axones. En la Fig. 2 se muestran estos tres casos que fueron elegidos debido a que son representativos del crecimiento de los axones.

Todos los algoritmos fueron implementados utilizando Matlab R14.

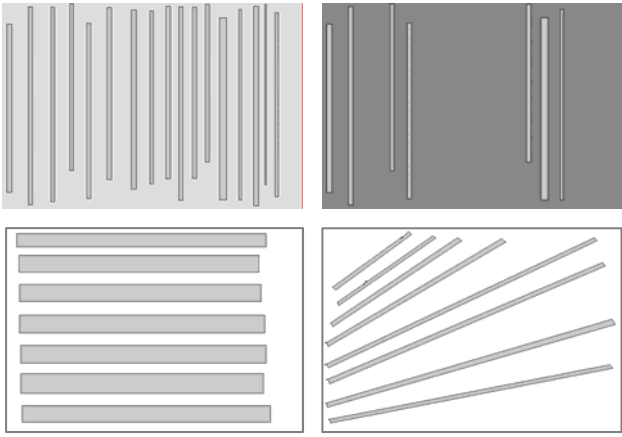


Fig. 1: Imágenes Sintéticas

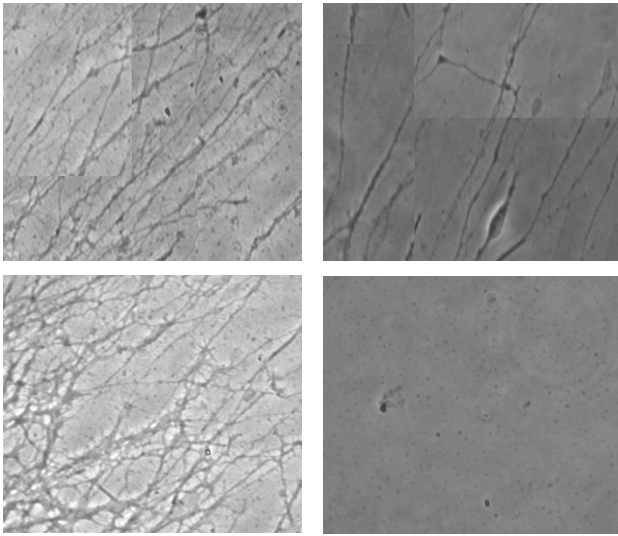


Fig. 2: Imágenes de axones en crecimiento

III. MÉTODOS

3.1. Morfología Matemática aplicada a imágenes binarias

Las operaciones básicas de la morfología binaria son la erosión y dilatación [6]. Estas operaciones comparan subconjuntos de la imagen binaria con un elemento patrón denominado elemento estructurante. El elemento estructurante es trasladado recorriendo de esta manera la imagen completa [8]-[10].

Formalmente, la erosión de un conjunto $A \subset \mathfrak{R}^2$ por un elemento estructurante $E \subset \mathfrak{R}^2$ se define como:

$$A \ominus E(x) = \{x \in A : E_x \subset A\} \quad (1)$$

donde E_x representa la traslación del conjunto E en x . El resultado de la erosión es una imagen binaria, donde los pixeles son blancos si el elemento estructurante queda incluido dentro del subconjunto de la imagen analizada y negros en caso contrario.

Análogamente, la dilatación de $A \subset \mathfrak{R}^2$ por el elemento estructurante $E \subset \mathfrak{R}^2$ se define como:

$$A \oplus E(x) = \{x \in A : E_x \cap A \neq \emptyset\} \quad (2)$$

En la dilatación se asigna un píxel blanco si existe al menos un píxel de intersección entre el subconjunto de la

imagen original y el elemento estructurante desplazado y un píxel negro cuando la intersección es vacía. La dilatación es una operación de expansión mientras que la erosión es una operación de contracción.

A partir de estas operaciones básicas se definen nuevos operadores morfológicos. Por ejemplo la apertura se define como la erosión seguida de una dilatación, esto es:

$$A \circ E(x) = (A \ominus E) \oplus E \quad (3)$$

La cerradura se define como la dilatación seguida de una erosión, esto es:

$$A \bullet E(x) = (A \oplus E) \ominus E \quad (4)$$

A partir de estos operadores se define la granulometría, que es una herramienta que proporciona la morfología matemática, para la caracterización de formas y tamaños de los objetos presentes en una imagen. Dada la familia $\{A \circ E_\lambda\}_{\lambda \in I}$ que surge de la aplicación de sucesivas aperturas con elementos estructurantes de tamaños crecientes, se define con el nombre de función de distribución granulométrica de tamaños a :

$$G(\lambda) = 1 - \frac{\Omega(A \circ E_\lambda)}{\Omega(A)} \quad (5)$$

Donde Ω es una medida de la imagen resultante que para el caso de las imágenes binarias resulta ser el área.

3.2. Morfología Matemática aplicada a imágenes en niveles de gris

Al igual que en la morfología matemática para imágenes binarias, las operaciones morfológicas básicas para imágenes en niveles de gris son la erosión y la dilatación [8]-[10].

Dadas dos imágenes f, g con dominios $D_f, D_g \subset \mathfrak{R}^2$ se define la erosión de la imagen f por el elemento estructurante g como:

$$f \ominus g(s, t) = \min_{\substack{(x, y) \in D_g \\ (s+x, t+y) \in D_f}} \{f(s+x, t+y) - g(x, y)\} \quad (5)$$

Para cada píxel de la imagen, la operación erosión se define como la diferencia mínima entre las intensidades del elemento estructurante desplazado y las intensidades correspondientes de la imagen original.

Análogamente, la dilatación de la imagen f por el elemento estructurante g se define como:

$$f \oplus g(s, t) = \max_{\substack{(x, y) \in D_g \\ (s-x, t-y) \in D_f}} \{f(s-x, t-y) + g(x, y)\} \quad (6)$$

La dilatación de cada píxel de la imagen se define como el máximo valor de la suma entre las intensidades del subconjunto de la imagen original y las intensidades correspondientes del elemento estructurante.

El operador apertura y la granulometría para imágenes en niveles de gris se definen de manera análoga a los operadores binarios.

En niveles de gris, la función de distribución granulométrica de tamaños se define de manera análoga que en imágenes binarias [14]-[15].

$$G(\lambda) = 1 - \frac{\Omega(A \circ E_\lambda)}{\Omega(A)} \quad (7)$$

Se realizan aperturas sucesivas a la imagen original con elementos estructurantes crecientes. Luego se calcula una medida Ω para cada apertura realizada que, para el caso de las imágenes en grises, es el volumen resultante. Este resultado es normalizado respecto a la imagen original.

Una vez calculada la función granulométrica de tamaños, que es en realidad una función de distribución de probabilidad, se calculan el valor medio, el desvío estándar y la energía de esta función.

IV. RESULTADOS

Se calculó la función granulométrica de tamaños para las imágenes de prueba utilizando elementos estructurantes de distintas formas (para este caso diferentes orientaciones). Se analizaron como variaban los momentos calculados a partir de la función granulométrica de tamaños, cuando varía el color del fondo, el número de rectángulos, el grosor de los rectángulos y su orientación.

A. Análisis de la variación de los momentos estadísticos respecto a la variación del nivel de gris del fondo.

En las imágenes sintéticas con distintos niveles de gris de fondo y para los mismos rectángulos se midió el valor medio de la función granulométrica de tamaños. Este parámetro presentó una alta variabilidad sin seguir ningún comportamiento específico ni repetible. Algunos de estos resultados se muestran en la tabla I.

TABLA I
VALOR MEDIO CALCULADO A PARTIR DE LA FUNCIÓN GRANULOMÉTRICA DE TAMAÑOS EN IMÁGENES CON DISTINTOS FONDOS.

Elemento estructurante	Fondo blanco 4 rectángulos delgados a 45°	Fondo gris claro 4 rectángulos delgados a 45°	Fondo gris oscuro 4 rectángulos delgados a 45°
línea 0°	0,3864	0,5416	0,9499
línea 90°	0,6249	0,6233	0,8805
	Fondo blanco 17 rectángulos delgados a 90°	Fondo gris claro 17 rectángulos delgados a 90°	Fondo gris oscuro 17 rectángulos delgados a 90°
línea 0°	0,8593	0,8175	0,8749
línea 90°	0,4689	0,4345	0,3664
	Fondo blanco 7 rectángulos gruesos a 0°	Fondo gris claro 7 rectángulos gruesos a 0°	Fondo gris oscuro 7 rectángulos gruesos a 0°
línea 0°	0,5054	0,3987	0,5439
línea 90°	0,891	0,8423	0,9139

B. Análisis de la variación de los momentos estadísticos respecto al número y grosor de los rectángulos

El valor medio calculado a partir de la función granulométrica de tamaños aumenta con el número y grosor de los rectángulos en todas las imágenes de prueba analizadas. Sin embargo, no se puede distinguir si este aumento se debe al aumento del número o del grosor. Solo podría utilizarse esta función para evaluar el grado de ocupación de los axones en la imagen, es decir la relación entre el área ocupada por neuronas y el área del fondo. En la tabla II se pueden apreciar estos resultados.

C. Análisis de la variación de los momentos estadísticos respecto a la orientación de los rectángulos y la orientación de los elemento estructurantes utilizados

Para las distintas imágenes sintéticas se calculó la función granulométrica de tamaños con elementos estructurantes lineales con diferentes orientaciones.

TABLA II
VALOR MEDIO CALCULADO A PARTIR DE LA FUNCIÓN GRANULOMÉTRICA DE TAMAÑOS EN IMÁGENES CON DISTINTOS NÚMERO DE AXONES. (CON UN ELEMENTO ESTRUCTURANTE LINEAL DE 0°)

Fondo Blanco 4 rectángulos delgados a 45°	Fondo Blanco 8 rectángulos delgados a 45°
0,5406	0,6536
Fondo Gris Claro 4 rectángulos delgados a 45°	Fondo Gris Claro 8 rectángulos delgados a 45°
0,5416	0,6521
Fondo Gris Oscuro 4 rectángulos gruesos a 135°	Fondo Gris Oscuro 8 rectángulos gruesos a 135°
0,8912	0,9021
Fondo Blanco 7 rectángulos delgados a 90°	Fondo Blanco 17 rectángulos delgados a 90°
0,6673	0,8593
Fondo Gris Claro 7 rectángulos delgados a 90°	Fondo Gris Claro 17 rectángulos delgados a 90°
0,6597	0,8175

TABLA III
VALOR MEDIO CALCULADO A PARTIR DE LA FUNCIÓN GRANULOMÉTRICA CON ELEMENTOS ESTRUCTURANTES DE DIFERENTES DIRECCIÓN.

Inclinación de los rectángulos en la imagen	Elemento estructurante lineal a 0°	Elemento estructurante lineal a 90°	Elemento estructurante lineal a 135°
90°	0,8175	0,4345	0,8319
90°	0,8153	0,6014	0,7284
135°	0,7671	0,5714	0,5497
90°	0,8749	0,3664	0,9057
90°	0,9078	0,4639	0,8846
135°	0,8912	0,8788	0,8075
90°	0,8924	0,3735	0,8657
90°	0,9064	0,4814	0,8813
90°	0,8593	0,4689	0,8789
90°	0,6673	0,4669	0,7698
0°	0,5054	0,891	0,8658
0°	0,3987	0,8423	0,8615

Los resultados mostraron que cuando el elemento estructurante utilizado se corresponde con la inclinación de los rectángulos de las imágenes, el valor medio de la función es menor. Esto se debe a que cuando se realiza una apertura con un elemento estructurante que coincide con la forma del objetos presentes en la imagen, estos objetos no aparecen en la imagen resultado, por lo que el volumen medido es menor y por ende el momento asociado.

En la tabla III se muestran algunos ejemplos. En esta tabla se resaltan los valores medios de la función granulométrica cuyo elemento estructurante coincide en orientación con el de los rectángulos. Hay que destacar que este resultado se confirmó para las 30 imágenes de prueba.

D. Análisis de las imágenes de axones en crecimiento

Una vez analizados los resultados para las imágenes sintéticas, se evaluó la estadística en imágenes donde se puede observar el crecimiento de los axones.

Al igual que en los estudios anteriores, el cálculo de la función granulométrica con diferentes elementos estructurantes permitió conocer la orientación de los objetos presentes en las imágenes. El valor medio determinado a partir de esta función es menor cuando el axón posee la misma orientación que el elemento estructurante utilizado en el cálculo de la función granulométrica.

El valor medio calculado a partir de la función granulométrica también aumenta con el número de axones y su grosor.

La función granulométrica de tamaños también se calculó utilizando un elemento estructurante cuadrado. Cuando no existe ninguna orientación definida de los axones, el valor medio, calculado a partir de la función granulométrica, es menor. Esta característica permite reconocer si existen axones que crecen en varias direcciones, ya que este elemento estructurante analiza todas las direcciones simultáneamente.

Las tablas IV y V muestran el poder de discriminación del valor medio, calculado a partir de la función de distribución granulométrica de tamaños, en las imágenes de axones en crecimiento.

Si bien en las tablas sólo se muestran algunos ejemplos, estos resultados fueron obtenidos para todas las imágenes de los axones en crecimiento.

TABLA IV

VALOR MEDIO CALCULADO A PARTIR DE LA FUNCIÓN GRANULOMÉTRICA EN IMÁGENES DE AXONES EN CRECIMIENTO.

(CON UNA IMAGEN SIN AXONES Y AXONES ALINEADOS A 0°, 45°, 90° Y 100°)

Imagen / elemento estructurante	Axones a 45°, 90° y 100°	Axones Alineados a 45°	Axones alineados a 0°	Sin axones
0°	0,7872	0,759	0,5559	0,6516
45°	0,7338	0,6956	0,6012	0,6425
90°	0,725	0,7387	0,5973	0,6368
135°	0,7325	0,7413	0,5967	0,6402
Disco 3x3	0,6776	0,7804	0,6893	0,5007

TABLA V

VALOR MEDIO CALCULADO A PARTIR DE LA FUNCIÓN GRANULOMÉTRICA EN IMÁGENES DE AXONES EN CRECIMIENTO.

(CON AXONES ALINEADOS A 45° Y 90°)

Imagen / elemento Estructurante	Axones alineados a 45°	Nº alto de axones alineados a 90°	Nº bajo de axones alineados a 45°	Nº alto de axones alineados a 45°
0°	0,6519	0,7788	0,5777	0,7754
45°	0,6077	0,7256	0,5669	0,7327
90°	0,6509	0,6776	0,6187	0,7836
135°	0,6759	0,7155	0,5953	0,7965
Disco 3x3	0,6945	0,7125	0,5987	0,7913

V. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye un estudio preliminar tendiente a desarrollar un método de análisis digital de imágenes que permita identificar y cuantificar características de los axones que informen acerca de su plasticidad, dinamismo y sensibilidad frente a factores que regulan la neuritogénesis (factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, interacciones con otras células etc.). Los resultados muestran que la función granulométrica de

tamaños es de utilidad para caracterizar la orientación espacial de los objetos tanto en imágenes sintéticas como en muestras reales de axones en crecimiento.

El valor medio calculado a partir de esta función permite cuantificar el grado de inclinación de los axones, lo que constituye un índice de la orientación espacial preferencial de los mismos. Este dato parece no ser muy relevante en casos en los que la fasciculación genera direcciones de crecimientos preferenciales y los axones comparten una orientación definida. Resulta sin embargo de alta utilidad en las situaciones, más difíciles de caracterizar, en las que los axones no exhiben un crecimiento preferencial, sino que forman redes complejas. Aún en estos casos el método permite detectar y cuantificar axones con diferente orientación espacial. Esta capacidad es muy útil pues frecuentemente las imágenes de axones en crecimiento son redes complejas. Los algoritmos desarrollados son automáticos facilitando el análisis de estas imágenes, lo cual es importante debido al gran número que es necesario procesar para realizar este tipo de estudios de manera robusta.

Como trabajo futuro se propone aplicar los algoritmos desarrollados para caracterizar la variación de las neuronas a lo largo de los ejes propios del tubo neural y también extender este análisis a las variaciones temporales que ocurren durante el desarrollo.

REFERENCIAS

- [1] S. Fiszler de Plazas, M. Rapacioli, D. Rodriguez, M. Vacotto, V. Flores, "Acute hypoxia differentially affects the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha(1), alpha(2), beta(2), and gamma(2) subunit mRNA levels in the developing chick optic tectum: Stage-dependent sensitivity". *Journal of Neuroscience Research*, vol. 95 No. 5 pp.280-286, 2008.
- [2] R. Farías, C. Vidal, M. Rapacioli, V. Flores, "Basics elements for modelling the dynamics of cell migration in cell culture", *Journal of Physics: conference series*. vol. 90 pp.1-7, 2007.
- [3] J. Mazzeo, M. Rapacioli, V. Sanchez, G. Scicolone, C. D'Attellis, V. Flores, "Characterizing cell proliferation process in the developing central nervous system", *InterJournal Complex Systems*, No. 1686 pp.1-7, 2006.
- [4] Glasbey, C. A. y Horgan G. W., *Image analysis for the biological science, Statistics in Practice*, Series Editor Vic Barnett., John Wiley and Sons, 1994.
- [5] González, R y Woods, R., *Tratamiento Digital de imágenes*, Addison Wesley, 1996.
- [6] Facon, J., *Morfología Matemática. Teoría y ejemplos*, Curitiba Brasil, CITS, 1996.
- [7] Castleman K. R., *Digital Image Processing*, Prentice Hall, 1979.
- [8] Serra, J., *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, London, 1982.
- [9] Serra, J., *Image Analysis and Mathematical Morphology- Part II: Theoretical Advances*, Academic Press, London, 1988.
- [10] Serra J. *Image analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, 1992.
- [11] Ballarin, V. y Valentinuzzi, M.: "Segmentación en imágenes de Resonancia Magnética de Cerebro utilizando Morfología Matemática." Actas del Congreso Argentino de Bioingeniería. Taff del Valle. Septiembre 2001. (Publicadas en CD), 2001.
- [12] Heijmans, H., "Theoretical aspects of gray-scale morphology," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 13, pp.568-582, 1991.
- [13] Vincent L., Dougherty E., *Morfological Segmentation for Textures and Particles*, Digital Image Processing Methods, Rochester, New York, 1994.
- [14] Dougherty, E. R. y Astola J., *An introduction to nonlinear image processing*, Tutorial Texts in optical engineering, vol. TT16, 1994.
- [15] Marshall, S. y Sicuranza G., *Advances in nonlinear signal and image processing*, Eurasip, 2006.