

# Segmentación automática del árbol dendrítico en imágenes neuronales de microscopía confocal

S.García Gutiérrez<sup>1</sup>, I. FondónGarcía<sup>1</sup>, A. Sarmiento Vega<sup>1</sup>, Q. Abbas<sup>2,3</sup>, JJ. Casañas Díaz<sup>4</sup>, ML. Montesinos Gutierrez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Teoría de la Señal y comunicaciones, Universidad de Sevilla, España, {irenef,sarmiento}@us.es

<sup>2</sup>Department of Computer Science, COMSATS Institute of Information Technology, Sahiwal, Pakistán, drqaisar@ntu.edu.pk

<sup>3</sup>College of Computer and Information Sciences, Al-Imam Muhammad Ibn Saud Islamic University, Ministry of Higher Education, Riyadh, Arabia Saudí, drqaisar@ntu.edu.pk

<sup>4</sup>Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, España, {mlmontesinos,jjcasanas}@us.es

## Resumen

En este artículo se propone el uso de un algoritmo para la segmentación de imágenes de neuronas obtenidas mediante microscopía confocal. La imagen es procesada inicialmente con un filtro de difusión anisotrópica para eliminar posible ruido. La detección de dendritas se realiza en distintas orientaciones y con diferentes escalas mediante dos bancos de filtros: adaptados gaussianos y primera derivada gaussiana, aprovechando la distribución de niveles de gris que caracteriza a las estructuras que nos ocupan. Así mismo, se ha desarrollado una interfaz gráfica, de forma que el algoritmo pueda ser ejecutado por personal médico sin conocimientos informáticos previos. El método ha sido probado en 30 imágenes validadas por expertos, procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena, obteniéndose una precisión media del 98.12 %.

## 1. Introducción

La microscopía confocal es una herramienta importante para los investigadores en neurociencia. Una simple neurona puede ser marcada usando proteína verde fluorescente (GFP), de manera que la estructura neuronal pueda ser visualizada en una pila de imágenes. Sin embargo, la obtención del árbol dendrítico en secciones de tejido individual requiere de horas a meses de trabajo [1,2], y, en la práctica, la segmentación de imágenes se lleva a cabo de una manera prácticamente manual [1]. Se han aplicado técnicas de procesamiento de imagen [1-7] con el objeto de minimizar la intervención del usuario experto y hacer más precisas las segmentaciones. Cada una de ellas trabaja con distinto tipo de imágenes, aunque el propósito final es siempre segmentar, medir y/o reconstruir la neurona con el propósito de tener una visión más clara.

## 2. Métodos y Materiales

### 2.1. Materiales

El método de detección automática de dendritas propuesto ha sido probado en un total de 30 imágenes proporcionadas por el Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla). Estas imágenes se corresponden con el valor máximo de intensidad para cada vóxel de cada

pila de imágenes. El número de neuronas presente en cada imagen es indeterminado, generalmente con una gran densidad de dendritas, correspondientes a los resultados de técnicas de marcado biológico usando proteína verde fluorescente. Dichas imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 (objetivo: PLAPON 60x; apertura numérica 1.42). La resolución de las imágenes y el tamaño eran 16 bits y 1024 x 1024 píxeles, respectivamente. Las propiedades confocales fueron ajustadas en cada experimento particular con el objetivo de maximizar el rango dinámico de la intensidad del pixel, evitando la saturación de la señal (monitorizada con el software Fluoview de Olympus para microscopio confocal).

Las secciones de cada pila de imágenes fueron normalizadas al valor máximo de la proyección normalizada de la pila, para facilitar el procesado.

### 2.2. Métodos

La herramienta propuesta ha sido desarrollada con el software MATLAB® R2014a y GuidedUser Interface (GUI). Puede ser ejecutado sin ningún conocimiento informático previo, ver Figuras 1 y 2.

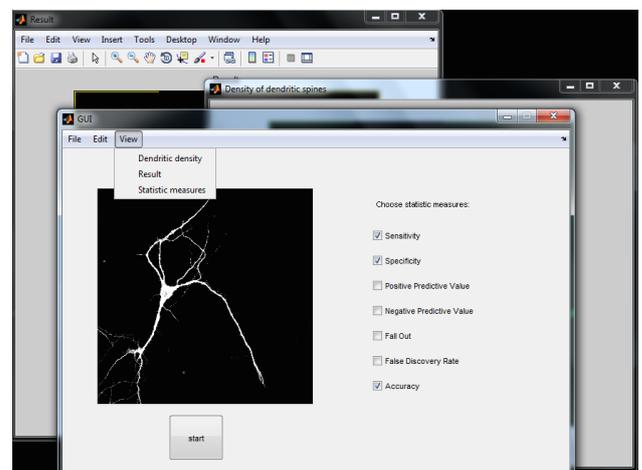
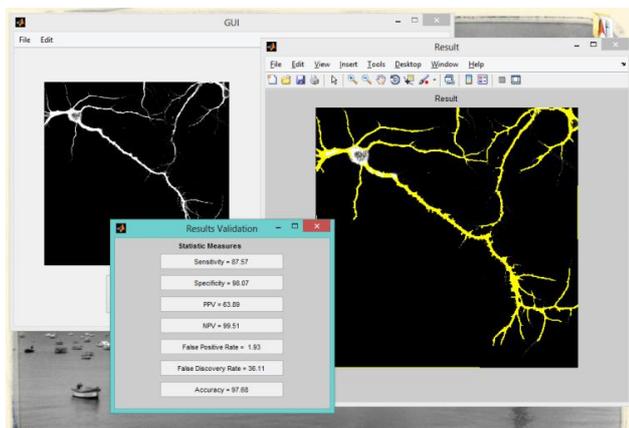


Figura 1. Un ejemplo de la herramienta software presentada.



**Figura 2.** Las dendritas seleccionadas pueden ser mostradas superpuestas sobre la imagen original.

El método implementado para la detección de dendritas se basa en la técnica propuesta en [8,9] para detección de pelos en imágenes dermatoscópicas y la detección de vasos sanguíneos en imágenes de fondo de ojo, dado el parecido entre las secciones transversales de dichas estructuras. Considerando el hecho de que la sección transversal de una dendrita puede ser modelada como una función gaussiana, empleamos filtros que “se adaptan” a ella posibilitando la detección del árbol dendrítico.

La imagen original es filtrada inicialmente para eliminar el posible ruido existente con un filtro de difusión anisotrópica, capaz de preservar los bordes en las imágenes. Posteriormente, las dendritas son detectadas con un método basado en un conjunto de filtros adaptados gaussianos (Matched Gaussian Filters, MGF), útiles por su simplicidad y efectividad, seguidos de un banco de filtros basado en la primera derivada de la función gaussiana (Derivative Of a Gaussian, DOG) que elimina determinados resultados no deseados, como se explicará en las siguientes secciones.

### 2.3. Bancos de filtros

En primer lugar, el banco de filtros MGF detecta dendritas mediante el filtrado de la imagen original y la posterior umbralización del resultado obtenido, basándose en una aproximación de la sección transversal de las dendritas a la función de distribución normal o gaussiana. El filtro adaptado gaussiano se define en [9] como:

$$f(x,y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}s} \exp\left(-\frac{x^2}{2s^2}\right) - m, \quad |x| \leq t \cdot s, \quad |y| \leq \frac{L}{2} \quad (1)$$

donde  $s$  representa la escala del filtro,  $m$  se utiliza para normalizar el valor medio del filtro a 0 (y así poder eliminar el fondo después del filtrado), y  $L$  es el tamaño de la vecindad a lo largo del eje Y, para suavizar el ruido. El parámetro  $L$  dependerá del valor de  $s$  (cuando ésta sea pequeña,  $L$  se ajustará a un valor relativamente pequeño). El parámetro  $t$  será una constante relacionada con la desviación estándar de la función gaussiana, normalmente ajustada al valor 3, puesto que más del 99% del área de la función gaussiana se encuentra en el rango  $[-3s, 3s]$  [8].

Un problema conocido de este filtro es que no sólo detectará dendritas, sino también bordes del núcleo, debido a que dicho filtro tendrá, en cierta medida, respuestas positivas también en bordes bruscos. Para

evitar esto, el algoritmo introduce un segundo conjunto de filtros, DOG, que servirá para determinar con mayor precisión cuáles de estos bordes no pertenecen a dendritas, aprovechando que las dendritas responderán de forma antisimétrica al filtrado DOG. De esta forma se eliminan los bordes que, aunque detectados por MGF, son incorrectos.

El filtro DOG puede obtenerse directamente de la primera derivada del filtro MGF, como se refleja en [8,9]:

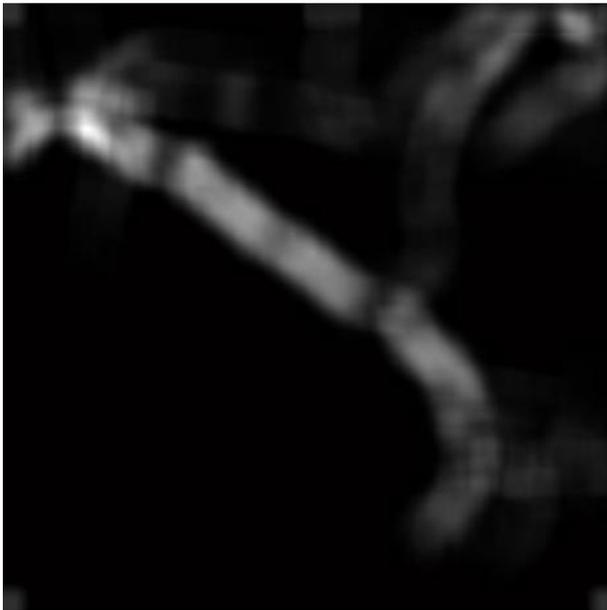
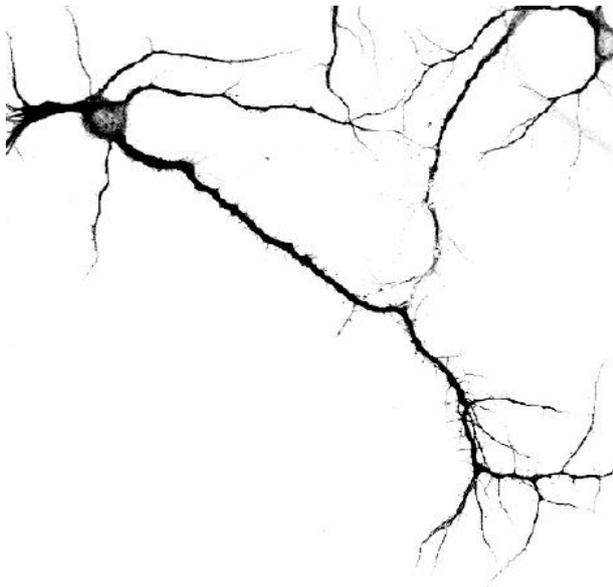
$$g(x,y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}s^3} \exp\left(-\frac{x^2}{2s^2}\right), \quad |x| \leq t \cdot s, \quad |y| \leq \frac{L}{2} \quad (2)$$

La respuesta al filtro DOG será muy cambiante y no será válida para localizar estructuras, por lo que es necesario hacer uso de su media local (y no de su respuesta directamente), que llamaremos  $d_m$ . En esta media local, el valor de cada píxel queda definido por el valor medio de los píxeles vecinos.

Llamemos  $T$  al umbral utilizado para distinguir entre dendritas y fondo o soma. Dicho umbral se aplicará a la respuesta de la imagen al filtro MGF para distinguir entre píxeles pertenecientes a dendritas o no pertenecientes, aunque el valor de  $T$  se basa en la media local de la respuesta de la imagen al filtro DOG. La media local se normalizará para que los valores se encuentren en el rango  $[0, 1]$  (ver Figura 3).

Si el valor de  $d_m$  es bajo en cierto punto, existirá en la vecindad de este píxel una estructura de tipo dendrítica, y el valor de  $T$  deberá ser pequeño (ver Figura 3: la magnitud de la media local es mayor en píxeles pertenecientes al núcleo de la neurona). Por el contrario, si el valor de  $d_m$  fuera alto, aparecerá en la vecindad de este punto un borde no perteneciente a dendritas, y el valor de  $T$  será alto para eliminar a éste del árbol dendrítico final.

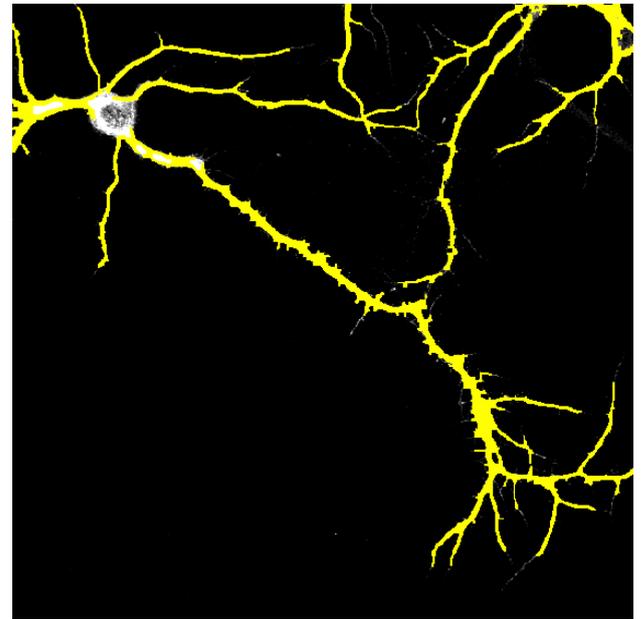
El umbral  $T$  dependerá linealmente, además de  $d_m$ , de la respuesta de la imagen al filtro MGF [9] mediante un peso fijado a 10 en base a los resultados experimentales obtenidos. En la herramienta software presentada, este valor es ajustable por el usuario experto, aunque está fijado por defecto, como hemos comentado.



**Figura 3** Imagen original (arriba); Imagen normalizada del valor medio de la respuesta al filtro DOG (abajo).

El filtrado se realizará con diferentes valores de escala (para buscar dendritas de distinto grosor) y diferentes orientaciones (para encontrar dendritas en todas ellas), por lo que se aplica una rotación [8]:

$$f^\theta(x', y') = f(x, y), \text{ donde } x' = x \cdot \cos\theta + y \cdot \sin\theta, \text{ e } y' = y \cdot \cos\theta - x \cdot \sin\theta.$$



**Figura 4.** Resultado de la aplicación del algoritmo

### 3. Resultados y Discusión.

Para la validación del algoritmo se han empleado 30 imágenes proporcionadas por el equipo de expertos del Hospital Virgen Macarena. A su vez, el algoritmo ha sido validado mediante segmentaciones manuales proporcionadas por dichos expertos tomadas como verdad de referencia (groundtruth).

Los valores numéricos empleados para medir objetivamente la eficacia del algoritmo son: sensibilidad (3), especificidad (4) y precisión (5).

La sensibilidad caracteriza la capacidad del algoritmo para detectar dendritas en aquellos puntos donde existen, y se define como:

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \left( \frac{VP}{VP+FN} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

La especificidad caracteriza la capacidad del algoritmo para detectar la ausencia de dendritas en aquellos puntos donde no había dendritas, y se define como:

$$\text{Especificidad (\%)} = \left( \frac{VN}{VN+FP} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

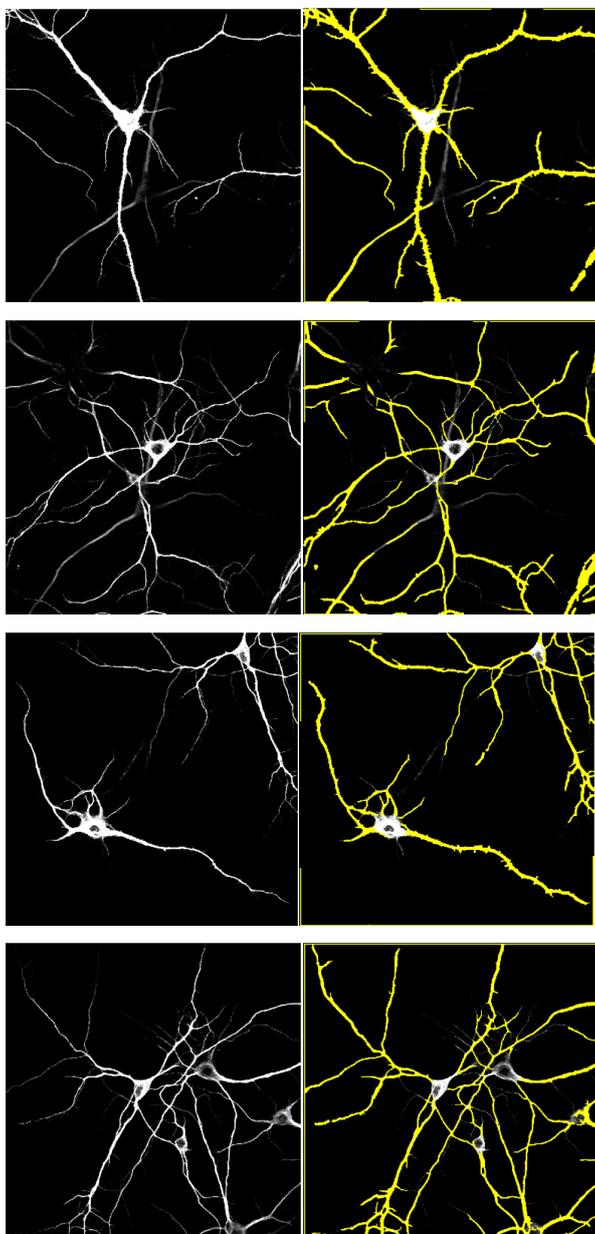
La precisión muestra la exactitud de nuestro algoritmo en la extracción de dendritas, y se define:

$$\text{Precisión (\%)} = \left( \frac{VP+VN}{VP+FN+FP+VN} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

La Tabla 1 muestra los resultados medios obtenidos, mientras que la Figura 5 presenta algunos ejemplos.

(%)	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Técnica propuesta	80.83	98.67	98.12

**Tabla 1.** Medidas de la precisión media de la segmentación para detección de dendritas en 30 imágenes.



**Figura 5.** Algunos ejemplos de los resultados obtenidos (derecha) para cuatro imágenes originales (izquierda).

#### 4. Conclusiones

En este artículo se propone el uso del filtro adaptado MGF conjuntamente con el filtro de primera derivada gaussiana DOG para la detección automática del árbol

dendrítico en imágenes de microscopio confocal. El algoritmo ha sido probado en 30 imágenes, obteniéndose una buena calidad en los resultados en términos de sensibilidad, especificidad y precisión. Así mismo, se ha programado una interfaz gráfica de manejo sencillo, para su utilización por parte de los expertos científicos, como herramienta de segmentación automática de la morfología de la neurona.

Como línea de trabajo futura, se propone un ajuste en la detección de las espinas dendríticas, que presenta una gran complejidad debido al reducido tamaño de las mismas en la imagen original.

#### 5. Referencias

- [1] Fanti Z, Martínez-Pérez ME. Three dimensional reconstruction of neuron morphology from confocal microscopy images. *SPIE Photonics Europe*. International Society for Optics and Photonics, 2010. p. 77231E-77231E-9.
- [2] Página web de DIADEM Challenge. <http://www.diademchallenge.org> (Consultada: Junio 2014).
- [3] Página web de NeuroLucida, Micro Bright Field Inc. <http://www.mbfbioscience.com/neuroLucida> (Consultada: Junio 2014).
- [4] Descombes X, Malandain G, Fonta C, Negyessy L, Mosko R. Automatic dendrite spines detection from x-ray tomography volumes. *IEEE 10th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI), 2013 IEEE 10th International Symposium*, IEEE 2013, pp 436-439.
- [5] Su R, Sun C, Pham TD. Dendritic spines detection based on directional morphological filter and shortest path. *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2012 Annual International Conference of the IEEE*. IEEE, 2012. p. 5343-5346.
- [6] Erdil E, Yagci AM, Argunsah AO, Ramiro-Cortes Y, Hobbiss AF, Israely I, Unay D. A tool for automatic dendritic spine detection and analysis. Part I: Dendritic spine detection using multi-level region-based segmentation. *Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA), 2012 3rd International Conference*. IEEE, 2012. p. 167-171.
- [7] He T, Xue Z, Wong ST. A novel approach for three dimensional dendrite spine segmentation and classification. *SPIE Medical Imaging. International Society for Optics and Photonics*, 2012. p. 831437-831437-8.
- [8] Abbas Q, Fondón I, Emre C, Ahmad W. A Feature-Preserving Hair Removal Algorithm for Dermoscopy Images. *Skin Research and Technology*, 2013, vol. 19, no 1, p. e27-e36.
- [9] Zhang B, Zhang I, Zhang L, Karray F. Retinal vessel extraction by matched filter with first-order derivative of Gaussian. *Computers in Biology and Medicine*, 2010, vol. 40, no 4, p. 438-445.