

## MEDIDA DEL LARGO DE CILIAS PRIMARIAS: UN PLUGIN PARA IMAGEJ

Mauricio Ramos (1), Paola Lepanto (2), Florencia Irigoin (3), Federico Lecumberry (4)

(1) Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República / Laboratorio de Procesamiento de Señales, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay. (2) Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur Montevideo. Montevideo, Uruguay. (3) Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República / Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur Montevideo. Montevideo, Uruguay. (4) Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República / Laboratorio de Procesamiento de Señales, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.  
Email: mramos@pasteur.edu.uy

Las cilias primarias son organelos que protruyen desde la superficie celular, presentes en la mayoría de las células de vertebrados que cumplen funciones de recepción y transducción de señales extracelulares. El estudio de la función de las proteínas asociadas a estos organelos conlleva a la evaluación rutinaria del largo ciliar en imágenes de microscopía confocal tanto en organismos enteros como en células en cultivo. Actualmente estas mediciones son realizadas a mano en proyecciones, resultando una tarea tediosa, subjetiva y que subestima la medida. Con el fin de sistematizar y acelerar el proceso de medida y generar mejores estimaciones, hemos desarrollado un método para medir el largo de las cilias primarias en 3D. Tomando como punto de partida un stack de imágenes de microscopía confocal deconvolucionado, desarrollamos un algoritmo que identifica cada cilia y mide su largo. El procedimiento incluye una convolución gaussiana, cálculo del esqueleto y ajuste a una curva 3D para extrapolación. La Figura 1 muestra el diagrama de bloques del algoritmo propuesto. La *Identificación de cilias* consiste en contar el número de objetos 3D que satisfacen ciertas restricciones de volumen y valores de intensidad, para ello sobre un stack de imágenes se aplica el plugin 3D Objects Counter [1] de ImageJ. En los sectores del stack original donde se detectaron las posibles cilias, el bloque *Reslice* y *Blurring Gaussiano* aplica una interpolación en la dirección z y un blurring gaussiano isotrópico, respectivamente, lo cual permite corregir la asimetría presente en la resolución del plano xy con respecto a la dirección z. El *Cálculo del esqueleto* sobre cada cilia se realiza utilizando los plugins Skeletonize 3D y AnalyzeSkeleton [2, 3] de Fiji. Estos últimos trabajan sobre la imagen binaria de la cilia. En general el esqueleto que inicialmente se computa presenta varias ramificaciones. AnalyzeSkeleton releva todas las uniones y ramas del esqueleto, efectúa un podado y permite obtener "the largest shortest path" como el esqueleto de interés. Por definición, el esqueleto encontrado anteriormente no permite llegar completamente a los extremos de la cilia además de presentar ciertas irregularidades en su trayectoria. Para solucionar estos inconvenientes se ajusta sobre el esqueleto una curva 3D y se efectúa una extrapolación con polinomios de bajo orden (no mayor a 3) hasta llegar a los extremos de la cilia definida por la imagen binaria ya mencionada. La Figura 2 muestra el resultado del ajuste sobre una cilia. Con el ajuste del esqueleto completo se mide el largo del mismo utilizando la distancia euclídea y se adjudica a la cilia correspondiente. Una vez finalizado el proceso sobre todas las cilias del stack se devuelven los datos de los largos al usuario. El algoritmo fue evaluado sobre una base de datos de 1200 cilias sintéticas, las cuales fueron generadas simulando el proceso de adquisición. Se calcularon los largos y se compararon con los reales con y sin la curva de extrapolación, los resultados se muestran en la Figura 3. También se efectuó una evaluación sobre un conjunto real de 145 cilias, cuyas proyecciones sobre el plano horizontal fueron medidas por un usuario y consideradas como el largo de las cilias. El algoritmo detectó 96 cilias del conjunto de 145 y 7 falsos positivos, se calcularon las diferencias entre los largos obtenidos con el algoritmo y los aportados por el usuario obteniendo los resultados de la Figura 4. La evaluación cualitativa realizada por los usuarios muestra que el ajuste del esqueleto es adecuado. Una evaluación cuantitativa usando datos simulados produce un error relativo medio inferior al 5% (300 nm). Mientras que usando datos reales se obtuvo una diferencia relativa media respecto al largo medido por usuario de 16.5% (460 nm) por exceso. Esta tendencia es esperable dada las posibles inclinaciones de las cilias en 3D medidas por algoritmo, respecto a sus proyecciones horizontales medidas por usuario. Dada la magnificación usada el error cometido está en el orden de dos píxeles. El valor de dicha diferencia es compatible con la resolución vertical disponible en las imágenes. En resumen, desarrollamos e implementamos un algoritmo como plugin ImageJ/Fiji que mide el largo de cilias primarias. Realizamos además, una primera validación y encontramos que el procedimiento propuesto permite obtener resultados similares a los que obtendría un usuario experimentado. El tiempo de procesamiento es de unos pocos segundos, lo cual permite acelerar y sistematizar la medida de los largos. En

futuras versiones el resultado será devuelto al usuario para validarlo y efectuar manualmente ajustes en las medidas.

**REFERENCIAS**

[1] Bolte S. and Cordelieres F.P., (2006) “A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy”. *Journal of Microscopy*, 224(3):213–232.  
 [2] Arganda-Carreras I., Fernández-González R., Muñoz Barrutia A. and Ortiz-De-Solorzano C., (2010) “3d reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue”. *Microscopy research and technique* 73(11):1019–1029.  
 [3] Polder G., Hovens H.L.E. and Zweers A.L., (2010) “Measuring shoot length of submerged aquatic plants using graph analysis”. In Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference, pages 27–29.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (DCI-ALA/2011/023-502 "Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial"). Los autores agradecen a la plataforma de Microscopía del Institut Pasteur de Montevideo por el uso de las facilidades.



Figura 1: Diagrama de bloques del sistema propuesto.

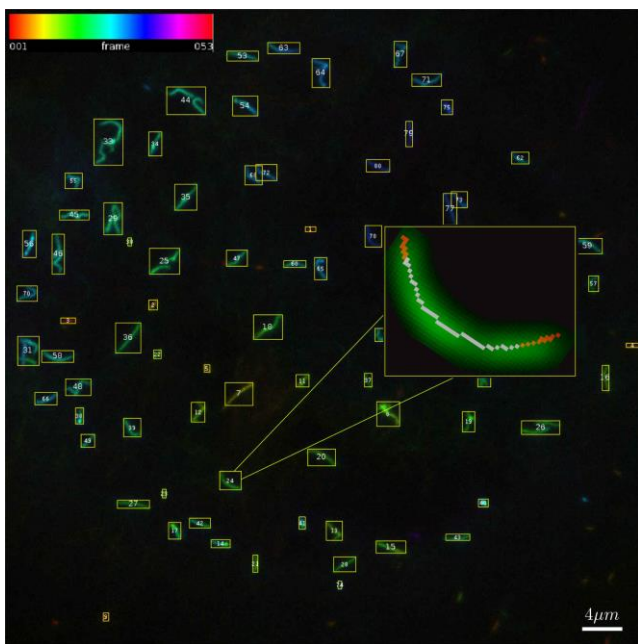


Figura 2: Detección de cilias y ajuste de esqueleto.

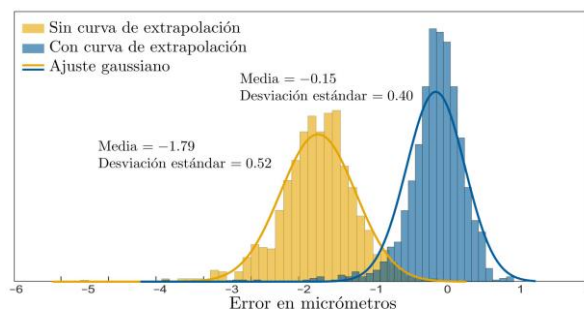


Figura 3: Histograma de errores en micrómetros.

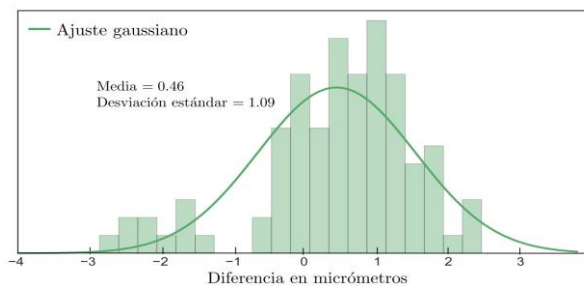


Figura 4: Histograma de diferencia entre largos de algoritmo y usuario.