

Neuro3d: Software de Reconstrucción Tridimensional de Neuronas.

Gregory Randall¹, Alicia Fernandez¹, Omar Trujillo Cenoz², Francisco Malmierca¹, Pablo Morelli¹, Gustavo Apelbaum¹, Marcelo Bertalmío¹, Luis Vázquez¹.

¹ Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

² Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Resumen: Se describe un proyecto de cooperación interdisciplinaria para construir un sistema de reconstrucción tridimensional de neuronas a partir de cortes observados al microscopio electrónico. Se presentan brevemente las partes constitutivas del sistema: adquisición de las imágenes, apareamiento, visualización e interfaz gráfica. Se presentan algunos resultados obtenidos.

1. Introducción

Nos proponemos compartir la experiencia de trabajo conjunto que se desarrolló durante dos años por un equipo de investigadores del Departamento de Neuroanatomía Comparada del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y un equipo de docentes del Instituto de Ingeniería Eléctrica (IIE) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República.

El objetivo fue construir una herramienta que permita potenciar la investigación en biología y abrir líneas de investigación en el campo del tratamiento de imágenes en el IIE. Intentamos también crear equipos multidisciplinarios que permitan encarar este tipo de proyectos desde un punto de vista global, integrando los conocimientos y las percepciones de ambos mundos: la informática y la biología.

El trabajo conjunto entre equipos de disciplinas diferentes plantea el problema de la comunicación: cada área tiene su propio lenguaje especializado. El trabajo continuo permite intercambiar ciertos conceptos. Para profundizar en la solución de este problema, decidimos organizar dos seminarios dirigidos específicamente a transmitir las nociones básicas de cada disciplina.

Ambas experiencias motivaron intercambios muy ricos entre ingenieros y biólogos. El presente artículo presenta los avances actuales del trabajo conjunto.

2. El problema.

En el marco de un proyecto de investigación centrado en la exploración anatómofuncional de los circuitos neurales que operan en el cuerno dorsal espinal

(CD), se busco desarrollar un programa de reconstrucción tridimensional (3D) aplicable a imágenes de microscopía electrónica.

Tal cual ocurre en otras regiones del sistema nervioso central (SNC) el CD está organizado en base a circuitos neuronales en los cuales la posición y geometría de las células nerviosas y de los contactos sinápticos son funcionalmente relevantes. Para estudiar la distribución de esos contactos se han creado a lo largo del tiempo, diferentes técnicas que utilizan como instrumento de análisis el microscopio de luz. Estas técnicas enfrentan las limitaciones inherentes a la resolución que es obtenida a través de la microscopía de luz.

La introducción del microscopio electrónico de transmisión (MET) en el campo de la neurobiología y la optimización de los procedimientos de preservación del SNC han permitido obtener información de suma importancia para comprender la funcionalidad neuronal. Sin embargo, la MET enfrenta a su vez, las limitaciones impuestas por el uso ineludible de rodajas de tejido extremadamente delgadas. En el caso de METs que operan con los voltajes de aceleración habituales (no más de 100Kv) el límite máximo del espesor de cada corte de tejido, compatible con una performance adecuada del MET se ubica en los 1000A. La observación electromicroscópica de cada uno de esos cortes brinda detalles estructurales con un nivel de resolución aproximado a los 75A. Sin embargo, el análisis de cortes aislados hace difícil, sino imposible, recabar datos ciertos sobre la geometría 3D de las estructuras analizadas. Estos datos geométricos son imprescindibles para estudiar la función integradora de las neuronas y sus procesos [Bul65]. Cabe señalar además que la posibilidad de "modelar" las propiedades funcionales de un tipo neuronal cualquiera depende, en gran medida, del preciso conocimiento de los detalles geométricos [Ral77].

Es necesario tener en cuenta por último, que el número de cortes necesarios para abarcar en totalidad el cuerpo de una neurona pequeña (20 micrómetros de diámetro) asciende a no menos de 200.

De modo que a nivel biológico existen procedimientos que permiten obtener y recoger en forma ordenada cortes ultra finos (800-1000 A); también es posible observarlos y registrar las imágenes de microscopía electrónica de los mismos [Sjo67]. A partir de esas secuencias de imágenes es posible generar "objetos modelos" que representan estructuras celulares (en los casos que aquí interesan se trata de prolongaciones neurales y contactos sinápticos). La obtención de estos modelos 3D involucra manipulaciones largas y tediosas:

- Registrar la imagen de microscopía electrónica por medios fotográficos.
- Calcar los elementos significativos de cada corte y recortarlos en algún material apropiado (plástico o madera).
- Construir un modelo tridimensional (maqueta) apilando los cortes.

Los progresos que han tenido lugar en el área de la computación pueden facilitar algunas de estas tareas. El objetivo del proyecto fue la adquisición de las imágenes y la construcción de los modelos tridimensionales por medios computacionales, el manejo de contornos celulares y su integración en imágenes de síntesis con apariencia 3D, visualizables en la pantalla. Finalmente la realización de medidas morfométricas sobre el modelo reconstruido.

3. Antecedentes.

En años recientes, con la difusión de máquinas poderosas, con gran capacidad gráfica y de memoria, y con el desarrollo acelerado de las técnicas de síntesis de imágenes,

han proliferado las aplicaciones del tratamiento de imágenes a la medicina y ciencias afines. Existen numerosos equipos que trabajan en la reconstrucción 3D y la visualización macroscópica de objetos anatómicos con fines de investigación y/u objetivos clínicos.

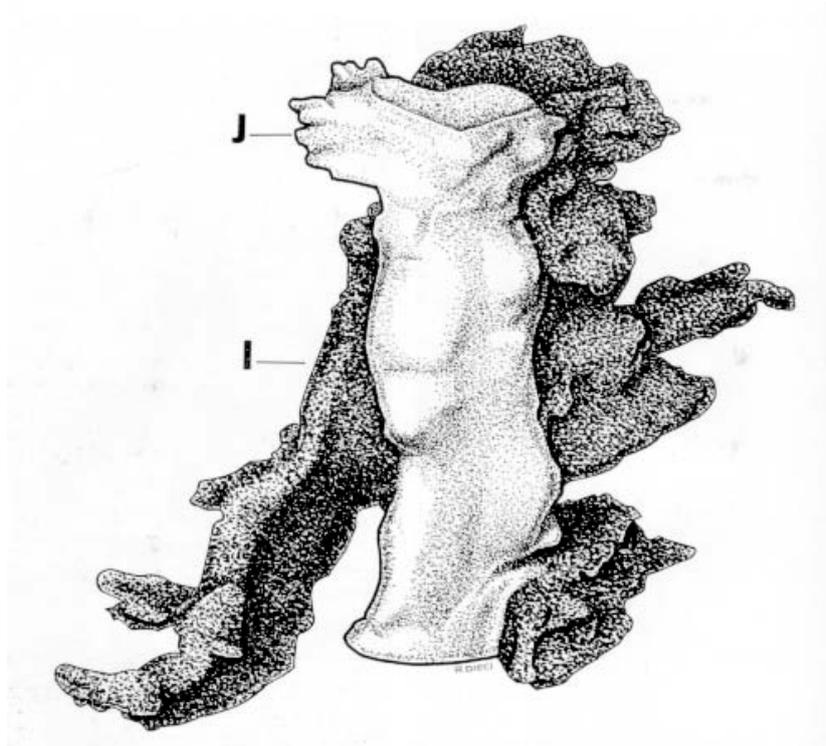


Fig. 1: Foto de una maqueta construida por el método tradicional mostrando dos fibras neuronales. Tomado de [Tru69].

Los equipos EPIDAURE y PRISME, del INRIA, Francia, trabajan en la interpretación automática de imágenes tridimensionales de origen variado: tomógrafos, resonancia magnética, ecógrafos, etc. Sus objetivos incluyen la presentación de verdaderas imágenes 3D y la construcción de un atlas anatómico informatizado del cerebro [Aya91]. Varios equipos de investigación trabajan en temas similares o relacionados en diversos países. Los grupos de D. Terzopoulos en la Universidad de Toronto [Car94] y de M. Ross en el NASA Ames Research Center [Ro1,Ke1,Ke2] han trabajado en el mismo problema que nos ocupa. Nuestro trabajo utiliza metodologías similares a las utilizadas por estos grupos, con la salvedad de que ellos cuentan con máquinas mucho más potentes que nosotros.

En muchos casos los datos se originan en sensores que generan directamente información tridimensional, o donde la posición relativa entre los cortes se conoce con gran precisión. En ocasiones se utilizan técnicas de filtrado para la detección de atributos directamente en el espacio 3D lo cual da resultados mucho más robustos [Mon89]. En algunas aplicaciones se llega a mostrar la imagen en movimiento, como en los trabajos de I. Herlin sobre datos ecográficos [Her90].

4. Metodología.

Es importante resumir el procedimiento experimental para pasar a analizar las mejoras que en cada etapa a aportado este trabajo conjunto:

1. En algún sector del SNC se registra la actividad de una neurona y eventualmente

- se la marca a través de la inyección de una materia colorante.
2. Una porción de tejido nervioso (TN) fijado es extraído del animal. Posteriormente el TN es deshidratado y embebido con una resina plástica que lo endurece. Notemos que en éste proceso el tejido sufre una deformación. Al finalizar esta etapa se tiene un bloque de resina sólida.
 3. El tejido endurecido es cortado en secciones muy finas (800 a 1000 A). En este proceso nuevamente se producen deformaciones mecánicas. Los cortes seriados son colectados y colocados en soportes.
 4. Los cortes son observados al microscopio electrónico y la imagen es capturada por medios fotográficos.
 5. Un biólogo experimentado detecta y transfiere al material adecuado los límites de la neurona y/o sus procesos.
 6. Se superponen los cortes para construir la maqueta.
 7. Si es necesario, se realizan mediciones sobre el modelo a escala.

Los primeros 4 puntos corresponden a la preparación del material y la adquisición de las imágenes, los 3 últimos conciernen al tratamiento que se efectúa sobre ellas. Se propone informatizar y automatizar los 4 últimos ítems.

5. Adquisición.

El primer paso a resolver, y del que dependen en gran medida los resultados posteriores, es la adquisición de las imágenes. Existen tres formas de observar la muestra:

1. Obtener una fotografía.
2. Utilizar un dispositivo de digitalización especial, que se introduce dentro del MET y convierte la imagen electrónica en imagen digital.
3. Adquirir la imagen con una cámara CCD a través del visor utilizado para la observación de la imagen en pantalla.

Una exigencia básica para desarrollar el proyecto fue lograr resultados correctos con los medios técnicos de que disponemos. No existían las condiciones económicas para comprar los equipos más sofisticados como un AccuView.

Se trató de sacar provecho de las instalaciones disponibles, en el caso que nos ocupa se trata de un MET instalado en 1985, en buenas condiciones pero que no tiene la capacidad de obtener imágenes digitalizadas de forma integrada.

El procedimiento fotográfico tiene la ventaja de su elevada resolución (fig. 3) pero varias desventajas para su tratamiento informático:

1. Se hace necesario digitalizar la foto con un scanner. De este modo se adicionan el ruido de la digitalización y el fotográfico.
2. El procedimiento fotográfico es largo y costoso (revelado, químicas, etc.).
3. La buena calidad fotográfica va unida a tamaños de archivos relativamente grandes, lo que hace pesado su tratamiento. Por otro lado, a los efectos de apilar los cortes y detectar los objetos de interés, los detalles inútiles se comportan como ruido: se trata de obtener una imagen con la información suficiente.

Para mejorar esta etapa se construyó una plataforma de adquisición directa a través del visor que muestra la pantalla del MET. Esta plataforma está formada de los siguientes elementos:

- Una cámara CCD. Montada sobre el binocular utilizado para ajustar el foco a través del visor. La figura 2 muestra la disposición de la cámara respecto al MET.

- Una PC con una tarjeta de adquisición TARGA 32+.
- Un software para controlar la tarjeta de adquisición con una interfaz gráfica que permite adquirir secuencias de imágenes. Para facilitar la adquisición incluye:
 - Realiza un promedio en tiempo de adquisición de varias imágenes para eliminar el ruido aditivo no correlacionado que proviene de pequeñas fluctuaciones en el haz electrónico del MET.
 - Permite señalar la zona de interés que se quiere adquirir (ROI).
 - Muestra en tiempo real un histograma de la ROI, lo que permite ajustar los controles externos de modo de maximizar el número de niveles de gris de la señal adquirida.

El método de adquisición directa introduce ciertas perturbaciones que es preciso compensar [Ra96]. La figura 3 muestra una imagen capturada con la plataforma de adquisición directa y la figura 4 la misma imagen luego de compensadas ciertas perturbaciones (iluminación no uniforme, ruido de adquisición, presencia del punto de enfoque).

La posibilidad de evitar el procedimiento fotográfico reduce considerablemente el tiempo de adquisición de una secuencia de cortes. Esto aumenta de modo significativo las posibilidades de estudiar un número mayor de neuronas. Las imágenes adquiridas por el procedimiento directo tienen la ventaja de ser más pequeñas lo que disminuye la carga de los algoritmos posteriores de reconstrucción 3D. Estas imágenes son también más pobres, pero contienen en general información suficiente para realizar la reconstrucción. El objetivo de éste proyecto es la reconstrucción tridimensional y la detección de la membrana exterior, lo cual es posible con las imágenes de adquisición directa. Una posible proyección futura del proyecto es la fusión de estas imágenes con las obtenidas por medios fotográficos, de modo de enriquecer el modelo.

6. Calibración.

Se hace necesario desarrollar un sistema de calibración que permita corregir varias fuentes de error presentes en el sistema:

1. Las deformaciones producidas por la óptica, entendiéndose como tal el conjunto de lentes y aditamentos que se interponen entre la imagen formada en la placa de fósforo y la retina de la cámara: vidrio plomado resistente al alto vacío, binoculares de puesta a punto, lente de la cámara, paralelismo entre estos diversos elementos ópticos.
2. La no homogeneidad en la sensibilidad del CCD: respuestas diferentes de las celdas a un mismo nivel de iluminación y otras no linealidades del CCD.

Por otro lado es necesario también calcular la relación entre el tamaño de un pixel del CCD y las dimensiones reales de un objeto observado.

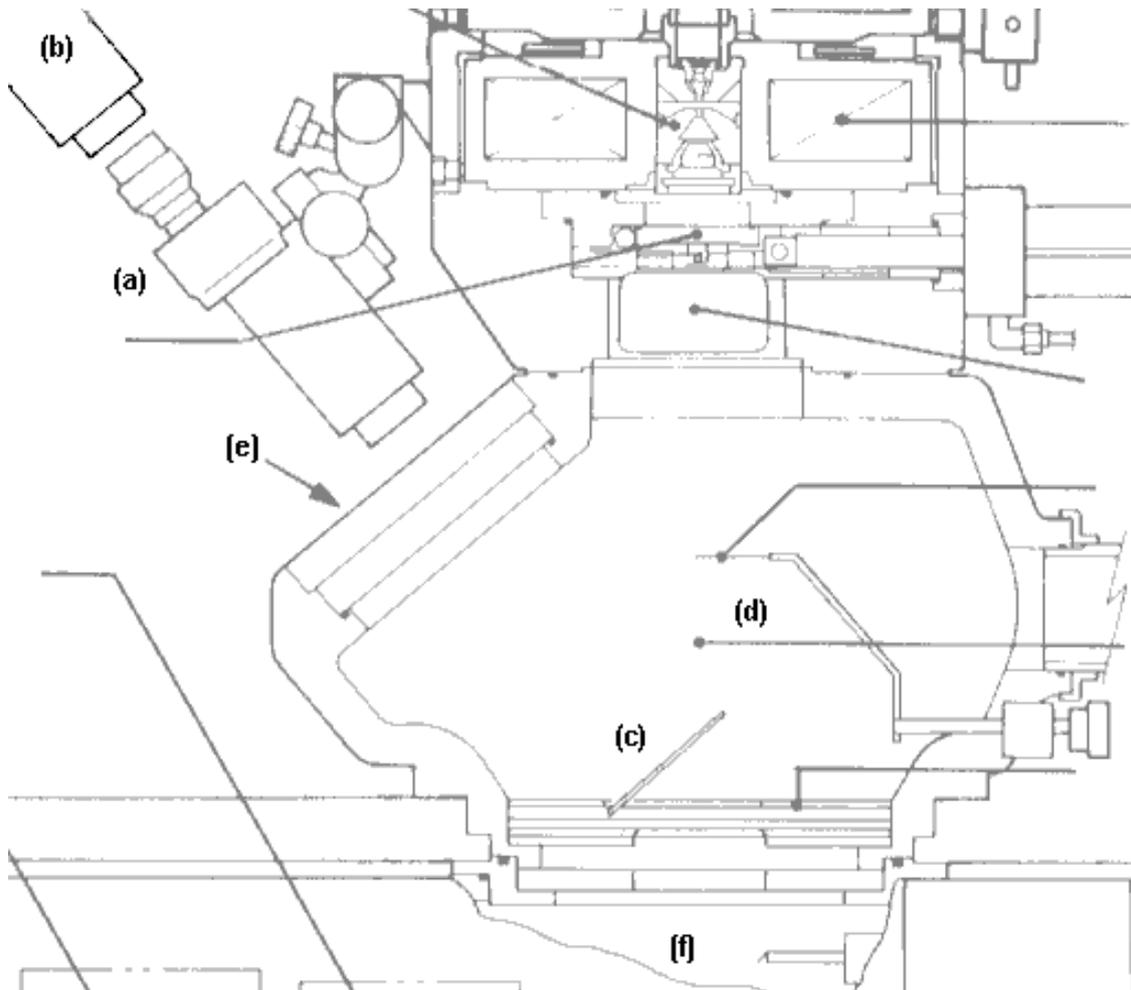


Fig. 2. Esquema de parte del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). Se pueden apreciar: **a)** Binoculares utilizados para el enfoque, **b)** Posición de la cámara CCD para la adquisición directa, **c)** Plaqueta con fósforo electroluminiscente sobre la que se proyecta la imagen, **d)** Zona de paso del haz de electrones, **e)** Vidrio grueso, **f)** Cámara fotográfica.

La calibración del sistema está basada en la observación de objetos de formas conocidas y valores de iluminación homogéneos (miras de calibración), con el fin de encontrar parámetros que corrijan las deformaciones.

Un problema complejo es la obtención de miras de calibración que puedan ser observadas en el MET: es difícil obtener una textura regular y de dimensiones conocidas al nivel de magnificación al que se trabaja. Para magnificaciones menores de 400 se puede utilizar una grilla standard de cobre (mesh) con rejilla de tamaño conocido. Para magnificaciones mayores podría utilizarse un coloide de oro con un tamaño calculable de las partículas.

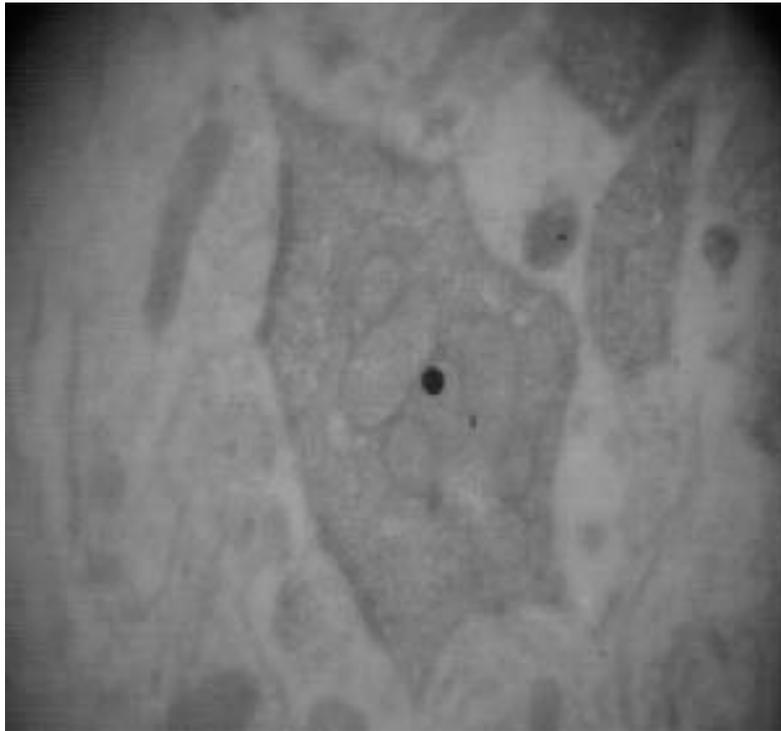


Fig. 3. Imagen obtenida con el método de adquisición directa, promediando 4 imágenes y controlando la iluminación con ayuda del histograma en tiempo real.

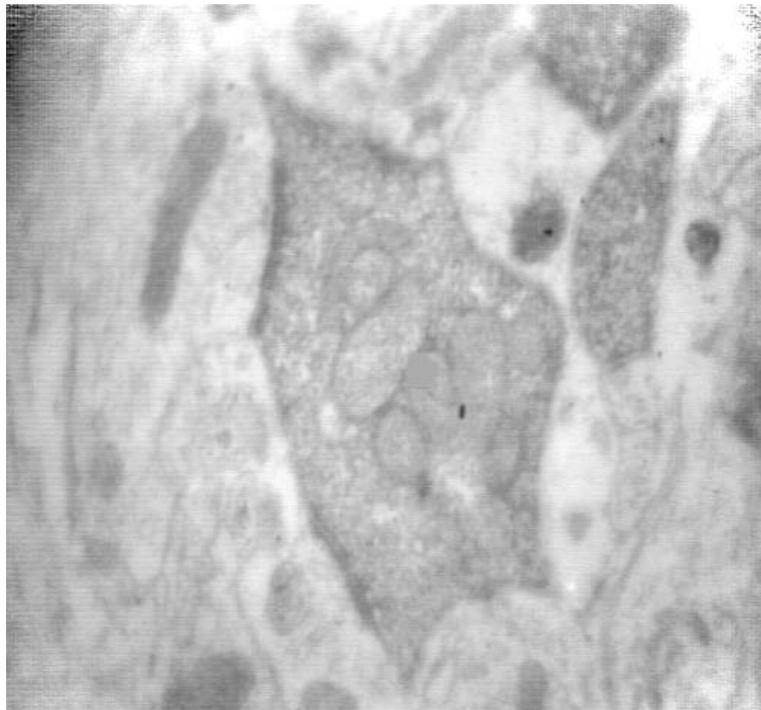


Fig. 4. La imagen de la fig. 3 con corrección de la iluminación no uniforme y del punto de enfoque.

7. La interfaz gráfica.

La reconstrucción del modelo de una neurona pequeña implica el apilamiento de un número elevado de cortes y por consiguiente un volumen muy importante de datos a tratar. Si se consideran los desarrollos potenciales futuros del proyecto, se observa que todos aumentarán significativamente la cantidad de datos a manejar: combinar varias neuronas para estudios comparativos o para fusión de datos, estudiar más de una neurona interconectada, fusionar datos diversos sobre la trama visual (registros eléctricos, químicos o de otra índole efectuados sobre el tejido). Un volumen de datos tan importante impone la utilización de una estación de trabajo potente.

Por razones de precio y performance se optó por utilizar una estación Alpha DEC con sistema operativo OSF 1 y desarrollar la interfaz gráfica (GUI) bajo MOTIF, lo cual permitirá su utilización en otras plataformas UNIX.

En un proyecto de esta naturaleza es fundamental contar con una interfaz hombre-máquina muy amistosa que permita al usuario, usualmente un biólogo extremadamente especializado, explotar todas las posibilidades del sistema y sentirse cómodo al utilizarlo.

Las características principales de la GUI que se construye son:

- Todas las funciones (apareamiento, detección de atributos, etc.) pueden ser efectuadas en forma manual, reproduciendo los métodos corrientemente utilizados por los biólogos, o bien de forma automática, a través de botones que llaman a algoritmos de tratamiento de imágenes que son parte importante del trabajo de investigación de este proyecto.
- Los modos de acción manual y automático están integrados en forma flexible en todas las etapas del proceso. Esto permite al usuario recurrir a uno u otro indistintamente y eventualmente corregir el funcionamiento automático y relanzar sólo parte del proceso a partir de las nuevas condiciones.

8. La detección de atributos.

La detección de los elementos significativos en las imágenes es una tarea difícil dada la presencia de otros elementos comparables pero no significativos a los fines del estudio biológico que se quiere realizar. La figura 4 muestra un ejemplo de dos cortes de una misma serie y la detección y correspondencia de los bordes significativos a los fines biológicos.

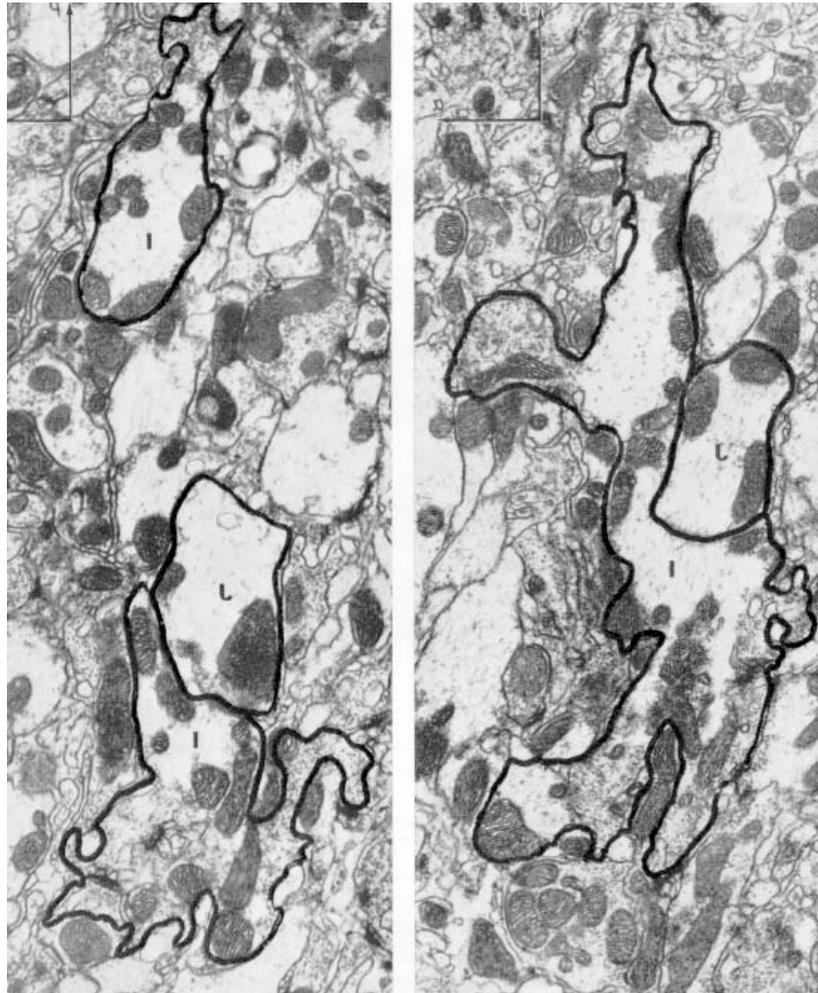


Fig. 4. Fotografías de microscopía electrónica de los cortes 99 y 119 de la serie cuya reconstrucción se muestra en la figura 1. Los bordes exteriores de las fibras fueron marcadas por un especialista. Nótese la dificultad para determinar la especificidad de los bordes a detectar respecto al conjunto de los datos. Tomado de [Tru69].

Para resolver este problema en cada corte (2D) el programa implementa una detección manual. Una herramienta en la GUI permite al utilizador marcar los pixeles de interés. Este método es el utilizado hoy por los biólogos (con un marcador). El método implementado permite también la interpolación de una curva a partir de algunos puntos principales marcados por el usuario. Con esta técnica fueron registrados los procesos que permitieron realizar la reconstrucción que se muestra en la figura 5.

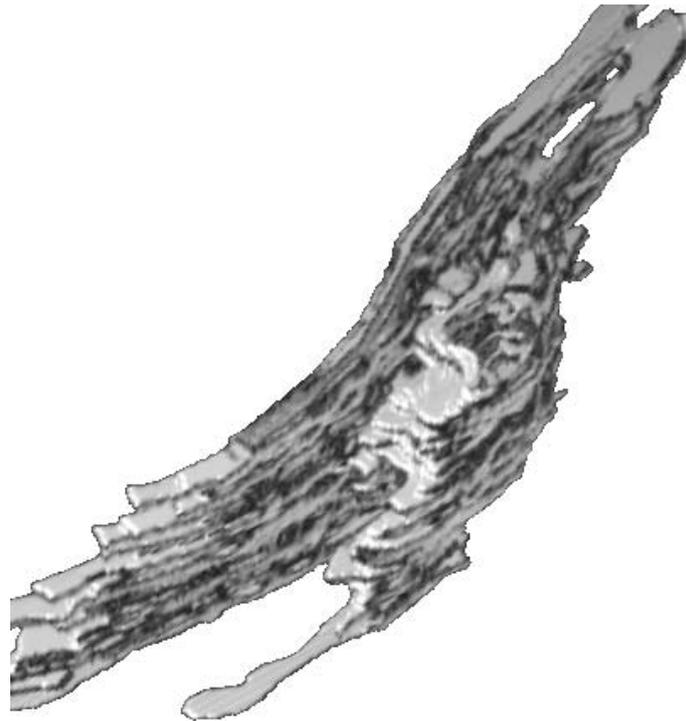


Fig. 5: Imagen de una sinapsis soma-dendrítica reconstruida a partir de 26 cortes, con detección manual de bordes y apareamiento automático. Para la visualización se utilizó la biblioteca Volpack.

9. El apareamiento de cortes.

Llamemos Im_n al corte n y T_n^{n+1} a la matriz 3x3 que da cuenta de la posición y orientación relativas entre las imágenes correspondientes al corte Im_n y al corte Im_{n+1} . El apareamiento consiste en encontrar las matrices T_n^{n+1} que relacionan los n cortes de una secuencia.

En numerosos trabajos de reconstrucción de objetos tridimensionales a partir de cortes, el apareamiento se obtiene en el procedimiento experimental: el objeto es fijado mecánicamente para ser observado y las posiciones y orientaciones relativas de los cortes son conocidas. Las técnicas de RMN y tomografía computada son ejemplos de estos procedimientos.

En el caso que nos ocupa, la posición y orientación relativas entre cortes sucesivos son desconocidas debido al procedimiento experimental: los cortes son tan finos que deben ser trasladados en un medio líquido. Por otro lado, el detalle observado es una pequeña fracción del corte, cuya posición precisa sólo se determina una vez que está siendo observada en el TEM.

Se restringe el problema del apareamiento a encontrar un movimiento (rotación mas traslación) que de correspondencia a dos cortes sucesivos.

Para resolver el problema del apareamiento se implementaron dos técnicas:

1. Apareamiento manual.

2. Apareamiento automatico

9.1 *Apareamiento manual.*

La interfaz gráfica permite visualizar algún atributo de un corte, por ejemplo los bordes marcados por el experto, produciendo una imagen con los pixeles pertenecientes a los atributos detectados en un color y el resto de los pixeles transparentes. A continuación el operador puede atrapar con el ratón esta representación del corte $n+1$ y posicionarla manualmente sobre la imagen en nivel de gris del corte n . Este método permitirá también corregir los errores producidos por un apareamiento automático.

Es fundamental contar con un modo interactivo: la diversidad de tipos de imágenes a tratar es muy grande y la experiencia acumulada por los biólogos muy importante. Un método interactivo permite corregir los errores que ineludiblemente el sistema cometerá y aprovechar el conocimiento acumulado por los utilizadores.

9.2 *Apareamiento automatico*

Se trabaja con la hipótesis de que dos cortes sucesivos son relativamente similares y que en consecuencia debe ser posible encontrar un movimiento entre ambos tal que se superpongan correctamente. Se observa que esta hipótesis es falsa muchas veces. La correlación es en general una medida robusta que da cuenta de la similitud global de dos imágenes. Si se calcula el coeficiente de correlación para todas las posibles posiciones y orientaciones relativas entre ambas imágenes, el valor máximo permite determinar la matriz T_n^{n+1} . Este método presenta una desventaja fundamentales:

Es muy costoso en tiempo de cálculo. Se calcula el coeficiente de correlación para cada posición relativa y se guarda la posición para la que éste coeficiente es máximo. El espesor de un corte es del orden de magnitud de los detalles observados lo que debilita la hipótesis de similaridad entre imágenes sucesivas. Por otro lado las condiciones de adquisición entre un corte y el próximo varían ligeramente. Estas realidades pueden hacer fracasar el apareamiento automático por correlación. Se intentaron diversos algoritmos para preprocesar las imágenes a fin de mejorar los resultados de la correlación. Los mejores resultados se obtuvieron pasando un operador de máxima entropía local y correlando las imágenes resultantes. Pensamos que esto puede explicarse, entre otras razones, por la presencia de una cantidad de procesos vecinos al proceso de interés que varían poco de un corte a otro. Esta "textura" es maximizada por la entropía local. Por otro lado, un procesamiento de este tipo tiende a eliminar el efecto de la iluminación que varía de una adquisición a otra.

Para acelerar los cálculos se trabajó en multiresolución. El costo en tiempo de cálculo del algoritmo es proporcional al cuadrado de la dimensión de las imágenes, esto significa que cada paso de la multiresolución es 16 veces más rápido respecto a la anterior. Se trata entonces de encontrar el máximo de la correlación entre los cortes en baja resolución. Ir a una resolución mayor y encontrar nuevamente el máximo de la correlación pero esta vez limitando el campo de la búsqueda a un entorno del máximo obtenido en la resolución precedente. De este modo se afina la búsqueda del máximo global economizando un tiempo importante.

10. *Visualización 3D y morfometría.*

Conocidas las matrices de pasaje entre los cortes es posible apilarlos y reconstruir en

3 dimensiones el objeto observado, ya sea en nivel de gris, una nube de puntos 3D cuyas intensidades corresponden a las de las imágenes adquiridas; o visualizando los atributos marcados por el utilizador (bordes de interés en cada corte). A continuación es posible utilizar un software de visualización tridimensional para observarlo desde diferentes ángulos, realizar cortes y medidas. A estos efectos se utilizó la biblioteca VOLPACK desarrollada por la Universidad de Standford y escrita en C, compatible con la biblioteca desarrollada en el IIE lo que permite integrar todo en un solo paquete.

11. Conclusiones y perspectivas.

La utilización de técnicas informáticas en el estudio morfométrico del tejido neuronal facilita de manera significativa el trabajo de los biólogos y abre nuevas posibilidades de investigación. El tiempo de construcción de un modelo se reduce dramáticamente lo que permite proponerse metas más ambiciosas tanto en cuanto al número de modelos a construir como en la complejidad del estudio. En este sentido aparecen varias líneas posibles de desarrollo futuro, cada una con niveles de complejidad e interés diferentes:

- Aplicar técnicas de contornos deformables para encontrar los bordes de interés de un corte a partir de el corte anterior.
- Fusionar imágenes adquiridas de modo directo con las obtenidas por medios fotográficos. Esto permitiría construir el modelo con las imágenes de adquisición directa: más pobres pero más fácilmente manejables, y enriquecer el modelo con los detalles de las imágenes fotográficas en caso de ser una experiencia que lo amerite.
- Construir una base de datos capaz de integrar la observación de una neurona o de partes de ella a diferentes niveles de magnificación. Un proyecto de esta naturaleza permitiría subsanar los errores que pueden aparecer en el proceso de reconstrucción 3D por falta de información global. En efecto, el apareamiento basado en la información local aportada por 2 o 3 cortes no da cuenta de ciertas formas que sólo se perciben observando el objeto completo a un nivel de magnificación menor [Rus94]. Esta base de datos podría ser enriquecida con elementos sintéticos y eventualmente servir como soporte para la simulación de modelos.
- Fusionar diferentes tipos de datos sobre el modelo reconstruido. Hoy se trabaja sobre la construcción de modelos visuales y la realización de medidas morfométricas. Se trata de integrar sobre la trama 3D reconstruida un conjunto de otros registros realizados sobre el tejido: potenciales eléctricos, composiciones químicas, etc. Esta línea de trabajo implica imaginar un procedimiento experimental que permita relacionar de manera precisa los sistemas de referencia utilizados para la realización de cada serie de medidas. Hay que señalar que algunas mediciones se realizan en el tejido antes de ser cortado, e inclusive en algunos casos en el tejido aun vivo.
- Fusionar los modelos de varias neuronas y estudiar su interrelación.

12. Referencias bibliográficas

[Bul65] **Bullock, T.H.** (1965) Mechanisms of integration. En: Structure and function of the nervous Systems of Invertebrates. T.H. Bullock y A. Horridge. Freeman, San Francisco. pp 254-331

[Ral77] **Rall, W.** (1977) Core conductor theory and cable properties of neurons. En: Handbook of Physiology; Section 1: The Nervous System. Edts. Brookhart,

- Mountcastle. American Physiological Society. Maryland pp. 39-97
- [Sjo67] **Sjostrand, F.**(1967) Electron Microscopy of Cells and Tissues. Academic Press, New York & London.
- [Mon89] **O. Monga, R. Deriche, G. Malandain y J. P. Cocquerez.** (1989) Recursive filtering and edge closing: two primary tools for 3D edge detection. Rapport de Recherche INRIA No 1103.
- [Her90] **I. Herlin, N. Ayache y R. Vojak** (1990) Spatio-temporal edge detection in ultrasound images. Technical report, INRIA.
- [Tru69] **Trujillo-Cenóz.** (1969) Some aspects of the Structural Organization of the Medulla in Muscoid Flies. J. Ultrastruc. Res. **27**: 533-553.
- [Tru86] **Trujillo-Cenóz O., Echague J.A., Bertolotto C., Lorenzo D.** (1986) Some aspects of the Structural Organization of the spinal cord of *Gymnotus carapo* (Teleostei, Gymnotiformes). I. The Electromotor Neurons. J. Ultrastruc. Res. **97**: 130-143
- [Tru90] **Trujillo-Cenóz O., Bertolotto C.** (1990) Mauthner cells in the medulla of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. Experientia, **46**: 441-443.
- [Aya91] **Ayache N., Boissonat J.D.** (1991) Vers l'interpretation automatique des images tridimensionnelles. Bull. de liaison de la recherche en informatique et en automatique. No.132:2-11.
- [Der90] **Deriche, R.** (1990) Fast algorithms for low level vision. IEEE transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence. **12**[Bul65]:78-87.
- [Coh94] **Isaac Cohen y Laurent Cohen.** (1994) A hybrid Hyperquadratic Model for 2D and 3D Data fitting. Rapport de Recherche No. 2188. INRIA.
- [Gag83] **Gagalowicz, A.** (1983) Vers un modele de textures. Tesis de Doctorado. Univers. de Paris 6.
- [Ber94] **Olaf Bergenguren.** Comunicación personal.
- [Rus95] **Jhon C. Russ.** (1995) The Image Processing Handbook. CRC Press.
- [Gon87] **Rafael C. Gonzales y Paul Wintz.** (1987) Digital Image Processing. Addison Wesley.
- [Har92] **Robert M. Haralick y Linda G. Shapiro.** (1992) Computer and Robot Vision. Addison Wesley.
- [Jor94] **Ramiro Jordan y Roberto de Alencar Lotufo.** (1994) Digital Image Processing with Khoros 2.0. Khoral Research Inc.
- [Car94] **I. Carlbom, D. Terzopoulos y K. M. Harris.** Computer-Assisted Registration, Segmentation and 3D Reconstruction from Images of Neural Tissue Sections. IEEE Transactions on Medical Imaging, Vol 13, N0. 2, June 1994.
- [Ro1] **M. D. Ross, K. Montgomery, R. Cheng, D. G. Doshay, S. W. Linton y B. R. Parnas.** High Performance Computing Applications in Neurobiological research. Artículo bajado por INTERNET. Biocomputation Center Home Page, 1995.
- [Ron94] **R. Ronfard** Region -Based strategies for Active Contour Models. International Journal of Computer Vision, Vol 13:2, 1994
- [Ke1] **K. Montgomery y M. D. Ross.** A Method for Semiautomated Serial Section Reconstruction and Visualization of Neural Tissue from TEM Images. Abstract bajado por INTERNET. Biocomputation Center Home Page, 1995.
- [Ke2] **K. Montgomery y M. D. Ross.** Improvements in Semiautomated Serial Section Reconstruction and Visualization of Neural Tissue from TEM Images. Abstract bajado por INTERNET. Biocomputation Center Home Page, 1995.
- [Ra96] **G. Randall, A. Fernandez, G. Appelbaum, M. Bertalmío, L. Vázquez,**

F. Malmierca, P. Morelli. Mejoramiento de imágenes de microscopía electrónica para reconstrucción tridimensional de neuronas. Artículo presentado a las VI jornadas de Informática en el Uruguay, IEEE, Montevideo 1996.

[Lai94.] **Kok Fung Lai.** Deformable contours: modeling, extracting, detection and classification. University of Wisconsin-Madison.