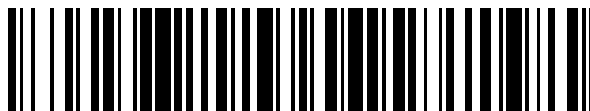


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 490**

21 Número de solicitud: 201330231

51 Int. Cl.:

G06T 17/20 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

20.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.09.2014

Fecha de la concesión:

16.02.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

23.02.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070124

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (80.0%)
C/ TULIPAN S/N
28933 MOSTOLES (Madrid) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (20.0%)**

72 Inventor/es:

**MATA FERNANDEZ, Susana;
BRITO MENENDEZ, Juan Pedro;
BAYONA BERISO, Sofia;
PASTOR PEREZ, Luis;
BENAVIDES PICCIONE, Ruth y
DE FELIPE OROQUIETA, Javier**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **MÉTODO PARA LA GENERACIÓN DE MODELOS REALISTAS EN TRES DIMENSIONES DE CÉLULAS NEURONALES**

57 Resumen:

Esta invención presenta un método para la generación de modelos tridimensionales de células neuronales partiendo de la información morfológica incompleta extraída mediante métodos de muestreo estándar. Los modelos generados incluyen un soma realista, árboles dendríticos y axonales, y espinas dendríticas, pudiendo ser generados a diferentes niveles de resolución. La invención propone una técnica innovadora que permite obtener una forma realista del soma partiendo de una definición simple del mismo (tal como centro y radio) que resulta incompleta para reconstruir la forma 3D original. El método propuesto se basa en la deformación de una forma inicial, guiada por restricciones establecidas de acuerdo a las propiedades morfológicas de los árboles dendríticos y axonales (por ejemplo: posición y grosor de las dendritas de primer orden). La distribución de un conjunto de espinas a lo largo de las dendritas completa el modelo, generando un modelo tridimensional adecuado para su visualización en una amplia gama de entornos 3D.

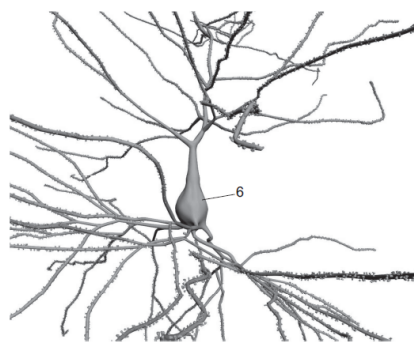


Fig. 15

ES 2 498 490 B2

Método para la generación de modelos realistas en tres dimensiones de células neuronales

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de la reconstrucción de las células neuronales. Más específicamente se refiere a la generación de mallas poligonales 3D que aproximan la forma del soma y la de los árboles dendríticos y axonales, utilizando como punto de partida datos morfológicos incompletos obtenidos de la célula.

10

Estado de la técnica

Se han realizado importantes contribuciones en el campo de la utilización de enfoques de visualización para sistemas complejos, aplicándose con éxito para el diseño y el análisis de una variedad de sistemas complejos, utilizando la capacidad del sistema visual humano para extraer información de escenarios visuales. En particular, la visualización analítica o la visualización de datos son campos de investigación activos y extremadamente multidisciplinarios cuyo objetivo es proporcionar representaciones gráficas de los datos para mejorar la comprensión del fenómeno observado. De hecho, los beneficios de la incorporación de enfoques basados en la visualización para el análisis de sistemas complejos ya son evidentes en la investigación neurocientífica. Por ejemplo, recientemente se ha desarrollado un método basado en la aplicación de transformaciones de enderezamiento y desenrollamiento para transformar la estructura original de las inserciones de las espinas en las dendritas de células piramidales a una disposición desenrollada plana (Morales, J., Benavides-Piccione, R., Rodriguez, A., Pastor, L., Yuste, R., & Defelipe, J. (2012). "Three-dimensional analysis of spiny dendrites using straightening and unrolling transforms". *Neuroinformatics*, doi: 10.1007/s12021-012-9153-2),, permitiendo una nueva forma de comprender la organización y los patrones de distribución de estas células.

20

30

La reconstrucción de células neuronales ha evolucionado desde las imágenes dibujadas a mano (basadas en las técnicas tradicionales de imagen microscópica con cámara lúcida) a las actuales morfologías tridimensionales digitalizadas extraídas mediante aplicaciones de trazado asistido por ordenador. Estas reconstrucciones se

35

han utilizado para medir los parámetros geométricos de árboles neuronales reales y simular morfologías de neuronas virtuales (López, PL, Bielza C, Larrañaga P, Benavides-Piccione R, DeFelipe J (2011) "Models and simulation of 3D neuronal dendritic trees using Bayesian networks." *Neuroinformatics* 9:347-369). La información morfológica extraída con estas aplicaciones típicamente está compuesta de un determinado número de puntos conectados entre sí que trazan el esqueleto de la neurona, capturando la forma y las trayectorias tanto de las dendritas como del axón en tres dimensiones, lo que permite el estudio de diversos parámetros morfológicos como las características de las dendritas/axón y el soma. No obstante, en el caso concreto de la forma del soma (el cuerpo de la neurona), la información de partida consiste a menudo en un grupo de puntos que delimitan su contorno en 2D. Estudios previos no consideran la forma del soma o, en el mejor de los casos, representan el soma con una esfera, lo que no necesariamente coincide con la morfología real. En la actualidad, la única alternativa para obtener una representación más precisa de la forma real del soma es su reconstrucción a partir de las imágenes seriadas de microscopía confocal. Para poder reconstruir la morfología real, este conjunto de imágenes deben ser procesados con determinados "softwares" muy costosos no disponibles en la gran mayoría de los laboratorios..

Además, en la actualidad no hay ningún método disponible para la reconstrucción de la forma del soma que proporcione una representación 3D del mismo cuando la información de partida es incompleta. Esta es la manera mas generalizada de reconstrucción de neuronas actualmente en la comunidad científica. Dicha información incompleta sobre el soma, a menudo consiste, como mencionábamos anteriormente, en puntos del contorno 2D del soma, o incluso la definición de un punto central (representando el centro del soma) y un radio. En la actualidad no hay información suficiente para reconstruir la forma original en 3D a partir de estos archivos.

La presente invención simula la deformación que se produciría sobre una forma inicial, en nuestro caso una esfera, si las dendritas que parten del soma tiraran de ella. Dicha deformación se propaga, hasta que el soma alcanza su forma final, utilizando una técnica de deformación como la de masa-muelle. La simulación es abordada como un problema de minimización de energía, ya que una superficie asumirá una deformación que minimice la energía total de deformación (Terzopoulos et al. 1987). La técnica

aquí descrita puede también ser utilizada por los laboratorios que definen el soma proporcionando únicamente el centro y su radio.

Problema técnico a resolver

5 La presente invención resuelve el problema técnico de generar una representación tridimensional de la forma de una célula, a partir de los datos incompletos de su morfología, extraídos mediante aplicaciones de trazado comúnmente utilizadas en la comunidad científica. Para ello se aplica una nueva técnica que aproxima la forma de la célula a través de mallas poligonales 3D, a partir de dicha información morfológica
10 incompleta. En particular, la presente técnica utiliza el sistema de deformación masa-muelle ya que es uno de los modelos de deformación más sencillos. De forma complementaria también genera mallas de alta calidad de los árboles dendríticos y axonales, incluyendo también reconstrucciones detalladas de las espinas dendríticas. Esta técnica crea y conecta los elementos de forma suave, para una mejor
15 visualización, y permite la aplicación de algoritmos gráficos tanto estándar como avanzados de mapeo de estructuras, sombreado o procesamiento de geometría. Además, la invención permite la obtención de mallas 3D a diferentes niveles de resolución, posibilitando así el tener modelos apropiados para técnicas de visualización con multirresolución.

20

Una ventaja adicional de este método es la posibilidad de reconstruir los modelos 3D de todas las células neuronales almacenadas en diferentes bases de datos actuales, que contienen información incompleta de la forma tridimensional del soma, para obtener una representación mucho más realista.

25

Descripción de la invención

Esta invención presenta un método para generar modelos de células neuronales en tres dimensiones a partir de la información morfológica extraída por métodos de muestreo. Típicamente este muestreo proporciona un conjunto de puntos 3D
30 conectados (con sus posiciones y radios asociados) que representan el esqueleto de la neurona. Este esqueleto puede ser procesado posteriormente para obtener características relevantes de su morfología, tales como la longitud de las dendritas, el número de bifurcaciones, número de terminaciones, etc. La malla poligonal en 3D que aproxima la membrana celular se puede generar con diferentes grados de resolución,
35 manteniendo un compromiso entre la complejidad y la calidad final del modelo. La

principal contribución de la presente invención es proponer una aproximación novedosa para generar modelos en 3D del soma con una morfología realista a partir de los datos incompletos de la estructura morfológica descrita anteriormente. Esta técnica se basa en la deformación, de una forma inicial, en función de características de los árboles dendríticos/axonal, como por ejemplo la posición y el grosor de las dendritas de primer orden (las dendritas que parten directamente del soma). El modelo se completa con la generación de árboles axonales y dendríticos continuos y la inclusión opcional de las espinas en las dendritas, generando así un modelo neuronal 3D completo que permite su visualización en un amplio rango de entornos 3D.

5
10

El método para la generación de modelos neuronales realistas en 3D a partir de los datos morfológicos incompletos de la célula comprende 3 etapas:

1.- Construcción del soma: esta etapa obtiene una forma 3D muy aproximada a la forma real del soma, partiendo de una descripción incompleta: el contorno 2D del soma (3A) o la posición del centro y el radio del soma. Esta etapa conlleva los siguientes pasos:

1.a.- Construir una forma inicial simple a partir de los datos incompletos.

Esta forma simple puede obtenerse de diferentes maneras; una opción es generar una esfera que contenga completamente el soma (3B) y reducirla de acuerdo con un parámetro establecido (3C). En una realización preferente, esta reducción puede estar comprendida entre un 10% y un 30%. La esfera es representada como una malla poligonal.

1.b.- Seleccionar el mecanismo de deformación que se aplicará a la forma inicial.

En una realización preferente de este método se ha empleado el modelo masa-muelle. Este modelo crea una estructura de muelles en las aristas de los triángulos de la esfera reducida (4A) y otro grupo de muelles internos unidos al centro de la esfera.

La esfera reducida puede ahora ser modelada como una serie de puntos de masa conectados a muelles, que siguen la Ley de Hooke y la segunda Ley de Newton para calcular la deformación.

Alternativamente, se pueden utilizar otros métodos de deformación.

1.c.- Seleccionar las características morfológicas, extraídas de la descripción de la neurona, que guiarán el proceso de deformación del soma.

5 En una realización preferente estas restricciones incluyen, al menos, la posición y el grosor del segmento inicial de las dendritas de primer orden, que son aquellas que están directamente conectadas con el soma (7, figura 3ªA). También se pueden utilizar otras características morfológicas o combinación de ellas para guiar esta deformación.

10 **1.d.- Codificar las características morfológicas seleccionadas como parámetros o restricciones en el proceso de deformación mecánica.**

Las características morfológicas seleccionadas en 1.c determinarán dos factores: la región de influencia de cada dendrita (12) y la magnitud de la influencia (16). En una realización preferente la región de influencia de cada dendrita de primer orden puede ser determinada de acuerdo con el grosor de la sección inicial de dicha dendrita. Igualmente, en una realización preferente, el desplazamiento de la región de influencia de cada dendrita de primer orden

15 puede ser determinado de acuerdo con la posición inicial de dicha dendrita.

1.e.- Deformación de la forma inicial aplicando el método de deformación y las restricciones definidas en 1.c y 1.d, de la siguiente forma:

- 20
- Calcular el desplazamiento de los vértices de la malla poligonal 3D bajo cada región de influencia de acuerdo a las restricciones previamente seleccionadas;
 - Calcular la fuerza a aplicar en los vértices de cada región de influencia que satisfaga dichas restricciones de desplazamiento;
- 25
- Obtener la deformación del soma propagando las fuerzas sobre la malla poligonal 3D usando el modelo de deformación mecánico definido en 1.b.

1.f.- Post-procesamiento de la forma del soma para un mejor ajuste del soma y las dendritas:

- 30
- Desplazar los vértices del contorno de cada región de influencia de tal manera que el diámetro de cada región de influencia coincida con el grosor inicial de la correspondiente dendrita.
 - Aplicar una retriangulación en forma de abanico (*fan tessellation*) entre los vértices del contorno y el vértice central, eliminando el resto de los
- 35 vértices y triángulos en la superficie de la región de influencia.

2.- Generación de un modelo 3D de los árboles dendríticos y axonal: este proceso persigue la obtención de una representación 3D para cada segmento del esqueleto. Preferiblemente, cada segmento del esqueleto, definido por sus puntos morfológicos, se representará como un cono truncado, donde el radio de las bases del cono truncado se corresponde con el radio definido por los puntos morfológicos en los extremos del segmento. Esta etapa toma como datos de entrada los puntos en 3D (posiciones y radios) del esqueleto morfológico y procede de la siguiente manera:

2.a.- Generación de los conos truncados (18) para cada segmento, definido por dos puntos consecutivos (17). En una realización preferente, el segmento define el eje central del cono y los diámetros de los puntos finales, el tamaño de las bases (19). Igualmente, en esta realización, la resolución del cono viene dada por dos parámetros definidos por el usuario: el número de las secciones transversales entre los dos extremos (21) y el número de puntos usados para aproximar la forma circular de la base (20).

2.b.- Unir los conos truncados consecutivos. Cada par de conos consecutivos se conecta triangulando los puntos definidos en la parte final del primer cono con los puntos definidos en la parte inicial del segundo cono (18c). Se evitan las intersecciones entre conos truncados consecutivos acortando el primer cono (18a) y reorientando la base inicial del segundo cono (18b)

2.c.- Unir los conos truncados en las bifurcaciones. En una realización preferente, se unen dos conos truncados consecutivos (24) de acuerdo al paso 2.b y se conecta un tercero abriendo un agujero en la malla de los dos primeros (23) y uniendo la sección del tercer cono truncado a los vértices de la unión anterior. Las intersecciones se evitan desplazando la base inicial del tercer cono truncado (18c).

3.- Unir el soma deformado (15) con los conos truncados de las dendritas de primer orden. En una realización preferente se eliminan, en cada región de influencia, los triángulos conectados al vértice central y se desplazan los vértices del contorno de cada región de influencia, de forma que se conectan con la parte inicial del cono truncado de la dendrita de primer orden que les influencia. De este modo se obtiene una malla cerrada 2D adecuada para la utilización de técnicas avanzadas de visualización.

4.- Obtención y distribución de las espinas dendríticas. Esta es una fase opcional, que distribuye un grupo de espinas a lo largo de las dendritas, creando un modelo completo de la célula piramidal. La morfología de las espinas se puede obtener de dos maneras: si ya es conocida, se utiliza ésta; si no es conocida, las espinas se generan a partir de una forma inicial y se aproximan a la morfología final algorítmicamente. Para distribuir las espinas a lo largo de la dendrita, igualmente, se presentan dos alternativas: usar las posiciones reales, en el caso de conocerse, o utilizar una función de distribución.

5
10

Breve descripción de las figuras

A continuación se describen brevemente una serie de figuras relacionadas con la realización de esta invención (de forma no limitativa), y que contribuyen a una mejor comprensión de ésta.

15

Las figuras 1A y 1B muestran un ejemplo de la información de partida correspondiente a neuronas piramidales obtenidas a partir de experimentos biológicos.

La figura 2 muestra una representación digital del esqueleto definido en la tabla 1 de la realización presente, mostrando los puntos morfológicos de una neurona piramidal.

20

Las figuras 3A, 3B y 3C muestran, respectivamente, una definición morfológica incompleta del soma, la esfera que la contiene y la esfera reducida a partir de la cual se desarrolla el proceso de formación del soma.

Las figuras 4A, 4B, 4C, 4D y 4E muestran el proceso de deformación de la esfera reducida del soma, representada mediante una malla poligonal 3D. Las figuras 4A y 4B ilustran el efecto que produce la variación de la extensión de la región de influencia; mientras que la 4C y 4D muestran el efecto de incrementar la magnitud del desplazamiento de los vértices pertenecientes a la región de influencia de una dendrita, es decir los vértices que serán atraídos por la dendrita.

25

La figura 5 muestra la etapa final del proceso de deformación del soma.

30

Las figuras de la 6A a 6F muestran una comparación entre imágenes reales de somas (6A, 6C y 6E) y los respectivos modelos generados mediante el método propuesto (6B, 6D y 6F).

La figura 7 representa una aproximación 3D de un segmento dendrítico mediante un cono truncado.

35

Las figuras 8A a 8F muestran varios ejemplos de las uniones entre elementos de las mallas generadas.

Las figuras 9A y 9B muestran ejemplos de espinas distribuidas de acuerdo a una función de distribución.

- 5 Las figuras 10A a 10F presentan una comparación entre diferentes representaciones 3D de la misma neurona: 10A, 10B, 10D y 10E son representaciones obtenidas con métodos ya existentes; las figuras 10C y 10F son resultado del método descrito en presente invención.

- 10 Las figuras 11A y 11B muestran dos formas diferentes del soma, generados con el presente método.

La figura 12 muestra tres representaciones de la misma neurona con diferentes niveles de resolución.

Las figuras 13A y 13B muestran un zoom de la malla para poder observar detalladamente las conexiones en las bifurcaciones y entre el soma y las dendritas.

- 15 La figura 14 muestra la malla 3D de una neurona completa.

La Figura 15 presenta una visión general de la representación 3D generada para una célula.

Descripción de una realización preferente

- 20 El presente ejemplo muestra el conjunto de métodos diseñados para generar modelos neuronales 3D a partir de los trazados morfológicos.

- 25 Los datos de partida, obtenidos a partir de experimentos biológicos, consisten en un conjunto de puntos morfológicos que definen la forma de las neuronas piramidales, el tipo de neurona cortical más frecuente. En el caso mostrado en las figuras 1A y 1B, estas neuronas fueron inyectadas intracelularmente con *amarillo Lucifer (Lucifer Yellow)* en la capa III de la corteza cingular humana, perteneciente a un varón de 40 años, obtenido en una autopsia (2-3 h post-mortem)

- 30 La figura 1A muestra una imagen de microscopía confocal de una neurona piramidal intracelularmente inyectada, correspondiente a la capa III (1) de la corteza cingular humana. La figura 1B muestra una ampliación de la imagen anterior mostrando las dendritas basales (3) y las espinas (4). La escala (mostrada en la parte inferior derecha de la figura 1B) es: 43 μm en A, 12 μm en B (5 μm en el recuadro).

Las imágenes han sido obtenidas con un escáner laser confocal Leica TCS 4D unido a un microscopio de fluorescencia Leitz QMIRB. Los perfiles de fluorescencia se obtuvieron con una longitud de onda de excitación de 491 nm para visualizar *Alexa fluor 488*. Se adquirieron imágenes seriadas (x20) que incluían árboles dendríticos basales y apicales. Adicionalmente, se obtuvieron imágenes seriadas, de gran resolución (x63 glicerol), para capturar las espinas dendríticas.

La figura 2 muestra la representación digital de una neurona piramidal (1). En la tabla 1, mostrada a continuación, se observa la definición de la neurona, donde cada fila representa un punto morfológico (5) y cada columna indica, respectivamente, el identificador, tipo de punto, coordenadas XYZ, radio en ese punto e identificador del punto precedente. En la parte derecha de la imagen se muestra un detalle de la representación del esqueleto morfológico definido en la tabla 1, mostrando tres puntos morfológicos (5), correspondientes a los tres puntos intermedios de la Tabla 1.

		# SWC Neuron Definition						
		1	1	0.000	0.000	0.000	6.430	-1
		2	3	-2.362	-6.272	5.830	1.479	1
		3	3	-3.742	-6.922	6.740	1.479	2
		4	3	-3.742	-6.922	7.350	1.067	3
		5	3	-5.272	-8.722	7.880	1.067	4
		6	3	-5.272	-8.722	8.480	1.067	5
		7	3	-5.422	-9.882	8.940	0.830	6
		8	3	-5.422	-9.882	9.010	0.830	7
		...						
		...						
		...						
		640	3	-0.162	116.938	0.080	1.788	639
		641	3	-0.142	129.938	0.080	1.788	640
		642	3	-0.122	143.068	0.080	1.887	641
		...						
		...						
		...						
		1381	2	404.66	-171.46	-62.3	0.652	1380
		1382	2	410.55	-173.92	-62.47	0.593	1381
15		1383	2	414.1	-175.85	-59.77	0.593	1382

Los datos mostrados en la tabla 1 se han extraído utilizando el software NeuroLucida Confocal (MicroBrightField). El esqueleto de las dendritas/axón se describe mediante puntos 3D, que delimitan los diferentes segmentos que forman el árbol dendrítico/axonal. Estos puntos tienen asociado un diámetro, que da información acerca del grosor de la dendrita (3) en ese punto particular, y va variando a lo largo de

la trayectoria dendrítica. El soma (6) se define mediante un conjunto de puntos que trazan el contorno del soma en 2D. Las espinas (4) se reconstruyeron de manera separada, a un aumento superior, obteniendo los puntos 3D que definían la posición de las espinas.

5

La generación de los modelos 3D de las neuronas implica las siguientes etapas:

1.- Generación del soma

La generación del soma (6) únicamente requiere la definición de los segmentos
10 iniciales (7) de las dendritas de primer orden (3) y el centro y radio que aproxima la esfera que contiene al soma (10). El primer paso del método reduce la esfera inicial en un porcentaje, que experimentalmente oscila entre el 10-30%, lo que establece el volumen mínimo del soma deformado (resultado final). La Figura 3 ilustra este proceso.

15

La Figura 3A representa la definición morfológica inicial del soma (6). La figura 3B muestra la esfera que contiene al soma (10). La figura 3C muestra la esfera reducida (11) y los segmentos iniciales de las dendritas de primer orden (7) utilizadas para guiar el proceso de deformación.

20

Esta esfera reducida (11) se representa por una malla poligonal 3D, que se deforma simulando que las dendritas tiran, desde sus puntos de inserción, hacia ellas. El comportamiento del proceso de deformación principalmente depende de dos factores:

1.- La región de influencia (12) de cada dendrita: esta región está determinada
25 por el grupo de vértices (13) de donde tirará cada dendrita. La región de influencia de una dendrita (3) se calcula en función de su grosor. Para eso, se selecciona el vértice más próximo (13') de la esfera al punto de inicio del primer segmento de la dendrita (7), junto con todos sus vértices colindantes (13) que estén a una distancia igual o menor al diámetro de la dendrita incluida en la
30 región de influencia. Esta distancia se computa como una distancia geodésica. Las figuras 4A y 4B muestran dos deformaciones distintas, obtenidas cuando se varia la región de influencia (12) de la dendrita (en la figura 4A, la región de influencia corresponde a una distancia geodésica = 1.39 μm ; en la figura 4B, la región de influencia corresponde a una distancia geodésica = 2.39 μm).

2.- El desplazamiento (16) o la posición final que alcanza cada vértice (13, 13') perteneciente a la región de influencia de la dendrita (12): el desplazamiento (16) de estos vértices induce una fuerza que se propaga a través de la malla del soma provocando la deformación final de ésta (14). La posición final de los vértices (13, 13') de los que tira cada dendrita, coincide con los vértices del principio de la dendrita (7). Las figuras 4C y 4D ilustran el efecto de variar esta posición final, esto es, el efecto de aumentar el desplazamiento (16) de los vértices tirados por las dendritas (en la figura 4C, el desplazamiento (16) de los vértices es de 1,5 μm ; en la figura 4D, el desplazamiento (16) de los vértices es de 2,5 μm).

Estos dos factores, junto con la reducción del porcentaje de la esfera inicial, son parámetros que se pueden modificar por el usuario, permitiendo incorporar una amplia variedad de criterios para guiar el proceso de deformación. Una vez que el modelo masa-muelle se construye, de acuerdo a la metodología descrita, se deforma el modelo tirando hacia el comienzo de cada dendrita de primer orden. La figura 4E muestra el proceso de deformación del soma desde su forma inicial, la esfera reducida (11), pasando por diferentes momentos de tiempo, hasta llegar a la deformación final (14).

Una vez que la simulación ha terminado y el soma tiene prácticamente su forma definitiva, es necesario un proceso final que facilite la unión del soma con las dendritas. El propósito de este proceso es modificar ligeramente la posición de los vértices pertenecientes a la región de influencia (12) de modo que el diámetro de estas regiones sea el mismo que el de la dendrita a la que se une (3). En este proceso, y comenzando con la forma final del soma ya deformado (14), el método selecciona los vértices (13'') en el contorno de la región de influencia (12) y los desplaza hasta que el diámetro de la región coincide con el grosor de la correspondiente dendrita de primer orden (3). Posteriormente, se aplica una retriangulación en forma de abanico entre los vértices (13'') y el centro (13'), borrando el resto de los vértices y los triángulos de la superficie (que ya no son necesarios). La Figura 5 muestra, en la parte izquierda (14), la deformación final del soma y, en la parte derecha, la malla retriangulada del soma (15) lista para unirse a la dendrita de primer orden. Este proceso permite una conexión de alta calidad entre el soma deformado (15) y las dendritas de primer orden.

35

En las figuras 6A y 6B se puede observar una comparación entre el soma real y el modelo 3D generado con la presente invención. En este ejemplo, los puntos de comienzo, el grosor de la dendritas, y el centro y radio del soma han sido extraídos directamente de la información volumétrica de una pila de imágenes de muy alto aumento (63x) (segmentado con el software Imaris). Esto permite obtener una precisión muy alta en la posición y diámetro de las dendritas, cuyos resultados en el modelo 3D (figura 6B) es muy similar a la estructura real del soma. La figura 6A muestra el soma segmentado a partir de una pila de imágenes tomadas por el microscopio confocal de alto aumento (63x) utilizando software Imaris. La figura 6B muestra el soma generado con el presente método utilizando un trazado de alta resolución (los puntos de comienzo y el grosor de las dendritas y el centro y radio del soma se ha obtenido directamente de la información volumétrica). Este no es el procedimiento habitual de trazado de neuronas, pero se ha aplicado con el fin de evaluar la calidad de los resultados del método propuesto al trabajar con datos de calidad extremadamente alta. Además, el disponer de datos volumétricos del soma permitirá comparar el soma real con el modelo de soma obtenido con la presente invención.

La misma célula ha sido trazada utilizando el software Neurolucida (figuras 6C y 6E). En este caso, la precisión del trazado es menor y corresponde al proceso habitual de reconstrucción de neuronas, que trabaja con un aumento típico de 40x o 20x. Aun así, el modelo 3D generado con el método propuesto es muy similar al de la célula original (Figuras 6D y 6F). La figura 6D muestra el soma generado con el presente método a partir del trazado de Neurolúcida obtenido de la Figura 6C. La figura 6E muestra otro ejemplo de una imagen de microscopía confocal, correspondiente a un soma real (aumento 20x), mientras que la figura 6F muestra el soma generado con la presente invención a partir del trazado de Neurolúcida obtenido de la Figura 6E.

2.- Generación de las dendritas y el axón

Cada segmento (17) de dendrita (o axón) (figura 7), se aproxima mediante conos truncados, utilizando el segmento para definir el eje central del cono truncado (18) y el diámetro de los puntos finales del segmento (17) para definir el tamaño de las bases (19, 19'). Aquí, la resolución del cono está definida por dos parámetros dados por el usuario: el número de secciones transversales (20) entre las dos bases (seis en este ejemplo) y la resolución de la sección transversal, esto es, el número de puntos (21)

utilizados para aproximar la forma circular de la base (nueve en este ejemplo). La figura 7 muestra la aproximación 3D del segmento resaltado (17) con un cono truncado (18), donde el radio de las bases (19) es el radio definido por los puntos morfológicos del extremo del segmento (17).

- 5 El diámetro de cualquier sección intermedia es, consecuentemente, calculado a partir de la interpolación de los diámetros de las bases del cono de acuerdo a su posición a lo largo del eje. Las secciones transversales (20) no están uniformemente distribuidas a lo largo del segmento (17), pero están cuidadosamente colocadas para evitar problemas cuando se unan o conecten con las estructuras cónicas adyacentes.
- 10 Posteriormente, para cada par de secciones consecutivas, se aplica una triangulación con el objetivo de construir la superficie poligonal de la malla 3D.

3.- Unión de las diferentes mallas generadas

- Este paso del procedimiento une las diferentes mallas generadas con el objetivo de formar una neurona completa. Se pueden distinguir tres casos: uniones de conos truncados consecutivos, uniones en las bifurcaciones y uniones entre las dendritas de primer orden y el soma.
- 15

- Para cada par consecutivo de conos truncados (18a, 18b), estos se conectan triangulando los puntos definidos en la última sección del primer cono truncado (18a) con los puntos definidos en la primera sección del segundo (18b). Las intersecciones entre conos consecutivos se evitan acortando el primer cono y reorientando la base inicial del segundo cono (ver figuras 8A, 8B y 8C). Los cambios en la dirección de segmentos consecutivos implican que las bases de los conos consecutivos se pueden unir; el acortamiento del primer segmento resuelve el problema.
- 20
- 25

- Tal y como se muestra en las figuras 8D, 8E y 8F, en el caso de las bifurcaciones (24), *el segmento padre (18a) se conecta con el primer segmento hijo (18b)*, de acuerdo a la estrategia explicada anteriormente (figura 8D). El segundo *hijo (18c)* se conecta abriendo un agujero (23) en la malla y cosiendo la primera sección de este segundo segmento *hijo (18c)* a los vértices pertenecientes al contorno del agujero (23). Este agujero se abre alrededor del vértice seleccionado como el más cercano al centroide de la sección transversal de la rama del segundo *hijo (18c)*. Las intersecciones con este segundo *hijo* se evitan desplazando su base inicial.
- 30

35

Para unir el soma (15) con las geometrías tubulares (18) de las dendritas de primer orden, se selecciona el vértice del soma deformado (15) más cercano al baricentro de la primera sección transversal de la geometría tubular (18) con la que se va a unir. Se eliminan todos los triángulos conectados a este vértice seleccionado, Como se ha
5 mencionado anteriormente, estos triángulos forman una teselación en abanico conectados a un vértice central (13'). Al borrar estos triángulos, se abre un agujero en la malla, y los vértices del contorno del agujero del soma se conectan a los vértices de la primera sección de la dendrita de primer orden.

10 La malla poligonal obtenida al final de esta etapa forma una superficie cerrada que se aproxima al soma y a los árboles dendríticos y axonal. En este punto se puede suavizar la malla para mejorar la apariencia de la membrana 3D.

15

4.- Adición de espinas a la malla

Para obtener un modelo de espinas 3D que se añada a la malla se han utilizado dos alternativas. La primera de ellas, en esta realización preferente, es la importación de un conjunto de modelos 3D de espinas. Una parte de estos modelos han sido
20 diseñados con software de modelado 3D y otra parte es extraída por medio de algoritmos de segmentación de secuencias de imágenes. Como una segunda alternativa en la realización preferente, se ha implementado un método para generar espinas 3D de manera procedural. Estas espinas se generan de forma similar a un cono truncado, como una serie de anillos concéntricos cuyos radios aumentan
25 progresivamente desde la base de la espina a su parte superior. La resolución de la espina (4), así como su altura y anchura han sido parametrizadas. Finalmente se han aplicado algoritmos de deformación con el fin de incorporar pequeñas variaciones en sus formas. Las figuras 9A y 9B presentan ejemplos de espinas distribuidas de acuerdo con una función de densidad. La figura 9A muestra espinas de baja resolución
30 generadas procedualmente. La Figura 9B muestra espinas modeladas de alta resolución.

Una vez que un conjunto de espinas 3D está disponible, en la realización preferente, si se conocen los puntos de inserción exactos, dichas espinas se sitúan en dichos
35 puntos. De lo contrario, las espinas pueden ser distribuidas siguiendo una función de

distribución. La figura 9B muestra una parte de la dendrita (3) con un conjunto de espinas pre-modeladas (4) posicionadas (y orientadas aleatoriamente) a lo largo de la superficie 3D de la dendrita.

5 Los métodos descritos en la presente invención también permiten superar los problemas causados por la baja calidad de las mallas desconectadas 3D que habitualmente generan las aplicaciones existentes en la actualidad. Las técnicas aquí presentadas pueden ser integradas en un dispositivo interactivo que permite la generación de modelos 3D a partir de los datos morfológicos trazados de imágenes de
10 microscopía. Este método hace posible la construcción de mallas poligonales tridimensionales a partir de los datos extraídos de las reconstrucciones morfológicas neuronales reales de una manera rápida y simple.

Como se ve en los resultados de este ejemplo, las mallas generadas superan varias
15 de las limitaciones de las anteriores herramientas neuronales, que crean mallas desconectadas, abiertas, de resolución fija, con aproximaciones poco realistas de las formas de los somas. Los paquetes de software existentes y ampliamente utilizados, como NeuroLucida, NeuroConstruct y Génesis, crean mallas de muy baja calidad y/o con partes de la neurona sin conectar.

20

La presente invención supera estas limitaciones ofreciendo mallas conectadas, cerradas (sin agujeros) y de tipo 2-variedad (*2D-manifold*). Estas características hacen que la geometría de las mallas sea fácil de procesar y las hacen adecuadas para la aplicación de otras técnicas de visualización (por ejemplo, la subdivisión y algoritmos
25 de suavizado). Estas mallas siguen con precisión las descripciones morfológicas e incluyen somas realistas, específicamente generados para cada célula. La Figura 10 muestra una comparación de la misma neurona utilizando modelos 3D creados por diferentes herramientas. Las figuras 10D, 10E y 10F muestran una vista en primer plano de las mismas bifurcaciones –las que se encuentran dentro del rectángulo de las
30 figuras 10A, 10B y 10C respectivamente- pertenecientes a modelos obtenidos con diferentes herramientas: NeuroConstruct (figuras 10A y 10D), NeuroLucida (figuras 10B y 10E) y los métodos descritos en esta propuesta (figuras 10C y 10F). Como se puede observar, NeuroConstruct genera mallas no conectadas y el soma (6) se aproxima como un cilindro. En el caso de NeuroLucida, la malla está también desconectada,
35 aunque esto se enmascara, en cierta medida, mediante el uso de una esfera que se superpone (25) en cada

bifurcación. Neurolucida aproxima el soma con un disco en 2D que ni siquiera se almacena cuando el modelo 3D se exporta. La malla generada con la presente invención (figuras 10C y 10F) incluye un soma (6) que se genera automáticamente para cada célula en particular, y, como se puede observar en la figura 10F, la malla 3D
5 está conectada y presenta una membrana suave que preserva la forma original de la célula. Nótese la diferencia con los elementos no conectados y la ausencia de un soma realista en las figuras 10A, 10B, y en las figuras 10D y 10E. El presente método genera una malla suave y conectada (figuras 10C y 10F).

10 A la vista de los resultados de este experimento se puede concluir que el presente método es un enfoque innovador para la generación de somas. Partiendo de los datos (incompletos) del soma presentes en los trazados neuronales, se propone una nueva técnica, deformando una forma inicial 3D, en consonancia con las dendritas que salen del soma. Esta técnica novedosa de deformación crea formas plausibles basándose
15 únicamente en los segmentos iniciales de las dendritas y en una estimación del diámetro de soma.

Dado que los somas reales y los modelos 3D obtenidos son muy similares, el enfoque de deformación utilizado en el presente método demuestra ser una técnica exitosa
20 para generar somas a partir de datos morfológicos incompletos. Además, el presente método es suficientemente genérico para ser adecuado para diferentes tipos de neuronas. Las figuras 11A y 11B muestra un ejemplo de las formas de soma finales obtenidos para interneuronas y células piramidales, respectivamente, de acuerdo con el presente método. Cabe señalar que las formas de los somas generados son
25 drásticamente diferentes para ambos tipos de neuronas, de la misma manera que los somas de las células piramidales reales difieren de los somas reales de interneuronas. La generación de un soma realista representa un paso adelante en comparación con otros instrumentos neuronales existentes que generan somas poco realistas.

30 En el presente método, el proceso de construcción en sí, garantiza que los árboles dendríticos/axonal preservan las trayectorias y diámetros originales extraídos de las imágenes de microscopía. En contraste con otras herramientas existentes, la resolución o el nivel de detalle de la malla generada se puede parametrizar, permitiendo la creación de diferentes versiones de la misma neurona, cada una con un
35 cierto grado de detalle. La figura 12 muestra tres versiones de la misma neurona con

diferentes niveles de resolución en los conos truncados (18): en (A) 2 secciones transversales x 3 puntos por sección (4892 triángulos); en (B) 4 secciones transversales x 6 puntos por sección (24.412 triángulos); en (C) 8 secciones transversales x 12 puntos por sección (98.652 triángulos). Esto permite tener en
5 cuenta los requisitos de precisión y facilita futuras aproximaciones de visualización multiresolución. Incluso a un nivel bajo de la resolución, la calidad de las mallas puede considerarse suficiente para una exploración general de la neurona. Las resoluciones más altas pueden ser necesarias para una inspección más detallada o para otros fines, tales como simulaciones electrofisiológicas.

10

Se dedica especial atención a las bifurcaciones y las conexiones del cuerpo de la célula (soma) con las dendritas de primer orden y el axón. La vista en primer plano de la malla en los puntos de unión que se muestra en las figuras 13A (ejemplo de una rama), y 13B (ejemplo de la conexión entre una dendrita y el soma) demuestra la
15 suavidad y calidad de la malla generada.

Además de la construcción de un soma 3D verosímil y la generación de los árboles dendríticos y axonal de la neurona, las técnicas presentadas también hacen posible la inclusión de espinas distribuidas a lo largo de las dendritas. Dado un conjunto de
20 espinas 3D (o espinas generadas con los procedimientos propuestos) éstas pueden ser distribuidas de acuerdo a sus posiciones reales o siguiendo una determinada función de densidad.

La posibilidad de añadir espinas reales o generadas automáticamente no está
25 disponible en ninguna herramienta anterior. La Figura 14 muestra el resultado final de la generación de una malla 3D de una neurona, a partir de la descripción morfológica real. La neurona generada presenta un soma plausible (6), conectado adecuadamente a las dendritas y al axón (3), y con espinas 3D (4) distribuidas a lo largo de las dendritas. Se muestra una vista en primer plano de la forma realista del cuerpo de la
30 célula, así como las espinas distribuidas a lo largo de las dendritas, de acuerdo con una función de densidad.

Esta es la primera vez que ha sido posible representar las neuronas reales en 3D con somas plausibles y con espinas a lo largo de sus árboles dendríticos (véase la figura
35 15, una vista general de una célula 3D generada, mostrando una forma realista del

soma, de las dendritas y espinas). Esto abre nuevas oportunidades para el estudio y el análisis de la morfología de las neuronas, y proporciona una herramienta para generar fácilmente una malla 3D de alta calidad de cualquier neurona real a partir de su descripción morfológica extraída mediante herramientas estándar de reconstrucción,
5 como Neurolucida.

El presente método se puede integrar en un dispositivo electrónico, que incluya una interfaz gráfica con un menú de opciones estándar para abrir archivos de morfología y guardar los modelos generados, haciendo de él una herramienta intuitiva y fácil de
10 usar. Esta herramienta realiza todos los pasos del proceso de generación: la generación del soma, la generación de las dendritas y la creación (o importación) y distribución de las espinas. También incluye la posibilidad de parametrizar algunos factores para controlar características tales como la calidad final deseada del modelo o la suavidad de la malla, mientras se visualiza interactivamente el resultado obtenido.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para la generación de modelos realistas en tres dimensiones de células neuronales a partir de los trazados morfológicos extraídos en los laboratorios de neurociencia que comprende:
- 5
- obtener una definición morfológica de la neurona (1) que contenga al menos una pluralidad de puntos morfológicos (5);
 - generar un modelo en tres dimensiones de los árboles dendríticos y axonales;
 - generar un modelo tridimensional del soma (6) mediante:

10

 - la generación de una forma inicial tridimensional del soma (6) a partir de la definición morfológica;
 - la aplicación de un modelo de deformación mecánica a la forma inicial tridimensional del soma, considerando un conjunto de restricciones extraídas de las propiedades morfológicas de las dendritas y axón para obtener una forma deformada (14) del soma (6);
 - unir dichos modelos tridimensionales generados en un único modelo tridimensional de la neurona (1).
- 15

2.- Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** las restricciones incluyen al menos la posición y el grosor de los segmentos iniciales (7) de las dendritas de primer orden (3).

20

3.- Método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la generación del modelo tridimensional del soma (6) comprende la obtención, a partir de la definición morfológica del soma (6), de una esfera envolvente (10) del soma (6), y donde la forma inicial tridimensional del soma (6) es una esfera reducida (11) obtenida como una reducción de la esfera envolvente (10) de acuerdo a un parámetro de reducción.

25

4.- Método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** el parámetro de reducción está comprendido en un rango entre el 10% y 30%.

30

5.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, **caracterizado porque** la generación del modelo tridimensional del soma (6) comprende las siguientes etapas:

35

- representar la esfera reducida (11) como una malla poligonal tridimensional;
- definir, en dicha malla poligonal tridimensional, la región de influencia (12) de cada dendrita de primer orden (3);
- calcular el desplazamiento de los vértices (13, 13') de la malla poligonal tridimensional bajo dicha región de influencia (12) de acuerdo al conjunto de restricciones previamente definidas;
- calcular las fuerzas a aplicar en los vértices (13, 13') de cada región de influencia (12) que satisfagan dichas restricciones de desplazamiento;
- obtener una forma deformada (14) del soma (6) mediante la propagación de dichas fuerzas sobre la malla poligonal tridimensional, utilizando un modelo de deformación mecánica.

6.- Método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** adicionalmente comprende la obtención, a partir de la forma deformada (14), de una malla del soma deformado (15) mediante:

- el desplazamiento de los vértices (13) del contorno de cada región de influencia (12) de forma que el diámetro de la región de influencia (12) coincida con el grosor inicial de la correspondiente dendrita de primer orden (3);
- la aplicación de una triangulación en forma de abanico entre los vértices (13'') del contorno y el vértice central (13') y la eliminación del resto de los vértices y triángulos de la superficie de la región de influencia (12).

7.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, **caracterizado porque** el modelo de deformación mecánica es un modelo masa-muelle.

8.- Método de acuerdo a la reivindicación 7, **caracterizado porque** el modelo masa-muelle se genera en la malla poligonal tridimensional, mediante la creación de una estructura de muelles en las aristas de los triángulos de la esfera reducida (11) y un conjunto de muelles internos que parten del centro de la malla.

9.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, **caracterizado porque** la esfera reducida (11) se modela como una serie de masas puntuales conectadas por muelles siguiendo la Ley de Hooke, aplicando posteriormente la Segunda Ley de Newton a las masas puntuales, incluyendo las fuerzas aplicadas por los muelles.

10.- Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 9, **caracterizado porque** la región de influencia (12) de cada dendrita de primer orden (3) se determina de acuerdo con el grosor de la misma.

5

11.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, **caracterizado porque** el desplazamiento de la región de influencia (12) asociada a una dendrita de primer orden (3) se determina de acuerdo a la posición inicial de dicha dendrita.

10 12.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la generación del modelo tridimensional de los árboles dendríticos y axonales comprende la representación de cada segmento (17) del esqueleto morfológico definido por los puntos morfológicos (5) como un tronco de cono (18), en el que los radios de las bases (19) son los radios definidos por los puntos morfológicos (5) en los extremos del segmento (17).

15

13.- Método según la reivindicación 12, **caracterizado porque** adicionalmente comprende la unión del soma deformado (15) con los conos truncados (18) de las dendritas de primer orden (3), mediante la eliminación, en cada correspondiente región de influencia (12), de los triángulos que conectan con el vértice central (13') y el desplazamiento de los vértices (13'') del contorno de la región de influencia (12) de manera que queden coincidentes con los vértices del segmento inicial (7) de la correspondiente dendrita de primer orden.

20

25 14.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, **caracterizado porque** la resolución de cada tronco de cono (18) está dada por al menos dos parámetros ajustables:

- el número de secciones transversales (20) entre las dos bases (19); y
- el número de puntos (21) utilizados para aproximar la forma circular de las bases (19).

30

15.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado porque** adicionalmente comprende la unión de los conos truncados consecutivos (18a, 18b), mediante la triangulación de los puntos que definen la última sección transversal del primer cono truncado (18a) con los puntos que definen la primera sección del segundo

35

cono (18b), y por el acortamiento del primer cono (18a) y la reorientación de la base adyacente (19) del segundo cono truncado (18b).

5 16.- Método según la reivindicación 15, **caracterizado porque** adicionalmente comprende la unión de los conos truncados (18a, 18b, 18c) en los puntos de bifurcación (24) primero uniendo dos conos truncados consecutivos (18a, 18b) y luego conectando los dos conos truncados ya unidos (18a, 18b) con el tercer cono truncado (18c), mediante la apertura de un orificio (23) en la malla de los dos conos truncados unidos (18a, 18b) y la unión de la primera sección del tercer cono truncado (18c) a los
10 vértices del contorno del agujero (23).

17.- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** comprende además la generación de modelos tridimensionales de las espinas dendríticas (4).
15

18.- Método según la reivindicación 17, **caracterizado porque** las espinas (4) se generan como una serie de anillos concéntricos cuyos radios aumentan progresivamente desde la base hasta la parte superior de la espina (4).

20 19.- Método según la reivindicación 18, **caracterizado porque** comprende además la distribución de los modelos tridimensionales generados de las espinas (4) a lo largo del modelo tridimensional de la neurona (1).

25 20.- Método según la reivindicación 19, **caracterizado porque** la distribución de las espinas (4) se realiza siguiendo una función de distribución.

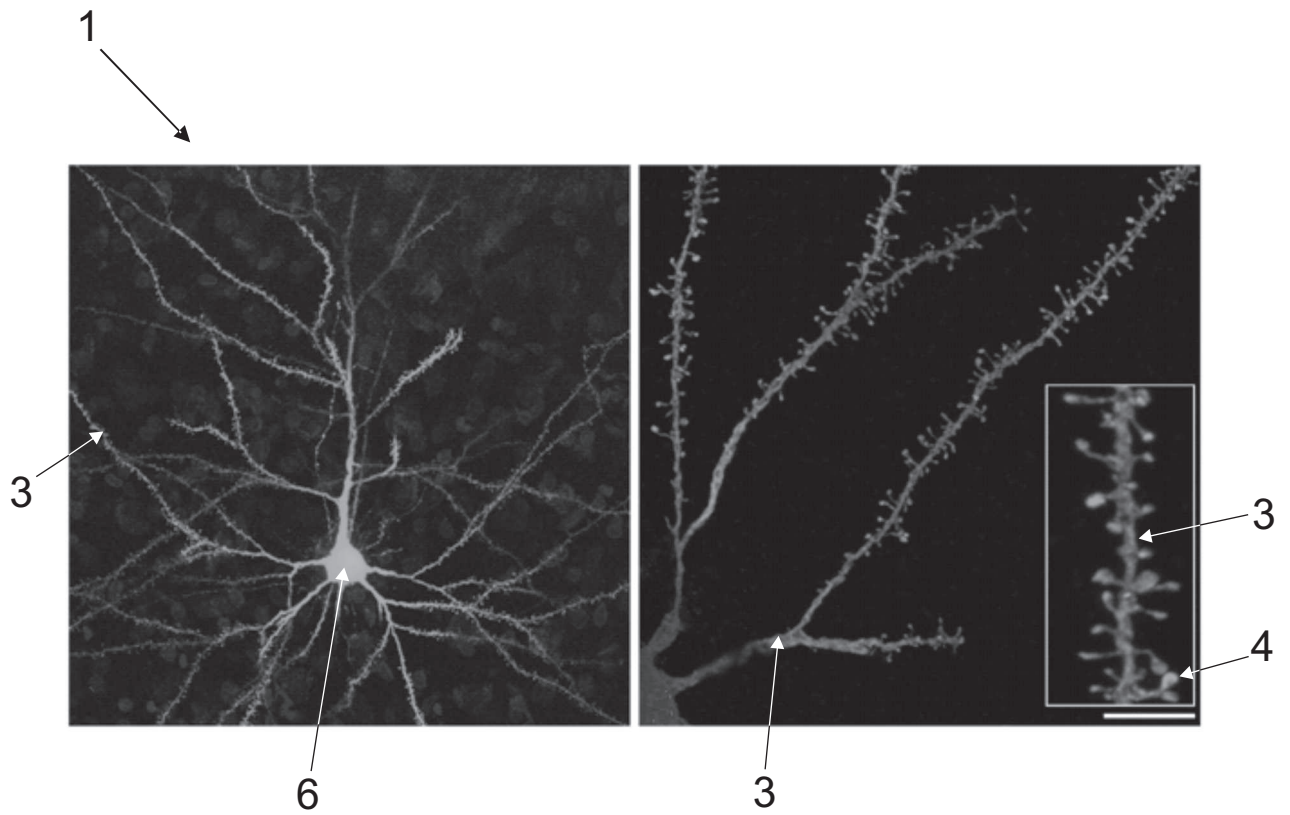


Fig. 1A

Fig. 1B

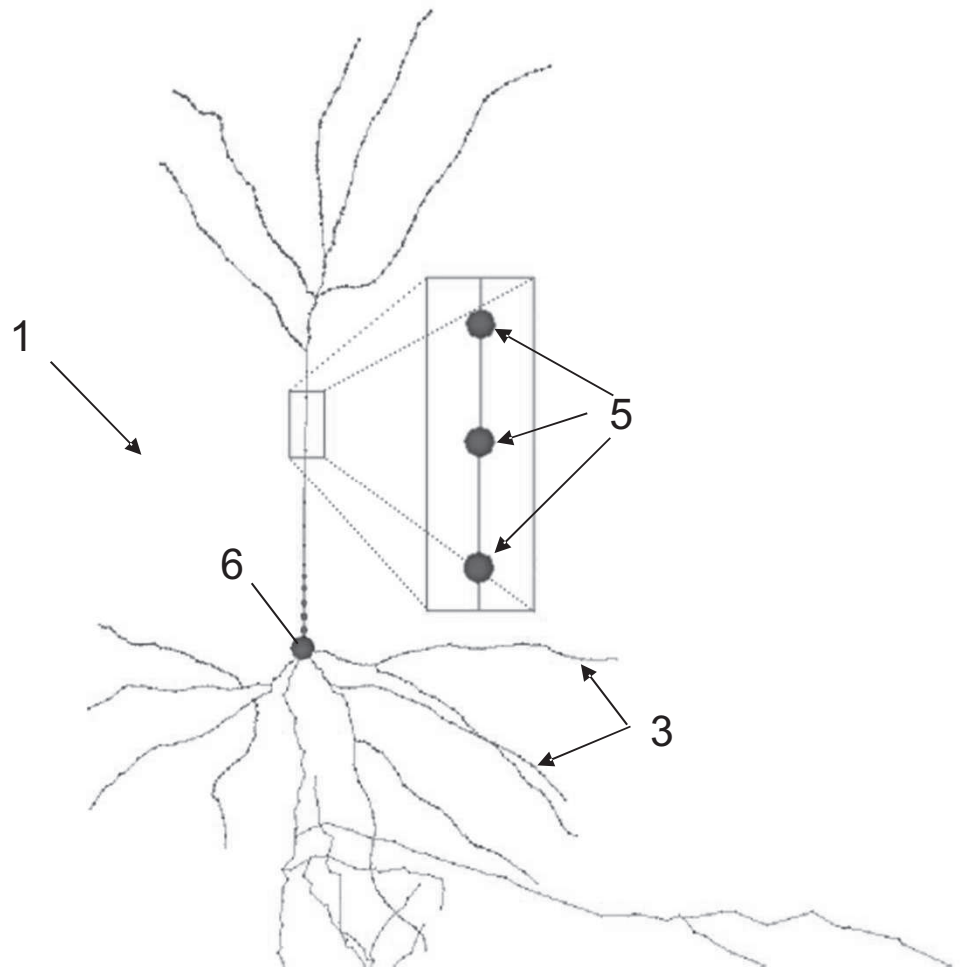


Fig. 2

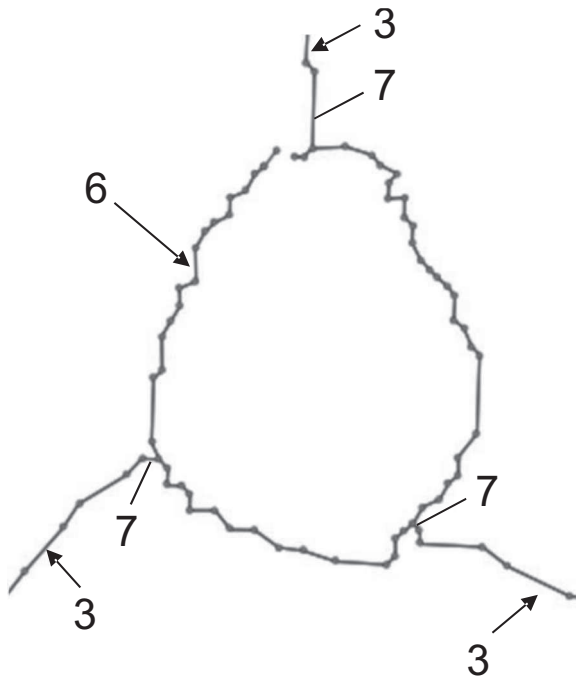


Fig. 3A

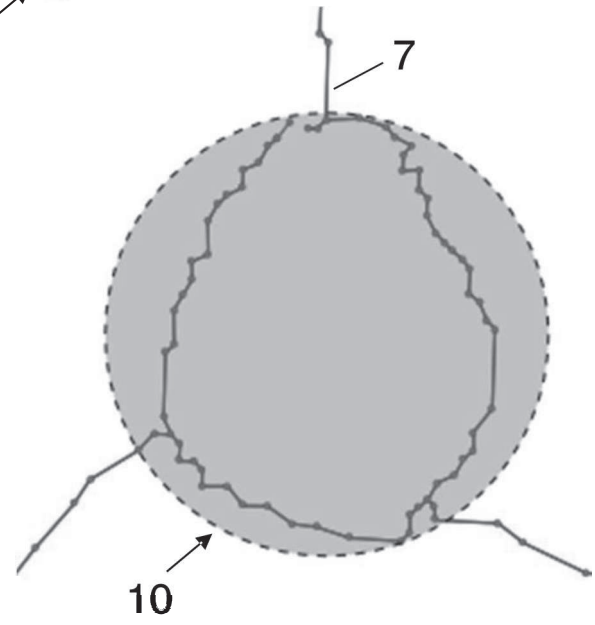


Fig. 3B

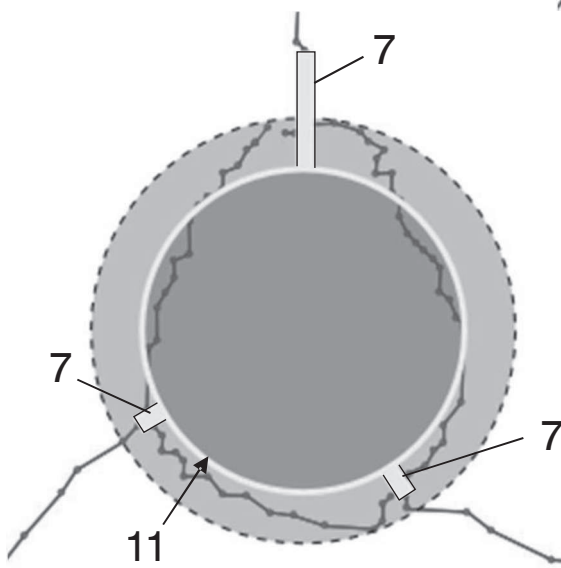


Fig. 3C

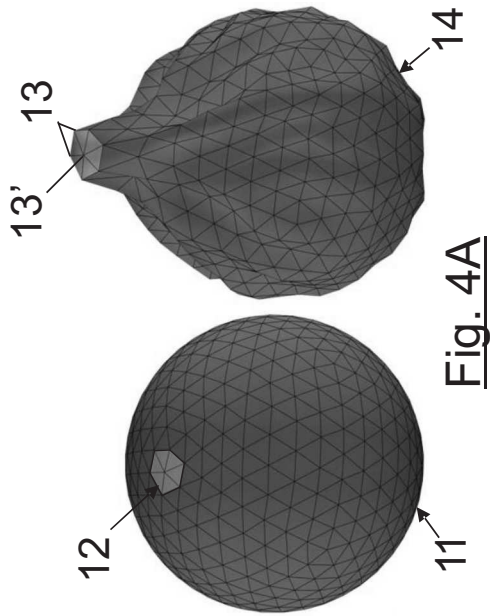


Fig. 4A

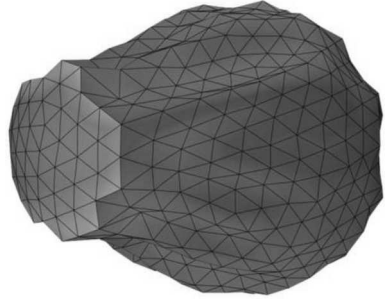


Fig. 4B

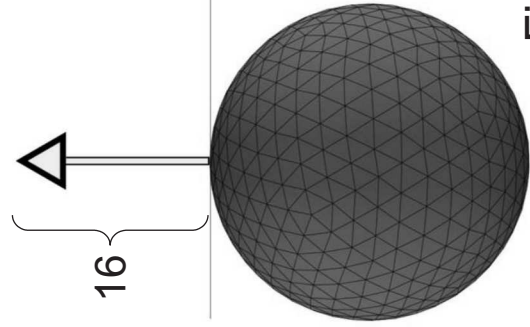


Fig. 4C

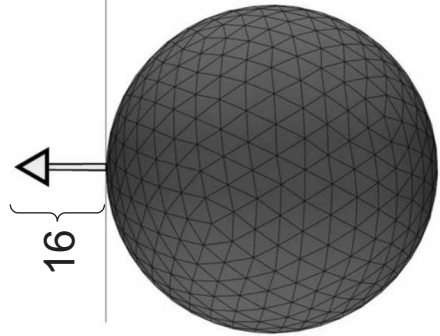
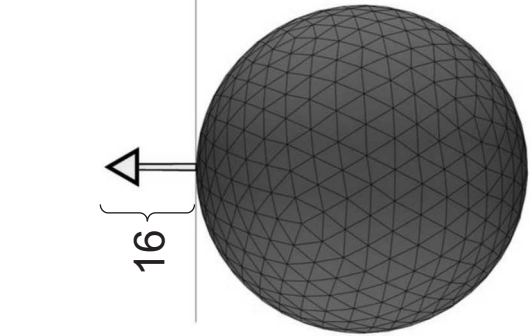
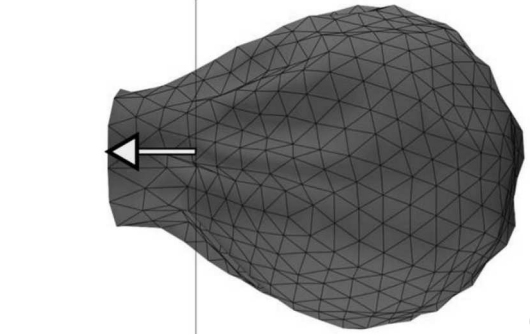
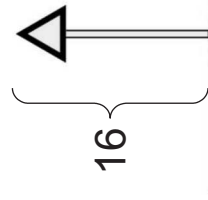
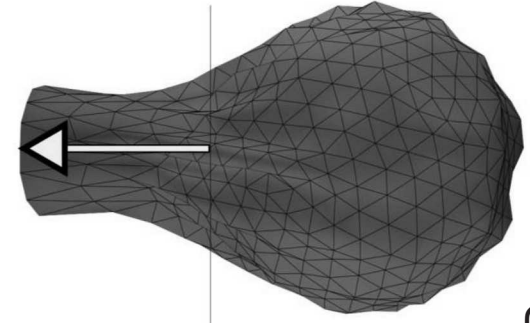


Fig. 4D



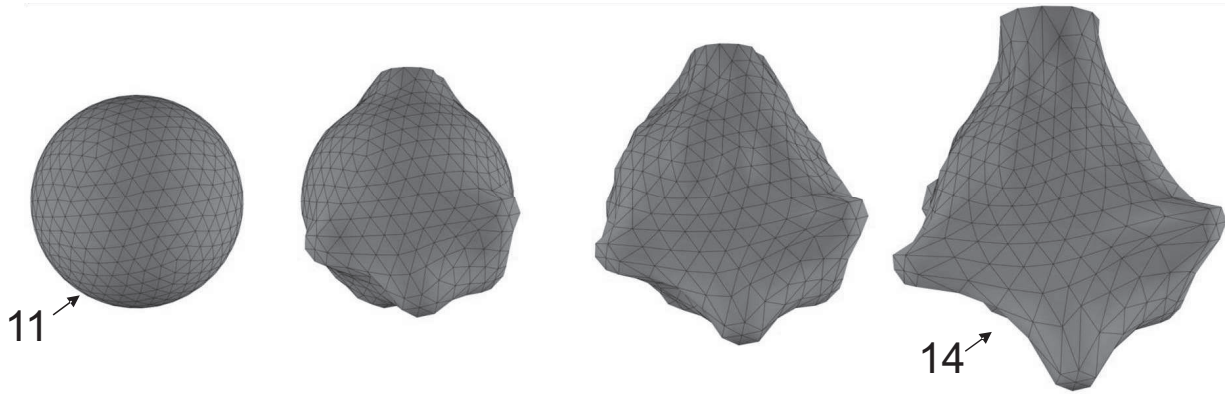


Fig. 4E

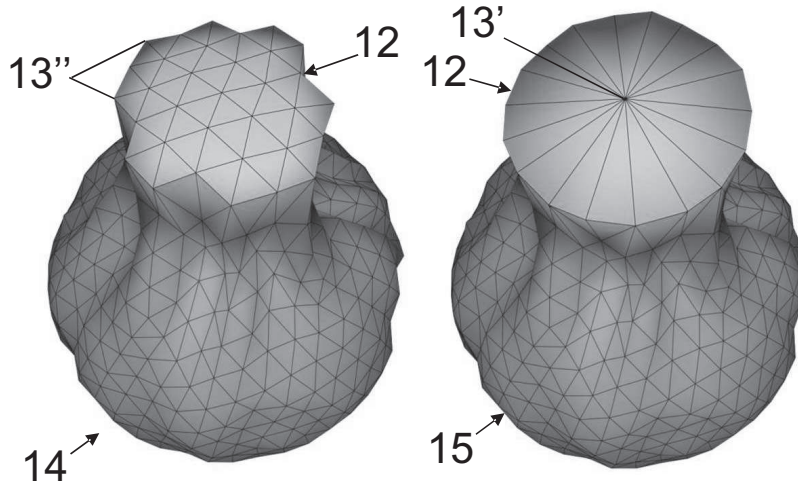


Fig. 5

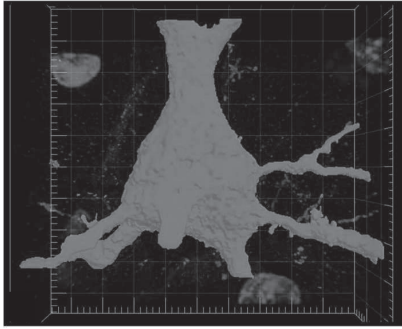


Fig. 6A

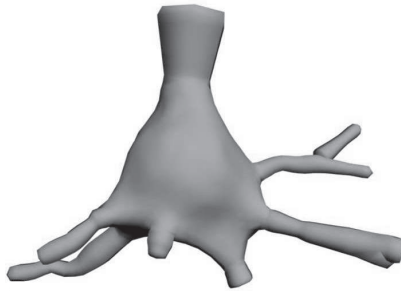


Fig. 6B

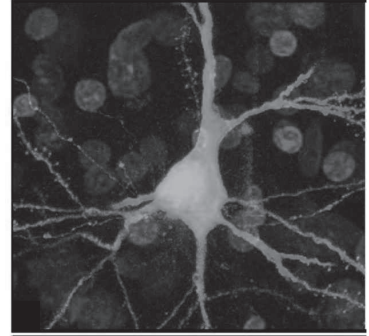


Fig. 6C

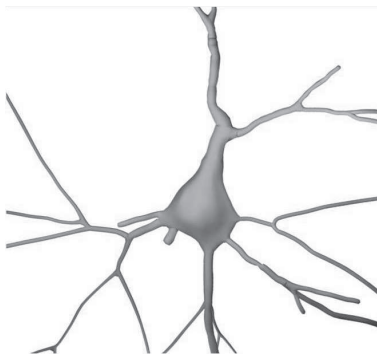


Fig. 6D

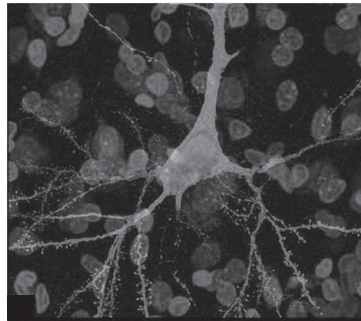


Fig. 6E

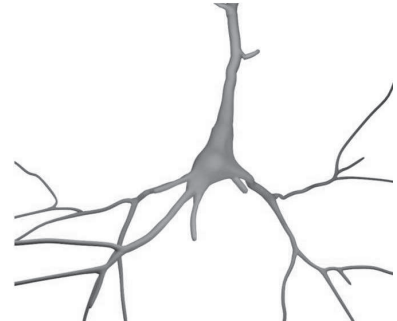


Fig. 6F

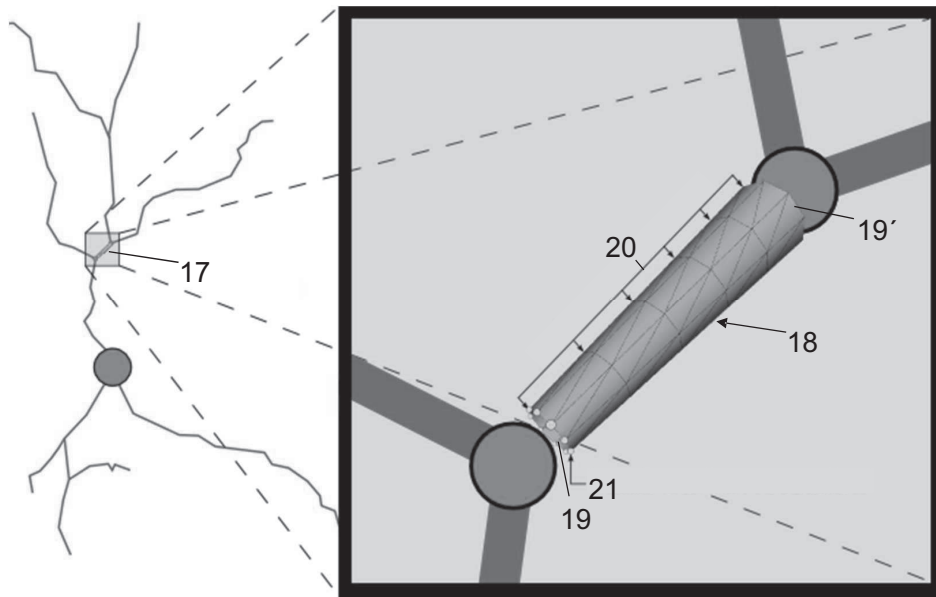


Fig. 7

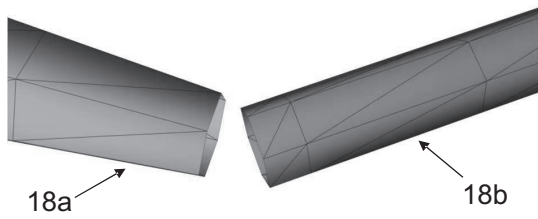


Fig. 8A

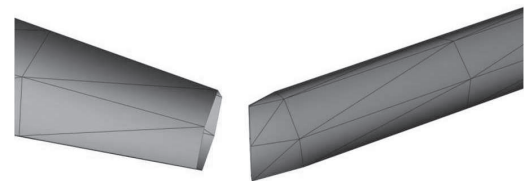


Fig. 8B

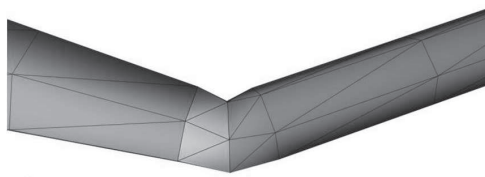


Fig. 8C

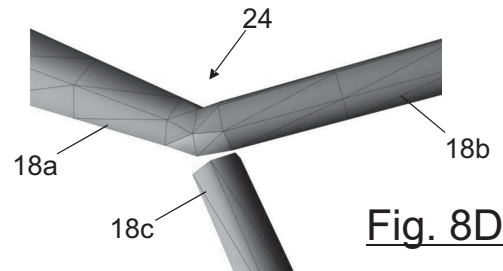


Fig. 8D

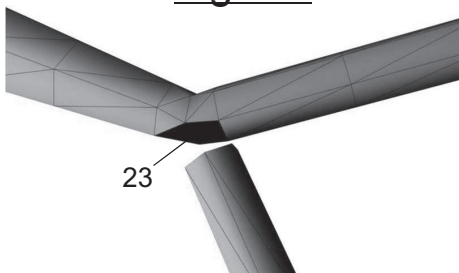


Fig. 8E

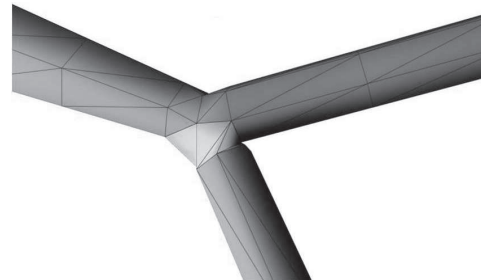


Fig. 8F

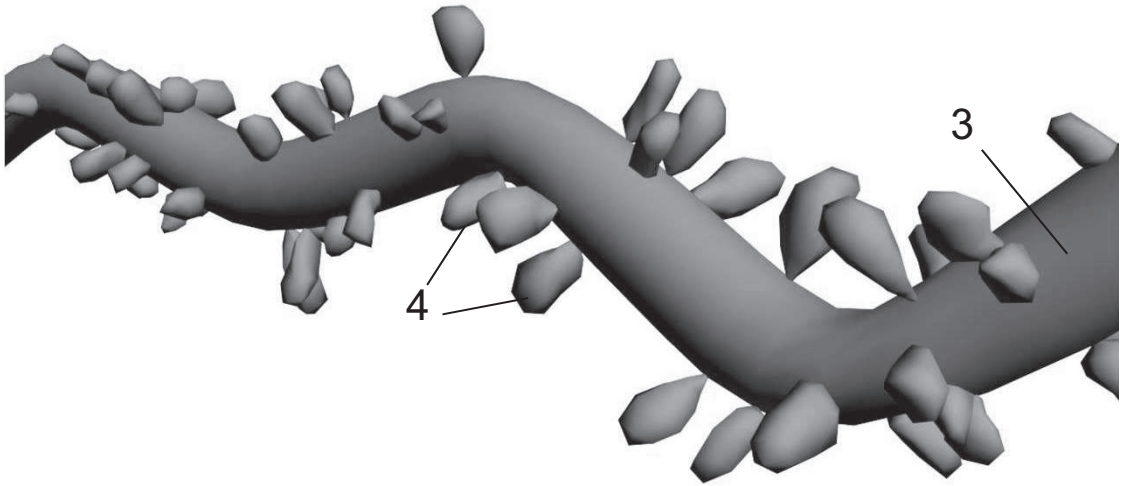


Fig. 9A

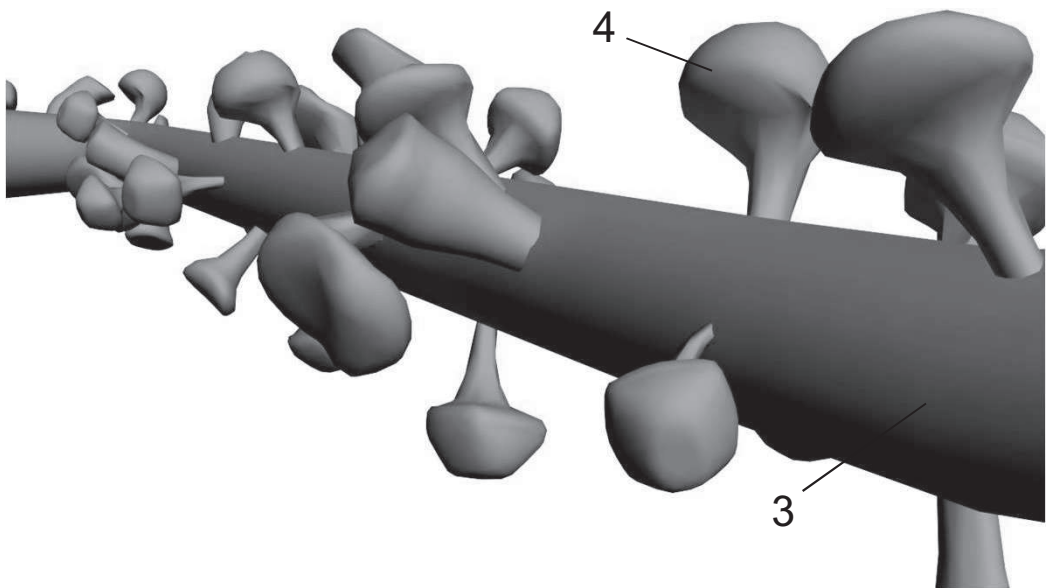


Fig. 9B

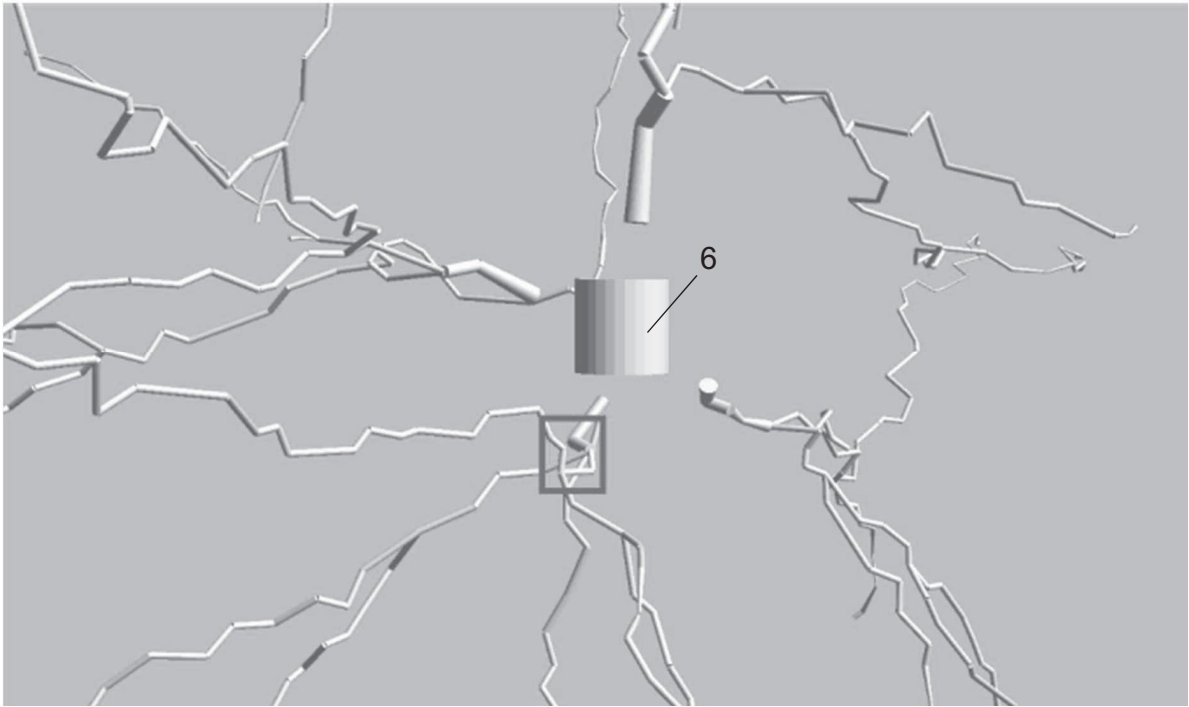


Fig. 10A



Fig. 10B

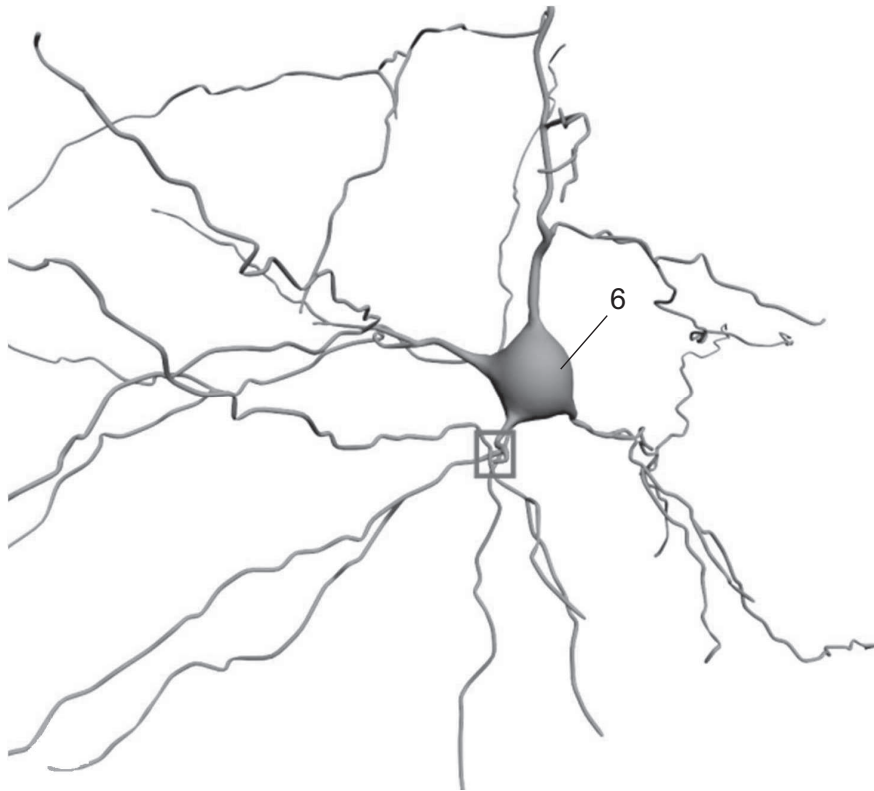


Fig. 10C

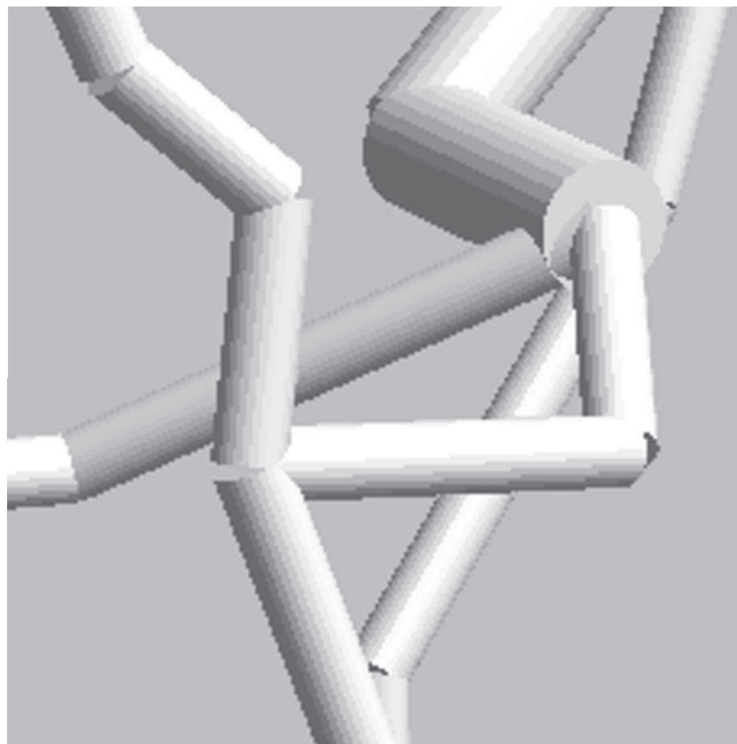


Fig. 10D

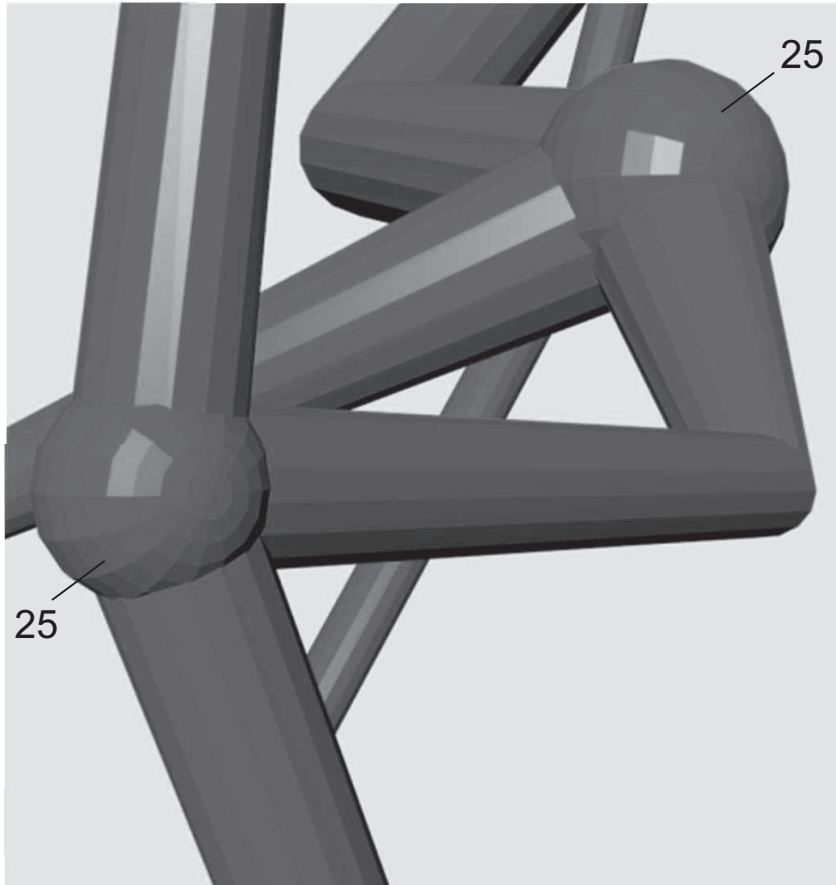


Fig. 10E

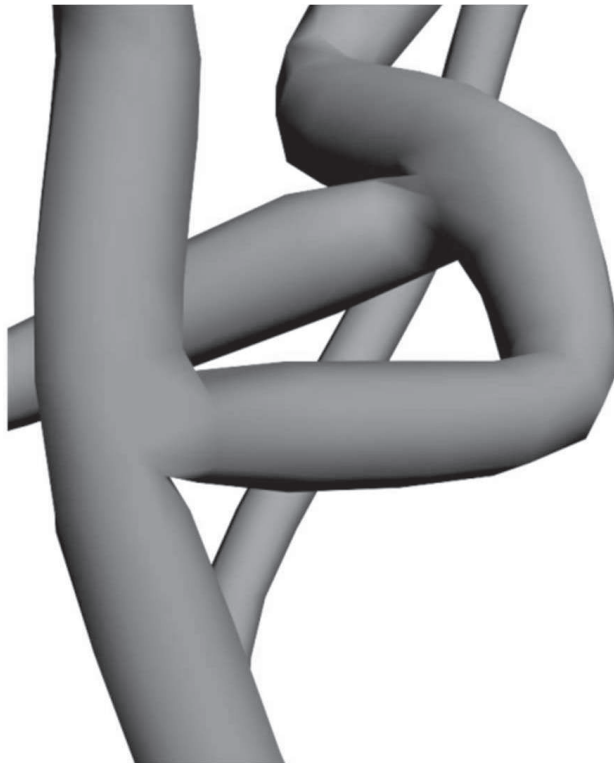


Fig. 10F

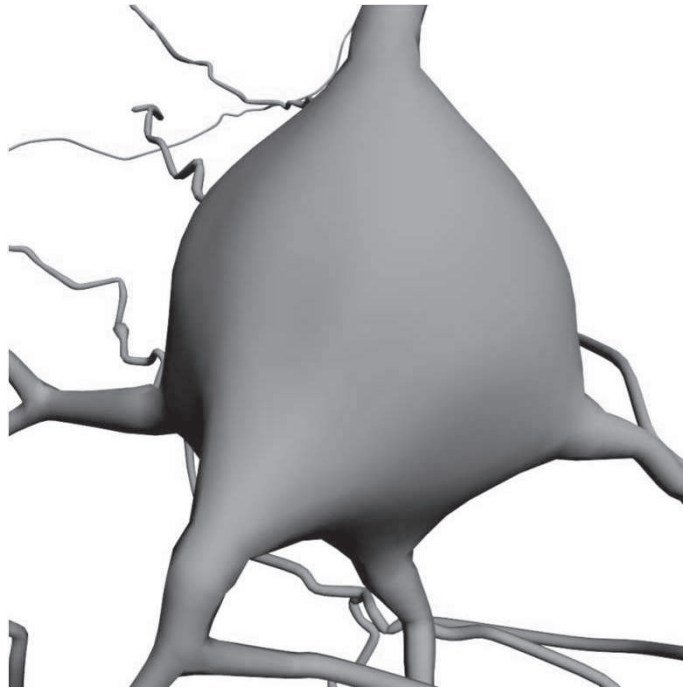


Fig. 11A

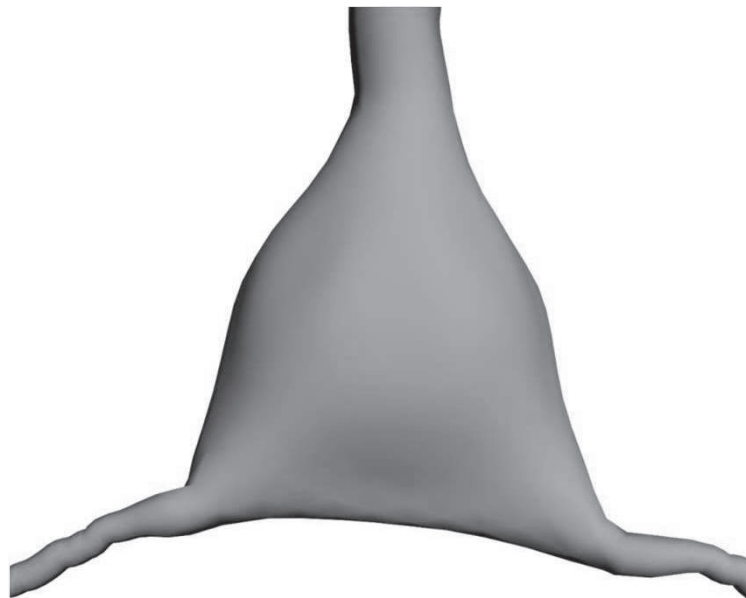


Fig. 11B

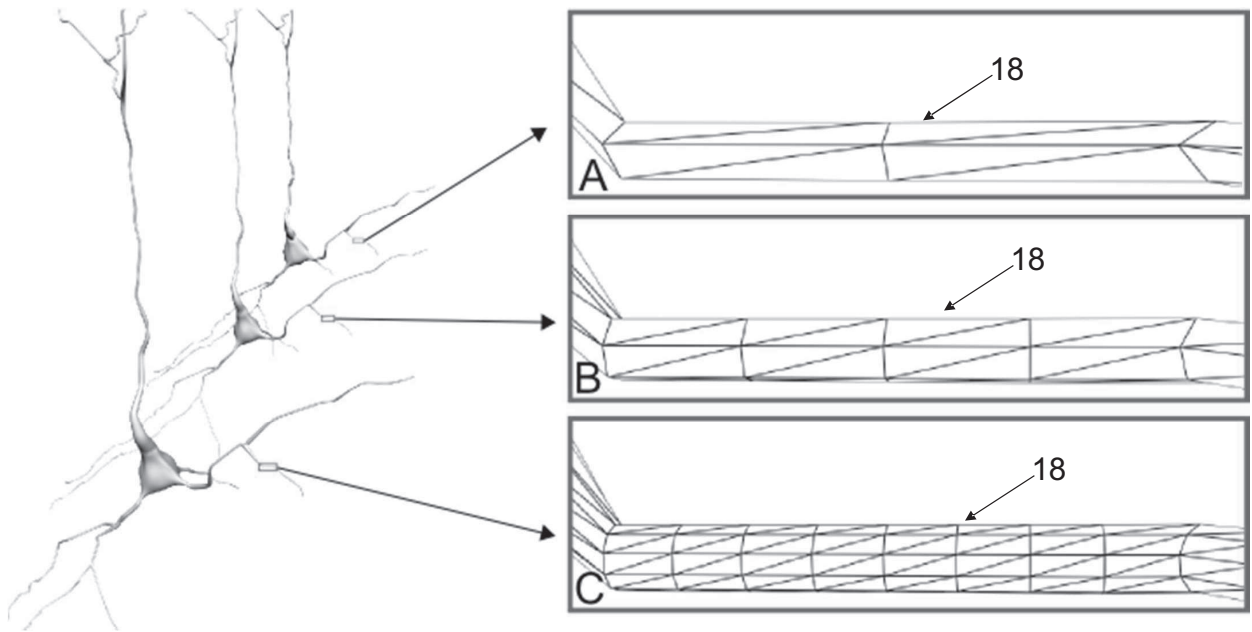


Fig. 12

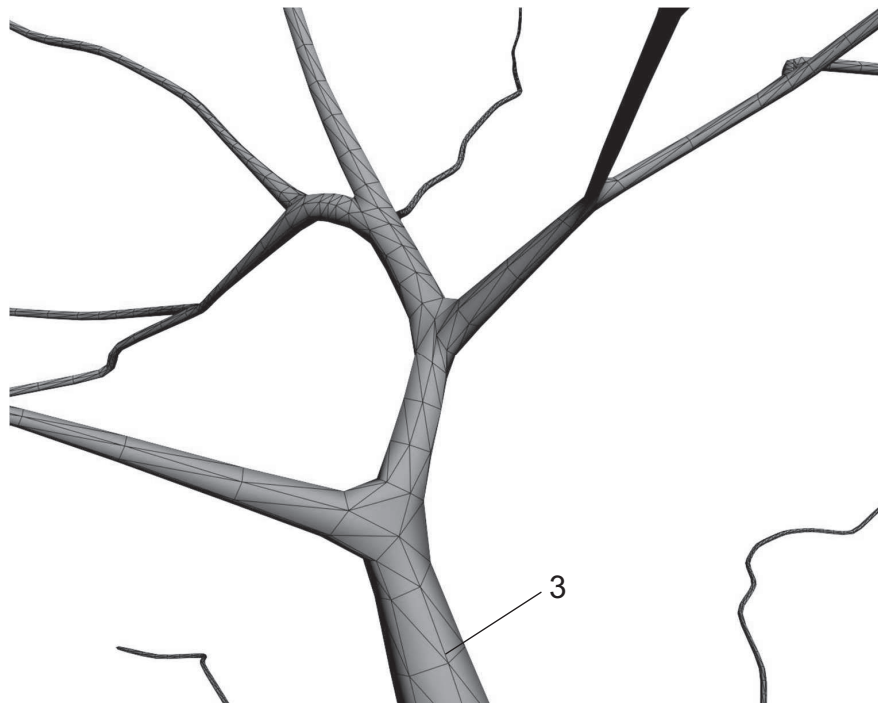


Fig. 13A

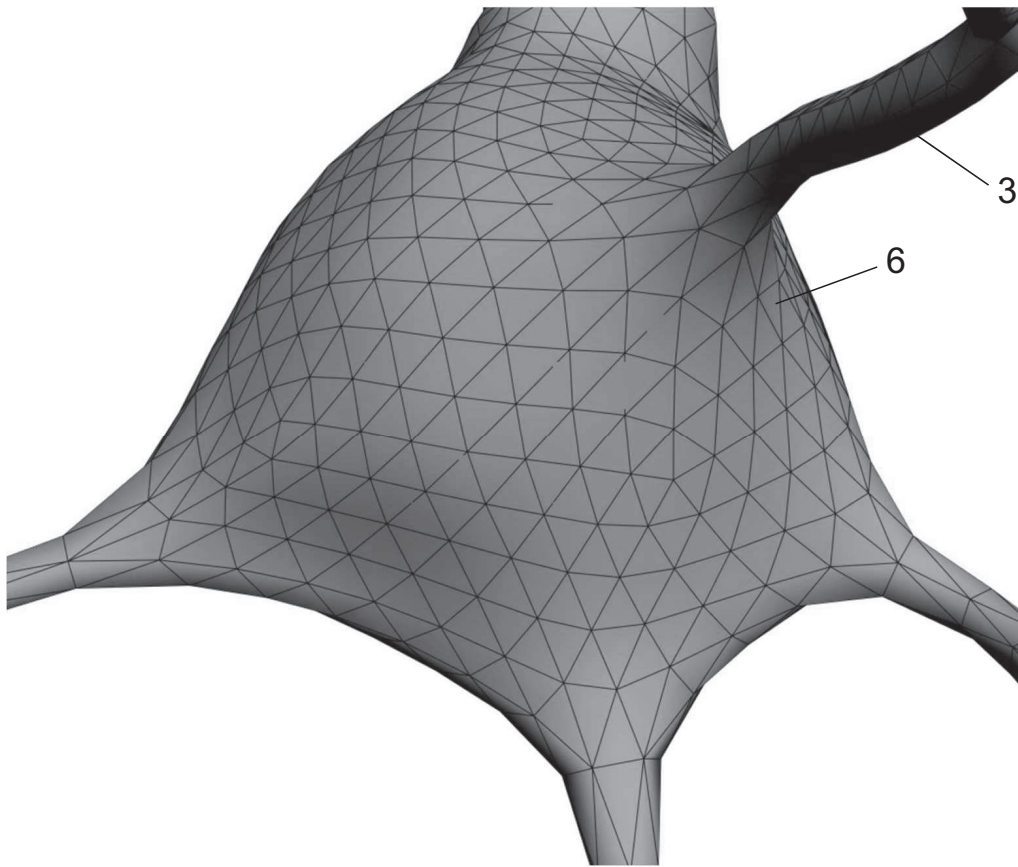


Fig. 13B

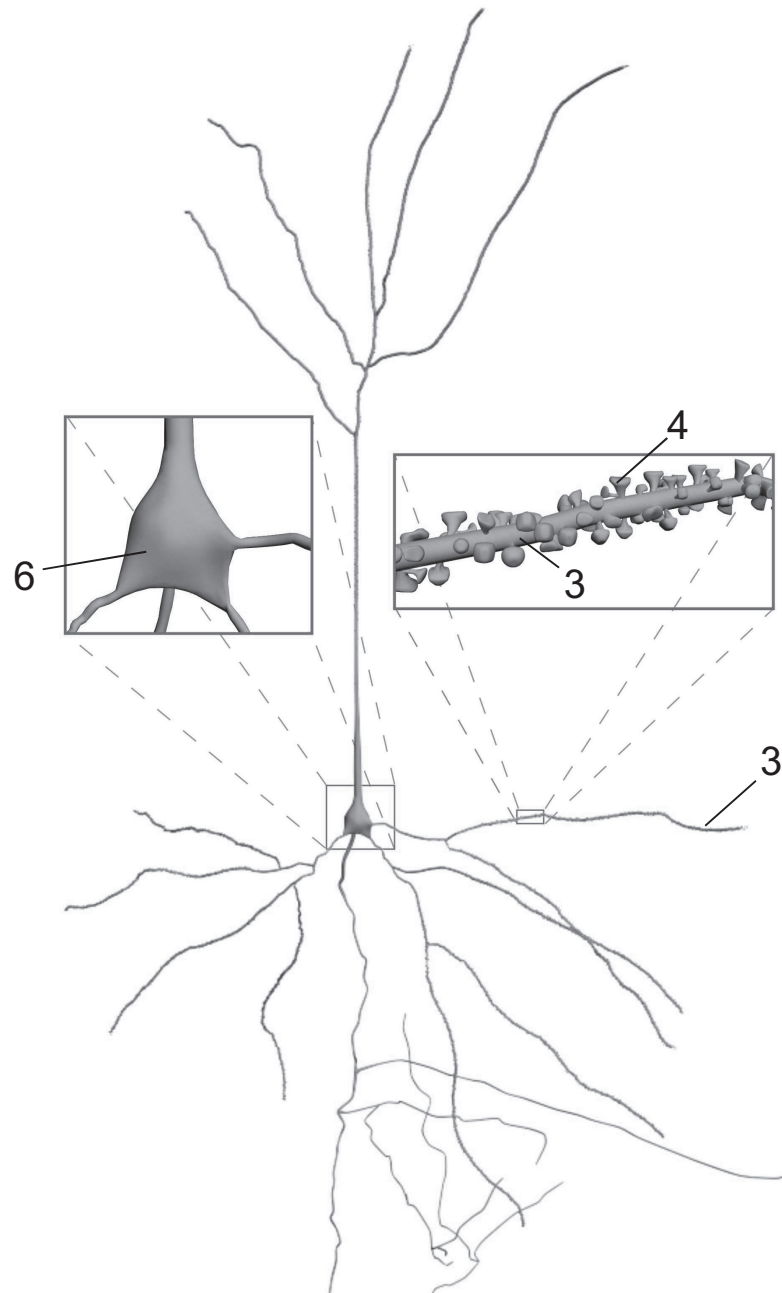


Fig. 14

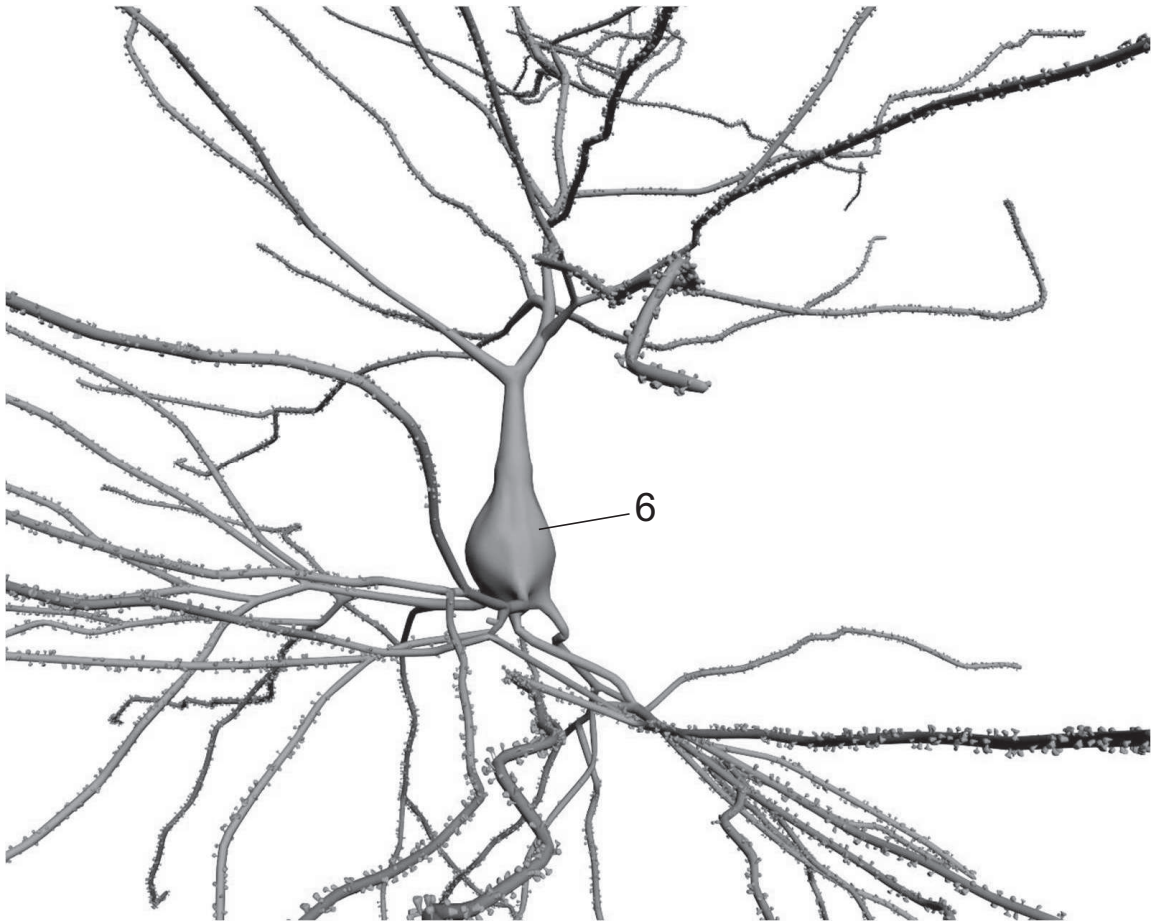


Fig. 15