



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA COMPUTACIÓN

**SISTEMA DE RASTREO TRIDIMENSIONAL DE MICRO-PARTICULAS:
APLICACIÓN EN EL RASTREO DE ESPERMATOZOIDES AL NADO LIBRE.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (COMPUTACIÓN).**

PRESENTA

M. en C. JAIME ARTURO PIMENTEL CABRERA

TUTOR:	DR. GABRIEL I. CORKIDI BLANCO,	INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.
COMITÉ TUTORAL	DR. ERNESTO BRIBIESCA, DR. FERNANDO ARÁMBULA COSÍO, DR. GABRIEL CORKIDI BLANCO,	IIMAS, UNAM. CCADET, UNAM. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.
JURADO:	DR. BORIS ESCALANTE RAMÍREZ, DR. GABRIEL I. CORKIDI BLANCO, DR. FRANCISCO GARCÍA UGALDE, DR. FERNANDO ARÁMBULA COSÍO, DR. JOAQUÍN AZPIROZ LEEHAN,	FACULTAD DE INGENIERÍA, UNAM. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM. FACULTAD DE INGENIERÍA, UNAM. CCADET, UNAM. CIIM, UAM-IZTAPALAPA.

MÉXICO, D.F. MAYO 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

- ⊗ El trabajo reflejado en esta tesis ha involucrado los esfuerzos de varias personas, a todos ellos mi más sincero agradecimiento y reconocimiento:
 - Al Dr. Gabriel Corkidi, por ser excelente maestro y mejor persona.
 - Al Dr. Alberto Darszon y al Dr. Jorge Carneiro, aunque su asesoría y apoyo han sido fundamentales, lo que principalmente agradezco es el privilegio de su ejemplo y amistad.
 - A mi comité tutorial compuesto por el Dr. Ernesto Bribiesca y el Dr. Fernando Arámbula, por su invaluable asesoría y apoyo a lo largo de varios años.
 - A los miembros de mi jurado de tesis: Dr. Boris Escalante Ramírez, Dr. Francisco García Ugalde, Dr. Fernando Arámbula Cosío y Dr. Joaquín Azpiroz Leehan, su esfuerzo e interés ha contribuido significativamente en la mejora de esta tesis.
 - Parte importante de este trabajo se debe a la contribución realizada por varias personas en el Laboratorio dirigido por el Dr. Alberto Darszon en el Instituto de Biotecnología, particularmente agradezco a Tatiana Luna por su soporte en una buena parte de la adquisición de datos experimentales y a Adán Guerrero por su asesoría en los inicios del montaje experimental.
 - Quiero también agradecer al personal administrativo del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de la Computación de la UNAM: Lulú, Diana, Cecilia, Amalia y Alvaro, su esfuerzo hace del posgrado un verdadero soporte en nuestro desarrollo.
 - Finalmente, agradezco el apoyo, comprensión y amor de mi familia: Natalia, Jorge e Itzel, para ustedes es este trabajo.

- ⊗ Esta tesis fue realizada con el apoyo de los siguientes proyectos.
 - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:
 1. Proyecto CONACYT No. **99508** a cargo del Dr. Gabriel Corkidi.
 2. Proyecto CONACYT No. **49113** bajo la dirección del Dr. Alberto Darszon.
 - Universidad Nacional Autónoma de México
 1. Proyecto DGAPA-UNAM **IN111909** bajo la dirección del Dr. Gabriel Corkidi.
 2. Proyecto DGAPA-UNAM **IN211809** a cargo del Dr. Alberto Darszon.
 - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal:
 1. Proyecto **PTDC/SAL-OBD/69928/2006** bajo la dirección del Dr. Jorge Carneiro.
 - National Institutes of Health, USA:
 1. Proyecto **NIH RO1 HD038082** a cargo del Dr. Pablo Visconti.

- ⊗ El autor; Jaime Arturo Pimentel Cabrera, agradece el apoyo brindado a través de las siguientes becas para nivel doctorado.
 - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Beca No. **21477**.
 - Universidad Nacional Autónoma de México, Beca DGAPA-PAPIIT **IN2022312**.

Sistema de rastreo tridimensional de micro-partículas: aplicación en el rastreo de espermatozoides al nado libre.

Resumen: El estudio de la dinámica exhibida por partículas microscópicas en espacios tridimensionales es un tema ampliamente abordado en diversas áreas de investigación científica y tecnológica. Al respecto, el desarrollo tecnológico de las últimas décadas ha permitido implementar sofisticados métodos de visión por computadora que han revelado procesos que por su escala espacio-temporal (micrómetros y milisegundos) habían permanecido inaccesibles. Esta nueva perspectiva ha impactado diversas áreas del conocimiento y particularmente, su aplicación en el estudio de los sistemas biológicos microscópicos ha revolucionado la forma en que se diseñan los sistemas experimentales, se analiza y se procesa la información obtenida integrando la visión por computadora y el análisis estadístico en estos procesos. En este contexto es donde se sitúa el trabajo que aquí presentamos y que consiste en un sistema automático de adquisición y procesamiento de imágenes que permite registrar, medir y caracterizar geoméricamente trayectorias simultáneas de micropartículas que se desplazan en espacios tridimensionales a velocidades de varios cientos de micras por segundo. Nuestra propuesta aprovecha algunas de las características de los patrones de difracción de luz asociados a objetos traslúcidos vistos en microscopía de campo claro para identificar con alta especificidad ($PPV \sim 98\%$) células en el contexto de las imágenes. Esta alta selectividad permite eliminar de forma automática artefactos de tamaño y apariencia similares a las células, lo que contribuye a la eficiente reconstrucción de las trayectorias tridimensionales. En su conjunto el sistema de rastreo automático de trayectorias 3D reduce en forma importante el tiempo de análisis, elimina la subjetividad implícita en la intervención manual de un usuario y permite obtener un conjunto de parámetros que caracterizan estadísticamente el nado tridimensional asociado a la población de células. En este documento describimos nuestra metodología y la contrastamos con el estado del arte en esta clase de sistemas. Durante nuestra descripción, analizaremos el caso particular del rastreo del espermatozoide de erizo marino, célula que es un paradigma en el estudio de motilidad de células flagelados o ciliados y que por su alta velocidad ($\sim 250 \mu\text{m/s}$) y reducido tamaño ($4 \mu\text{m}$) constituye un caso límite dentro de un amplio rango de casos experimentalmente relevantes. Por ejemplo, espermatozoides dirigiéndose hacia un ovulo en la fertilización, bacterias siguiendo nutrientes o evadiendo sustancias tóxicas, dispersión de bacterias para bio-remediación, la migración de neuronas o linfocitos en funciones corporales, partículas inanimadas en movimiento browniano o sometidas a dinámicas de fluidos, etc.

Palabras Clave: Sistemas Microscópicos tridimensionales, Rastreo de micro partículas en 3D, Segmentación en video.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.	1
1.2. Estructura de este trabajo.	2
1.3. Microscopia digital.	2
1.3.1. Técnicas en microscopia óptica.	10
1.3.2. Ruido en imágenes de microscopía.	14
1.3.3. Digitalización.	15
1.4. Tendencias en microscopía.	21
1.4.1. El proyecto <i>Open Microscopy Environment</i> (OME)	21
2. Rastreo de partículas microscópicas.	27
2.1. Patrones de difracción de las partículas.	27
2.2. Métodos de detección.	30
2.2.1. Reducción de ruido	30
2.2.2. Detección de partículas.	32
2.2.3. Traslapes entre objetos.	37
2.3. Rastreo de cúmulos.	37
2.3.1. Métodos no probabilísticos.	38
2.3.2. Rastreo como un problema de optimización.	40
2.3.3. Métodos probabilísticos.	42
2.3.4. Filtros en el espacio de estados.	44
2.3.5. Filtros Bayesianos de partículas.	47
2.4. Software para rastreo	49
3. Sistema experimental.	55
3.1. Sistema de Adquisición de Imágenes.	56
3.2. Análisis del error experimental.	57
3.2.1. Resonancia mecánica del piezoeléctrico.	58
3.2.2. Periodo de la oscilación real.	59
4. Algoritmo de rastreo 3D+t.	65
4.1. Caracterización de las células.	65
4.1.1. Propiedades estadísticas de los objetos.	66
4.2. El algoritmo de segmentación.	68
4.2.1. Proceso secuencial de segmentación.	69
4.3. Rastreo de trayectorias.	74
4.3.1. Precisión de las trayectorias automáticas.	74
5. Análisis de Trayectorias.	79
5.1. Caracterización estadísticas del nado tridimensional.	80
5.2. Índice de quimiotaxis en población.	81
5.2.1. Pictus.	82
5.2.2. Purpuratus.	83
5.2.3. Análisis estadístico de densidad.	84

6. Discusión y conclusiones.	89
6.1. Evaluación General del Sistema.	89
6.1.1. Sistema experimental	89
6.1.2. Algoritmo de segmentación.	91
6.1.3. El algoritmo de rastreo.	92
6.1.4. Contribución biológica	92
6.1.5. Conclusiones y perspectivas.	93
Bibliografía	95
A. Publicaciones generadas.	107

Introducción

1.1. Antecedentes.

El rastreo y análisis del movimiento tridimensional descrito por partículas microscópicas es un tópico recurrente en diversos ámbitos de investigación básica y tecnológica, por ejemplo: en sistemas de velocimetría de fluidos en reología [1, 2], en la formación de micro-estructuras multifásicas en ingeniería química o ciencias de materiales [3], en el registro de actividad neuronal simple en micro-regiones cerebrales en neurología [4, 5], o en el análisis del movimiento de células y microorganismos como función del ambiente químico en fisiología celular o bio-remediación, etc. [6–18]. Pese a importantes esfuerzos, durante mucho tiempo las dificultades técnicas involucradas en analizar sistemas tridimensionales por medio de un dispositivo de visualización basado en planos focales (como es el microscopio) han limitado el análisis a sistemas cuasi-bidimensionales donde los efectos de frontera modifican el comportamiento de los microorganismos, células o partículas respecto a las condiciones silvestres [19]. En este contexto, en años recientes se han propuesto algunas metodologías basadas en planos focales que son capaces de adquirir y reconstruir información de la dinámica tridimensional descrita por el sistema analizado [20–25]. Es entre estas propuestas donde situamos el trabajo que aquí presentamos y que consiste en un sistema automático de adquisición y procesamiento de imágenes que reconstruye trayectorias tridimensionales de micro-partículas (espermatozoides en el caso analizado) que se desplazan simultáneamente con velocidades de varios cientos de micras por segundo. Una de las componentes esenciales de nuestro sistema es el método de segmentación basado en el patrón de difracción producido por la interacción de las partículas y la luz. El método está compuesto por tres etapas de segmentación que aplicadas secuencialmente permiten detectar las células con una eficiencia muy alta, lo que simplifica notablemente el rastreo [26] y permite obtener datos precisos de trayectorias tridimensionales. El grado de automatización de nuestro sistema reduce en forma importante el tiempo de análisis, elimina la subjetividad implícita en la intervención manual de un usuario y permite procesar una gran cantidad de datos sin intervención del usuario. En estas condiciones es factible caracterizar de forma estadística algunos de los efectos que el medio ambiente y las restricciones mecánicas imponen sobre la motilidad de las partículas rastreadas, que en el caso analizado está formada por una población de espermatozoides. La elección de estas células como caso de estudio se debe por una parte a que estos gametos son un paradigma en el estudio de motilidad de células flageladas y ciliadas¹ y por otra es que dada su alta velocidad ($\sim 250 \mu\text{m}/\text{s}$ en promedio), representan un caso límite en motilidad celular. En estas condiciones, resolver los problemas de rastreo para esta célula abre un abanico de posibilidades de aplicación en un amplio rango de casos experimentalmente relevantes, por ejemplo determinar los efectos de ambientes químicos en espermatozoides humanos, analizar el movimiento de bacterias siguiendo nutrientes o evadiendo sustancias tóxicas, dispersión de microorganismos para bio-remediación, la migración de neuronas o linfocitos en funciones corporales, partículas inanimadas en movimiento browniano tridimensional, etc.

¹ Un flagelo o cilio es un apéndice móvil con forma de látigo presente en una gran variedad de organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares, como los espermatozoides. Usualmente los flagelos son usados para el movimiento, aunque algunos organismos como los coanocitos de las esponjas los utilizan para producir corrientes de agua que arrastre alimentos.



1.2. Estructura de este trabajo.

El trabajo que aquí presentamos se compone de las siguientes partes principales:

1. Introducción a la microscopía digital y a los parámetros relevantes en dispositivos de adquisición de datos orientados al análisis de sistemas microscópicos (Capítulo 1).
2. Descripción del estado del arte en algoritmos de detección y rastreo aplicados en partículas microscópicas móviles (Capítulo 2).
3. Diseño e implementación del sistema experimental para adquisición de las imágenes de microscopía que contienen la información sobre el desplazamiento tridimensional de las partículas (capítulo 3). Esta parte incluye la descripción del proceso para adquisición de datos así como de la metodología para minimizar y caracterizar el error experimental en los datos obtenidos y una breve revisión de las diferentes condiciones experimentales que conforman los diferentes ambientes químicos donde analizamos el nado 3D de los espermatozoides.
4. En el capítulo 4 abordamos el tratamiento computacional que realizamos para el procesamiento de los datos obtenidos, el diseño e implementación de un novedoso algoritmos para la detección y rastreo que se basa en las propiedades de difracción que las partículas exhiben al ser iluminadas y vistas a través de la lente de un objetivo de microscopio.
5. Enseguida, en el capítulo 5 describimos el análisis orientado a definir de forma estadística las propiedades geométricas asociadas a la dinámica del desplazamiento exhibido por la población de células en diferentes ambientes químicos. Los datos experimentales que analizamos fueron obtenidos en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Alberto Darszon, perteneciente al departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, particularmente en colaboración con la estudiante de maestría en Ciencias Biológicas Tatiana Luna.
6. Finalmente, en el capítulo 6 discutimos algunos de los aspectos de nuestra contribución al estado del arte en sistemas de rastreo 3D orientados a sistemas microscópicos y ofrecemos nuestras conclusiones generales.

Comenzaremos por definir algunos conceptos básicos en la terminología de sistemas microscópicos y la transformación de la señal analógica de las imágenes ópticas a su forma digital y describiremos además algunos aspectos frecuentes entre la relación señal ruido en imágenes de microscopía.

1.3. Microscopia digital.

Fundamentos de microscopía.

El uso y aplicación de instrumentos ópticos ha evolucionado a la par de la civilización moderna; desde registros del siglo I que indican cómo los Romanos experimentaban con vidrios transparentes de diferentes formas y grosores para enfocar los rayos de sol y producir fuego, hasta los sistemas ópticos modernos como telescopios espaciales o microscopios de altísima resolución que permiten registrar información inaccesible por varios ordenes de magnitud al ojo humano. En el contexto de microscopía, los registros históricos indican que las primeras imágenes de microscopía datan del siglo XVI cuando, instrumentistas como Antoni van Leeuwenhoek, Jan Swammerdam, Hans y Zacharias Janssen, etc, desarrollaron sistemas de lentes compuestos que los naturalistas de la época usaron para producir esquemas muy detallados de diferentes sustancias y objetos ². Posteriormente, en 1665, el físico inglés Robert Hook construyó el primer microscopio compuesto, instrumento que utilizó para examinar sangre, semen, insectos y pequeños animales

²No existen datos precisos sobre el origen de los sistemas de lentes compuestos que anteceden al primer microscopio (*micron* o pequeño y *skopein* mirar hacia), sin embargo, se reconoce a Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723) como el primero en llamar la atención de los naturalistas de su época hacia los sistemas de lentes compuestos que son los precursores de este instrumento.

nadando al interior de gotas de agua. El conjunto de estas observaciones fueron ilustradas y reproducidas en una colección de imágenes publicadas en su libro *Micrographia*. Hasta ese momento, ninguno de estos dispositivos fabricados contaba con algún sistema de proyección o medio que facilitara el registro de la imagen observada. Es hasta 1835 que William Henry Fox Talbot diseñó un proceso basado en emulsiones químicas que permitía capturar foto-micrografías con una baja magnificación. En los años siguientes, entre 1830 y 1840, ocurrió un explosivo crecimiento en la aplicación de esta clase de emulsiones para registrar imágenes microscópicas y desde entonces, tanto los sistemas ópticos como el registro de información han evolucionado de forma sorprendente, corrigiendo diferentes problemas ópticos e implementando mejoras tecnológicas en los sistemas de adquisición de datos (Figura 1.1). Aunque ha existido una gran evolución en los instrumentos orientados a microscopia óptica, los principios teóricos básicos siguen siendo los fundamentos de los dispositivos modernos, fundamentos que abordaremos brevemente en la siguiente sección.

Sistemas de lentes compuestas.

El ojo humano es un sistema óptico capaz de percibir y transformar luz en información espacio-temporal del entorno. Dentro de sus capacidades, las células foto-receptoras son sensibles al color y a la intensidad de la luz, pudiendo percibir luz en una porción del espectro electromagnético que va del violeta al rojo pasando por verde, amarillo y naranja, dejando fuera espectro en el ultravioleta y el infrarrojo y siendo capaces de detectar diferencias en brillo o intensidad que van del blanco al negro y todo el espectro intermedio de grises. Estas células se encuentran localizadas en la retina y se conocen como células cónicas y bastones (Fig. 1.2). Para que el ojo humano registre una imagen claramente, la luz incidente debe poder estimular (por encima de un umbral) a una cierta cantidad de células lo suficientemente dispersas para lograr una resolución espacial significativa. El ojo humano normal posee tres clases de células cromo sensibles (conos), las primeras responden a longitudes de onda cercanas al rojo (564–580 nm) y se denotan como conos largos **L**, el segundo tipo responde a longitudes de onda intermedias centradas en el verde (534–545 nm) y se denotan como células medianas **M**, finalmente el tercer tipo es estimulado por luz de longitud de onda cercana al azul (420–440 nm) y se denominan células pequeñas (**S**). Los tres tipos de células proveen detectores suficientes que en combinación permiten al cerebro implementar un sistema de visión a color. Por su parte, los bastones son fotosensibles a longitudes de onda centradas en 498 nm, entre las bandas de detección de las células **S** y **M**. Para que el ojo humano pueda reconstruir una imagen apropiadamente, la luz que la compone debe poseer suficiente contraste entre los detalles que la forman, debe foto-activar células en un ángulo visual amplio y debe poseer una densidad que permita la resolución espacio-temporal del detalle asociado al objeto representado. Al respecto, existe una escala para medir la resolución angular del ojo humano llamada escala de ciclos por grado (CPD). Para definirla, considérese un patrón de franjas de 1.75 cm de ancho colocado a 1 m de distancia del ojo observador, en estas condiciones el ángulo subtendido por el patrón completo es de 1 grado, y el número de franjas que el patrón posee determina los ciclos por grado máximo que este patrón posee. Para medir la agudeza visual de cada observador se coloca un patrón estándar a cierta distancia y se le pide que determine el número de franjas que puede distinguir, el número reportado define la agudeza visual del observador. Un ojo humano con una agudeza visual ideal tendrá una resolución teórica de 50 CPD (1.2 minutos de arco por par de franjas o 0.35 mm a 1 m), una rata puede resolver solamente 1 o 2 CPS mientras que un ojo de caballo posee una resolución espacial más alta que el humano aunque no es homogéneamente distribuida³. La aberración esférica asociada al grupo de lentes en una pupila de 7 mm limita la resolución a cerca de 3 minutos por arco, mientras que una reducción a 3 mm disminuye la aberración logrando una resolución de 1.7 minutos por par de líneas. Una resolución de 2 minutos de arco por par de líneas equivalente a 1 minuto de arco corresponde a una visión 20/20 (normal) en humanos, debido a la limitada capacidad de deformación, los objetos muy cercanos a la pupila no pueden enfocarse adecuadamente en una distancia menor a 10 pulgadas o 25 centímetros. El uso y aplicación de instrumentos ópticos ha permitido acceder a información en escalas micro y macroscópicas fuera de esta escala, por supuesto el empleo de estos instrumentos para registrar la información modifica su naturaleza, convirtiéndola en una representación de la información original. En estos términos, la fidelidad a la información original se condiciona por tres factores específicos: la capacidad del instrumento para coleccionar la información deseada, la fidelidad con la

³<http://www.olympusmicro.com/>



Figura 1.1: 1:Microscopio compuesto inventado por Robert Hook en 1660: permite enfoque y ajuste del tamaño del campo visual. La iluminación es provista por una lámpara de aceite como fuente, un depósito esférico de agua como difusor y un juego de lentes como condensador. El prototipo sufría de aberraciones cromáticas y esféricas que producían imágenes con “halos” azules y rojos. 2:Microscopio simple creado en 1660 por Anton von Leeuwenhoek usado para ver células simples de animales (llamadas “animaculas”) y bacterias. 3:Modelo de microscopio creado en los inicios de 1600 atribuido a los hermanos Janssen en Holanda y a Galileo en Italia; en su forma simple consiste de dos lentes convexas alineadas en serie. 4:A finales de 1800 prosperaron fabricantes Ingleses y Alemanes entre los que se encuentran Hugh Powell y Peter Lealand que en 1850 produjeron un microscopio soportado por un trípode, el más avanzado de su época. 5:En los inicios del siglo 20 se implementa la forma mono ocular, la geometría basada en un brazo, partes móviles e iluminación con espejos. 6:Microscopio de investigación Olympus Provis AX70, representa el estado del arte en diseño y accesorios. Incluye fuentes de luz concurrentes, prismas, divisores de haz, condensadores. La geometría de “Y” proporciona comodidad al observador. Imágenes tomadas de <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/introduction.html>

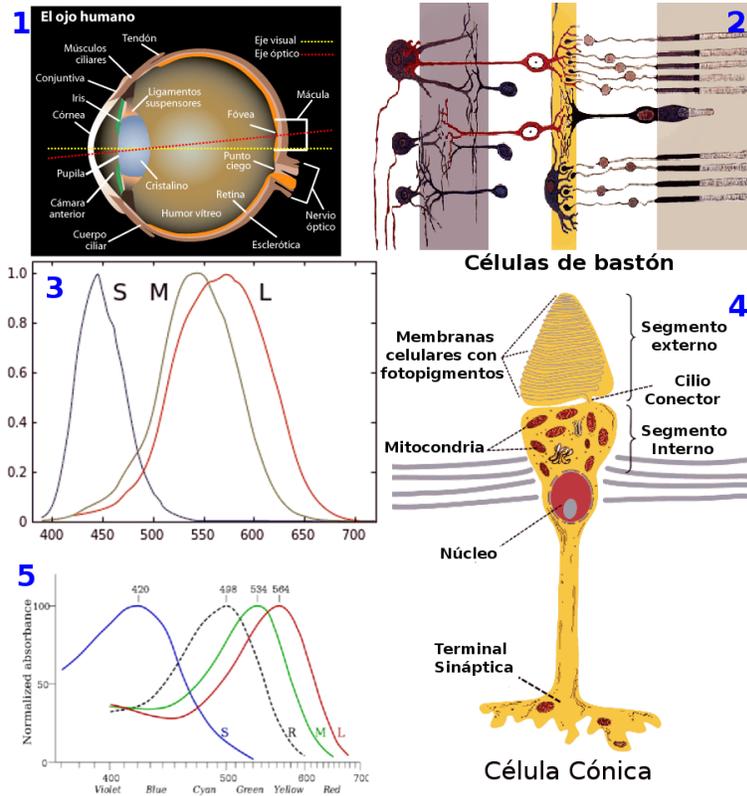


Figura 1.2: 1: Esquema de estructura ocular que incluye componentes para enfocar la luz sobre las células sensitivas. 2: Corte de retina que ilustra la estructura de los bastones, células responsables de la foto-sensibilidad a la intensidad. 3: Sensibilidad normalizada de células cónicas de tipo S, M, y L como respuesta a longitud de onda. 4: Estructura de células cónicas de la retina, células foto-sensibles a la longitud de onda. 5: Respuesta a estímulos luminosos en función de la longitud de onda para tres tipos de conos (línea continua) y bastones (curva segmentada).

que representa la información original y la habilidad del usuario para explotar la capacidad instrumental. Al respecto, enseguida mencionaremos brevemente algunos conceptos elementales relacionados al instrumento que es la base de nuestro sistema experimental de adquisición, el microscopio óptico. La formación de una imagen por medio de un sistema de lentes compuestas sigue un principio básico conocido como **refracción**. En su forma básica, este concepto describe la manera en que la luz proveniente de una fuente incide sobre una superficie y, al atravesar el material, cambia en velocidad y dirección. En la Fig. 1.3 se ilustra la forma en que una onda esférica de luz diverge de una fuente puntual para incidir y refractarse en la superficie de una lente convexa que la transforma en una onda esférica convergente que produce una mancha o punto pequeño en el plano de la imagen. La forma de este punto se denota como función de dispersión puntual (psf) y su tamaño mínimo se logra con el sistema enfocado, esto es, si se cumple la ecuación de lentes,

$$\frac{1}{d_f} + \frac{1}{d_i} = \frac{1}{f},$$

donde f es la longitud focal de la lente. Esta longitud es una propiedad intrínseca de cualquier lente y se puede medir bajo dos consideraciones,

$$\begin{aligned} d_f \rightarrow \infty &\Rightarrow d_i = f \\ d_i \rightarrow \infty &\Rightarrow d_f = f. \end{aligned}$$

La potencia de la lente, P está dada por $P = 1/f$ y cuando f se mide en metros P se reporta en dioptrías. Por definición el plano focal es el plano donde se forma la imagen compuesta por la información proveniente de la fuente de luz. En el caso donde la fuente puntual está desplazada respecto al origen del eje de simetría del sistema hacia una nueva coordenada (x_0, y_0) , la nueva posición de la imagen enfocada también corresponderá a una nueva coordenada (x_i, y_i)

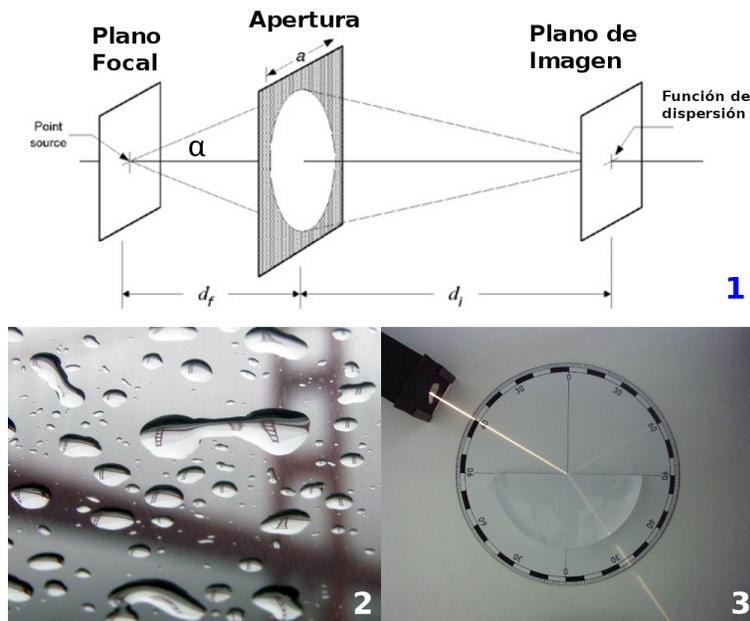


Figura 1.3: **1:** Principio de refracción que ilustra la forma en que una lente deforma un haz de luz proveniente de una fuente puntual para proyectarla en un plano que forma la imagen. **2:** Ejemplo de refracción que muestra la manera en que gotas de lluvia refractan la imagen de fondo del puente Golden Gate. **3:** Haz de luz láser refractada (haz inferior) y reflejada (haz superior) por un elemento de polímero graduado.

definida como,

$$\begin{aligned}x_i &= M x_0 \\y_i &= M y_0 ,\end{aligned}$$

donde M es la magnificación del sistema óptico. Frecuentemente la imagen producida por el sistema óptico se proyecta directamente en el sensor del dispositivo de adquisición, en esta situación el espaciado entre píxeles se combina con la magnificación para producir una resolución espacial máxima. Por ejemplo, si el sensor de la cámara tiene un espaciado entre píxeles de $6.8 \mu\text{m}$, cualquier objeto visto bajo un lente de magnificación $100\times$ tendrá un espaciado efectivo de $6.8 \mu\text{m}/100 = 68 \text{ nm}$. Cualquier lente en el camino óptico entre el objeto observado y el sensor puede modificar la dimensión registrada, en este sentido, en vez de la magnificación, es usual reportar el tamaño del píxel en la imagen registrada así como es común que alguna de las distancias d_i o d_f estén fijas o restringidas a un intervalo. Es posible interpretar el manejo de la señal original como un conjunto de transformaciones aplicadas sobre la señal original (Fig. 1.4.).

Apertura numérica, aberraciones y PSF lineal.

Usualmente para caracterizar un sistema óptico asociado a un microscopio no se usa su distancia focal ni su diámetro de apertura, en lugar de esto se reportan su magnificación M y su apertura numérica NA definida como,

$$NA = n \sin(\alpha) \approx n \left(\frac{a}{2d_f} \right) \approx n \left(\frac{a}{2f} \right) .$$

donde n es el índice de refracción del medio entre la fuente de luz (aire, agua, aceite) y el espécimen observado. El ángulo $\alpha = \arctan\left(\frac{a}{2d_f}\right)$ se mide entre el eje óptico y un rayo marginal que va de la fuente puntual al borde de la

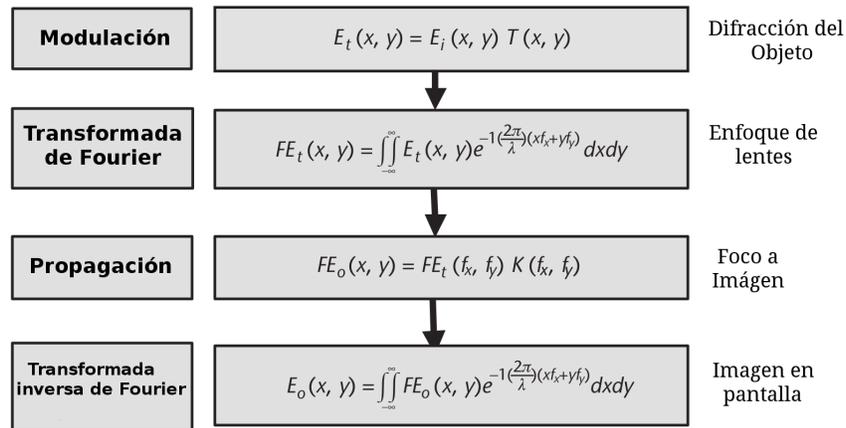


Figura 1.4: La formación de una imagen en microscopía de transmisión se compone en base a la luz difractada por la muestra, luz que se colecta en las lentes del objetivo y es propagada en el espacio para colapsar en una pantalla para formar la imagen final.

la apertura. Las aproximaciones indicadas presuponen una apertura pequeña y una amplificación grande, condiciones que pueden fallar con sistemas ópticos con larga distancia focal f y pobre apertura numérica (situación poco común). Para lentes esféricas con distancia focal mucho mayor a su apertura, la ecuación que relaciona la distancia focal con el radio de curvatura de las lentes se conoce como la *ecuación del fabricante de lentes*.

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right).$$

donde n es el índice de refracción del material de la lente y R_1 y R_2 son el radio de curvatura de las superficies de las lentes. Cuando esta curvatura es de magnitud comparable a la distancia focal, aparecen distorsiones en la imagen formada conocidas como aberraciones esféricas, estas distorsiones se asocian a las deficiencias que la lente tiene para reproducir una onda esférica convergente en el punto de enfoque, deficiencia que repercute en una **PSF** menos localizada que la teórica. Cuando un sistema reproduce idealmente esta onda esférica a partir de luz divergente se denomina sistema óptico limitado por difracción, sistemas que son abstracciones teóricas a las que los sistemas reales sólo se aproximan.

Además de las aberraciones geométricas, un sistema óptico está caracterizado por su respuesta a ligeras modificaciones en la posición y magnitud de la fuente puntual, aquellos que no se modifican significativamente se denominan sistemas lineales y pueden ser caracterizados por su PSF asociada y su función de transferencia, función que se define como la transformada de Fourier de la PSF. Adicional a los efectos geométricos descritos, existen los efectos asociados a fuentes de luz incoherentes que usualmente son descritas como fuentes independientes con fases sin correlación estadísticamente significativa. Los sistemas ópticos de los microscopios modernos funcionan con diversas fuentes de luz que van de longitudes de onda entre 350 nm (ultravioleta) hasta 1100 nm (cercano al infrarrojo).

PSF y OTF coherentes e incoherentes.

Para lentes con apertura circular de diámetro a que difractan luz, un sistemas ópticos lineales de PSF circular tiene dos expresiones asociadas:

■ $h(r) = \left[2 \frac{J_1\left(\pi \frac{r}{r_0}\right)}{\pi \frac{r}{r_0}} \right]^2$. Fuentes incoherentes.

$$\blacksquare h(r) = 2 \frac{J_1\left(\pi\left[\frac{r}{r_0}\right]\right)}{\pi\left[\frac{r}{r_0}\right]}. \quad \text{Fuentes coherentes de luz.}$$

donde J_1 es la función de Bessel de primer orden del primer tipo, $r_0 = \lambda d_i/a$ es un factor a dimensional y la variable r es la variable radial en coordenadas cilíndricas. La intensidad descrita por esta función se conoce como *patrón o discos de Airy*. La correspondiente función de transferencia óptica (OTF) para el caso de fuente de luz incoherente centrada en la longitud de onda λ se define de la forma:

$$H(q) = \begin{cases} \frac{2}{\pi-2} \left\{ \cos^{-1} \left[\frac{q}{f_c} \right] - \sin \left[\cos^{-1} \left(\frac{q}{f_c} \right) \right] \right\} & q \leq f_c \\ 0 & q \geq f_c \end{cases},$$

donde, q es la variable radial en el espacio de frecuencias y el parámetro $f_c = 1/r_0 = a/\lambda d_i$ se conoce como *frecuencia óptica de corte*. En el caso de luz coherente de longitud λ que pasa por una abertura de diámetro a , la OTF asociada es de la forma,

$$H(q) = \Pi\left(q \frac{\lambda d_i}{a}\right), \quad \text{donde:} \quad \Pi(q) = \begin{cases} 1 & |q| < \frac{1}{2} \\ 0 & |q| > \frac{1}{2} \end{cases}.$$

Resolución espacial.

Uno de los parámetros más importantes de la óptica de un microscopio es su resolución óptica, parámetro que se relaciona con la habilidad para reproducir los detalles estructurales de la muestra o espécimen y se define como la distancia mínima tal que dos objetos diferentes pueden distinguirse entre sí, o dicho de otra manera, la distancia mínima donde el traslape de las PSF's comienza a ser significativo. Aunque no hay una forma única de medir esta distancia, existen dos criterios comúnmente utilizados para determinar la resolución de un sistema óptico:

Distancia de Abbe. La primera aproximación se conoce como distancia de Abbe y se define como el diámetro medido cuando la amplitud del pico central del la PSF es la mitad de su amplitud máxima,

$$r_{Abbe} = \frac{1}{M} \lambda \frac{d_i}{a} = \lambda \frac{d_f}{a} \approx \frac{\lambda}{2 NA} = 0.5 \left(\frac{\lambda}{NA} \right).$$

Distancia de Rayleigh. Para sistemas de lentes con apertura circular, el primer cruce por cero de la PSF ocurre en un radio que se conoce como radio del disco de Airy. De acuerdo al criterio de Rayleigh para resolución, dos fuentes puntuales pueden resolverse entre sí siempre y cuando su distancia sea menor o igual al radio de Airy. En términos de óptica, la distancia de Rayleigh define la unidad mínima de resolución circular de la imagen, tal que dos objetos que estén dentro de ese radio no podrán ser distinguidos.

$$r_{Airy} = 1.22 r_0 = 0.61 \left(\frac{\lambda}{NA} \right),$$

cuando la apertura numérica del condensador NA_{cond} es mayor o igual que la apertura de objetivo $\geq NA_{obj}$ (como en microscopía de fluorescencia o microscopía de campo oscuro). Por otro lado,

$$r_{Airy} = 1.22 \frac{\lambda}{NA_{cond} + NA_{obj}},$$

cuando NA_{cond} es menor que NA_{obj} , como en el caso de campo claro, DIC o microscopía de contraste de fases. Una resolución típica para sistemas ópticos está dada por $r_{Airy} = 260 \text{ nm}$ que es límite superior a objetos como moléculas u órganos intracelulares, pese a que es posible implementar algunas técnicas especiales para tratar de resolver objetos por debajo de estas dimensiones, es prácticamente imposible obtener las dimensiones correctas.

Resolución en profundidad. Además de la resolución lateral, las imágenes en microscopía poseen una resolución finita en Z dada por,

$$Z = \frac{n \lambda}{NA_{obj}^2}$$

donde n es el índice de refracción del medio entre las lentes y el objeto y Z define la magnitud o distancia en la profundidad durante la cual el objeto se mantiene “en foco”, dicho de otra manera, es el “grosor” del plano focal mismo.

Cromática de la resolución. Para hacer el calculo de la resolución del sistema óptico es deseable utilizar información proveniente del plano focal, en este sentido, para un objetivo de microscopio, la frecuencia óptica de corte en el sistema de coordenadas del plano focal es,

$$f_c = \frac{Ma}{\lambda d_i} = \frac{a}{\lambda d_f} = \frac{2 NA}{\lambda},$$

la distancia de Abbe,

$$r_{Abbe} = \frac{1}{M} \lambda \frac{d_i}{a} = \lambda \frac{d_f}{a} \approx \frac{\lambda}{2 NA} = 0.5 \left(\frac{\lambda}{NA} \right),$$

y la distancia de Rayleigh o radio de unidad mínima,

$$\delta_{Rayleigh} = 1.22 r_0 = 0.61 \left(\frac{\lambda}{NA} \right).$$

Cuando $\lambda = 0.5 \mu m$ (luz verde) y $NA \sim 1.4$ (objetivo de inmersión con lentes de alta calidad), se obtienen los siguientes valores: $f_c = 5.6 \text{ ciclos}/\mu m$, $r_{Abbe} = 0.179 \mu m$ y $\lambda_{Rayleigh} = 0.218 \mu m$. Esta aproximación deja de ser útil en el intervalo de baja potencia y alta NA, sin embargo, esta combinación es poco común.

Distancia de Rayleigh.

Calibración espacial.

Para estimar la distancia física representada por el espaciamiento entre píxeles de una imagen es posible usar la información relacionada al sistema óptico global. En este sentido, la siguiente expresión permite relacionar algunos de los parámetros relevantes,

$$\delta_x = \frac{\Delta x}{M_0 M_a}$$

donde Δx es el espaciamiento en el sensor de la imagen, δ_x el espaciamiento físico en el objeto medido, M_0 es la magnificación del objetivo y M_a la magnificación asociada al resto de los componentes ópticos como adaptadores de cámara. No obstante estos parámetros, la forma más práctica de determinar la escala espacial es usar una referencia calibrada para determinar el tamaño del píxel en la imagen resultante, esto es,

$$\delta_x = \frac{D}{\sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}},$$

donde, δ_x es el tamaño del píxel, D es el tamaño del patrón medido y (x_i, y_i) denotan las coordenadas de los píxeles usados para determinar la escala.

Brillo y contraste. En un sistema microscópico moderno, la magnificación total incluye los efectos del objetivo y de las lentes, esto es, $M = M_o \times M_e$, en estas condiciones la brillantez B de la imagen se relaciona con la apertura numérica NA de la siguiente manera $B \propto \left(\frac{NA}{M}\right)^2$ para microscopía de transmisión.

Hasta ahora es claro que parámetros de la imagen como magnificación, resolución y brillo dependen de la combinación de lentes empleada, sin embargo, otro factor clave es la técnica de iluminación elegida. Por ejemplo, para acentuar el contraste en una imagen producida por un sistema de iluminación por transmisión pueden tomarse dos vías: 1) explotar la capacidad del ojo humano para distinguir entre colores, 2) modular la intensidad de forma que las heterogeneidades espaciales se traduzcan en variaciones perceptibles al ojo. Al respecto pueden aprovecharse diferentes propiedades ópticas como son; absorción, variabilidad espacial del índice de refracción, dispersión, bi-refringencia, fluorescencia, etc. La combinación de factores a elegirse depende totalmente de cada caso en particular, por ejemplo, una apertura numérica grande resulta en un incremento de resolución, sin embargo, disminuye el contraste y aumenta el riesgo de acentuar aberraciones asociadas a iluminación no-paraxial. Por otro lado, para conseguir contraste por medio del color es usual el empleo de pigmentos y colorantes en el caso de microscopía de campo claro o fluoroforos en el caso de fluorescencia, que sean afines a elementos específicos de la muestra.

1.3.1. Técnicas en microscopía óptica.

El interés generado por el estudio de estructuras y dinámicas presentes en sistemas microscópicos ha impulsado el desarrollo de una gran diversidad de técnicas de microscopía que, diseñadas para resolver situaciones específicas, han evolucionado para resolver problemas cada vez más sofisticados. Al respecto, en esta sección haremos una breve descripción de algunas técnicas básicas de microscopía óptica.

1.3.1.1. Microscopía de contraste de fases.

La microscopía de contraste de fases es un método frecuentemente usado para el análisis de muestras translúcidas por ejemplo, células vivas o fijadas. La técnica se basa en una observación plantada por F. Zernike en 1955 [27] que hizo notar que la luz difractada por un objeto no absorbente posee un corrimiento de fase de $\lambda/4$. Esta técnica utiliza un disco condensador especial y un anillo complementario para ajuste de fase (Fig. 1.5.a) para, por medio de interferencia, lograr aumentar el contraste de los bordes de muestra, esto se logra de la siguiente manera. La luz difractada o dispersada que pasa por fuera del anillo de fase no sufre cambio de fase mientras que por la presencia del disco de fase, bajo esta configuración la luz que pasa por la muestra tiene un retraso relativo de $\pm\lambda$ respecto a la luz que no es difractada, cuando ambos haces de luz interfieren en el plano de la imagen se forma un patrón de interferencia que guarda correspondencia con la geometría del espécimen, resaltando los bordes y oscureciendo el resto, el resultado son imágenes de contraste invertido y son de baja intensidad. Un efecto secundario es que la polarización de la luz puede disminuir en algún grado la apertura numérica efectiva del sistema óptico, lo que resulta en una reducción de la resolución espacial, este efecto hace que el contraste de fases sea poco efectivo para resolver objetos muy delgados, por ejemplo capas de células apiladas en multi-capas. Cabe mencionar que el método de contraste de fases mejora utilizando luz monocromática (verde).

Microscopía de campo oscuro.

El principio utilizado en esta técnica consiste en hacer que la luz colectada por el objetivo del microscopio corresponda solamente a luz refractada, reflejada o difractada por la muestra, para lograrlo se utiliza un disco de fase como el 1.5.b que elimina la componente principal del haz de luz central dejando la componente residual. Alternativamente, la iluminación de campo oscuro se puede lograr usando condensadores especiales, como condensadores de campo oscuro de Abbe que usan un cono hueco de luz para iluminar la muestra y cumplen que $NA_{cond} \gg NA_{obj}$. En esta clase de microscopía el fondo de la imagen es por supuesto oscuro y los objetos generan un alto contraste, pudiendo inclusive visualizarse objetos por debajo de resolución espacial ($\sim 200\text{ nm}$), esta sensibilidad a las heterogeneidades puede resultar inconveniente si existen componentes ópticos sucios o polvo en la preparación ya que se generarán

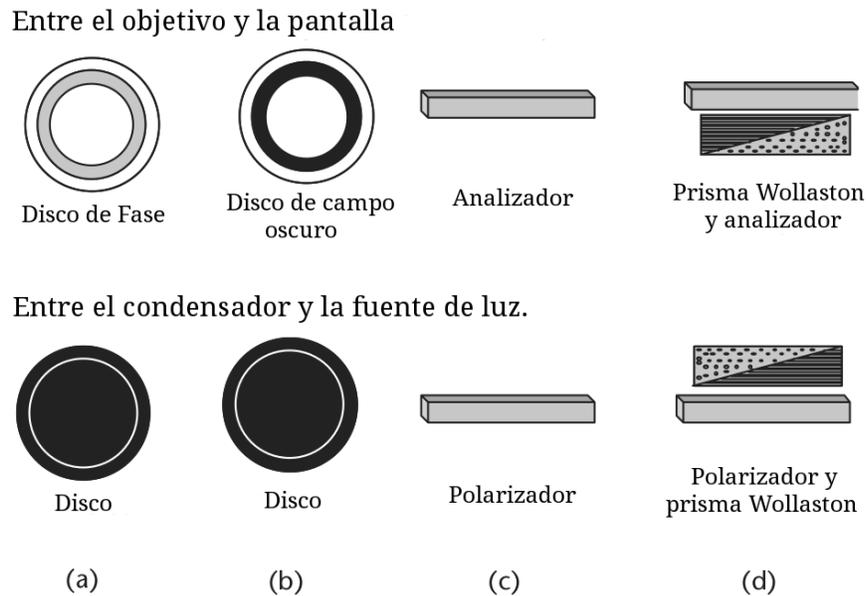


Figura 1.5: Elementos ópticos usados para generar contraste en imágenes de microscopía: (a) contraste de fases, (b) campo oscuro, (c) polarización, y (d) microscopía DIC o Nomarsky. Los elementos del renglón inferior de cada conjunto se usan para preparar la luz previo a que incida sobre la muestra, por ejemplo, el disco condensador en (a) y (b) se usan para que la luz que ilumine la muestra siga la geometría de cilindro hueco, mientras que el polarizador en (c) y (d) polarizan la luz que se usa para iluminar la muestra. Los elementos del renglón superior se coloca entre el objetivo y la pantalla de proyección de imagen y se usan para realizar el contraste en el patrón de difracción formado cuando se reduce -como en el caso (a)-, o se bloquea -como en el caso (b)- la luz que no fue refractada, polarizada o en general, modificada por la interacción con la muestra -como en (c) y (d)-.

sombras y contraste. Por su naturaleza, la iluminación de campo oscuro no es útil para revelar detalles estructurales internos de los espécimenes.

Microscopía de polarización.

Esta técnica está basada en el uso de luz polarizada, que es luz restringida a oscilar en un plano ⁴ y que se obtiene por refracción de luz en materiales como cristales de calcita. Para implementar esta técnica se coloca un cristal denominado polarizador entre el condensador y el objetivo de forma que toda la luz que llegue a la muestra esté polarizada, una vez que la luz interactúa con la muestra se hace incidir sobre un segundo polarizador, comúnmente denominado analizador, cuyo eje óptico está girado un ángulo θ respecto al del primer polarizador (1.5.c). En esta configuración la intensidad de la luz transmitida se define de acuerdo a la ley de Malus,

$$I = I_0 \cos^2(\theta) ,$$

donde θ es el ángulo entre los ejes ópticos de los polarizadores. Cuando los ejes ópticos son perpendiculares ($\theta = \pi/2$) no existe transmisión de luz, por el contrario, si $\theta = \pi$ la transmisión será completa, solo atenuada por la absorción del material polarizador. Para la implementación de la microscopía de polarización el polarizador se coloca perpendicular al analizador y se colecta la luz que pasando por la muestra logra transmitirse por estos dos componentes, la idea

⁴En su representación ondulatoria, una onda de luz monocromática y no polarizada se compone por múltiples campos eléctricos que oscilan con la misma frecuencia pero en direcciones diferentes, cada uno de estos campos \vec{E}_k tiene asociado un campo magnético \vec{B}_k que oscila en dirección perpendicular a su campo eléctrico asociado. El efecto neto de un polarizador sobre este conjunto de campos es impedir el paso de los campos eléctricos que no sean paralelos al eje óptico del polarizador.

detrás de esta operación es coleccionar solo la luz cuya polarización fue alterada como efecto de refractarse en la muestra. Este efecto es común en materiales que presentan anisotropía óptica o birrefringencia tal como micro-túbulos, citoesqueletos y estructuras semi-cristalinas.

Microscopía DIC o Nomarsky.

La técnica conocida como Contraste por Interferencia Diferencial (DIC) es, en algunos aspectos, una combinación de microscopía de polarización y de contraste de fases. La base conceptual de esta técnica sustenta que las características estructurales de un espécimen translúcido guardan correlación con el cambio en polarización que sufre una onda de luz polarizada cuando es refractada por dicho espécimen. La configuración necesaria para esta técnica emplea dos polarizadores y dos prismas Nomarsky que son modificaciones de prismas divisores de haz del tipo conocido como Wollaston ⁵ bajo la configuración descrita en 1.5.d. El principio físico es el siguiente: la luz generada por la fuente pasa por un polarizador ajustado con un ángulo $\theta = 0$ y es proyectado a la cara del prisma Nomarsky que divide el haz principal en dos haces separados, que poseen una polarización relativa de $\theta = \pi/2$ entre sí. Posteriormente, cada uno de estos haces pasa por un condensador que lo proyecta sobre el espécimen, objeto cuyas heterogeneidades en grosor e índice de refracción refractará los haces de luz cambiándoles su fase. Enseguida la luz es capturada por el objetivo y dirigida hacia un segundo prisma Nomarsky que combina los rayos de luz produciendo luz que emerge con una gama de polarizaciones (lineal, circular o elíptica), posteriormente la luz incide sobre un polarizador lineal colocado con un ángulo $\theta = \pi/2$ de forma tal que los rayos salen del polarizador e interfieren en el plano de la imagen. En la microscopía DIC los gradientes de intensidad de los campos electromagnéticos perpendiculares a la dirección de propagación son los factores primarios que determinan el contraste; los cambios abruptos en polarización producen un magnífico contraste mientras que los cambios graduales resultan en variaciones tenues. Bajo esta clase de iluminación los objetos planos producen un contraste insignificante y frecuentemente se confunden con el fondo de la imagen, por el contrario, los objetos con variaciones significativas de volumen (como las células) son ideales para analizarse con microscopía Nomarsky. Estas características han hecho del contraste de fases y de Nomarsky dos técnicas muy populares para el análisis de la topografía de superficie de muestras con propiedades birrefringentes asociadas, al respecto la tabla muestra una comparativa en ventajas y desventajas de ambas técnicas.

Contraste de fase	Nomarsky (DIC)
<ul style="list-style-type: none"> ▲ Interferencia con una referencia. ▲ Intensidad de luz difractada, eliminando el resto. ▲ Las imágenes contienen “halos” y “sombras”. ▲ No detectan efectos por birrefringencia. 	<ul style="list-style-type: none"> △ Interferencia entre dos ondas divididas. △ Gradientes de contraste asociados a variaciones en polarización. △ Las imágenes muestran relieves aparentes 3D. △ Detectan efectos de birrefringencia incluso en objetos con pobre nivel de contraste.

Cuadro 1.1: Lista comparativa de ventajas e inconvenientes asociados a microscopía de contraste de fases y microscopía Nomarsky (DIC).

Microscopía de reflexión.

Este tipo de técnica, conocida como iluminación por incidencia o microscopía por epi-iluminación se utiliza para observar objetos que, por sus características ópticas, permanecen opacos aún y cuando su grosor es relativamente

⁵El prisma Wollaston fue inventado por el químico inglés William Hyde Wollaston (1776-1828) el cual, unió con pegamento óptico por la hipotenusa dos prismas triangulares rectos formados de calcita (espato de Islandia) con ejes ópticos perpendiculares. La luz entra por una de las facetas laterales y se divide en dos haces al incidir en el corte diagonal. Los haces salientes divergen del prisma con un ángulo que depende del ángulo de corte de los prismas y de la longitud de onda de la luz. Hay disponibles prismas comerciales con un ángulo de divergencia de entre 15 y 45°.

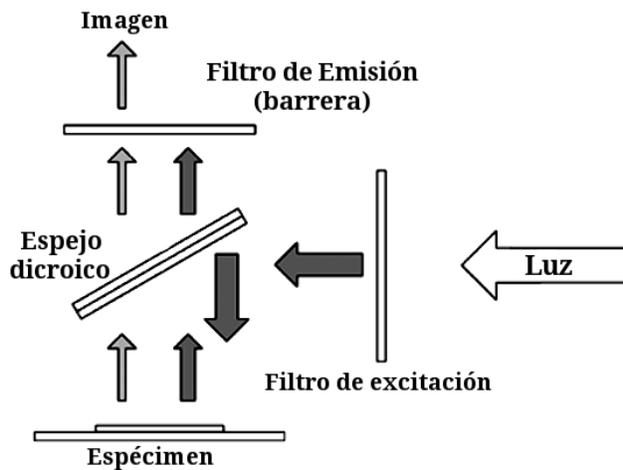


Figura 1.6: Configuración de elementos ópticos para microscopía de epi-iluminación. El haz de luz de la fuente se refleja en un espejo dicroico y se dirige hacia la muestra usando condensadores, posteriormente, la luz reflejada se colecta usando un objetivo que la dirige para cruzar el dicroico hacia una barrera y posteriormente hacia una pantalla.

pequeño ($30 \mu\text{m}$). La configuración básica para epi-iluminación se describe en la Fig. 1.6 y consiste en reflejar la luz en el espécimen analizado para capturarla después y proyectarla en la imagen final. La zona analizada se determina por medio de la posición de las barreras o filtros que permiten el paso a rayos de luz con ángulos específicos. La iluminación por incidencia se puede usar en combinación con varias de las técnicas que hemos mencionado, logrando diferentes efectos que enfatizan aspectos puntuales de las imágenes. Al respecto enseguida hacemos un breve listado:

- Campo claro: la apariencia de la imagen cambia de acuerdo al ángulo de la iluminación, cambiando del negro al blanco pasando por contrastes de grises.
- Campo oscuro: permite enfatizar detalles de la muestra que no son visibles con refracción y dada que atenúa las fuentes residuales de luz no enfocada, permite mostrar, mejor que en técnicas como campo claro, los colores y estructura de la muestra.
- Luz polarizada: este recurso es muy empleado en el análisis de materiales birrefringentes o bireflejantes porque permite cambiar la apariencia del objeto como función de su orientación angular. En combinación con epi-iluminación se agrega el efecto del índice de refracción para conseguir una técnica sensible a la orientación angular y a la profundidad del plano focal observado.
- Cambio de Fase: en muestras delgadas resulta complicado encontrar diferencias provocadas por la refracción de la luz en la muestra, lo que implica que para combinarla con reflexión se requiere de técnicas especializadas para capturar esa luz.
- DIC (Nomarsky): en combinación con epi-iluminación, la luz polarizada y reflejada por la muestra contiene cambios de polarización que codifican la estructura topográfica 3D de la superficie enfocada.
- Microscopía estéreo: A semejanza de los ojos humanos (entendidos como dos sensores separados entre 64 y 65 mm), la información de la luz original y refractada puede utilizarse para construir imágenes tridimensionales de los objetos circundantes. La profundidad de la información obtenida es limitada y el ángulo de reflexión usualmente es pequeño (entre 10 y 12 grados).

Microscopía de fluorescencia.

Por su naturaleza, la microscopía de fluorescencia es distinta a las técnicas de transmisión de luz descritas anteriormente, su principio funcional se basa en la absorción de fotones (luz de excitación) por moléculas de una sustancia,

que es seguida por la emisión de fotones de una longitud de onda superior al de los fotones absorbidos (luz de emisión). Dado que en microscopía de fluorescencia la fuente de luz externa está diseñada para excitar la muestra para lograr que emita luz, la configuración óptica implementada está diseñada para captar la mayor cantidad de luz asociada a la emisión y a eliminar la luz asociada a fuentes de luz externa, para ello los componentes básicos son: filtro de excitación, filtro de emisión y espejo dicróico para dirigir la luz. Sus aplicaciones son muy diversas y particularmente frecuentes en biología y ciencia de materiales.

Aplicaciones de microscopía óptica.

Dada la resolución de los sistemas ópticos, la microscopía óptica es inviable para el análisis de estructuras moleculares, siendo aplicable en el análisis de microorganismos, células y estructuras, al respecto considérese el cuadro 1.2.

Técnica	Tipo de muestra
Contraste de fases / DIC (Nomarsky)	Especímenes traslucidos y objetos que cambian la fase: Bacterias, espermatozoides, células en recipientes de vidrio, protozoarios, fibras, ácaros.
Campo Oscuro	Objetos dispersores de luz: Diatomeas, fibras, cabello, microorganismos en agua, radiolarios.
Campo claro	Especímenes que modulan la amplitud: muestras teñidas, especímenes coloreados, cabello, insectos de fibra y algas marinas.
Fluorescencia	Especímenes fluorescentes: Cultivos de células cargadas, secciones teñidas con fluorocromo, frotis.
Polarización	Muestras birrefringentes: porciones de minerales, cristales líquidos, cristales y sustancias fundidas, cabellos, plumas, huesos.

Cuadro 1.2: Técnicas de microscopía y su uso más frecuente de acuerdo a las propiedades ópticas de la muestra.

1.3.2. Ruido en imágenes de microscopía.

El concepto de ruido en imágenes de microscopía se asocia a diversas fuentes que pueden ser mecánicas o electrónicas. Entre las fuentes mecánicas, las más comunes son heterogeneidades en la iluminación, alineamientos deficientes o mala selección de los componentes ópticos, impurezas en las muestras, vibraciones mecánicas originadas por motores, ventiladores, bombas de vacío o sonido ambiente, etc. Usualmente esta clase de contaminación se atenúa con la calibración de instrumentos y trabajando en el aislamiento mecánico, acústico y térmico del sistema (Fig. 1.7). En cuanto a las fuentes electrónicas pueden afectar factores externos como inducción electromagnética generada por motores o factores internos asociados a la SNR y a la naturaleza de los detectores, en la siguiente sección discutiremos al respecto.

Manejo de muestras biológicas.

Para lograr la adquisición de datos de buena calidad, la microscopía de células vivas requiere la combinación de diversos factores que no sólo dependen de la técnica o del modo de adquisición usado sino que también se ven afectados por la habilidad del experimentalista para manejar el equipo disponibles manteniendo al mismo tiempo las condiciones

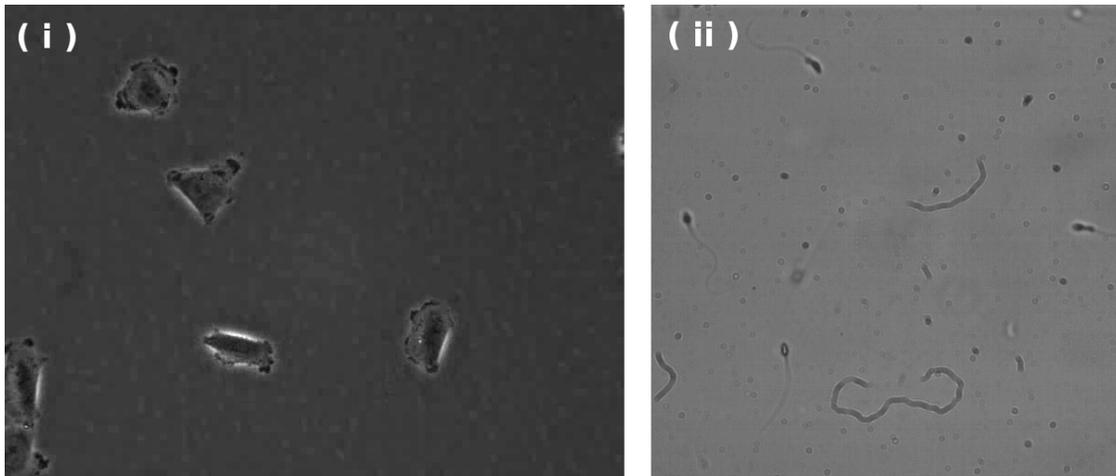


Figura 1.7: En una imagen de microscopía óptica existen varias clases de ruido: heterogeneidades en la iluminación, inadecuada selección de lentes o componentes ópticos o alineamiento deficiente, impurezas en la muestra o en la cámara, ruido electrónico, etc. (i) Células cancerosas en microscopía 2D de campo claro: la resolución espacial combinada de la óptica y la cámara es baja, mostrando un efecto de granulación en los objetos; (ii) Espermatozoides humanos en microscopía 2D de campo claro, las imágenes muestra un ejemplo de múltiples clases de impurezas en la muestra, usualmente polvo.

experimentales propicias para la muestra. Estos aspectos se deben combinar con los requerimientos espaciales y temporales para obtener la información requerida. Muchos organismos y preparaciones biológicas son sensibles a cambios en pH y de temperatura de forma que se requieren mecanismos de control térmico. Otro aspecto a tomar en cuenta son los cambios metabólicos que los microorganismos o células pueden sufrir a lo largo del experimento, estos cambios pueden inducir variaciones de humedad, oxigenación, etc, aspectos críticos cuando se trata de muestras cerradas.

En casos como fluorescencia, un elemento esencial a considerar es la intensidad de la señal, en estos casos es usual enfrentar retos para tener una relación adecuada entre la razón señal-ruido. Para solventar esta situación se recurre a estrategias como aumentar el tiempo de integración o el tamaño del *pinhole* confocal, aunque el riesgo de aumentar la señal es que se puede desencadenar foto-toxicidad o foto-blanqueo. Para remediar esta situación es usual implementar obturadores automáticos que reducen el tiempo de exposición solamente a los momentos cuando se colecte imagen. En este sentido, el uso de frecuencias de muestreo adecuadas es muy importante para obtener imágenes fieles de la muestra, y aún más, resulta crítico entender las relaciones entre resolución espacial y contraste así como sus limitaciones teóricas y prácticas.

1.3.3. Digitalización.

Representación digital.

Desde sus inicios en la década de 1950, el desarrollo de aplicaciones basadas en procesamiento de imágenes por computadora se ha incrementado a tal grado que actualmente es una herramienta común en muchos y muy diversos contextos, por ejemplo en vigilancia, ciencias forenses, aplicaciones militares, procesamiento de documentos, predicción del clima, inspecciones de calidad de productos, entre muchas otras. Dado su impresionante progreso, pudiera pensarse que los sistemas de visión computacional pronto tendrán habilidades semejantes a las que posee la visión humana, sin embargo, aún después de 60 años de investigación, nuestro conocimiento de los sistemas que sustentan la visión humana está muy fragmentado y en su mayoría todavía es prematuro, este es el estado del arte en procesamiento de imágenes. No obstante, es razonable esperar que los esfuerzos multidisciplinarios de años venideros habrán muchas nuevas posibilidades que permitan desarrollar sistemas eficientes de visión que sean capaces de minimizar la

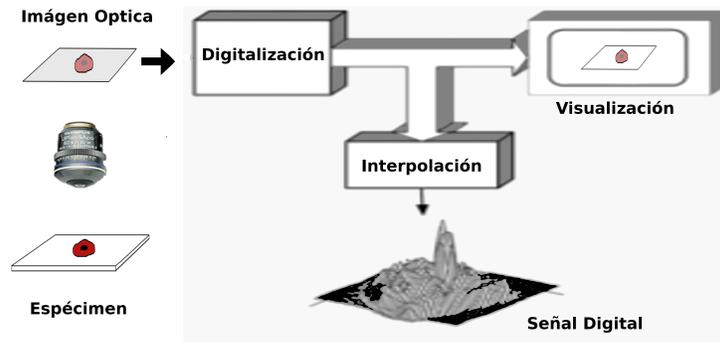


Figura 1.8: Esquematación de proceso seguido para obtener la forma discreta de la información codificada en ondas electromagnéticas reflejadas o refractadas por el espécimen bajo observación.

subjetividad a la par de incrementar la eficiencia y precisión. En el contexto que nos ocupa, que es análisis de imágenes orientado a sistemas microscópicos, la inclusión de medios digitales han replanteado las capacidades y formas en las que se adquiere y procesa la información visualizada: desde los especímenes dibujados en los albores del siglo XVII, hasta los sofisticados sistemas semi o completamente automáticos que se pueden encontrar actualmente. Esta notabilísima evolución ha resultado en que existen sistemas capaces de generar una enorme cantidad de información, circunstancia que demanda protocolos eficientes de procesamiento y análisis. Dentro de la variedad de instrumentos diseñados para microscopía, los más accesibles técnica y económicamente son los microscopios ópticos; en la sección anterior hemos descrito la base conceptual de estos dispositivos y en lo que sigue describiremos los aspectos más importantes en la que este tipo de información es llevada a su representación digital.

Una imagen digital es un registro discreto de la información contenida en ondas electromagnéticas provenientes de un espécimen o de un conjunto de moléculas. En una forma más general (su representación matemática), una imagen digital es una matriz o función *n-dimensional* (típicamente con $n \in [1, 5]$ donde cada dimensión corresponde a un parámetro, un grado de libertad o una coordenada necesaria para identificar un valor de la imagen. Cuando hablamos de imágenes provenientes de microscopía, la información original está condensada en planos focales que son imágenes 2D que registran cortes ópticos del espécimen. Como veremos en el Capítulo 4, el procesamiento de estos planos focales implica realizar una serie de operaciones que alteran el contenido de una imagen para obtener datos cuantitativos o cualitativos dependiendo del tipo de tratamiento. La interpretación de la información recabada depende totalmente del contexto, no obstante, en muchos campos de investigación existe una fuerte tendencia hacia la creación de marcos conceptuales que sistematicen la forma de procesar y analizar la información obtenida; esta perspectiva no solo requiere de medidas abstractas, sino de un razonamiento integral que proponga una forma interpretativa de los datos. Al respecto considérese el esquema mostrado en la Fig. 1.8, que ilustra las diferentes etapas por las que la información que representa al espécimen observado (luz difractada o transmitida) debe pasar hasta componer una imagen digital.

Las etapas o representaciones por las que pasa la imagen óptica hasta llegar a la representación digital se enumeran a continuación,

- Imagen continua: es una representación abstracta de la intensidad de la radiación electromagnética I que se mide en la posición (x, y) referida al plano focal del microscopio. Esta representación permite el tratamiento analítico de la señal y es la primera representación bidimensional de la información tridimensional contenida en la luz proveniente del espécimen.
- Imagen digital: es el resultado de someter la imagen continua a un proceso de muestreo, comúnmente realizado por un grupo de sensores distribuidos en forma rectangular que forman una representación discreta de la radiación.

ción electromagnética que asocia un valor positivo y normalizado de la intensidad a un par de índices denotados por (n, m) . Este proceso colapsa de forma dramática la información original y es tan crítico que, de hacerlo erróneamente, el resultado puede dañar seriamente la información original y en el peor de los casos, perder la representación del espécimen. Por otro lado, un sobre muestreo resultará en una enorme cantidad de información repetida que no aporta nada al resultado final, lo que lo vuelve poco eficiente el proceso. Resulta claro que optimizar el proceso de muestreo es un reto que debe asumirse con pleno conocimiento tanto de la situación experimental que se analiza como de la configuración y capacidad de los dispositivos de adquisición. El proceso inverso del muestreo se conoce como interpolación y permite recuperar una versión continua de la información a partir de una discreta; la calidad de la versión continua resultante depende de la calidad del muestreo y de la naturaleza de la información, siendo óptima cuando la textura de la imagen adquirida es suave y mala con imágenes heterogéneas.

- **Imagen observada:** es una reconstrucción de la imagen digital por medio de un proceso de interpolación efectuado por algún dispositivo de hardware, usualmente, monitores. La salida puede ser interpretada por un observador como una imagen visible del espécimen original.
- **Imagen resultante:** es la versión final de la representación del espécimen y condensa los efectos ejercidos por las lentes, el ruido y la digitalización sobre la radiación electromagnética proveniente del espécimen. La mejor calidad en la imagen resultante se consigue optimizando tanto la imagen continua como la imagen digital.

Al final de este proceso, el objeto digital generado es una transformación a un espacio discreto de la radiación electromagnética que, reflejada por el espécimen, pasa a través del sistema óptico del microscopio hasta el detector que construye una representación discreta y bidimensional de información continua y tridimensional. Durante este proceso, la manipulación de la imagen óptica debe ser suficientemente eficiente tal que a partir de la información discreta y mediante el proceso de interpolación pueda reconstruirse hasta un objeto continuo con información equiparable a la imagen óptica, al menos en información sustancial. Como es de esperarse, existen alteraciones específicas que pueden limitar la eficiencia en el proceso de digitalización: pérdida de resolución, ruido, suavizado, sombreado, efectos no lineales y distorsiones geométricas. En la medida que el sistema de adquisición y registro consiga balancear adecuadamente estos factores en función del objetivo, la calidad de la información será óptima, lo que facilitará el diseño y desarrollo de los algoritmos de procesamiento para identificar el espécimen dentro del contexto de las imágenes. En lo que sigue describiremos de forma general estos factores y en el siguiente capítulo describiremos algunas de las principales técnicas que se usan para minimizar la degradación que producen en la información de la imagen.

Muestreo. El proceso de digitalización implica realizar una representación discreta de una señal continua, en el caso que nos ocupa, formar una representación matricial de una imagen óptica. Teóricamente, este proceso se puede modelar como el resultado de realizar la convolución entre la imagen óptica y la PSF asociada al sistema óptico de registro para posteriormente cuantizar en el sensor la señal analógica. Cuando se hace adecuadamente, este proceso preserva los componentes esenciales de la señal original, por el contrario una mala aplicación puede resultar desastrosa y hacer desaparecer los aspectos relevantes. Al respecto el teorema de muestreo de Shannon establece lo siguiente:

Teorema de muestreo de Shannon. Dada una muestra uniformemente distribuida de puntos asociados a una función continua, la reconstrucción de esta señal es posible siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones:

- La función original debe estar contenida en un ancho de banda finito, esto es, debe cumplirse que su representación en el espacio de Fourier es cero para cualquier frecuencia por encima de un valor de corte f_c .
- La frecuencia de muestreo de los puntos discretos no debe ser mayor que $\Delta x = \frac{1}{2f_c}$. Esto es, dado un ciclo de la más alta frecuencia contenida en la señal, deben haber al menos dos puntos de muestra asociados.

En el caso donde $\Delta x < \frac{1}{2f_c}$, la frecuencia de muestreo es superior a la necesaria y se dice que la señal está *sobremuestreada*, el mayor inconveniente de esta situación es el incremento de costos, tanto en instrumentación como en

el manejo de la información, no obstante la reconstrucción de la información está garantizada. El caso contrario, $\Delta x > \frac{1}{2f_c}$ se denomina sub-muestreo y no garantiza la reconstrucción de la señal.

Interpolación. Aunque el teorema de Shannon garantice que se dispone de la información suficiente para la reconstrucción completa de la información, para llegar a la función original debe realizarse un proceso conocido como interpolación que consiste en usar funciones continuas para inferir la información no colectada entre cada par de puntos discretos muestreados. Esta inferencia tiene un grado de error asociado que está relacionado a la naturaleza de la función usada en el proceso. Por ejemplo, si la señal original es lineal, el uso de una función sinusoidal para reconstruir los espacios vacíos es inadecuado y arrojará un grado de imprecisión que se reflejará en el resultado final. Muchos de los artefactos inducidos por el proceso de interpolación pueden ser minimizados haciendo un sobre-muestreo de la señal, sin embargo, no pueden ser completamente eliminados.

Suavizado. El proceso de suavizado ocurre cuando en el proceso de muestreo, una imagen es sub-muestreada espacialmente ($\Delta x > \frac{1}{2f_c}$), esto es, el espaciamiento entre píxeles es demasiado grande respecto a los detalles de la imagen óptica. Las consecuencias de este proceso es que la señal original queda sepultada en un ruido de baja frecuencia que es complicado de filtrar, adicionalmente, bajo el proceso de interpolación, no obstante se use una función de interpolación ideal, una señal sobre-suavizada produce una clase de ruido conocido como patrones de Moiré. En casos donde la señal incluye altas frecuencias, un sobre-suavizado puede destruirla, para evitar esta situación es recomendable un sobre-muestreo de la señal. Es frecuente que los sistemas ópticos de los microscopios incluyan una frecuencia de corte $f_c = 1/2 NA$, tal que, por debajo de esta frecuencia la OTF tiende a cero, este es un filtro anti-suavizado inherente al sistema.

Sombreado. En imágenes de microscopia es usual encontrar zonas de iluminación no homogénea asociadas a las variaciones en fuentes de luz o en la componentes ópticas (lámparas, condensadores, espejos, o lentes). Estas variaciones introducen cambios aditivos en el contraste exhibido por objetos conforme se mueven en la imagen, afortunadamente, en la generalidad de los casos este tipo de heterogeneidades son cuasi-estáticas y pueden eliminarse por diversos métodos para substracción de fondo. Más sutiles, pero igualmente importantes, existen también variaciones multiplicativas que introducen variaciones en el contraste de los objetos, dependiendo de la posición en la imagen. Un adecuado manejo de las condiciones de iluminación puede aportar magníficos resultados en el posterior procesamiento.

Fotometría. Idealmente, los niveles de grises registrados en la imagen digital debe ser proporcionales a las propiedades ópticas del espécimen analizado (transmitancia, densidad óptica, reflectancia, intensidad de fluorescencia, etc), no obstante, existen algunas condiciones especiales donde la información registrada por los sensores no guarda una relación lineal con la luz incidente, por el contrario, existe una transformación que lleva de la información original a la información registrada. Para determinar esta transformación, es usual utilizar referencias u objetos de propiedades ópticas conocidas a partir de los cuales se determina la forma en que la transformada actúa. Algunos objetos comúnmente usados son lentes fluorescentes de tamaño y brillo conocido.

Distorsiones geométricas. Este aspecto aborda una clase de deformaciones que distorsiona la relación espacial que guardan los componentes de una imagen. Estas deformaciones cambian el tamaño y forma aparente de los objetos observados así como su espaciamiento aparente. Usualmente estas deformaciones son invariantes en el tiempo y basta con calcular la deformación para construir la transformada geométrica que la corrige, en otros casos el cambio de alguno de los componentes de la óptica puede modificar la transformación.

Resolución acumulativa. Hemos visto que para obtener una imagen digital es necesario que la imagen óptica original siga una serie de transformaciones asociadas a los componentes del sistema óptico y de registro. Si se cumple que esta serie de transformaciones son lineales e invariante de fase, la representación del sistema completo en términos de

la PSF es simplemente la convolución de todas las PSF's individuales, de lo contrario, es necesario introducir algunas referencias como las ya mencionadas para caracterizar la PSF del sistema completo. Para complementar nuestra descripción, en lo que sigue abordaremos las características de los dispositivos de adquisición, las cámaras digitales.

Cámaras digitales.

Los sistemas de fotografía digital han evolucionado notablemente, al grado que, actualmente prácticamente cualquier persona puede adquirir una cámara digital y aplicar procesamientos básicos a las imágenes adquiridas sin mayor esfuerzo ni capacitación. La primera tecnología que hizo posible este avance se denomina *charge-coupled device* y fue inventado en 1969 en los laboratorios de AT&T por Willard Boyle y George E. Smith. Esta tecnología sustituye la película fotosensible por medio de un arreglo de foto-sensores integrados a una unidad de memoria que permite convertir la señal codificada en el flujo electromagnético de fotones a un flujo de electrones. El proceso implicado comienza por exponer, durante un cierto tiempo, un arreglo de foto-diodos al espectro electromagnético incidente, los foto-sensores convierten el espectro en carga eléctrica y la almacenan en depósitos discretos de potencial eléctrico, una vez acumulados a este arreglo se le aplica un voltaje positivo entre 0 y 10 Volts que crea zonas empobrecidas de electrones con voltaje proporcional a la carga inicial. A la capacidad de cada zona para almacenar carga negativa antes de exceder el potencial aplicado se le conoce como el tamaño del pozo de potencial y está relacionado con lo que se conoce como tamaño el píxel. Un tamaño de píxel típico para cámaras usadas en fluorescencia es entre 20,000 y 40,000 fotones. La exposición excesiva a la luz puede saturar un pozo de potencial y los foto-electrones liberados se “desbordan” hacia pozos de potencial vecinos. Usualmente el intervalo de tiempo entre dos aplicaciones consecutivas del potencial se controla por el programa de la cámara y se relaciona con el tiempo de exposición, al respecto existen muchos tipos de configuraciones que permiten particularizar de forma muy específica la colecta de la información. Una vez que se ha colectado la información la señal, el reloj interno de la cámara que es controlado por un chip controla un flujo de transferencia en forma ordenada hacia el amplificador de señal y después hacia un convertidor analógico/digital. Existen diferentes arreglos estructurales de sensores de foto-diodos y foto-capacitores que se conocen como variedades de arquitecturas CCD, además de estas variedades también existen diferentes modos de transferencia de la información que permiten registrar imágenes totales o líneas parciales de la misma. Una imagen sin procesar salida del CCD esta compuesta por tres partes:

- Las señales que provienen desde la fuente (los electrones son generados desde la fuente general de fotones).
- Una señal inicial denominada “bias”, debida al propio funcionamiento del CCD.
- Una señal térmica generada por la distorsión de la corriente de los electrones del semiconductor.

Dentro de estas señales, las principales fuentes de ruido que intervienen en la toma de una imagen CCD son:

- Ruido Fotónico producido por las fluctuaciones aleatorias en la señal de la corriente fotónica debida al flujo no constante de recepción de fotones.
- Las fluctuaciones estadísticas en la generación de la señal térmica, o sea el flujo que producen los electrones en el substrato del semiconductor debido a efectos térmicos.
- Los errores en la lectura de la señal, generalmente originados por el amplificador interno del chip.
- Errores introducidos en el proceso de conversión analógica/digital.
- La variación de sensibilidad, que es la diferencia de sensibilidades entre elementos sensores. Al respecto, los CCD's modernos son uniformes hasta un 1 % entre elementos vecinos y uniformes hasta un 10 % a través de la superficie detectora.

Existen fuentes de ruido cuyos niveles están definidos desde la construcción de la cámara CCD y no pueden ser mejoradas por el usuario, por ejemplo el proceso de lectura o el de cuantización, en otros casos es posible implementar técnicas que ayudan a minimizar otras causas. Por ejemplo, si un chip es utilizado a temperatura ambiente (20°C), los átomos del área fotosensible producen una corriente con una componente de ruido determinada. El ruido térmico, sin embargo, puede ser reducido enfriando el CCD por medio de líquidos o sistemas eléctricos a muy baja temperatura. Un ejemplo de esta técnica es el sistema de adquisición de la cámara CCD SBIG ST7 que posee un chip de 765 X 510 píxeles de resolución y un tamaño de pixel de 9 X 9 μm además de un sistema de enfriamiento controlado por el efecto termoeléctrico Peltier (una bomba de calor controlada por voltaje) que era capaz de llevar al equipo a temperaturas cercanas a -30 °C.

Una tecnología alternativa a los CCD fue desarrollada en 1968 y 1969 cuando Noble y Chamberlain diseñaron un sensor denominado Active Pixel Sensor (APS) capaz de detectar la luz basado en tecnología CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor), razón por la que este tipo de sensor es más conocido como Sensor CMOS. Gracias a esta tecnología es posible integrar más funciones en un chip sensor, como por ejemplo control de luminosidad, corrector de contraste, o un conversor analógico-digital. La principal característica de este tipo de sensor es que cada píxel de la red posee un sensor y amplificador propio, según los fabricantes de CCDs, los sensores CMOS tienen un elevado ruido de patrón fijo (FPN, ruido invariante en el tiempo y que se ve como un fondo fijo en la imagen) pero sus defensores indican que tienen un bajo consumo de energía (lo cual redundaría en una mayor autonomía de la cámara). Al parecer, el ruido mencionado se debe a que los sensores CMOS convencionales tienen un amplificador por separado en cada píxel y estos amplificadores normalmente no serán uniformes por todo el chip y la desigualdad residual será la que genere el ruido. Por el contrario, todos los píxeles de un CCD se activan a través de una etapa común del amplificador, de modo que se evita este problema. Comparativamente, el protocolo CMOS ofrece las siguientes ventajas sobre el CCD:

- Consumo eléctrico inferior.
- Económico (necesita pocos componentes externos).
- Lectura simultánea de mayor número de píxeles.
- El conversor digital puede estar integrado en el mismo chip.
- Escaso o inexistente “desborde” entre píxeles adjuntos.
- Mayor flexibilidad en la lectura (pre-visualización más rápida).
- Los píxeles pueden ser expuestos y leídos simultáneamente.
- Topologías muy diversas, por ejemplo, el sensor SuperCCD de Fujifilm emplea una construcción en forma de panel (octogonal) para los píxeles.
- Distintos tipos de píxeles (según tamaño y sensibilidad) combinables.
- Muy alta frecuencia de imagen en comparación a un CCD del mismo tamaño.

En contrapartida, las desventajas son:

- Menor superficie receptora de la luz por píxel.
- Menor uniformidad de los píxeles (mayor ruido de patrón fijo-FPN).
- Inestabilidad en la imagen por movimientos rápidos o luz de flash debido al tipo de obturación giratoria que utiliza.

Finalmente, mencionaremos que existe otro tipo de sensor basado en el principio APS, especializado en captura de espectro infrarrojo y diseñado para operar a temperaturas criogénicas. El dispositivo consiste en dos chips contrapuestos; el primer chip formado por elementos detectores de InGaAs o HgCdTe, y el otro típicamente hecho de silicón y usado para la lectura de salida de los foto-detectores. La fecha exacta de creación de estos dispositivos está clasificada, pero, a mediados de los años 80 su uso estaba ampliamente difundido.

1.4. Tendencias en microscopía.

La transición hacia la digitalización de la información asociada a sistemas microscópicos ha generado una importante demanda de procedimientos estandarizados para almacenamiento, manejo, procesamiento y visualización de los datos registrados. Al respecto han surgido protocolos de organización destinados a homologar las soluciones a los siguientes puntos claves:

- No existe un estándar para describir un sistema experimental de adquisición de imágenes.
- No existe un formato unificado de representación de datos de adquisición de imágenes.
- La mayoría de los datos requieren un análisis específico que ninguna herramienta de la plataforma puede proveer anticipadamente.
- Es muy difícil manejar datos de imágenes en la escala producida por los laboratorios.
- La imagen y su análisis están intrínsecamente asociados, pero no existe un método coherente que permita manejar los resultados analíticos junto con los datos de la imagen.

entre ellos uno de los más desarrollados es el proyecto OME (*Open Microscopy Environment*) que veremos enseguida.

1.4.1. El proyecto *Open Microscopy Environment* (OME)

El Open Microscopy Environment (OME) es una novedosa plataforma que, a través de un sistema cliente-servidor de código abierto y un modelo de datos flexible, permite organizar, almacenar y analizar grandes volúmenes de imágenes microscópicas a la vez que administra la información técnica asociada [28, 29]. Este proyecto es soportado por un consorcio de universidades, constituido actualmente por: Universidad Dundee Laboratorio (Swedlow, Lab., UK), Instituto Nacional en envejecimiento perteneciente al NIH, (Goldberg Lab, USA), Universidad de Wisconsin (Lab de Instrumentación Óptica y Computacional, USA), Madison (White y Eliceiri Lab.) y Harvard Medical School (Lab. Sorger, USA). Este proyecto es un modelo cooperativo para administración de datos, diseño de procesos y desarrollo de módulos orientados al análisis de imágenes de microscopía, en su mayoría de contenido biológico. Su lanzamiento es resultado de la alta demanda de protocolos para adquirir, almacenar, procesar y visualizar la información adquirida en el área de microscopía digital aplicada en sistemas biológicos. La solución propuesta por el consorcio OME está orientada al desarrollo de herramientas de acceso libre protegidas bajo licencia GNU (Free Software Foundation) que aporten soluciones al área de microscopía digital de acuerdo a los siguientes objetivos generales:

- Crear un sistema que integre el almacenamiento, visualización, registro, manejo y análisis de imágenes de microscopía.
- Proporcionar herramientas para resolver los problemas de acceso y procesamiento de la información asociados a la heterogeneidad de formatos de archivos.
- Promover la contribución en la creación e integración de programas abiertos y de libre acceso enfocado a resolver los retos que en el área de análisis de imágenes se presentan en la comunidad científica que emplea microscopía.

Los retos inherentes a estos objetivos son enormes, no obstante existen importantes avances que describiremos sucintamente en el resto de esta sección.

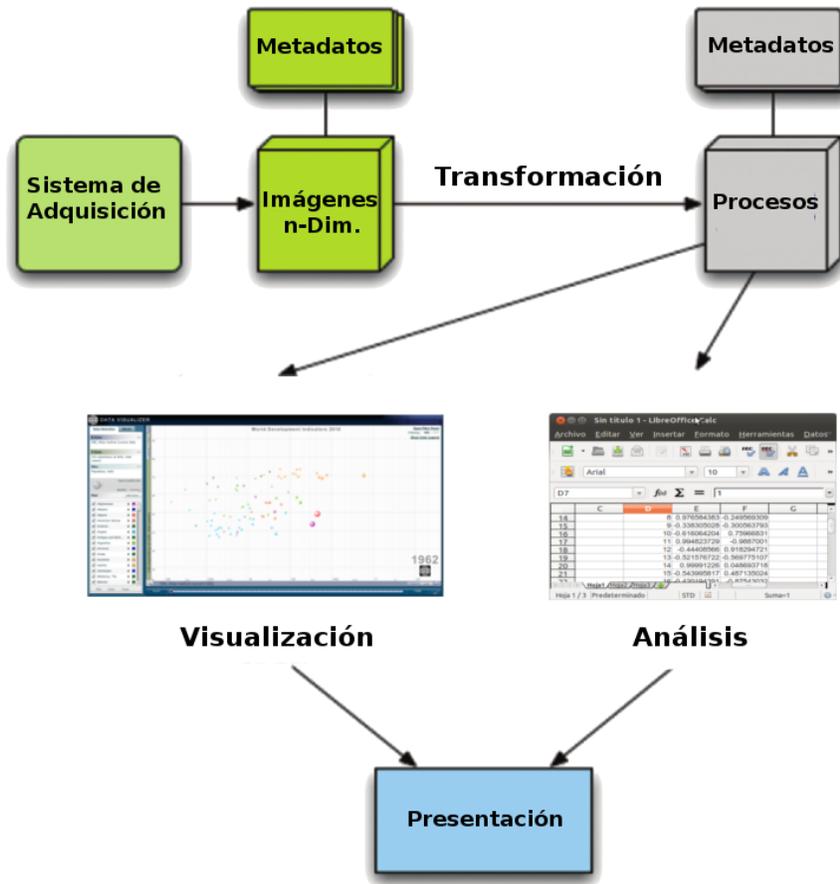


Figura 1.9: Esquemización del paradigma clásico para el manejo de imágenes de microscopía. Generalmente los metadatos en la información experimental se pierden en el procesamiento de la información [21].

El paradigma clásico vs OME.

La versatilidad de los sistemas de microscopía modernos permite explorar distintas perspectivas de la dinámica analizada: adquirir datos de una estructura 3D por medio de cambios del plano focal, registrar la evolución temporal del sistema ajustando los tiempos de adquisición entre cuadros consecutivos, utilizar componentes ópticos (filtros) para seleccionar partes de la información proveniente de la muestra (incluyendo el color). Las combinaciones de estas variables generan imágenes multidimensionales que son la base de procesos subsecuentes (ajustes de contraste, filtrado, restauración, de-convolución iterativa, etc.), que están orientados a obtener características específicas de los objetos representados en las imágenes (tamaño o forma de objeto, contenido, etc). El registro del conjunto de características detectadas constituye “el resultado” que es exportado para elaborar cualquier análisis de los datos (Fig. 1.9).

Esta secuencia de eventos constituyen la perspectiva clásica utilizada para el procesamiento y análisis de imágenes, no obstante su precisión conceptual, en la práctica existen una enorme diversidad de tipos de datos, procedimientos y herramientas computacionales involucradas, realidad que vuelve prácticamente imposible la colaboración y uso eficiente de recursos disponibles. En este contexto es que surge OME como una plataforma que permite estandarizar los formatos y protocolos para adquisición, almacenaje y acceso a datos. Actualmente OME provee una serie de herramientas

Imagen tipo OME	Nombre	ID Realización
	No de canales	ID Clase experimento
	Fecha de creación	ID Datos
	ID Óptica	ID Cámara
	Tamaño del píxel (X,Y,Z)	Frecuencia adquisición
	ID Procesamiento	ID Experimentalista
	ID Análisis	ID Grupo
	ID Etapa	Opciones pantalla
	Iluminación.	Atributos configurables

Cuadro 1.3: Campos asociados a un elemento básico del modelo de datos dentro de OME. La especificación completa se puede consultar en: <http://www.openmicroscopy.org/site/support/file-formats>.

y recursos para soportar y dirigir de forma coherente este proceso preservando los metadatos y estructurando la información, además de que garantiza la compatibilidad entre versiones distintas del mismo programa pertenecientes al mismo proyecto. Enseguida veremos algunas de las especificaciones de OME.

Modelos de datos OME.

La complejidad de los procedimientos experimentales actuales requiere el manejo de una gran cantidad de información adicional a la contenida en el conjunto de imágenes, esta información (conocida como metadatos) registra datos asociados al proceso de adquisición, procesamiento y análisis de la información. Al respecto, la solución implementada por el modelo OME propone un esquema que integra la estandarización y la administración de metadatos. La base conceptual de este modelo es un objeto multidimensional que soporta la imagen bidimensional, parámetros de escala, resolución espacial, temporal, información asociada al experimento como el ID del experimentalista, la configuración experimental, los algoritmos y parámetros para realizar el procesamiento de imágenes e incluso la información sobre el análisis de los datos obtenidos. En el cuadro 1.3 se mencionan algunas de estas características [29]. Para administrar los objetos conocidos como imágenes OME, el proyecto implementa dos formatos básicos: **OME-XML**, **OME-TIFF**, y dos plataformas para administración: OME para manejo local de objetos y **OMERO** para administración de objetos remotos basado en protocolos cliente-servidor. Enseguida haremos una breve descripción al respecto.

Los formatos OME-XML y OME-TIFF. La mayoría de las versiones propietarias de OME requieren de programas especializado para acceder a los metadatos registrados, de forma que, cualquier proceso posterior a la adquisición debe pasar por exportar los datos y los metadatos de su formato nativo a un formato neutro (usualmente TIFF) que no siempre está preparado para almacenar toda la información disponible. La primera propuesta de OME para resolver este problema fue integrar a este proceso un estándar para el intercambio de información estructurada entre diferentes plataformas conocido como XML (Extensible Markup Language), este formato permite el acceso a la información por medio de etiquetas que identifican de forma estructurada el contenido de cada campo. La estructura de los archivos “.xml” integra la información digital con los metadatos en un archivo único comprimido en formato base64 lo que facilita el almacenaje de la información pero vuelve poco práctico el manejo y acceso a grandes volúmenes de información. Como respuesta a este problema, LOCI, un miembro del consorcio OME implementa un formato alternativo denominado OME-TIFF que por medio de su estructura (colocando los metadatos en forma de encabezado y la información binaria como planos multidimensionales) permite mejor acceso, prosperando como un formato abierto para el intercambio de información. Para crear y administra datos tipo OME-XML y OME-TIFF, el proyecto OME diseño una librería identificada como Bio-Formato que es compatible con una importante variedad de programas en forma de bibliotecas o complementos y permite convertir cerca de 40 formatos propietarios al formato OME y además importa, exporta y administrar estos datos de forma local (OME) o remota (OMERO).

Manejo de datos OME y análisis de Software. Uno de las más importantes implementaciones de OME es el concepto de servidor-OME, como plataforma de almacenaje, procesamiento y análisis de datos experimentales. El servidor OME proporciona una interfase web para el usuario por medio de la cual puede acceder, administrar, procesar, analizar y visualizar la información y metadatos generados experimentalmente. Dentro de sus utilerías proporciona medios para exportar la información hacia herramientas de alto nivel para el análisis de datos como MATLAB, o exportarla en estructuras jerárquicas estándar o arbitrarias definidas por el usuario para usar la información por medio de programación en bajo nivel como C o Java. Al respecto, el servidor-OME utiliza dos jerarquías principales para auxiliar al usuario en la organización de datos; el primero conocido como Proyecto/Datos/Imágenes (PDI) establece una jerarquía donde cada conjunto de imágenes se relaciona con al menos un conjunto de datos, conjunto que a su vez corresponde al menos a un proyecto; el segundo, denominado CG/C se basa en establecer colecciones o grupos de categorías que contengan los datos originales, este esquema permite flexibilidad al usuario porque agrupa datos sin establecer criterios predefinidos.

Servidor OME e interfase web. El estado actual del proyecto servidor OME (version 2.6.0) es el resultado de un importante conjunto de esfuerzos que han evolucionado notablemente para crear herramientas de administración y análisis de datos, no obstante, dada la magnitud del problema abordado, persisten algunas limitaciones importantes. La primera es que, la flexibilidad y amplitud conceptual del programas es agregar dificultad para reducir la curva de aprendizaje de los desarrolladores y usuarios que contribuyen al proyecto, la segunda es que para lograr la implementación de OME en cada sistema de computo, se requiere de un conocimiento previo para implementar configuraciones específicas. Finalmente, la tercera es que el usuario que se basa en el servicio web para el uso de OME ve limitada su experiencia por factores como el ancho de banda y la velocidad de transferencia de grandes volúmenes de información. Estos problemas han sido abordados por desarrollos como el de LOCI, quienes crearon OMERO, la versión remota del servidor OME. Esta versión es un desarrollo basado en java que optimiza la transferencia y manejo de la información remota. La interacción entre OMERO y OME usa un conjunto e bibliotecas llamadas Hibernate que permiten la compatibilidad con la mayoría de los sistemas de bases de datos.

Visualización e importación en OME. Uno de los aspectos fundamentales del análisis de imágenes en microscopía es el desarrollo de técnicas de visualización que presenten versiones óptimas de la información colectada, donde se entiende como óptima aquella que enfatiza los aspectos deseados por el usuario. Para llegar a esta versión OME ofrece un conjunto de bibliotecas para representación de información procesada en forma de gráficos ajustables a la pantalla, esto incluye, escalamiento, filtrado, interpolación, tablas de color, etc. Uno de los requerimiento implícitos para el eficiente funcionamiento de estas técnicas bajo la plataforma OMERO es la disponibilidad de técnicas de compresión y disponibilidad de ancho de banda suficiente para la presentación de la información procesada por el servidor en sitios remotos de visualización. Actualmente el protocolo de servicio asociado a OMERO es el Java Remote Method of Invocation (Java RMI). Respecto al sistema de importación de información los protocolos OME y OMERO comparten el protocolo de adquisición de imágenes y metadatos para estructurar la base de datos a partir del DataManager contenido en la biblioteca de bio-formatos ya mencionada, misma que exporta la información en formato OME-TIFF u OME-XML y bajo las estructuras jerárquicas PDI o CG/C. La única diferencia es que, en el caso del protocolo OMERO, previo al proceso de importación se realiza se utiliza una aplicación basada en java que establece la conexión remota para descargar la información que posteriormente se procesará de la misma manera que OME.

OMERO, análisis de imágenes y perspectivas. Actualmente las bibliotecas de OMERO poseen bastantes algoritmos adaptados para el procesamiento genérico de datos, sin embargo, dado que es una plataforma abierta orientada al desarrollo colaborativo, dentro de su estructura jerárquica de metadatos existen campos diseñados para registrar el historial de los eventos de procesamiento ejercidos sobre las imágenes. Inclusive, dentro de la plataforma existe un espacio para desarrollo llamado *Usable Image Project* donde se incluye código e implementaciones que, en sus versiones beta se colocan disponibles a la comunidad para que las pruebe, comente y construya registros de la interacción

con el usuario.

Perspectivas. En respuesta a las necesidades actuales en microscopía digital, el consorcio OME ha construido una poderosa plataforma que integra de manera congruente una serie de herramientas diseñadas para la administración, procesamiento y análisis de datos. No obstante su origen, la flexibilidad de estas herramientas ha permitido que su uso esté incrementándose en muy diversos contextos que retro alimentan el desarrollo del proyecto. En su etapa actual OME y su contra-parte remota OMERO se encuentran incrementando los recursos disponibles y la cantidad de las herramientas asociadas a partir del desarrollo producido por el consorcio y de las colaboraciones externas. Hasta el momento OME ha demostrado ser una plataforma estable, flexible y con un potencial muy importante para convertirse en un estándar en el procesamiento y administración de datos y recursos.

Referencias en línea.

- Imágenes de microscopía, Molecular Expressions (<http://microscopy.fsu.edu>).
- Nikon Microscopy (<http://www.microscopyu.com>).
- Olympus Microscopy Resource Center (<http://www.olympusmicro.com>).
- Olympus FluoView Resource Center (<http://www.olympusconfocal.com>).
- Open Microscope Environment (<http://www.openmicroscopy.org/site>).

Rastreo de partículas microscópicas.

El estudio de la dinámica exhibida por partículas microscópicas en espacios 2D y 3D es un importante tópico abordado en diversas áreas de investigación científica y tecnológica. Al respecto se han creado múltiples sistemas para adquirir y procesar información sobre la dinámica exhibida en situaciones complejas como por ejemplo, células involucradas en procesos de fecundación o del sistema inmune [30–37]; neuronas en procesos sinápticos *in vivo* [5, 21]; células o microorganismos respondiendo a estímulos del medio ambiente (viscosidad, temperatura, estímulos químicos, etc) [7, 10, 38, 39]; flujos de partículas o estructuras complejas que se mueven de acuerdo a un campo de velocidades en un reactor químico o que interactúan para formar estructuras [2, 40, 41], etc. Desde el sistema propuesto por H. Berg en 1971 diseñado para seguir el nado tridimensional de una bacteria de *E. Coli*¹ [6, 8, 42]. El incremento de recursos tecnológicos de las últimas décadas ha impulsado el desarrollo de novedosos métodos de adquisición y análisis de imágenes [11–14, 17], destacando entre ellos trabajos como el de Wu et al, donde a partir de imágenes correspondientes a planos focales y usando algoritmos de enfoque, reconstruyen el nado simultáneo de varias bacterias (*E. Coli*) en volúmenes de 60 μm de profundidad [15] o el trabajo de Sheng et al donde usan holografía digital para registrar el nado simultáneo de dinoflagelados, microorganismos rápidos (250 $\mu\text{m}/\text{s}$ aprox.) [20]. Pese a sus ventajas, estas propuestas presentan algunas restricciones como poca profundidad de rastreo u oclusiones en el caso de Wu, el uso de fuentes de luz coherente y alto costo computacional para decodificar patrones de interferencia en el caso de Sheng. En lo que resta de este capítulo revisaremos el estado del arte en sistemas de rastreo 2D y 3D orientados a sistemas microscópicos.

En su perfil de diseño, un algoritmo de rastreo puede dividirse en dos componentes principales: la detección de partículas en toda la colección de imágenes y la reconstrucción de trayectorias a partir de estas detecciones (Fig. 2.1). En nuestra descripción comenzaremos por discutir las características de los objetos a rastrear vistos a través del sistema óptico del microscopio.

2.1. Patrones de difracción de las partículas.

Por construcción, cualquier procedimiento basado en microscopía óptica que esté diseñado para adquirir información de la estructura o dinámica tridimensional de un objeto debe estar dotado de un procedimiento para reconstruir la información deseada a partir de las colecciones de planos focales adquiridas. Entre los métodos disponibles, uno de los más generales se conoce como modelo paramétrico de la PSF asociada al objeto y básicamente propone que la intensidad de la luz difractada por un objeto arbitrario y detectada por un observador puede ser descrita por una distribución de probabilidad \mathcal{I} que es una combinación lineal de una distribución Poissoniana y una Gaussiana (MPG) [43],

$$\mathcal{I}(x, y, z) \sim \alpha \mathcal{P}(\lambda(x, y, z)) + \beta \mathcal{N}(\mu(x, y, z), \sigma(x, y, z)) , \quad (2.1)$$

donde, \mathcal{P} denota una forma funcional Poissoniana y \mathcal{N} la forma normal o Gaussiana. Basados en esta representación es posible ajustar los pesos α y β además de los parámetros λ, μ, σ para interpolar espacialmente cualquier forma funcional de la PSF asociada. En condiciones experimentales reales la intensidad medida \mathcal{I} está compuesta por la luz

¹La *Escherichia coli* es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria asociada generalmente a los intestinos animales, pero que se puede encontrar en todos lados. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. En promedio mide 4 μm y desplaza a velocidades promedio de $\sim 100 \mu\text{m}/\text{s}$.



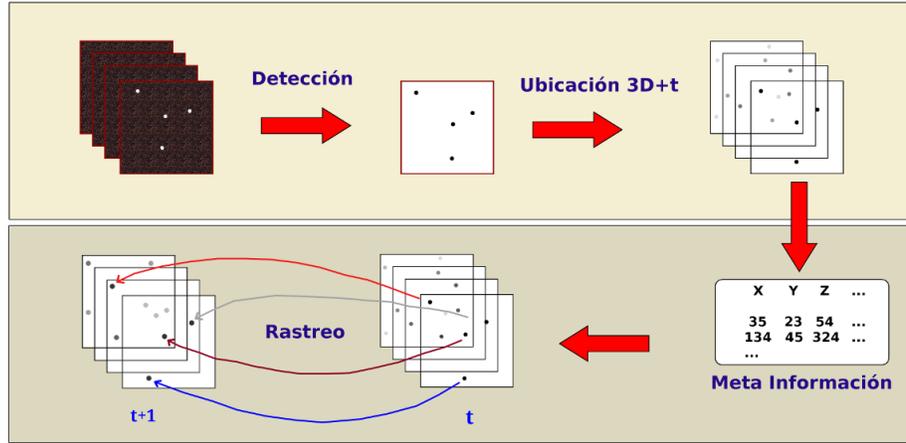


Figura 2.1: Esquema conceptual del proceso de rastreo en dos etapas principales: detección y asociación de posiciones consecutivas.

proveniente de la partícula (I_i) y por componentes residuales provenientes de intensidad de fondo o ruido. Considerando que tanto la luz proveniente de la partícula como los componentes residuales y el ruido puede ser modelados por procesos Poissonianos se puede obtener que la luz medida I_i tiene asociado una distribución de Poisson con un exponente λ que cumple la siguiente relación.

$$\lambda(x, y, z) = \lambda_i(x, y, z) + \lambda_o(x, y, z) + \lambda_n(x, y, z), \quad (2.2)$$

donde, λ_i , λ_o y λ_n corresponden a los exponentes de las distribuciones de Poisson asociadas a la luz de la partícula, la luz de fondo y el ruido. En estos términos, la SNR asociada a la distribución de intensidad luminosa se mide de acuerdo a la expresión de la Ec. 2.4.

$$\text{SNR}(x, y, z) \equiv \frac{\text{E}[I_o(x, y, z)]}{\sqrt{(\text{E}[I(x, y, z)] - \text{E}[I_i(x, y, z)])^2}}, \quad (2.3)$$

expresión que puede reescribirse en términos de los exponentes de las distribuciones Poissonianas de la Ec. (2.2) de forma que:

$$\text{SNR}(x, y, z) = \frac{\alpha \lambda_i}{\sqrt{\alpha(\lambda_i(x, y, z) + \lambda_o(x, y, z) + \lambda_n(x, y, z)) + \sigma_n^2}}, \quad (2.4)$$

donde σ_n se asocia al ruido electrónico implícito en el proceso de digitalización. En caso particular donde la señal de la partícula predomina fuertemente sobre el ruido, la forma funcional del cociente SNR es de la forma $\text{SNR}(x, y, z) \approx \sqrt{\alpha I_i(x, y, z)}$, por el contrario cuando predomina el ruido, el SNR se comporta linealmente con la señal de la partícula, esto es, $\text{SNR}(x, y, z) \approx \alpha I_i(x, y, z)$. Ambas condiciones son extremas y lo usual es que la información tenga condiciones intermedias entre estos dos casos. Las consideraciones expresadas sugieren que para optimizar la SNR es deseable medir y minimizar las distribuciones de probabilidad asociadas a las fuentes de ruido antes de realizar la adquisición de los datos, sin embargo es común enfrentar requerimientos experimentales que ponderan este objetivo, por esta razón es común simplificar la expresión de la Ec. 2.4 y medirla de acuerdo a la PSNR o *peak signal to noise ratio*.

$$\text{PSNR}(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{\sigma_e}, \quad (2.5)$$

donde, σ_e es una estimación experimental de la desviación estándar del ruido total $\sim \sqrt{\alpha(\lambda_i + \lambda_o + \lambda_n) + \sigma_n^2}$. Para ilustrar el efecto de la PSF, en la Fig. 2.2 mostramos el proceso de convolución entre una PSF y una señal original para

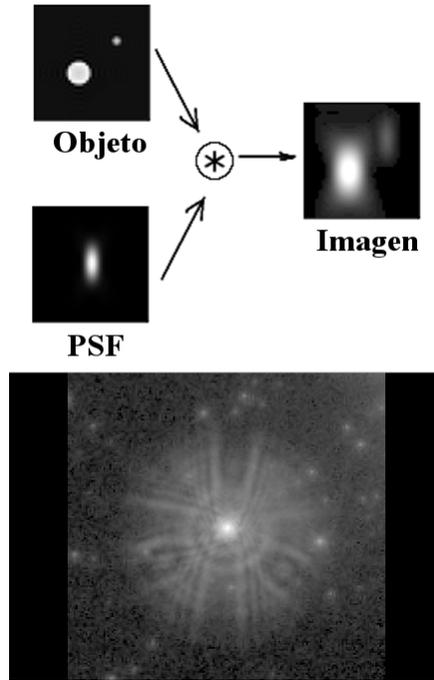


Figura 2.2: Arriba: Formación de una imagen en un microscopio confocal; plano correspondiente al corte longitudinal (XZ). La distribución 3D resultante es producto de la convolución de la señal original con la PSF. Abajo: Función de dispersión puntual (PSF) de la cámara WFPC montada en el telescopio espacial Hubble previo a las correcciones aplicadas a sus sistema óptico. Imagen tomada de wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Point_spread_function.

dar producir una señal de salida. Usualmente, en un proceso de rastreo microscópico, la magnificación utilizada es un factor muy importante a ponderar entre dos requerimientos: un espacio de observación lo más grande posible y una señal asociada a la partícula que permita distinguirla del fondo en la información registrada. En partículas pequeñas y de nado rápido este factor es muy relevante puesto que la información asociada a los objetos de interés suele ser escasa, por ejemplo considérese la Fig. 2.3 que ilustra una situación típica que se enfrenta en el rastreo tridimensional de células. En esta situación, es posible simplificar la descripción paramétrica del MPG, tal que la intensidad de la señal en el espacio es una composición lineal de una Gaussiana multidimensional y un término estocástico, a esta simplificación se le conoce como forma Gaussiana múltiple MG y es de la forma,

$$I(x, y, z) \sim \mathcal{T}(x, y, z) + \mathcal{W}(x, y, z) , \quad (2.6)$$

donde, $\mathcal{T}(x, y, z)$ es una componente determinista definida como,

$$I(x, y, z) = \sum_{i=0}^N P_i(x, y, z) , \quad (2.7)$$

donde $P_i(x, y, z)$ es la seña proveniente de la i -ésima partícula en el punto (x, y, z) . Cuando la intensidad de la señal es suficientemente pequeña en comparación a la PSF del sistema óptico, esta contribución puede describirse en términos de una Gaussiana de la forma,

$$P_i(x, y, z) = A_i \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 - (y - y_0)^2}{2\sigma_{x,y}^2} \right] - \exp \left[-\frac{(z - z_0)^2}{2\sigma_z^2} \right] , \quad (2.8)$$

donde cada partícula i está centrada en (x_0, y_0, z_0) . Usualmente, la dispersión en la dirección z es distinta a la que se observa en el plano $x - y$, por esta razón se implementa un coeficiente σ distinto dependiendo de la dirección y del sistema óptico. Complementando el modelo Gaussiano, el término $\mathcal{W}(x, y, z)$ se asume como un término estocástico que sigue una distribución normal $\mathcal{N}_{\sigma,\mu}(x, y, z)$ para la cual los coeficientes μ y σ se determinan empíricamente.

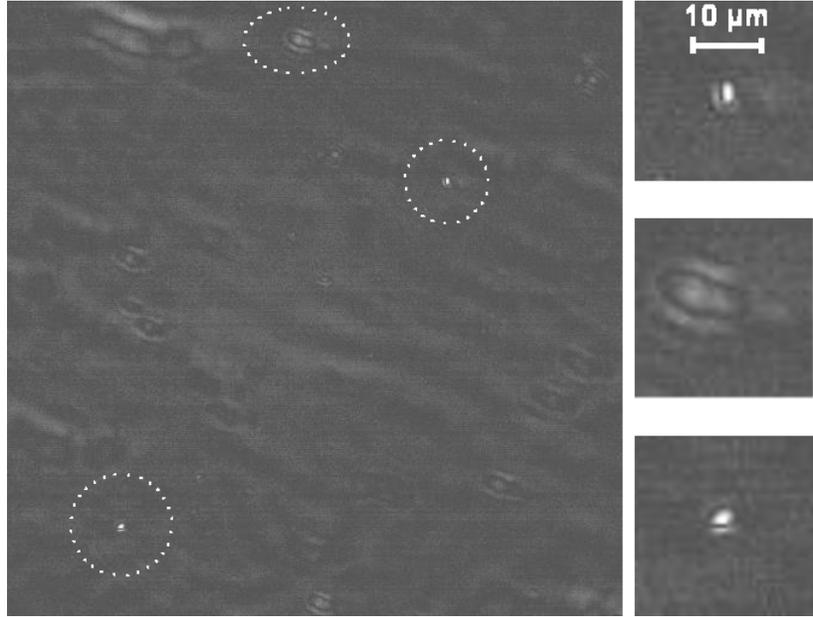


Figura 2.3: Ejemplo de imagen típica empleada para rastreo de micro-partículas (espermatozoides en este caso) vistas en un plano focal. Izquierda: Tamaño relativo entre el campo de observación ($400 \mu\text{m}$) y las partículas para rastreo ($4 \mu\text{m}$) denotadas por el perímetro punteado. Derecha: ampliaciones de las partículas (abajo y arriba) y de artefactos (en el medio).

2.2. Métodos de detección.

En su generalidad, los métodos de detección de partículas incluyen dos etapas de pre-procesamiento de la información; la primera donde se busca minimizar el ruido que contamina la señal y la segunda donde se trata de enfatizar la información buscada; iniciaremos la descripción de los métodos de detección mencionando algunas de las técnicas básicas al respecto.

2.2.1. Reducción de ruido

Dos de las técnicas más utilizadas para reducción del ruido en las imágenes son el suavizado Gaussiano y los filtros basados en *wavelets*, ambas técnicas han demostrado ser efectivas en general y de fácil aplicación computacional, lo que las ha vuelto muy populares. En lo que sigue las describiremos brevemente además de mencionar algunas otras.

Suavizado Gaussiano.

Una de las formas más básicas para eliminar ruido homogéneamente distribuido es conseguir una versión suavizada $\mathcal{J}(i, j)$ de la imagen como resultado de la convolución entre un operador Gaussiano $\mathcal{G}_\sigma(i, j)$ etiquetado por un parámetro σ y la imagen original $\mathcal{I}(i, j)$ tal que,

$$\mathcal{J}(i, j) = (\mathcal{G}_\sigma \star \mathcal{I})(i, j) = \sum_{i'}^{N_x} \sum_{j'}^{N_y} \mathcal{G}_\sigma(i - i', j - j') \mathcal{I}(i', j'). \quad (2.9)$$

En el caso de estructuras minúsculas contaminadas por ruido aditivo sin correlación, el filtro tipo Gaussiano maximiza la SNR dado que la forma funcional de la PSF se asemeja a la forma del filtro. En estos casos, la correlación del filtro con la imagen, seguido de un procedimiento de umbrales para seleccionar las zonas de alta correlación pueden proporcionar la localización espacial de las partículas de interés, sin embargo, este procedimiento es muy sensible a las heterogeneidades en el espacio, por lo que suele descartarse para el tratamiento de imágenes arbitrarias.

Filtros basados en *wavelets*.

Como ya hemos mencionado, en diferentes contextos es usual encontrar enormes cantidades de imágenes experimentales cuyo factor común es que la apariencia de los objetos de interés presenten importante variabilidad en formas y tamaños, en esta situación, las técnicas basadas en la identificación de patrones tridimensional específicos puede resultar ineficientes para detectarlos. En este contexto, una clase de técnicas usadas frecuentemente son las basadas en *wavelets* u ondículas: una *wavelet* es una oscilación que comienza con amplitud cercana pero diferente de cero, se incrementa y decrece hasta regresar alrededor de cero, visualizada típicamente como una oscilación corta; son usuales en registros sísmológicos o electrocardiogramas. Las *wavelets* son ampliamente utilizadas en procesamiento de señales, su ventaja sobre transformadas como Fourier para el análisis de señales en el dominio del tiempo y la frecuencia ha contribuido a que sea ampliamente utilizada en campos como procesamiento digital de imágenes, análisis de electrocardiogramas, estudio del ADN, análisis de proteínas, meteorología, reconocimiento de voz, análisis multi-fractal, biometría, etc.

Dentro de las clases de transformaciones disponibles utilizando la base *wavelet*, una que se usa frecuentemente para eliminar ruido e identificar objetos que son difusos y de tamaño relativamente variable es la que se conoce como *isotropic undecimated wavelet transform* (IUWT) [44–47]. La transformación IUWT pertenece a la clase conocida como técnicas de escala múltiple donde la imagen se filtra mediante una convolución con una función kernel que se va escalando siguiendo una secuencia de escalas predefinida. El resultado es una secuencia de coeficientes que permiten reconstruir la señal original en el espacio de *wavelets* (espacio que tiene inversa) donde forman una representación que después de identificarse se puede regresar al espacio de configuraciones. Una de las variantes de esta técnica es la representación B3-spline de una IUWT bidimensional, este método descompone la imagen original I en \mathcal{K} planos en el espacio *wavelet* mas una versión suavizada de la imagen original, todos del mismo tamaño que la imagen original. Enseguida se obtiene la convolución renglón a renglón y columna a columna entre la imagen I y el kernel unidimensional dado por $[1/16, 1/4, 3/8, 1/4, 1/16]$, añadiendo $2^{k-1} - 1$ ceros entre cada entrada del kernel para cada escala k . Enseguida se hace la convolución de la imagen resultante $I_{k-1}(i, j)$ con la imagen original resultando $I_k(i, j)$, a partir de este par de imágenes es posible calcular la representación k en el espacio *wavelet*,

$$W_k(i, j) = I_{k-1}(i, j) - I_k(i, j), \quad 0 \leq k < K.$$

donde $I_0(i, j) = I(i, j)$. La representación final de la imagen original es en términos de la serie de $K + 1$ imágenes en el espacio de *wavelets* W_1, \dots, W_K, I_K y es de la forma:

$$I(i, j) = I_K(i, j) + \sum_{k=1}^K W_k(i, j). \quad (2.10)$$

La representación IUWT en *wavelets* se caracteriza por permitir la localización en frecuencia y espacio de la señal, esta característica juega un papel sumamente relevante porque permite separar los componentes de la señal por su tamaño. Los valores altos corresponden a estructuras definidas mientras que los pequeños usualmente corresponden a ruido. En este contexto la estrategia a seguir para eliminar ruido se basa en una adecuada elección del umbral para separar el ruido de la señal en el espacio de *wavelets*. El operador de umbral $\mathcal{T}_d : \mathcal{I} \rightarrow \mathcal{I}'$ se define como;

$$\mathcal{I}'(i, j) = \begin{cases} I(i, j) & \text{si } |I(i, j)| > d \\ 0 & \text{En otro caso,} \end{cases} \quad (2.11)$$

donde d es el umbral elegido y se relaciona con la desviación estándar σ_k de los coeficientes de la señal en la representación de *wavelets* a la resolución k . Un nivel estándar para el umbral que se usa frecuentemente en aplicaciones orientadas en astrofísica y fluorescencia es de $3\sigma_k$, no obstante existen esquemas más avanzados basados en estimación bayesiana que tratan de evitar la dependencia del valor del parámetro p [48–50]. En estos esquemas la representación de cada capa en el espacio de *wavelets* es de la forma:

$$\widetilde{W}_k(i, j) = W_k^{-1}(i, j) \max [W_k^2(i, j) - 3\sigma_k^2] \quad (2.12)$$

donde $\max[-]$ denota el valor máximo del argumento. El umbral determinado corresponde a la desviación estándar de los coeficientes *wavelet* para cada nivel de resolución k y se emplea para seleccionar sólo los coeficientes necesarios para construir la representación a partir de la cual y mediante la transformada inversa, se reconstruirá la versión de imagen original que está filtrada.

Técnicas de estabilización de varianza.

Generalmente se asume que el ruido que contamina a las imágenes es del tipo aditivo Gaussiano tal que la varianza del ruido es independiente de la señal, no obstante y como ya mencionamos antes, es común tener una combinación entre ruido tipo Poisson y Gaussiano, lo que hace heterogénea la distribución de ruido en el espacio. En esta situación se han propuesto métodos para estabilizar la varianza a lo largo de la extensión de la imagen, por ejemplo, en el caso de ruido tipo Poisson se utiliza la técnica basada en la transformada Anscombe [51], que propone transformar la intensidad de acuerdo a la relación $I(i, j) \rightarrow 2\sqrt{I(i, j) + 3/8}$ de forma que se consigue un ruido tipo Gaussiano en la imagen, o en su versión general (GAT) calcula los parámetros de la transformación en función de los datos en la imagen. Esta transformación es aplicable en ruido tipo Poisson con valores medios menores que 10 o mezclas de Gaussiana y Poisson del mismo orden.

2.2.2. Detección de partículas.

Como vimos antes, la interacción de la luz refractada por una partícula microscópica (vista en una escala compatible con rastreo²) con las componentes del sistema óptico puede modelarse como la convolución de una partícula cuasi-puntual con la PSF asociada al sistema óptico. La señal resultante se registra en las imágenes experimentales como regiones semi circulares mas o menos difusas *spots* (Fig. 2.2) que pueden describirse como perturbaciones locales en imágenes con baja SNR; estas perturbaciones son tan pobres que los métodos básicos de umbrales o texturas tienen poco éxito para segmentarlas correctamente. En este contexto, desde hace ya varios años se han creado diversas técnicas orientadas a identificar esta clase de señales en imágenes de microscopía, entre ellas, una de las más utilizadas es basarse en modelos paramétricos MPG (Ec. 2.1) o su correspondiente simplificación MG (Ec. 2.8) para crear perfiles específicos para cada clase partícula-PSF y aplicar detectores en el espacio de configuraciones o en el espacio de Fourier [52, 53]. Al respecto se ha encontrado que una de las mejores aproximaciones para el perfil cuasi-bidimensional de una partícula corresponde a la función resultado de aplicar un operador Lapaciano a una Gaussiana (LoG), función conocida como sombrero Mexicano que, en términos de la expresión MG de la Ec. 2.8 es de la forma:

$$\text{LoG} = \Delta P(x, y, z) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi)^3 \sigma_{x,y}^4 \sigma_z^2}} \left(\frac{x^2 + y^2}{\sigma_{x,y}^4} - \frac{2}{\sigma_{x,y}^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^4} - \frac{1}{\sigma_z^2} \right) \exp \left[-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma_{x,y}^2} - \frac{z^2}{2\sigma_z^2} \right]. \quad (2.13)$$

En la práctica, el filtro LoG 3D puede aplicarse como una convolución sucesiva a lo largo de tres dimensiones de la región candidata y un filtro unidimensional preparado en base al perfil ya descrito. Esta estrategia facilita su aplicación incluso para imágenes extensas.

Enseguida haremos una breve reseña de algunas de las técnicas más populares y las generalidades de los principios involucrados.

Producto multi-escala en *wavelets*.

En el contexto de una imagen es plausible suponer que, a diferencia de ruido, la señal correspondiente a los objetos de interés es consistente a través de varias transformaciones de escala, con este argumento en mente, la representación

²La escala o amplitud de campo necesaria para rastrear una partícula se define en función de dos parámetros: el tamaño relativo de la partícula respecto al campo visual y su velocidad de desplazamiento. En condiciones ideales, el tamaño relativo de la partícula debe ser suficientemente grande como para poder segmentarla, mientras que la amplitud de campo debe ser lo bastante amplia como para observar a la partícula durante el tiempo suficiente para determinar su dinámica.

multi-escala de la imagen basada en *wavelets* que fue discutida en la sección 2.2.1 proporciona los principios para implementar un método que enfatice la señal a partir de los coeficientes de esta representación en *wavelets*. Al respecto, considérese la expresión conocida como producto multi-escala de la imagen que es de la forma:

$$P_K(i, j) = \prod_{k=1}^K W_k(i, j) . \quad (2.14)$$

Este método trabaja bajo la suposición de que la señal está representada por unos pocos coeficientes mientras que el ruido, aleatoriamente distribuido, no prevalece en las variaciones de escala. Los objetos contenidos en la imagen resultante P_K pueden ser segmentados por ser los pixeles conectados por encima de un umbral simple convirtiéndola en una imagen binaria. Algunas modificaciones recientes que proponen un kernel Gaussiano para el ajuste de coeficientes en lugar de interpolaciones por *splines* se han usado recientemente para la segmentación y análisis de células madres [54].

Transformada multi-escala para varianza homogénea.

Otra estrategia para detección basada en la descomposición *wavelet* propone aprovechar la descomposición multicapa propuesta en la Ec. 2.10 para aplicar un proceso individual que haga homogénea la varianza del ruido en cada capa I_k y posterior a este proceso realizar el cálculo de la representación global W_k de forma que el proceso global se calcule en base a coeficientes óptimos. El proceso de selección de los coeficientes correspondientes a cada capa se realiza en base al proceso de prueba por multi-hipotesis de Benjamini-Hochberg [55] que depende de los parámetros (K, γ) para identificar los pixeles que en cada capa pertenecen a los objetos de interés. La reconstrucción global de la información permite conectar las capas binarias de forma que los objetos segmentados se reconstruyen a partir de las regiones conexas por multi-capa.

Filtro tipo *top hat*.

Inspirado en una geometría que recuerda un sombrero de copa, este filtro usualmente se emplea para dar realce a zonas circulares brillantes en ambientes con fondo de intensidad variable. Basado en parámetros de la imagen, el filtro emplea operadores con umbral adaptativo que toman en cuenta la morfología y la intensidad de la región analizada que permiten discriminar entre formas circulares de intensidad variable que incluyen en su selección tanto objetos difusos como objetos pequeños. Dada cada ubicación específica (i, j) se calculan las intensidades mínima y máxima en las vecindades delimitadas por dos regiones circulares denotadas por D_{top} y D_{brim} definidas de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} D_{top}^{i,j} &= \{(i', j') : (i - i')^2 + (j - j')^2 < R_{top}^2\} , \\ D_{brim}^{i,j} &= \{(i', j') : R_{top}^2 < (i - i')^2 + (j - j')^2 < R_{brim}^2\} . \end{aligned}$$

donde el radio R_{top} corresponde al radio del círculo superior del “sombrero” y el radio R_{brim} al radio inferior. Dado un punto arbitrario de la imagen (i, j) el algoritmo de transformación evalúa si la diferencia entre las intensidades promedio $\bar{I}_{top} - \bar{I}_{brim}$ está por encima de cierto umbral H , en caso afirmativo, asigna la intensidad $I(i, j)$ al clasificador C , en caso contrario, asigna el valor 0. El resultado final se convierte en un mapeo binario mediante una simple regla que asigna el valor 1 a todos los pixeles diferentes de cero y mediante criterios de conectividad se componen los objetos de interés. El valor clave del umbral H se puede definir en función del valor de SNR que se busca, por ejemplo, si se desea segmentar la colección de objetos cuya SNR esté por encima de cierto valor de umbral a , el valor de H puede fijarse como $H = a \sigma_{brim}$, donde σ_{brim} es la desviación estándar asociada a la distribución de intensidad en la región delimitada por D_{brim} . Existen variantes de este filtro que emplean diferentes geometrías construidas para casos particulares.

Filtro de realce para regiones circulares.

Basado en un kernel tipo Poisson-Gaussiano semejante al descrito en la Ec. 2.9 de la forma $(2\sigma_L^2 - i^2 - j^2)\sigma_L^{-4}\mathcal{G}_{\sigma_L}$, este filtro se emplea para enfatizar regiones circulares cuya geometría se ajusta en función del parámetro σ_L . Al resultado de la convolución entre la imagen y el filtro puede aplicarse un umbral l_d para mapear el resultado al espacio de clasificación C , a partir del cual y usando criterios de conectividad, es posible segmentar los objetos de interés. A semejanza del filtro “top hat”, este filtro depende de dos parámetros (σ_L, l_d) para enfatizar regiones e incluso se puede entender como la versión continua del “top hat”.

Filtro *top-hat* para dilatación de niveles de grises.

Similar al filtro de realce, este filtro usa una operación de dilatación para optimizar el desempeño del detector. Como primer paso, se aplica un filtro Gaussiano de varianza σ para suavizar la imagen original \mathcal{I} , obteniendo la imagen \mathcal{J} , posteriormente la imagen se dilata usando un elemento A en la escala del objeto de mayor tamaño que desea detectarse³. El resultado es una imagen \mathcal{J}_A a partir de la cual es posible obtener los límites del algoritmo *top-hat* mediante la operación $C = \mathcal{J} - \mathcal{J}_A$. El resultado de esta operación elimina el ruido y preserva los objetos por debajo de la escala definida por el elemento A además de los objetos difusos pertenecientes a áreas extendidas con huecos. Enseguida a la imagen C se le aplica un umbral l_d y se agrupan los píxeles conectados para formar los objetos. Si durante el proceso es importante preservar los tamaños de los objetos, es posible aplicar un nuevo proceso de segmentación con un nuevo umbral v_d . El algoritmo completo depende de cuatro parámetros: σ, r_A, l_d, v_d .

Detección basada en filtro *H-Dome*.

Otro método empleado frecuentemente en la detección de *spots* o cúmulos en imágenes, es la transformada *H-Dome*, operación que garantiza que todos los objetos presentes en la imagen transformada tendrán la misma intensidad máxima, característica que puede ser aprovechada en la implementación de métodos de rastreo probabilísticos. La transformación comienza por suponer que la imagen original \mathcal{I} está formada por N_0 objetos (puntos brillantes) embebidos en un fondo $B(i, j)$ que incluye una componente de ruido $\eta(i, j)$ (aditivo o multiplicativo) con correlación espacial. En este contexto el problema a resolver se convierte en estimar correctamente el número N_0 y las posiciones asociadas $(x_l, y_l)^T, l = \{1, \dots, N_0\}$ en el contexto de la imagen ruidosa, este procedimiento se ejecuta en tres pasos consecutivos: a la imagen original se le aplica un filtro *LoG* (Ec. 2.8) de escala σ_L (ajustada de acuerdo al tamaño de los objetos) para enfatizar a los objetos y sustraer el fondo resultando en una imagen \mathcal{J} . En el paso siguiente, a \mathcal{J} se le aplica un filtro de la forma $\mathcal{J} - h$, donde $h > 0$ es una constante dividiendo la imagen en dos componentes: el fondo que está por debajo de h y la señal que está por encima de h . El procedimiento implica que la imagen original puede ser descrita como:

$$\mathcal{I}_\sigma(i, j) = \mathcal{H}_\sigma(i, j) + \mathcal{B}_\sigma(i, j), \quad (2.15)$$

donde $\mathcal{H}_\sigma(i, j)$ denota los objetos y estructuras dentro de la imagen con valores por encima de h mientras que $\mathcal{B}_\sigma(i, j)$ representa las estructuras no uniformes que componen en el resto de la imagen. El paso final del algoritmo comienza por compensar la pérdida de información del paso anterior, para ello, el valor de cada píxel de la imagen \mathcal{H}_σ se eleva a la potencia s (donde el valor de s se determina en términos de la varianza σ_L), obteniendo una nueva versión de la imagen a la que se le aplica un nuevo proceso de filtrado por el kernel tipo *LoG* con varianza σ_L . La función que describe la imagen resultante de este proceso se denomina función de muestreo $q(i, j|\mathcal{I})$ y describe los elementos de área que son similares a los objetos de interés, esta función es de la forma:

$$q(i, j|\mathcal{I}) \equiv \mathcal{H}_\sigma^s(i, j) = (\mathcal{J}(i, j) - B(i, j))^s. \quad (2.16)$$

Basados en esta función y usando el método *Monte Carlo* se realiza un muestreo sistemático para obtener N pares ordenados $\vec{x} \equiv (i, j)$ que aproximarían la función de muestreo de la forma $\mathbf{x}^l \sim q(i, j|\mathcal{I})$, donde $l \in \{1, \dots, N\}$.

³En el caso de partículas de apariencia semi-circular es usual utilizar un disco de radio r_A

Enseguida, los N puntos se agrupan usando un algoritmo mean-shift para obtener M distintos cúmulos y para cada uno de estos cúmulos se calcula la media y varianza en función de los N_c puntos que lo forman:

$$\begin{aligned}\mathbf{x}_c &= \frac{1}{N_c} \sum_{l=1}^{N_c} \mathbf{x}_c^l, \\ \mathbf{R}_c &= E \left[(\mathbf{x}_c^l - \mathbf{x}_c) (\mathbf{x}_c^l - \mathbf{x}_c)^T \right].\end{aligned}$$

Analizando los valores medios y covarianza de las distribuciones asociadas a los cúmulos es posible establecer que el determinante de la matriz de covarianza asociada a objetos validados como reales está acotado por el valor $(\sigma_m a x^2 + \sigma_L^2) s^{-1}$. Mientras que las muestras correspondientes a ruido son de orden de $\sigma_L^2 s^{-1}$. A partir de estos datos es posible establecer dos criterios para distinguir entre objetos y artefactos: 1) el número de muestras en el cúmulo N_c debe ser superior al número de ocurrencias elegidas aleatoriamente dentro del área ocupada por el cúmulo mismo y 2) el determinante de la matriz de covarianza del *cluster* denotado por $\det(\mathbf{R}_c)$, debe ser menor que σ_M^4 / s^2 , donde σ_M caracteriza el tamaño máximo de los objetos de interés. Mientras que el filtro es relativamente insensible a los valores que toman los parámetros s y N , es necesario ajustar los valores de las desviaciones σ_L y σ_M en base a medidas directas en la apariencia media de los objetos de interés y de la SNR en el caso del parámetro h como en el caso ya descrito en el método *top-hat*.

Detección basada en características de la imagen.

Esta clase de técnicas es una variante de la técnica mencionada anteriormente que retoma el proceso a partir de la reconstrucción propuesta en la Ec.2.16 que separa los cúmulos del fondo y del ruido. La variante introducida propone que si la imagen posee una SNR por encima de 4, los objetos de interés pueden describirse como una combinación entre variables de intensidad y parámetros geométricos como curvatura. Específicamente, a diferencia del ruido que no presenta simetría específica, un objeto de interés está caracterizado por una combinación de distribuciones de intensidad convexa y una relativamente alta intensidad. Para explotar esta característica el método propone generar un mapa de clasificación C a partir de una imagen filtrada de ruido por el método LoG tal que; $J(i, j) = (G_\sigma \star I)(i, j)$, de acuerdo al siguiente proceso:

$$C(i, j) = J(i, j) \kappa(i, j), \quad (2.17)$$

donde la curvatura $\kappa(i, j)$ de cada pixel de la imagen J está dada por el determinante de la matriz Hessiana $\mathbf{H}(i, j) \equiv (\nabla \cdot \nabla^T)(i, j)$, operador que por sí mismo es conocido por ser un buen detector de cúmulos. El mapa de clasificación C se hace binario usando un umbral l_d y un tamaño crítico v_d que no necesariamente se relaciona con la apariencia del objeto.

Algoritmo AdaBoost.

El algoritmo *AdaBoost* [56] es una metodología de aprendizaje automático que se utiliza frecuentemente en visión computacional para detección de objetos. El método toma una decisión booleana sobre un objeto en base a un vector de características construido a partir de la proyección del objeto y una colección predefinida de patrones de apariencia conformada por pequeñas imágenes con patrones de simetría específicos. Usualmente esta clase de algoritmos de detección basados en características son preferidos por encima de los algoritmos basados en criterios de intensidad de grises dado que son mucho más veloces y permiten incluir más criterios para evaluar las decisiones, en este sentido, *AdaBoost* utiliza un conjunto de N_F características tipo Haar construidas a partir de formas simples donde cada una de estas características puede transformarse por escalamiento o rotación en l formas simétricas derivadas donde $l \in \{1, \dots, N_F\}$. Cada una de las N_F características y sus l formas simples transformadas se utilizan para entrenar un clasificador que genera N_T máscaras definidas como detecciones positivas y N_F detecciones negativas, a partir de este conjunto se eligen N_{AB} características como las representativas de los objetos. Aplicando este clasificador a la

imagen es posible generar un mapeo de la forma C^l que se transforma a una forma binaria mediante un umbral para llegar a la forma final C_B^l ; este procedimiento se aplica para todas las características N_{AB} consiguiendo un conjunto de detecciones a las que finalmente se les aplica un filtro de tamaño basado en un parámetro v_d para eliminar las regiones pequeñas. Para agilizar el trabajo del clasificador *AdaBoost* es usual que las entrada del algoritmo *Adaboost* se acople a la salida de un clasificador previo mucho menos eficiente pero si más rápido.

Discriminante de Fisher.

El análisis por discriminantes es una metodología estadística empleada para clasificar objetos en grupos distintos a partir de una serie de características previamente definidas [57]. Dentro de esta clase, el discriminante de Fisher [58] es una técnica que utiliza una representación de características similar a la descrita en el método *Adaboost* para clasificar las regiones de la imagen original. Partiendo de una colección de N_F imágenes de dimensión $n \times n$ compuesta por patrones de simetría específicos tipo Haar además de un conjunto de entrenamiento conformado por detecciones positivas y negativas, esta metodología comienza por calcular la representación que cada clase o grupo de entrenamiento posee en el espacio de características, obteniendo dos conjuntos denotados por $\{\mathbf{y}_1^l\}_{l=1}^{N_T}$ y $\{\mathbf{y}_0^l\}_{l=1}^{N_T}$ que corresponden a las detecciones positivas y negativas respectivamente. A partir de estas representaciones se calcula la distribución de cada clase en el espacio de parámetros y sus parámetros asociados: el valor medio μ_c y la matriz de covarianza Σ_c para cada clase ($c \in \{1, 0\}$). En este contexto, la metodología propuesta por Fisher consiste en encontrar la transformación lineal \mathbf{w} tal que, el coeficiente de la Ec. 2.18 sea mínimo.

$$Q(\mathbf{w}) = \frac{(\mathbf{w}^T (\mu_1 - \mu_0))^2}{\mathbf{w}^T (\Sigma_1 + \Sigma_0) \mathbf{w}} . \quad (2.18)$$

Esta perspectiva puede ser vista como una forma de maximizar la SNR de la clase, interpretando el numerador como la varianza entre clases y denominador como la varianza entre una clase en sí misma. Fisher demuestra que la condición óptima ocurre cuando se cumple que,

$$\mathbf{w} = \frac{(\mu_1 - \mu_0)}{(\Sigma_1 + \Sigma_0)} . \quad (2.19)$$

Para evaluar una objeto arbitrario el procedimiento establece que la información del objeto debe transformarse en un vector unidimensional de tamaño n^2 en el espacio de características mediante la proyección $\mathbf{w}^T \mathbf{y}$ y posteriormente se evalúa su distancia a cada clase, confirmando que es una detección positiva siempre y cuando se cumpla la condición siguiente:

$$\|\mathbf{w}^T \mathbf{y} - \mu_1\| < \|\mathbf{w}^T \mathbf{y} - \mu_0\| , \quad (2.20)$$

resultando un artefacto en cualquier otro caso.

Desempeño comparativo.

Hasta ahora hemos presentado un conjunto de los más populares algoritmos empleados en detección de cúmulos de píxeles asociados a objetos presentes en imágenes experimentales, principalmente de contenido biológico, dentro de este contexto una cuestión importante es el desempeño comparativo que estos algoritmos presentan en situaciones equivalentes. Al respecto, en su trabajo presentado en el 2010, Smal *et al* [59] realizaron una serie de experimentos numéricos para comparar el desempeño de varios algoritmos en la detección de objetos sintéticos de apariencia similar a células fluorescentes. Para ello diseñaron imágenes típicas construidas con tres tipos de fondo; a) uniforme; b) con un gradiente lineal horizontal y c) incluyendo estructuras borrosas. En todos los casos se agregó ruido tipo Poisson y se normalizó para mantener condiciones de baja SNR (~ 2) 2.1. Sus resultados muestran que los algoritmos con mejor desempeño son los clasificados como supervisados; textitAdaBoost y discriminantes de Fisher, exhibiendo un TPR (*true positive rate*) cercano a uno, un bajo FPR (*false positive rate*) y una baja sensibilidad a la variación en los valores de los parámetros. En contraste, los algoritmos no supervisados exhiben una alta sensibilidad a los parámetros y un pobre desempeño de acuerdo al FPR obtenido.

Tipo Imagen	True Positive Rate							
	AdaBoost	Fisher D.	H-Dome	M-Top Hat	Spot E.	Top-Hat	M.Scale	Wavelet M.
A	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.81
B	0.94	0.99	0.97	0.87	0.91	0.88	0.99	0.37
C	0.94	0.96	0.90	0.88	0.95	0.48	0.93	0.30

AdaBoost

Cuadro 2.1: Tabla comparativa elaborada en base a los datos publicados por Smal *et al* [59] para analizar la eficiencia exhibida por diferentes algoritmos de segmentación diseñados para detectar cúmulos contenidos en imágenes sintéticas con una SNR = 2. La tabla muestra el máximo nivel de detección (TPR) obtenido por cada algoritmo restringido a un FPR a 0.1 y bajo tres clases de fondo: a) fondo uniforme; b) gradiente lineal horizontal; c) artefactos en forma de estructuras borrosas.

2.2.3. Traslapes entre objetos.

En casos donde existe traslapes de objetos una estrategia comúnmente usada es proponer que la intensidad de los objetos puede ser descrita por una superposición de n Gaussianas con centros desplazados, acotadas al tamaño de la PSF experimental, descritas por:

$$M(x, y, z) = \sum_{i=1}^n P_i(x, y, z) + b, \quad (2.21)$$

donde b es el nivel promedio de grises del fondo. La estrategia es entonces incrementar la N hasta que la adición de mayores componentes no ejerce cambios significativos de acuerdo al parámetro de estimación χ_{r_n} que es proporcional a la suma del cuadrado del error,

$$\chi_{r_n}(x, y, z) = \frac{\sum_{(x,y,z) \in I} (M_n(x, y, z) - I(x, y, z))^2}{r_n}, \quad r_n = N - p_n, \quad (2.22)$$

donde N es el número de vóxeles que componen al objeto y $p_n = 4n + 1$ es el número de grados de libertad de los parámetros asociados a las Gaussianas de la aproximación. Para determinar cuándo son suficientes los elementos base que se adiciona, se pueden usar pruebas estadísticas sobre la varianza como la prueba T de Fisher que advierte del nivel de confianza dentro de un cierto porcentaje, porcentaje que es muy dependiente de la magnitud del SNR [59]. Para el lector interesado, una revisión extensa de las particularidades asociadas a esta clase de métodos se puede encontrar en las referencias [59, 60]. En este punto concluiremos con nuestra descripción de métodos orientados a la detección de cúmulos en secuencias de imágenes microscópicas y comenzaremos la descripción de métodos de rastreo asociado.

2.3. Rastreo de cúmulos.

Una forma general para definir el rastreo de partículas es como una regla de correspondencia que permite definir las posiciones consecutivas de una partícula a lo largo de una secuencia de detecciones. Antes de mostrar algunos de las metodologías representativas de rastreo, comenzaremos por hacer algunas definiciones útiles a este propósito:

1. Sea k un índice que denota un instante de tiempo dentro de una secuencia de imágenes l tal que: $0 \leq k \leq l$.
2. Dado un instante de tiempo k , al conjunto de $n(k)$ detecciones asociadas se le denota por $Z(k) = \{z_0(k), \dots, z_n(k)\}$.
3. El conjunto de detecciones a lo largo de toda la secuencia l se denota por $\mathbb{Z}^l = \bigcup_0^l Z(k)$.

4. En un proceso de rastreo múltiple, la trayectoria formada por k detecciones consecutivas de la partícula i se representa por $\mathbf{r}_i^k \equiv \{\mathbf{r}_i(1), \dots, \mathbf{r}_i(k)\}$.
5. Al conjunto de N trayectorias individuales se le denota por: $\mathbb{R}_N^l \equiv \bigcup_{i=0}^N \mathbf{r}_i^l$.

Bajo estas definiciones analizaremos dos perspectivas distintas para rastreo de partículas: los métodos no probabilísticos que establecen los criterios para unir posiciones consecutivas en base al cálculo de valores extremos para parámetros preestablecidos como energía o desplazamiento espacio-temporal y los métodos probabilísticos, que en base a la historia de la partícula usan criterios estadísticos para estimar los posibles desplazamientos.

2.3.1. Métodos no probabilísticos.

Rastreo por criterios de vecindad.

Este criterio, conocido generalmente como NN (*nearest neighbors*), es uno de los algoritmos de rastreo más intuitivos y simples de implementar, esta característica lo ha hecho común en muchas aplicaciones comerciales de rastreo. Para su funcionamiento requiere un conjunto de detecciones en el espacio-tiempo a partir de las cuales reconstruye trayectorias en base a criterios de vecindad ajustados de acuerdo a los parámetros dinámicos asociados a las partículas rastreadas, por ejemplo, dada la trayectoria \mathbf{r}_i^k , el criterio para establecer la posición \mathbf{r}_i^{k+1} es;

$$\|\mathbf{r}_i^{k+1} - \mathbf{r}_i^k\| \leq \|\mathbf{r}_j^{k+1} - \mathbf{r}_i^k\| ; \forall \mathbf{r}_j^k \in Z(k+1), \quad (2.23)$$

y así hasta completar la trayectoria. En la práctica, existen dos perfiles básicos para adaptar el algoritmo NN a condiciones más realistas: el rastreo local (INN) y el rastreo global (gINN);

- **Rastreo LNN:** dada una colección de trayectorias R_N^k al tiempo k y un conjunto de detecciones en el tiempo $(k+1)$, el criterio para establecer la serie de detecciones que formarán las trayectorias R_n^{k+1} es el descrito en la Ec. 2.23. Una vez hechas las asociaciones, el conjunto restante de detecciones dentro de $Z(k)$ que no se asocian, y que se denotarán por s se utiliza para iniciar nuevas trayectorias que se agregarán a las existentes para tener \mathbb{R}_{N+s}^{k+1} . Este procedimiento se repite hasta que no haya más detecciones disponibles.
- **Rastreo gLNN:** dada una colección de trayectorias R_N^k al tiempo k y las $n(k+1)$ detecciones del conjunto $Z(k+1)$, para determinar posiciones consecutivas se utiliza el siguiente criterio:

$$\min \left[\sum_{i=0}^N \|\mathbf{r}_i^{k+1} - \mathbf{z}(k+1)\| \right],$$

donde se establece que la asociación entre trayectorias y detecciones se obtiene calculando la distancia mínima que resulte de todas las combinaciones posibles. La condición de finalización se alcanza cuando no hay más detecciones no-asociadas.

En la práctica es usual utilizar cotas que limitan la búsqueda a cierta distancia máxima d_{max} asociada a los desplazamientos máximos compatibles con la dinámica de las partículas. Concluiremos la descripción mencionando que pese a que el algoritmo NN funciona razonablemente bien cuando la resolución temporal y el TPR asociado al método de detección son suficientemente altos para garantizar la densidad necesaria para que no existan huecos en las trayectorias, condiciones que suelen ser poco frecuentes en la realidad.

Correspondencia entre puntos.

La correspondencia entre detecciones consecutivas es una categoría de algoritmos que surgió para resolver los problemas de selección y asignación de posiciones consecutivas implícitas en el desplazamiento de partículas. Al respecto, un ejemplo de un refinamiento a las técnicas de NN es la propuesta por Sethi y Jain en 1987 [61] donde

sustituye el criterio basado en distancia descrito anteriormente por la función de costo $c_i(k)$ de la Ec. 2.24 que toma en cuenta la historia previa del desplazamiento y asigna mayor importancia a las trayectorias más regulares y con mayor movilidad.

$$c_i(k) = \gamma_1 \left[1 - \frac{(\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}) \cdot (\mathbf{r}_i^k - \mathbf{r}_i^{k-1})}{\|\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}\| \times \|\mathbf{r}_i^k - \mathbf{r}_i^{k-1}\|} \right] + \gamma_2 \left[1 - 2 \frac{\sqrt{\|\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}\| \times \|\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}\|}}{\|\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}\| + \|\mathbf{r}_i^{k-1} - \mathbf{r}_i^{k-2}\|} \right], \quad (2.24)$$

donde el primer término de la ecuación favorece los desplazamiento con dirección constante, mientras que el segundo favorece los desplazamientos regulares. Ambos factores se pueden ponderar por las constantes γ_1 y γ_2 respectivamente.

Rastreo de puntos por características.

Propuesto en 1999 por Chetverikov [62] y aplicado posteriormente en el rastreo de partículas en diferentes contextos [63] incluyendo fluorescentes por Sbalzarini [64], el algoritmo conocido como Feature Point Tracking Method (FPT) es un método que establece una regla de correspondencia basada en matrices para relacionar dos conjuntos de detecciones consecutivas. La regla evolutiva se conoce como matriz de asociación \mathbb{G}_s^k y se define en términos del conjunto compuesto por $\{Z(k), Z(k+s)\}$, donde $s \in \{1, \dots, l\}$, es un parámetro que establece cuantos pasos de tiempo se toman en cuenta para formar el conjunto. Bajo estas definiciones, la matriz toma los siguientes valores.

$$\mathbb{G}_s^k(i, j) = \begin{cases} \delta_{i,j} & \text{si } \mathbf{r}_i^k \cup \mathbf{r}_j^{k+s} \in \{Z(k), Z(k+s)\}, \\ 0 & \text{en otro caso.} \end{cases} \quad (2.25)$$

Expresión que indica que la entrada de la matriz es diferente de cero solo en el caso donde la i -ésima partícula pertenece a ambos conjuntos. En los casos donde ocurren oclusiones o las partículas aparecen, se utilizan líneas y columnas virtuales para representar el inicio o fin de trayectorias. Bajo estas condiciones, el procedimiento óptimo para asociación se realiza utilizando una función de puntuación basada en el modelo de transporte de Hitchcock [65] que es de la forma:

$$\Phi = \sum_{i=0}^{m_k} \sum_{j=0}^{m_{k+s}} \phi_{i,j} g_{i,j}, \quad (2.26)$$

donde m_k y m_{k+s} son los números de detecciones en el tiempo k y $(k+s)$ respectivamente, mientras que $\psi_{i,j}$ es la función de costo por la asociación entre las detecciones $z_i(k)$ y la detección $z_j(k+s)$ y $g_{i,j}$ es la correspondiente entrada de la matriz \mathbb{G}_s^k . En el trabajo de Sbalzarini [64], la función de costo a minimizar se puede expresar como una combinación lineal de la forma;

$$\phi_{i,j} = \|\mathbf{r}_i^k - \mathbf{r}_j^{k+s}\|^2 + \left(m_0(z_i(k)) - m_0(z_j(k+s))\right)^2 + \left(m_1(z_i(k)) - m_1(z_j(k+s))\right)^2, \quad (2.27)$$

expresión que emplea la norma euclidiana típica calculada previamente además de la diferencia entre dos momentos de ordenes consecutivos. Esta clase de algoritmo es buena opción para partículas que se mueven lentamente comparado con la tasa de adquisición de la información. Sin embargo, a semejanza de los algoritmos NN, la función de costo es susceptible a cambios en las condiciones de parámetros como la intensidad o ruido, por lo que para la aplicación de esta técnica es indispensable incluir las condiciones de normalización y control de la SNR.

Unión de trayectorias parciales.

Esta técnica, publicada en 2008 por Jaqaman *et al* [66], establece un procedimiento para rastrear células fluorescentes que se compone de dos etapas principales:

1. Construir un conjunto de trayectorias usando algoritmos tipo NN basados en detecciones consecutivas.

2. En base a las trayectorias construidas en la etapa anterior, usar una función de costo para evaluar eventos como el inicio, fin, división o unión de segmentos de trayectorias.

La función de costo toma diferentes valores de acuerdo a las combinaciones que se elijan para la configuración final, bajo esta perspectiva, el método de unión de trayectorias parciales puede ser visto como un problema estándar de asignación, clase para la que hay soluciones generales en la literatura [67–69]. La implementación de este método es relativamente simple, sin embargo su desempeño es fuertemente dependiente de la eficiencia de la primera etapa donde aparecen los problemas ya mencionados en los algoritmos NN y por otra parte, existen errores asociados a la elección del peso de cada evento en la función de costos y los errores en la asignación de divisiones y uniones de trayectorias.

2.3.2. Rastreo como un problema de optimización.

Una alternativa a los métodos de rastreo basados en la información en cuadros secuenciales son las técnicas donde se utiliza información dinámica sobre el desplazamiento de las partículas para implementar métodos de rastreo que alternan la detección de partículas, métodos que resultan eficientes para construir trayectorias en ambientes ruidosos. En lo que sigue describiremos algunas de las técnicas representativas al respecto.

Rastreo de partículas por características dinámicas.

En el 2005, Sage *et al* propusieron un método de rastreo de partículas fluorescentes que sigue las tres etapas descritas a continuación;

1. Alineamiento de la secuencia: en esta etapa se compensa el movimiento asociado a la contaminación por movimiento que la muestra biológica pudiera tener. Para lograrlo este procedimiento rastrea las estructuras residuales incluidas en el fondo y resta el movimiento determinado de la secuencia original de imágenes.
2. Realce de los cúmulos: usado un filtro tipo Gaussiano, el algoritmo enfatiza las estructuras afines a la geometría especificada, al mismo tiempo que disminuye el ruido y reduce la heterogeneidades del fondo.
3. Rastreo en el tiempo: mediante un procedimiento de estimación de posiciones consecutivas sin un proceso de detección explícito, este algoritmo permite reconstruir una trayectoria completa que comprende toda la colección de imágenes en la secuencia.

Orientado al rastreo individual de partículas y bajo la suposición de que cada una de las trayectorias de todas las partículas comprenden desde el principio al final de la secuencia de imágenes, la perspectiva del algoritmo de rastreo propone la optimización de una función de costo $\xi(\mathbf{r}_i^l)$ cuyo valor depende de la trayectoria elegida:

$$\xi(\mathbf{r}_i^l) = \sum_{k=1}^l \left[(1 - \lambda) f(z_i(k), k) - \lambda \frac{\|z_i(k) - z_i(k-1)\|}{M} \right], \quad (2.28)$$

donde la primera componente de la suma está compuesto por el factor $f(z_i(k), k)$, que es el resultado de la convolución entre la imagen original y el filtro Gaussiano de realce evaluado en las coordenadas asociadas a $z_i(k)$ al tiempo k . Este factor está diseñado para incrementar el valor de la función de costo cuando la trayectoria pasa por los puntos brillantes en cada imagen. Por otro lado, el segundo término de la suma esta relacionado con el peso específico asociado a la distancia euclidiana, de forma que son preferidos los desplazamientos cortos. Combinando ambos factores, la ecuación completa implica que las trayectorias preferidas son aquellas para las que los desplazamientos son cortos en imágenes consecutivas y pasan por puntos brillantes. Para ponderar cada componente el algoritmo permite que se ajuste la constante λ , mientras que la constante M es un factor para normalizar el desplazamiento. Para implementar el algoritmo se inicia por calcular la función de costo para todas y cada uno de los posibles desplazamientos dados por las detecciones en pares de imágenes consecutivas. Enseguida, dado un valor de tiempo k y una posición específica, el algoritmo calcula iterativamente todas las posibles combinaciones para llegar a ese estado y le asocia un valor global

a cada posible trayectoria, eligiendo la que mayor puntuación obtiene. Este procedimiento se ha aplicado en algunas situaciones demostrando un buen comportamiento cuando se cuenta con baja densidad de partículas y los eventos de inclusión o eliminación de elementos son inusuales, no obstante, estas condiciones son poco frecuentes en situaciones experimentales típicas, lo que restringe su aplicación.

Agregación espacio-temporal.

Propuesta en 2005 [70], esta técnica propone un criterio basado en vecindad espacio-temporal para determinar las posiciones consecutivas de partículas individuales. Las etapas básicas de este algoritmo son dos:

1. En base a criterios de detección por máscaras, ubicar la posición en espacio y tiempo de todas las partículas presentes en la colección de imágenes. Basados en esta información y usando criterios de rastreo NN, crear trayectorias parciales.
2. Las trayectorias parciales obtenidas se conectan mediante un algoritmo conocido como trayectoria mínima que trabajando en el espacio-tiempo completa los huecos en las trayectorias parciales.

El algoritmo de trayectoria mínima se basa en un criterio similar al establecido en el rastreo por características dinámicas donde se prefieren las trayectorias cortas que pasan por puntos brillantes; para cuantificar esta característica se utiliza una función llamada potencial de la imagen que es de la forma:

$$P(x, y, k) = \frac{1}{I_k(x, y) + 1}, \quad (2.29)$$

donde (x, y) denota la posición en la imagen en el tiempo k y la función de costo está dada por la integral de la función potencial a lo largo de la trayectoria. En su forma más general, esta función de costo se define como la trayectoria de distancia mínima descrita por la geodésica en el espacio de Riemann con norma \mathcal{P} . La reconstrucción de las trayectorias mínimas se basa en el algoritmo de contornos activos propuesto por Kass en 1988 [71] que minimiza la energía para unir dos puntos de la trayectoria a través de la curva C definida como:

$$E(C) = \int_C [w + \mathcal{P}(C(s))] ds, \quad (2.30)$$

donde s representa el parámetro de arco para recorrer la trayectoria mientras que w es un término de agregación que evita la energía nula. A semejanza del criterio por características dinámicas, la trayectoria mínima se determina en función del mapa de acción denominado \mathcal{U} donde se establece un campo escalar relacionado a la energía empleada en ir de un punto arbitrario hacia otro, eligiendo la combinatoria que resulta mínima y reconstruyendo la trayectoria mediante la propagación en dirección inversa.

Resumen.

La colección de métodos de rastreo mostrados describen algoritmos que a cambio de su relativamente simple implementación y velocidad, presentan un comportamiento deficiente en condiciones de bajo SNR, exhibiendo pérdida de información, alta sensibilidad a eventos como entrada y salida de partículas en el campo de observación u oclusiones. Estas características restringen la aplicación de estos algoritmos a condiciones muy específicas que desafortunadamente son poco frecuentes en aplicaciones como el rastreo de partículas microscópicas. En la siguiente sección abordaremos un conjunto de técnicas que presentan mayor robustez a estos eventos; los métodos probabilísticos de rastreo.

2.3.3. Métodos probabilísticos.

Rastreo por características estadísticas de movimiento.

Rastreo de estructuras Lipo-proteicas. El primer ejemplo que describiremos dentro de esta categoría corresponde a un caso de rastreo de estructuras lipo-proteicas móviles asociadas a receptores del virus de la influenza publicado por Anderson *et al* en 1992 [72]. El análisis de las características del movimiento se compone de cinco etapas consecutivas: marcaje de las estructuras mediante colorantes fluorescentes, adquisición de una secuencia de imágenes mediante un dispositivo de adquisición provisto con microscopio y cámara CCD, detección y registro de los cúmulos fluorescentes, rastreo y finalmente, análisis de las trayectorias. Dentro de este procedimiento, la etapa orientada a la detección se realiza usando filtros para identificación de formas Gaussianas tipo LoG como las descritas anteriormente en la Ec. 2.8; por otro lado, para la etapa enfocada en la asociación entre posiciones consecutivas, los autores proponen un método de rastreo que, en base a todas las detecciones asociadas a dos cuadros consecutivos, asigna una probabilidad a cada desplazamiento posible. Para describir este método, considérese un par arbitrario de detecciones en cuadros consecutivos denotadas por $z(k-1)$ y $z(k)$, la probabilidad condicional de que la partícula ubicada en la posición asociada a la detección $z(k-1)$ sea nuevamente detectada en la posición $z(k)$ se denota como $P(z(k)|z(k-1))$ y es de la forma:

$$P(z(k)|z(k-1)) \propto \exp\left[-\left(\frac{\Delta R}{\Delta R_d}\right)^2\right] \exp\left[-\frac{(\Delta I)^2}{I_n}\right], \quad (2.31)$$

donde $\Delta R = \|z(k-1) - z(k)\|$ es la distancia entre los puntos, R_d es una medida del valor esperado para el desplazamiento, $\Delta I = |I_{k-1}(z(k-1)) - I_k(z(k))|$ es el cambio en la intensidad de la imagen e I_n es la intensidad media de pico del cúmulo. La función densidad de probabilidad asociada a la componente espacial de P se obtiene estableciendo una analogía entre el sistema original y el modelo de difusión asociado a una partícula Browniana con velocidad de desplazamiento ajustada por los parámetros del sistema. Mezclando esta componente con la componente de densidad de probabilidad asociada a la distribución producida por el cambio de los niveles de grises en detecciones consecutivas se obtiene una versión mezclada de la PDF que permite modular el efecto de cada una de ellas. Cuando una característica es dominante se refleja como una PDF bien localizada, por el contrario, si la característica es difusa la PDF será extendida.

Rastreo de partículas coloidales en suspensión. En su trabajo desarrollado en 1996, Crocker y Grier [73] propusieron un método de rastreo orientado a determinar los desplazamientos de partículas moviéndose en una suspensión coloidal. Las etapas que conforman el método propuesto son cinco: restauración de la imagen, localización de las partículas, refinamiento de la localización, discriminación de ruido y estimación de posición z en profundidad, asociación entre detecciones consecutivas y finalmente estimación del error. La detección de las partículas en la secuencia se realiza usando criterios de segmentación basado en el histograma de intensidad y dilatación de escala de grises, además de un refinamiento en la posición del centro de gravedad basado en criterios de intensidad de grises. La asociación entre posiciones consecutivas está basada en criterios donde se asume que la dinámica descrita por las partículas puede ser descrita por un comportamiento Browniano donde las partículas no interactúan. Para un ensamble compuesto por n partículas, la probabilidad de transición entre un conjunto de posiciones $Z(k-1)$ hacia las posiciones $Z(k)$ se describe en términos de una combinación de los valores normales de probabilidad asociados a los desplazamientos:

$$P(Z(k)|Z(k-1)) = \left(\frac{1}{4\pi D\Delta t}\right)^n \exp\left[-\sum_{i=1}^n \frac{\|r_i^k - r_i^{k-1}\|^2}{4D\Delta t}\right], \quad (2.32)$$

donde D es el coeficiente de difusión del sistema. En sus resultados Crocker y Grier muestran que la mejor asociación entre los conjuntos $Z(k-1) \Rightarrow Z(k)$ ocurre cuando se minimizan la suma del cuadrado de las distancias,

$$\begin{aligned} \{z_i(k-1)\}_{i=1,\dots,n}^* &= \text{Arg} \left[\max_{\{z_i(k)\}_{i=1}^n} P(Z(k)|Z(k-1)) \right] \\ &= \text{Arg} \left[\min_{\{z_i(k)\}_{i=1}^n} \sum_{i=1}^n \|z_i(k) - z_i(k-1)\|^2 \right]. \end{aligned} \quad (2.33)$$

A diferencia de los resultados obtenidos usando algoritmos tipo NN, esta expresión indica que la distancia euclidiana no satisface una condición de mínimos cuadrados que sea compatible con la dinámica descrita por una partícula Browniana.

Rastreo de puntos cuánticos. Propuesto en 2008 por Sergé *et al* [74], el método para rastreo multipartícula (MTT) es un algoritmo originalmente diseñado para el rastreo 2D+t de partículas micrométricas conocidas como *quantum dots* (QDs) que se caracterizan por la emisión periódica de luz como respuesta a la luz de excitación. La propuesta de Sergé asocia una probabilidad de transición p de una posición $z(k)$ hacia otra $z(k+1)$ como la combinación de tres diferentes probabilidades:

$$p(z(k+1)|z(k)) = p_d(r)p_i(I)p_o(k), \quad (2.34)$$

donde $p_d(k)$ es la probabilidad de movimiento de la partícula, $p_i(k)$ la probabilidad asociada a la intensidad y $p_o(k)$ la probabilidad asociada a la posible extinción de la luz debido al parpadeo.

Movimiento de la partícula. La distancia euclidiana asociada al desplazamiento de una partícula entre los cuadros k y $k+1$ denotada por r se calcula considerando que las partículas describe un movimiento Browniano bajo dos condiciones distintas de difusión: D_l para difusión libre local y uno de máxima difusión D_m para incrementos rápidos respecto a la difusión libre. Bajo estas consideraciones, la probabilidad p_d toma la forma:

$$p_d(r) = \gamma_d p_l(r) + (1 - \gamma_d) p_m(r) \quad (2.35)$$

$$= \frac{\gamma_d}{\sqrt{2\pi}r_l} \exp\left[-\frac{r^2}{2r_l^2}\right] + \frac{1 - \gamma_d}{\sqrt{2\pi}r_m} \exp\left[-\frac{r^2}{2r_m^2}\right], \quad (2.36)$$

donde $\gamma_d \in [0, 1]$ es un factor de ponderación entre los dos modos de difusión mientras que r_l y r_m corresponden a las desviaciones estándar de las PDF's asociadas a los movimientos de difusión calculados. El valor del coeficiente de difusión D_l se actualiza en el tiempo dentro de un intervalo de tiempo definido por una ventana temporal $w_k = [k-4, \dots, k]$ mientras que D_m está fija. La capacidad de modificar el valor del coeficiente de difusión en el tiempo permite realizar ajustes en la PDF calculada en función de los movimientos recientes de cada partícula.

Probabilidad asociada a la intensidad. La probabilidad de que una partícula arbitraria tenga asociada una intensidad I se define como la combinación de dos PDF's que dependen del tiempo:

$$p_I(I) = \gamma_i p_o(I) + (1 - \gamma_i) p_b(I) \quad (2.37)$$

$$= \frac{\gamma_i}{\sqrt{2\pi} \sigma_I} \exp\left[-\frac{(I - \langle I_o \rangle)^2}{2 \sigma_I^2}\right] + U_{[0, \langle I_o \rangle]}(I). \quad (2.38)$$

El primer término de esta ecuación se asocia a la probabilidad que posee la intensidad de la partícula cuando no parpadea y que tiene la forma de una distribución normal de media $\langle I_o \rangle$ que es estimada en base a valores previos. El segundo término de esta ecuación corresponde a la PDF de la intensidad cuando la partícula parpadea, caso en el que la intensidad está uniformemente distribuida entre 0 y $\langle I_o \rangle$. La forma funcional $U_{[0, \langle I_o \rangle]}(I)$ toma el valor $\frac{(1-\gamma_i)}{\langle I_o \rangle}$ cuando $I \in [0, \langle I_o \rangle]$ y 0 en otro caso. En principio este modelo permite abordar problemas asociados a rastreo 2D+t de partículas con intensidad fluctuante como los QD's, no obstante, el núcleo de este algoritmo es un rastreo tipo NN y no propone una forma para manejar las detecciones falsas o traslapes, situaciones frecuentes en sistemas 2D.

2.3.4. Filtros en el espacio de estados.

Los métodos de rastreo descritos hasta ahora toman en cuenta comportamientos sistemáticos que pueden ser descritos en base a PDF's más o menos bien definidas, sin embargo, en la práctica es frecuente encontrar situaciones que requieren métodos más adaptables que posean adaptabilidad y robustez para estimar la información contenida en medidas experimentales inexactas, parciales o indirectas. Al respecto, un par de perspectivas que han demostrado una gran aplicabilidad en problemas de rastreo, vigilancia y navegación son los métodos Bayesianos [75] y las técnicas de estimación [76]. El factor común en las metodologías desarrolladas en estos campos consiste en establecer modelos matemáticos que, basados en las PDF's asociadas al movimientos de las partículas, son los suficientemente flexibles y robustos como para detectar y estimar las posiciones consecutivas, mientras se adaptan a los cambios en los ambientes donde se desarrolla la dinámica observada. En lo que resta de este capítulo, discutiremos algunos de los conceptos relacionados.

Modelo de trayectoria única.

Los modelos de esta clase generalmente se describen en el espacio conocido como *espacio de estados* donde a cada partícula se le asigna un vector n -dimensional $\mathbf{x}(k)$ denominado vector de características que describe el estado de la partícula en el tiempo k . El estado de la partícula depende de su estado anterior de forma que existe una ecuación de evolución de la forma:

$$\mathbf{x}(k+1) = f_k(\mathbf{x}(k)) + \mathbf{w}(k), \quad (2.39)$$

donde el término aditivo $\mathbf{w}(k)$ representa una componente ruidosa, usualmente aleatoria, que evoluciona temporalmente y la función f_k es la parte determinista de la regla de evolución asociada a la ecuación de estado. Al conjunto de estados que identifican al grupo de partículas presentes en el instante de tiempo k se le denota por $\mathbf{x}^k \equiv \{\mathbf{x}(t)\}_{t=1}^k$ mientras que a las medidas experimentales asociadas se les denomina por $\mathbf{z}^k \equiv \{\mathbf{z}(t)\}_{t=1}^k$. Asumiendo que las mediciones experimentales son estadísticamente independientes entre sí e independientes de los vectores de estado asignados, la probabilidad condicional del estado $\mathbf{x}(k)$ cumple la siguiente propiedad:

$$p(\mathbf{z}(t) | \mathbf{z}^{k-1}, \mathbf{x}^k) = p(\mathbf{z}(k) | \mathbf{x}(k)). \quad (2.40)$$

Definiendo la transformación entre el espacio de características y el estado medido de la forma:

$$\mathbf{z}(k) = h_k(\mathbf{x}(k)) + \mathbf{v}(k), \quad (2.41)$$

donde h_k es la función de medida que representa la parte determinista que relaciona al estado en el espacio de características con la medida experimental y $\mathbf{v}(k)$ es la componente de ruido asociada. La estimación de los vectores de estado a partir de las medidas experimentales es el campo de acción de una gran cantidad de metodologías, dentro de las cuales, el procedimiento descrito por Kalman en 1960 es uno de los más socorridos [77]. En la siguiente sección describiremos sucintamente este proceso.

El filtro de Kalman.

Filtro lineal de Kalman. Cuando las funciones f_k y h_k son lineales, las ecuaciones de evolución y de medida pueden reescribirse siguiendo la representación algebraica siguiente:

$$\mathbf{x}(k+1) = \mathbf{F}_k [\mathbf{x}(k) + \mathbf{w}(k)] \quad (2.42)$$

$$\mathbf{z}(k) = \mathbf{H}_k [\mathbf{x}(k) + \mathbf{v}(k)], \quad (2.43)$$

donde \mathbf{F}_k y \mathbf{H}_k son las denominadas matriz de transición y matriz asociada al proceso de medida respectivamente. Asumiendo que el ruido inherente al proceso y el ruido proveniente del experimento es blanco y Gaussiano con media

nula (WGN) y matrices de auto-covarianza denotadas por $\mathbf{Q}(k)$ y $\mathbf{R}(k)$ respectivamente, es posible reescribir la regla evolutiva como:

$$p(\mathbf{w}(k)) = \mathcal{N}(\mathbf{w}(k); 0, \mathbf{Q}(k)) , \quad (2.44)$$

$$p(\mathbf{v}(k)) = \mathcal{N}(\mathbf{v}(k); 0, \mathbf{R}(k)) , \quad (2.45)$$

Condiciones bajo las cuales la Ec. 2.40 asociada a la probabilidad condicional toma la forma:

$$p(\mathbf{x}(k+1)|\mathbf{x}(k)) = \mathcal{N}(\mathbf{x}(k+1); \mathbf{F}_k \mathbf{x}(k), \mathbf{Q}(k)) , \quad (2.46)$$

$$p(\mathbf{z}(k)|\mathbf{x}(k)) = \mathcal{N}(\mathbf{z}(k); \mathbf{H}_k \mathbf{x}(k), \mathbf{R}(k)) , \quad (2.47)$$

tal que las PDF's condicionales del vector de estado y de las medidas están centradas en el estado predicho $\mathbf{F} \mathbf{x}(k)$ y en la medida esperada $\mathbf{H} \mathbf{x}(k)$ respectivamente, de donde la densidad asociada a la probabilidad condicional $p(\mathbf{x}^k | \mathbf{z}^k)$ es también Gaussiana, tal que, de acuerdo al criterio conocido como Maximum A-Posteriori (MAP) tiene la solución $\mathbf{x}^{*,k} = \text{Arg} \left[\max (p(\mathbf{x}^k | \mathbf{z}^k)) \right]$, que también satisface el criterio *Minimum Mean Squared Error* (MMSE). En estas condiciones la aplicación iterativa del filtro de Kalman (KF) en su versión lineal es capaz de encontrar una solución exacta al estado óptimo $\mathbf{x}^{*,k}$ tal que la PDF condicional asociada al estado $\mathbf{x}(k)$ es de la forma:

$$p(\mathbf{x}(k)|\mathbf{z}^{k-1}) = \mathcal{N}(\mathbf{x}(k); \mathbf{x}(k|k-1), \mathbf{P}_{k|k-1}) , \quad (2.48)$$

$$p(\mathbf{x}(k)|\mathbf{z}^k) = \mathcal{N}(\mathbf{x}(k); \mathbf{x}(k|k), \mathbf{P}_{k|k}) , \quad (2.49)$$

donde $\mathbf{x}(k|k-1)$ es el vector de características esperado en el tiempo k cuando se conocen las $k-1$ medidas experimentales previas, $\mathbf{x}(k|k)$ es el estado esperado cuando se conocen medidas por encima del estado k mientras que las matrices $\mathbf{P}_{k|k-1}$ y $\mathbf{P}_{k|k}$ son la covarianza de las PDF's de cada uno de los casos respectivamente. El proceso de predicción basado en KF se consigue aplicando la parte determinista de la ecuación de evolución al estado estimado $\mathbf{x}(k-1|k-1)$:

$$\mathbf{x}(k|k+1) = \mathbf{F}_k \mathbf{x}(k-1|k-1) . \quad (2.50)$$

A partir del estado medido y la ecuación de medida es posible calcular el valor de expectación $\mathbf{z}(k|k-1)$ al tiempo k como:

$$\mathbf{z}(k|k-1) = \mathbf{H}_k \mathbf{x}(k|k-1) . \quad (2.51)$$

Una vez que el estado $\mathbf{z}(k|k-1)$ se determina, el estado esperado $\mathbf{x}(k|k-1)$ se corrige para formar el estado estimado $\mathbf{x}(k|k)$ como lo muestra la siguiente ecuación:

$$\mathbf{x}(k|k-1) = \mathbf{x}(k|k) + \mathbf{K}_k (\mathbf{z}(k) - \mathbf{z}(k|k-1)) , \quad (2.52)$$

donde \mathbf{K}_k es la que se conoce como matriz de ganancia. El estado estimado se obtiene agregando un término al estado predicho, término que depende de la diferencia entre la nueva observación $\mathbf{z}(k)$ y la medida predicha $\mathbf{z}(k|k-1)$ y que se denomina la *innovación* del proceso. La distribución de probabilidad asociada a la innovación se utiliza para cuantificar la bondad del ajuste tal que formas precisas de evolución y modelos de medida reducen esta diferencia significativamente.

Filtro de Kalman extendido. A diferencia de su forma lineal, la versión extendida del filtro Kalman (EKF) es capaz de manejar situaciones donde la ecuación de transición entre estados consecutivos puede contener términos no lineales para las que generalmente es posible obtener soluciones numéricas o aproximadas para el estado $\mathbf{x}^{*,k}$. Exceptuando los términos no lineales en las ecuaciones de evolución asociadas a los estados medidos y predichos, el procedimiento de medida/actualización en el filtro EKF es similar al del caso KF. En su versión aproximada, el procedimiento de EKF trabaja con los primeros términos de las series de Taylor asociadas a las funciones f_k y h_k y con matrices $\widehat{\mathbf{F}}_k$ y $\widehat{\mathbf{H}}_k$ que son versiones aproximadas de las matrices originales \mathbf{F}_k y \mathbf{H}_k en la versión lineal KF. Adicionalmente, existen

versiones extendidas del EKF como la forma iterativa del EKF y la versión de ordenes superior donde se buscan formas analíticas \widehat{F}_k y \widehat{H}_k para las versiones no lineales de f_k y h_k . Un problema asociado a la forma extendida EKF es que la representación de Taylor requiere formas funcionales diferenciables de f_k y h_k , condición que no siempre se cumple; para estos casos es usual aproximar $p(\mathbf{x}(k)|z^k)$ con una distribución normal, lo que puede resultar complicado si la forma no lineal es muy importante.

Filtro de Kalman Unscented. Contrario a la versión EKF, la UKF no construye aproximaciones para f_k y h_k , en lugar de esto, la UKF trata de capturar la componente no lineal en la forma funcional de la densidad $p(\mathbf{x}(k)|z^k)$ por medio de una aproximación basada en una distribución Gaussiana caracterizada por una colección de elementos finitos. Estos elementos son seleccionados en una forma determinista y propagados en el tiempo por medio de una función no lineal. El uso de la forma UKF se asegura que el conjunto seleccionado sea representativo de la distribución ajustando los valores medios y la covarianza de la distribución seleccionada. En una perspectiva sencilla, el UKF es una forma simple y rápida que aproxima la función de evolución, no obstante es impropia para representar formas no lineales de ordenes superiores, lejanas a formas Gaussianas.

Filtro de interacción multiple.

Dentro de los filtros construidos para manejar formas funcionales de $p(\mathbf{x}(k)|z^k)$ no lineales, el filtro *interacting multiple-model* (IMM) está diseñado para trabajar con formas funcionales multi-modales por medio de una representación de Gaussianas múltiples mezcladas. Para obtener buenos resultados es necesario ajustar cuidadosamente el número de Gaussianas así como el peso que se le asigna cada una. Dado un número específico $r_k \in [1, \dots, p]$ de distribuciones asociadas, existen dos perspectivas posibles: considerar que sólo uno de estos modelos es aplicable en la secuencia completa y elegir el más adecuado o considerar que las partículas pueden cambiar de distribución evolutivamente en función del tiempo k a manera de un modelo de Markov tipo HMM. En este último caso, la probabilidad de transición entre el modelo etiquetado por el estado r_{k-1} al tiempo $(k-1)$ y el modelo r_k está definido como:

$$\pi_{ij} = P\{r_k = j | r_{k-1} = i\}, \quad (2.53)$$

y se asume que es constante en el tiempo. Una de las consecuencias de considerar transiciones entre modelos es que el número de hipótesis posibles se eleva considerablemente, lo que demanda criterios específicos para restringir las combinaciones. En este contexto, el modelo IMM [78], propone una forma funcional que separa los componentes mezclados como si fuera estados bases a partir de los cuales construye una forma funcional combinada para la PDF de $p(\mathbf{x}(k)|z^k)$. El procedimiento diseñado para este fin es el siguiente:

1. Construcción del estado mezclado; dado un modelo j , el estado estimado mezclado $\hat{\mathbf{x}}^{0j}(k-1|k-1)$ y la matriz de covarianza $\mathbf{P}^{0j}(k-1|k-1)$ se calculan como:

$$\hat{\mathbf{x}}^{0j}(k-1|k-1) = \sum_{i=1}^p \mu^{ij}(k-1|k-1) \hat{\mathbf{x}}^i(k-1|k-1), \quad (2.54)$$

$$\mathbf{P}^{0j}(k-1|k-1) = \sum_{i=1}^p \mu^{ij}(k-1|k-1) \left[\mathbf{P}^i(k-1|k-1) + \left(\hat{\mathbf{x}}^i(k-1|k-1) - \hat{\mathbf{x}}^{0j}(k-1|k-1) \right) \left(\hat{\mathbf{x}}^i(k-1|k-1) - \hat{\mathbf{x}}^{0j}(k-1|k-1) \right)^T \right], \quad (2.55)$$

donde $\hat{\mathbf{x}}^i(k-1|k-1)$ es el estado estimado para el modo i al tiempo $(k-1)$, y $\mathbf{P}^i(k-1|k-1)$ su matriz de covarianza. Por otro lado, la probabilidad condicional $\mu^{ij}(k-1|k-1)$ se define como:

$$\mu^{ij}(k-1|k-1) \equiv \mathbf{P}\{r_{k-1} = i | r_k = j, z^{k-1}\}, \quad (2.56)$$

y es calculada de acuerdo a la regla de Bayes para obtener:

$$\mu^{ij}(k-1|k-1) = \frac{\pi_{ij}\mu^i(k-1|k-1)}{\sum_{q=1}^p \pi_{qj}\mu^q(k-1|k-1)}, \quad (2.57)$$

donde $\mu^{ij}(k-1|k-1)$ es la probabilidad condicional del modelo j al tiempo $k-1$ con las medidas z^{k-1} .

2. Actualización de modelo condicionada; cada modelo j se actualiza con z aplicando un KF por medio de las matrices $\hat{x}^{0j}(k-1|k-1)$ y $P^{0j}(k-1|k-1)$ a partir de las cuales es posible calcular $\hat{x}^j(k|k)$ y $P^j(k|k)$.
3. Actualización de probabilidades; la probabilidad asociada al modelo j calculada al tiempo k es:

$$\mu^j(k|k) = \frac{p(z(k)|z^{k-1}, r_k = j) \sum_{i=1}^p \pi_{ij}\mu^i(k-1|k-1)}{\sum_{q=1}^p p(z(k)|z^{k-1}, r_k = q) \sum_{i=1}^p \pi_{iq}\mu^i(k-1|k-1)}, \quad (2.58)$$

donde la probabilidad de la medida $p(z(k)|z^{k-1}, r_k = j)$ se calcula usando el KF del modelo j .

En cada tiempo k , la densidad de estado predicha se aproxima por una mezcla ponderada de la PDF asociada a la p -ésima Gaussiana dada por la KF's de los modelos;

$$p(x(k)|z^k) \sim p_{IMM}(x(k)|z^k) = \sum_{i=1}^p w_i^k \mathcal{N}(x(k); \hat{x}^i(k|k), P^i(k|k)). \quad (2.59)$$

Dado que el método IMM mezcla p filtros distintos, su costo computacional es la suma de los p costos. La flexibilidad y eficiencia de esta técnica la han vuelto bastante popular para aplicaciones de rastreo.

Hasta ahora hemos visto algunas técnicas de estimación que, basadas en parámetros estadísticos ofrecen adaptabilidad a las variaciones presentes en el medio ambiente, dentro de ellas las más accesibles como el KF son mucho más frecuentes porque su costo beneficio es mayor. Enseguida veremos otra clase de algoritmos de rastreo basados en filtros Bayesianos orientados al rastreo de partículas microscópicas.

2.3.5. Filtros Bayesianos de partículas.

Recientemente se han desarrollado varias aplicaciones basadas en filtros Bayesianos orientadas al tratamiento de sistemas biológicos donde se requiere detección y rastreo de células [46, 79–81]. Enseguida veremos algunos de los criterios desarrollados y discutiremos sus diferencias.

Asociación instantánea de máxima probabilidad. Desarrollado en su forma original por Ngoc en 1991 [79], el algoritmo IML (*instantaneous maximum likelihood*) ha ido evolucionando hasta la forma actual propuesta por Genovesio *et al* [46]. Publicado en 2006, este trabajo aborda por separado las tareas de detección y asociación de posiciones consecutivas; en lo que respecta a la detección, el procedimiento propuesto usa un criterio de correlación basado en la representación por coeficientes de los objetos en el espacio de *wavelets* y el conjunto de imágenes transformadas a este mismo espacio. El conjunto de las detecciones denotado por Z^l sirve como la base para la construcción de trayectorias a partir de la correspondencia entre puntos. En el espacio de estados, a cada detección $z(k)$ al tiempo k corresponde un vector $z(k)$ que, entre sus características, incluye las coordenadas cartesianas del centro de masa, denotadas por $\tilde{x}(k)$, $\tilde{y}(k)$, $\tilde{z}(k)$, el volumen del objeto seleccionado $\tilde{v}(k)$ y su intensidad media $\tilde{i}(k)$, tal que:

$$z(k) = [\tilde{x}(k), \tilde{y}(k), \tilde{z}(k), \tilde{v}(k), \tilde{i}(k)]^T. \quad (2.60)$$

A partir de esta definición, el algoritmo usa la información de todas las detecciones disponibles en cada instante de tiempo para construir un criterio de correspondencia entre puntos (Sec. 2.3.1) que determina las posiciones consecutivas que componen cada una trayectoria. Es posible refinar este criterio si se incluye información relativa a la evolución espacio-temporal de la partícula rastreada, en este sentido un nuevo vector de estado puede ser de la forma:

$$\mathbf{x}(k) = [\tilde{x}(k), \tilde{y}(k), \tilde{z}(k), \tilde{x}(k-1), \tilde{y}(k-1), \tilde{z}(k-1), \tilde{x}(k-2), \tilde{y}(k-2), \tilde{z}(k-2), \tilde{v}(k), \tilde{i}(k)]^T . \quad (2.61)$$

Asumiendo condiciones de ruido Gaussiano blanco, Genovesio *et al* proponen que tanto la intensidad como el volumen de cada cúmulo es prácticamente constante entre dos detecciones consecutivas, tal que sus variaciones temporales pueden ser descritas en términos de distribuciones Gaussianas con varianza σ_i y σ_v respectivamente:

$$p(i(k)|i(k-1)) = \mathcal{N}(i(k); i(k-1), \sigma_i) \quad (2.62)$$

$$p(v(k)|v(k-1)) = \mathcal{N}(v(k); v(k-1), \sigma_v) . \quad (2.63)$$

Considerando que existe independencia estadística entre las variables de volumen e intensidad, es posible separar cada vector en el espacio de estados en dos componentes fundamentales relacionadas a las características de movimiento y apariencia tal que; $\mathbf{x}(k) = \mathbf{x}^m(k) \cup \mathbf{x}^a(k)$, donde:

$$\mathbf{x}^m(k) = [\tilde{x}(k), \tilde{y}(k), \tilde{z}(k)]^T \text{ movimiento.} \quad (2.64)$$

$$\mathbf{x}^a(k) = [\tilde{v}(k), \tilde{i}(k)]^T \text{ apariencia,} \quad (2.65)$$

donde se asume que evolucionan independientemente en el tiempo. Bajo estas premisas, Genovesio *et al* proponen combinar su representación en el espacio de estados con un par de modelos dinámicos de uso frecuente para describir el movimiento tridimensional de partículas: caminata aleatoria (RW) y extrapolación lineal de primer orden (FLE) [41, 82].

Caminata aleatoria. El modelo de difusión de partículas en espacios tridimensionales basado en *random walk* (RW) propone que la probabilidad asociada a la posición de cada partícula al tiempo $k+1$ está descrita por una PDF normal centrada en la posición que la misma partícula guardaba en el instante de tiempo k . En estas condiciones, la probabilidad de transición entre estados es de la forma:

$$p(\mathbf{x}^m(k+1)|\mathbf{x}^m(k)) = \mathcal{N}(\mathbf{x}^m(k+1); \mathbf{x}^m(k), \mathbf{Q}_{RW}) . \quad (2.66)$$

donde \mathbf{Q}_{RW} es una matriz de 9×9 asociada al ruido, con los tres primeros elementos de su diagonal iguales a $\sigma_x^2, \sigma_y^2, \sigma_z^2$ respectivamente y ceros en las demás entradas.

Extrapolación lineal de primer orden. El método FLE (*first order linear extrapolation*) se utiliza para modelar el movimiento de partículas que se desplacen a velocidad constante en forma progresiva. Esta restricción permite describir el desplazamiento asociado a cada partícula en forma recursiva referido al desplazamiento descrito en instantes de tiempo previos, tal que;

$$\|\mathbf{x}(k+1) - \mathbf{x}(k)\| = \|\mathbf{x}(k) - \mathbf{x}(k-1)\| \Leftrightarrow \mathbf{x}(k+1) = 2 \cdot \mathbf{x}(k) + \mathbf{D} , \quad (2.67)$$

donde \mathbf{D} es el vector desplazamiento formado por las componentes asociadas a $\|\mathbf{x}(k) - \mathbf{x}(k-1)\|$. Para agregar componentes ruidosas a los criterios de estimación se añade ruido tipo Gaussiano con una matriz de covarianza asociada que se denota por \mathbf{Q}_{FLE}^c que es similar a la descrita para caminata aleatoria pero con sus parámetros específicos. Bajo estas condiciones, la probabilidad condicional asociada a la ecuación de evolución temporal es de la forma:

$$p(\mathbf{x}^c(k+1)|\mathbf{x}^c(k), \mathbf{x}^c(k-1)) = \mathcal{N}(\mathbf{x}^c(k+1); 2\mathbf{x}^c(k) - \mathbf{x}^c(k-1), \Sigma) \quad (2.68)$$

donde se usa una combinación de Gaussianas linealmente independientes implícitas en la matriz de covarianza Σ que están centradas en el valor estimado $2\mathbf{x}^c(k) - \mathbf{x}^c(k-1)$.

Asociación por máxima probabilidad. Esta metodología describe el procedimiento a seguir durante un proceso de rastreo y dado el instante de tiempo k , tal que, la asociación entre las trayectorias activas y las detecciones asociadas a cada cuadro se realiza siguiendo el criterio ML (*maximun likelihood*). El primer paso es construir la matriz de probabilidad asociada L , compuesta por elementos matriciales l_{ij}^{max} que son de la forma:

$$l_{ij}^{max} = \max_{q \in \{1, 2, 3\}} p(z_j(k) | x_i^{k-1}, z_i^{k-1}, r_k = q), \quad (2.69)$$

donde $z_j(k)$ denota el conjunto de medidas asignadas a la trayectoria i después del tiempo $k-1$. Cuando el movimiento modelado corresponde a una caminata aleatoria (RW) $r_k = 1$, mientras que si se trata de un movimiento lineal tipo FLE $r_k = 2$. Cada probabilidad condicional $p(x)$ involucrada se calcula usando el esquema definido por el filtro Kalman lineal (KF) y la asignación de posiciones consecutivas se realiza iterativamente, seleccionando en cada paso de tiempo el elemento de mayor valor de la matriz L para después quitarlo y así sucesivamente hasta que la matriz esté vacía. La complejidad computacional asociada al método es comparable con las técnicas NN, no obstante, para incrementar su robustez al ruido es usual acompañar al método con criterios de vecindad en el espacio de estados que pueden hacerlo más complejo. En la práctica el criterio IML debe estar dotado de condiciones para inicio y término de una trayectoria, al respecto es usual utilizar las entradas de la matriz asociada a cada instante de tiempo, identificando las detecciones no asignadas a ninguna trayectoria como nuevas partículas y finalizando las trayectorias sin nuevas asignaciones, todo dentro de un intervalo d que, medido en cuadros, es uno de los parámetros del algoritmo.

Resumen.

Concluiremos nuestra descripción de algoritmos para rastreo enfatizando el objetivo común descrito: construir funciones de evaluación que permitan distinguir características a partir de las cuales sea posible asociar posiciones consecutivas de una misma partícula. La naturaleza de cada función propuesta puede implicar características dinámicas, de apariencia o una combinación de ambas. Cual sea que fuere la relación seleccionada, en todos los casos es necesario incluir reglas para el manejo de la variabilidad implícita en los experimentos, sea en la forma de ruido o comportamiento sistemático.

Para concluir este capítulo, en la sección final describiremos algunos de los elementos de software comerciales y académicos que se encuentran disponibles actualmente para el rastreo de partículas [83].

2.4. Herramientas para rastreo de partículas microscópicas.

Desde sus inicios, dentro del área de microscopía digital se han realizado múltiples esfuerzos para implementar técnicas eficientes para adquisición y procesamiento de las imágenes obtenidas. El resultado de estos esfuerzos es una importante diversidad de metodologías experimentales, y para cada una de ellas, un conjunto de algoritmos diseñados para obtener información relevante a partir de las imágenes asociadas. Este universo de algoritmos ha sido la base para implementar múltiples herramientas de software. Herramientas que se pueden clasificar de acuerdo a su perfil de uso: en la primera clase se ubican las de procesamiento básico, principalmente desarrolladas por fabricantes de microscopios: AIM tool (LSM Image Browser, Carl Zeiss), QWin (Leica Microsystems), y analySIS (Olympus and Soft Imaging System); en la segunda encontramos herramientas que, además de operaciones básicas, incluyen módulos para problemas frecuentes, por ejemplo, algoritmos de deconvolución, colocalización, segmentación básica y rastreo de filamentos o partículas: Imaris (Bitplane), Matlab (the mathworks), DIPimage (Quantitative Imaging Group, Delft University of Technology), AxioVision (Carl Zeiss), Image-Pro Plus (MediaCybernetics), MetaMorph (Molecular Devices Corporation) o ImageJ (National Institutes of Health); en la tercera categoría existe software especializado en tareas específicas: Huygens (Scientific Volume Imaging) o AutoDeblur (AutoQuant Imaging) para de-convolución, Amira (Mercury Computer Systems) para visualización, Volocity (Improvision) para rastreo y análisis de movimiento,

NeuroLucida (MicroBrightField) para rastreo de neuronas o CellProfiler para identificación de fenotipos celulares. Además de los ya mencionados, existe un universo de algoritmos y aplicaciones que entre sus utilerías incluyen herramientas para detección y rastreo de partículas en dos y tres dimensiones; al respecto hemos dividido el universo en dos clases: la primera, compuesta por los elementos de la tabla 2.2, que está conformada por desarrollos académicos principalmente que proporcionan una descripción más o menos detallada de sus procedimientos para rastreo; la segunda, compuesta por los elementos de la tabla 2.3, y conformada por elementos en su mayoría comerciales sin publicaciones académicas asociadas.

Dentro de este universo, destacan dos plataformas:

1. Cell Profiler [84]: es una aplicación de código libre, multi-plataforma y multi-proceso para la identificación y análisis estructural de células de diferentes tipos. La aplicación está construida de forma flexible tal que pueden construirse procesos secuenciales a partir de los módulos básicos o inclusive implementarse nuevos módulos. Entre sus características implementadas permite cuantificar y corregir heterogeneidades en la iluminación, segmentar objetos arbitrarios a partir de propiedades como intensidad, textura, forma, etc, además de cuantificar parámetros globales y locales de los objetos en la imagen. Una de sus mayores ventajas es que incluye herramientas para identificar células de fenotipos específicos como *Drosophila Kc167* entre muchos otros. La clasificación general de módulos disponibles es la siguiente;
 - Identificación de objetos en la imagen: posición en el campo de observación, umbral para segmentación (cuando aplica) y conteo de objetos.
 - Parámetros de forma: área, excentricidad, convexidad, extensión, número de Euler, perímetro, semieje mayor, semieje menor, etc.
 - Parámetros de intensidad asociados a los objetos completos como intensidad total, intensidad promedio, centro de gravedad, desviación estándar, máxima, mínima, y sus análogas para las fronteras, etc.
 - Medidas de textura: implementa utilerías para calcular las características de Haralick derivadas de la matriz de co-ocurrencia: segundo momento angular, contraste, correlación, varianza, momento de diferencias inversas, suma de promedios, suma de varianzas, suma de entropías, entropía, diferencias de entropía y medidas de correlación [101].
 - Características obtenidas usando transformadas *wavelets* de Gabor: permite calcular las componentes de los patrones presentes en la imagen a lo largo de diferentes orientaciones. Las características obtenidas detectan bandas de correlación entre intensidades, esto es patrones iterados en el espacio con control direccional.
 - Calculo de coeficientes de correlación para pares de imágenes y regiones.
 - Características de conectividad entre objetos de la imagen y relaciones por pares.
 - Medidas cuantitativas de desenfoque [102] y de saturación.
 - Medidas estadísticas de calidad de ensayos clínicos o biológicos como factor Z [103].
 - Espacio para asignación de medidas y procesos secuenciales definidos por el usuario.
 - Modulo para comparación paso a paso de algoritmos diseñados para procesos equivalentes.
2. Cell Track [85]: es un software multi-plataforma, auto-consistente y extensible desarrollado para la segmentación y/o el rastreo de células agregando elementos de análisis cuantitativo de sus parámetros de movimiento. Incluye elementos comunes al CellProfiler para identificación de características estructurales de células en general y algunos otros para tratar casos específicos, principalmente asociados a desarrollos académicos:
 - Rastreo de leucocytos para la investigación y tratamiento de enfermedades inflamatorias.
 - Modelos analíticos de locomoción celular para establecer propiedades mecánicas de la estructura celular.

- Modelos de contornos activos para manejar segmentación de pseudopodos o procesos de división celular.
- Criterios paramétricos basados en motilidad para identificar eventos de mitosis o de muerte celular.

Concluiremos esta discusión presentando la tabla [2.4](#) donde se definen algunos de los parámetros dinámicos más comunes a estimar durante al rastreo de partículas [\[83\]](#).

ID	Nombre	Disponible	Plataforma	Fuente	Partícula	Célula	Multi-partícula	Dimensión	Automático	Referencia	Sitio Web
1.	CellProfiler	Libre	Win/Lin/Mac	✓	✓	✓	✓	2D	Auto	Carpenter et al (2006) [84]	http://www.cellprofiler.org/
2.	CellTrack	Libre	Win	✓	✓	×	✓	2D	Auto	Sacan et al (2008) [85]	http://db.cse.ohio-state.edu/CellTrack/
3.	CellTracker	Libre	Win	×	✓	×	✓	2D	Semi	Shen et al (2006) [86]	http://go.warwick.ac.uk/bretschneider/celltracker/
4.	ClusterTrack	Libre	Matlab	✓	×	✓	✓	2D	Auto	Matov et al (2010) [87]	http://lccb.hms.harvard.edu/software.html .
5.	DcellIQ	Libre	Matlab	✓	✓	×	✓	2D	Auto	Li et al (2010) [88]	http://www.cbi-tmhs.org/Dcelliq/
6.	DIAS	Pago	Win/Mac	×	✓	×	✓	3D	Auto	Wessels et al (2006) [89]	http://keck.biology.uiowa.edu/
7.	DYNAMIK	Libre	Matlab	✓	✓	×	✓	2D	Auto	Mosing et al (2009) [90]	http://www.picb.ac.cn/sysbio/DYNAMIK/
8.	FARSIGHT	Libre	Win/Lin/Mac	✓	✓	×	✓	3D	Auto	BJornsson et al (2008) [91]	http://www.forsight-toolkit.org/
9.	ICY	Free	Java	✓	✓	✓	✓	3D	Auto	de Chaumont et al (2011) [92]	http://icy.biomagenanalysis.org/
10.	Level Set Tracker	Libre	Matlab	✓	✓	×	✓	3D	Auto	Dzyubachyk et al.(2010) [93]	http://celmia.bigr.nl/
11.	MTrackJ	Libre	ImageJ	✓	×	✓	✓	3D	Manual	Erik Meijering [83]	http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/
12.	Octane	Libre	ImageJ	✓	×	✓	✓	2D	Auto	Ji Yu Lab [94]	http://www.ccam.uchc.edu/you/Software.html
13.	Particle Tracker	Libre	ImageJ	✓	×	✓	✓	3D	Auto	Sbalzarini y Koumoutsakos (2005) [95]	http://weeman.inf.ethz.ch/ParticleTracker/
14.	QuimP	Libre	ImageJ	×	✓	×	×	2D	Auto	Bosgraaf et al. (2010) [96]	http://go.warwick.ac.uk/bretschneider/quimp/
15.	SpotTracker	Libre	ImageJ	×	×	✓	×	2D	Auto	Sage et al. (2005) [52]	http://www.bigwww.epfl.ch/sage/soft/spottracker
16.	StarryNite	Libre	Win/Lin	×	✓	×	✓	3D	Auto	Murray et al. (2006) [97]	http://westerston.gs.washington.edu/
17.	TIKAL	Solicitud	Win/Lin	×	×	✓	✓	3D	Auto	Bacher et al. (2004) [98]	http://ibios.dkfz.de/tbi/
18.	u-track	Libre	Matlab	✓	×	✓	✓	2D	Auto	Jaqaman et al. (2008) [99]	http://lccb.hms.harvard.edu/software.html
19.	CASA	Libre	ImageJ	✓	✓	✓	✓	2D	Auto	Kime et al (2001) [100]	http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/casa.html

Cuadro 2.2: Desarrollos académicos que incluyen elementos para identificación y rastreo de células en dos y tres dimensiones. Las columnas indican disponibilidad, plataforma, nivel de automatización, tipo de datos de entrada (2D o 3D), autor, cita bibliográfica y sitio web asociado [83].

ID	Nombre	Disponible	Plataforma	Fuente	Partícula	Célula	Multi-partícula	Dimensión	Automático	Referencia	Sitio Web
1.	Brain Cells	Libre	Win	×	✓	×	×	2D	Manual	Gabon Ivancsy	http://pearl.elte.hu/~kyd
2.	DiaTrack	Comercial	Win	×	✓	✓	✓	3D	Auto	Semassoph, Switzerland	http://ww.semasoph.com/
3.	Image-Pro Plus	Comercial	Win	×	✓	✓	✓	3D	Auto	Media Cybernetics, USA	http://www.mediacy.com/index.aspx?page=IPP
4.	Imaris Track	Pago	Win/Mac	×	✓	✓	✓	3D	Auto	Birplane, Switzerland	http://www.bitplane.com/go/products/imaristrack
5.	Lineage Tracker	Libre	ImageJ	×	✓	×	✓	2D	Auto	Till Bretschneider	http://go.warwick.ac.uk/bretschneider/lineagetracker/
6.	Manual Tracking	Libre	ImageJ	✓	×	✓	✓	3D	Manual	Fabrice Cordeliers	http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.shtml
7.	MetaMorph	Comercial	Win	×	✓	✓	✓	3D	Auto	Molecular Devices, USA	http://www.moleculardevices.com/Products/Software.html
8.	Mtrack2	Libre	ImageJ	✓	×	✓	✓	2D	Auto	Nico Stuurman	http://valelab.ucsf.edu/~nico/IJplugins/Mtrack2.html
9.	Oko-Vision	Comercial	Win	×	✓	×	✓	2D	Semi	Okolab, Italy	http://www.oko-lab.com/cell_tracking.page
10.	plus Tip Tracker	Libre	Matlab	✓	×	✓	✓	2D	Auto	Danuser lab	http://lccb.hms.harvard.edu/software.html
11.	TLA	Libre	Matlab	✓	✓	×	✓	2D	Auto	Kestler lab	http://www.informatik.uniulm.de/staff/HKestler/tla/
12.	Volocity	Comercial	Win/Mac	×	✓	✓	✓	3D	Auto	Perkin Elmer, USA	http://cellularimaging.perkinelmer.com/products/volocity/demo/
13.	PIV	Comercial	Win/Lin	×	✓	×	✓	2D	Auto	Willert et al (1991) [1]	http://www.holomap.com/dptv.htm

Cuadro 2.3: Herramientas de software que incluyen módulos para detección y/o rastreo de partículas y células en dos y tres dimensiones. Las columnas indican disponibilidad, plataforma, nivel de automatización, tipo de datos de entrada (2D o 3D), autor, cita bibliográfica correspondiente y sitio web asociado [83].

Medida	Definición
Distancia total recorrida	$d_{tot} = \sum_{i=1}^{N-1} d(\vec{p}_i, \vec{p}_{i+1})$
Distancia neta recorrida	$d_{net} = d(\vec{p}_1, \vec{p}_N)$
Distancia máxima recorrida	$d_{max} = \max_i d(\vec{p}_1, \vec{p}_i)$
Tiempo total de trayectoria	$t_{tot} = (N - 1)\Delta t$
Radio de Confinamiento	$r_{con} = \frac{d_{net}}{d_{tot}}$
Ángulo Instantáneo	$\alpha_i = \frac{\arctan(\gamma_{i+1} - \gamma_i)}{(x_{i+1} - x_i)}$
Cambio dirección	$\gamma_i = \alpha_i - \alpha_{i-1}$
Velocidad Instantánea	$v_i = \frac{d(\vec{p}_i, \vec{p}_{i+1})}{\Delta t}$
Velocidad angular promedio	$\bar{v} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} v_i$
Velocidad progresiva promedio	$v_{lin} = \frac{d_{net}}{t_{tot}}$
Linealidad del desplazamiento	$\gamma_{lin} = \frac{v_{lin}}{\bar{v}}$
Desplazamiento cuadrado medio	$MSD(n) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} d^2(\vec{p}_i, \vec{p}_{i+1})$.

Cuadro 2.4: Índices genéricos para cuantificar el movimiento de trayectorias rastreadas. Dado un intervalo constante de tiempo Δt entre puntos consecutivos, la distancia está dada por $d(\vec{p}_i, \vec{p}_{i+1})$.

Sistema experimental.

Durante varias décadas se han realizado importantes esfuerzos orientados al análisis cuantitativo de los desplazamientos descritos por células, microorganismos o partículas, sin embargo, en su inmensa mayoría estos esfuerzos se han orientado al desarrollo de sistemas bidimensionales, situación poco representativa de la condición silvestre donde la gran mayoría de las células no sufriría restricciones mecánicas relacionadas a efectos de frontera (casi siempre debidas a la adherencia de la célula a una superficie). Estas constricciones podrían afectar significativamente los resultados experimentales obtenidos y consecuentemente favorecer interpretaciones erróneas sobre el nado de células. En este contexto es donde se sitúa la discusión que aquí presentamos y que se centra en el desarrollo de un sistema de rastreo capaz de registrar, procesar y analizar datos experimentales con información de desplazamientos 3D.

El primer antecedente de un sistema experimental capaz de registrar el desplazamiento de un microorganismo en un espacio 3D es la propuesta que desarrolló Berg *et al* en 1971 [6] (Fig. 3.1.a) cuando registró el desplazamiento de una bacteria de *Escherichia Coli* al nado libre. El sistema propuesto utiliza un microscopio óptico al que acopla una serie de motores manejados por software con los que controla la posición del plano focal y los desplazamientos laterales de la platina que sostiene la muestra. Mediante software se mantiene la bacteria centrada y en foco tal que, registrando todos los movimientos inducidos por los motores, al final del proceso se cuenta con toda la información del desplazamiento tridimensional de la célula. Este tipo de tratamiento es eficiente cuando se sigue una sola partícula y la velocidad del microorganismo, célula o partícula (*E. coli* en el caso estudiado por Berg) no supera la resolución de los motores, pero resulta completamente inadecuada en casos de rastreo multi-partícula o para seguir partículas con velocidades superiores a $100 \mu\text{m/s}$. Sistemas semejantes se utilizaron para estudiar el desplazamiento de microorganismos (principalmente bacterias) en diferentes ambientes químicos [7], sin embargo fue hasta 1990 cuando Crenshaw [104, 105] (Fig. 3.1.b), reportó el primer sistema experimental capaz de rastrear trayectorias 3D de un solo espermatozoide de erizo marino (*Arbacia punctulata*), célula con velocidades promedio de $250 \mu\text{m/s}$ [30, 34]. El sistema de Crenshaw ajusta la posición de dos microscopios de forma que sus planos focales sean perpendiculares entre sí, posteriormente acopla una cámara a cada uno de los microscopios y sincroniza sus disparos tal que se en un instante de tiempo se adquiere información del mismo objeto desde dos diferentes perspectivas, de donde se pueden obtener sus coordenadas tridimensionales. Basado en estas observaciones, Crenshaw propuso un modelo de desplazamiento para el nado del espermatozoide [106] que incluye factores como velocidad, curvatura de giro y ángulos de torsión. A este modelo recientemente se han añadido sistemas equivalentes para rastreo 3D de partículas simples; aplicado en células [107–109] o microorganismos [11, 13] de escala semejante (Fig. 3.2.a) y nuevos modelos de movimiento 2D construidos en base a vídeos con alta resolución espacio temporal [37, 110]. No obstante el avance, estos sistemas se diseñaron para seguir una sola partícula, por lo que el reto de contar con un sistema de rastreo multi-partícula para microorganismos o células de alta velocidad ($\geq 100 \mu\text{m/s}$) seguía sin resolverse, lo que complicaba la obtención de datos estadísticos sobre el nado 3D.

Posteriormente, en el 2006, Sheng *et al* [20], propusieron un sistema basado en holografía digital capaz de rastrear células de nado rápido en profundidades de más de $500 \mu\text{m}$ durante intervalos de varios segundos. No obstante que este avance fue muy significativo, el sistema diseñado por Sheng tiene algunas limitantes, como por ejemplo, es incapaz de incluir fuentes múltiples de luz, es muy sensible a la contaminación mecánica y luminosa, e implica un costo computacional muy grande para decodificar la información 3D contenida en los patrones de difracción (Fig. 3.2.b)).

Más recientemente en el 2008, Corkidi *et al* [22] (Fig. 3.3) desarrollaron el primer sistema experimental aplicado al



rastreo 3D de múltiples espermatozoides¹ nadando simultáneamente en micro-volumenes. El dispositivo propuesto se basa en la oscilación de un cristal piezoeléctrico sobre el que se monta el objetivo del microscopio, este montaje consigue hacer oscilar periódicamente el plano focal del microscopio a lo largo de una profundidad de $100\ \mu\text{m}$. Durante este escaneo de volumen, una cámara rápida adquiere información a una frecuencia de 4200 imágenes por segundo, obteniendo una colección de imágenes que son cortes del micro-volumen. A partir de estos datos y un proceso semi-automático de segmentación y rastreo se obtuvieron algunas trayectorias 3D, sin embargo dada la dificultades para identificar espermatozoides en un contexto ruidoso y para seguirlos a lo largo de la secuencia de imágenes, el proceso de segmentación y rastreo rápidamente se vuelve tedioso y propenso a errores. Como ya describimos en el capítulo anterior, actualmente existe una gran diversidad de técnicas para adquisición de imágenes microscópicas que han permitido registrar información sobre el comportamiento de los microorganismos o células en situaciones muy cercanas a su ambiente natural, sin embargo, sigue siendo particularmente complejo determinar la dinámica del movimiento de micro-partículas de nado rápido que se distinguen pobremente de su contexto y que cambian su apariencia en el tiempo. Es en este contexto que hemos desarrollado un sistema automatizado de adquisición y análisis de imágenes capaz de proporcionar información cuantitativa de las trayectorias descritas por células móviles en una gran variedad de condiciones experimentales [26].

3.1. Sistema de Adquisición de Imágenes.

Nuestro sistema experimental se construye en base al principio experimental publicado por Corkidi *et al* en 2008 [22] e ilustrado en la Fig. 3.4. El sistema propuesto permite adquirir información tridimensional a partir de una colección de imágenes bidimensionales registradas secuencialmente conforme se desplaza el plano focal del microscopio en la profundidad y al interior de la muestra biológica que contiene las células al nado libre.

Para controlar el movimiento del plano focal se utiliza un dispositivo basado en un cristal piezoeléctrico P-725 (Physik Instruments, MA, USA) colocado entre un objetivo de larga distancia de trabajo (40X 0.60 AN Olympus Ph 2 FL N) y el revolver de un microscopio (Olympus IX71) (Fig. 3.5). El movimiento del piezoeléctrico es controlado por un nano-posicionador E-501 que, integrado con un generador de ondas y amplificador E-505 (Physik Instruments, MA, USA), trata de seguir una señal triangular de $250\ \mu\text{m}$ en amplitud y $30\ \text{Hz}$ en frecuencia. Acoplado con el arranque del piezoeléctrico, una cámara rápida (Motion-Pro HS4, RedLake, AZ, USA) de 4 Gigabytes en RAM registra una colección de 16384 imágenes TIFF de 512×512 píxeles a una tasa de 2000 cuadros por segundo durante 8.19 segundos, tiempo en el que el piezoeléctrico completa un poco más de 245 ciclos.

El análisis de las primeras secuencias de imágenes adquiridas reveló que el movimiento del piezoeléctrico, además de desplazar el plano focal a lo largo de la profundidad de la muestra, también induce contaminación mecánica que se registra en la colección de imágenes. Dado que uno de los aspectos críticos para obtener información tridimensional a partir de la secuencia de imágenes es cuantificar de la forma más precisa posible el movimiento relativo entre el plano focal del microscopio y la muestra biológica, esta contaminación resulta un aspecto crítico a resolver antes de avanzar en el análisis. Específicamente buscamos establecer dos condiciones fundamentales para el posterior proceso de rastreo:

1. Cuantificar los desplazamientos residuales asociados a la resonancia producida por el acoplamiento mecánico del piezoeléctrico y el microscopio.
2. Determinar la correspondencia entre el movimiento teórico y el desplazamiento real del piezoeléctrico a lo largo del eje óptico (profundidad Z).

En la siguiente sección discutiremos los detalles del análisis que realizamos para concretar estos objetivos.

¹El sistema de Corkidi *et al* puede rastrear trayectorias simultaneas de varias células. Cada célula miden en promedio $4\ \mu\text{m}$ y en medios de baja viscosidad nada a velocidades promedio de $250\ \mu\text{m}/\text{s}$. En una escala más familiar, la velocidad a la que se desplaza el espermatozoide sería equivalente a la de un corredor con estatura de 1.8 metros que recorre 100 metros en 0.9 segundos.

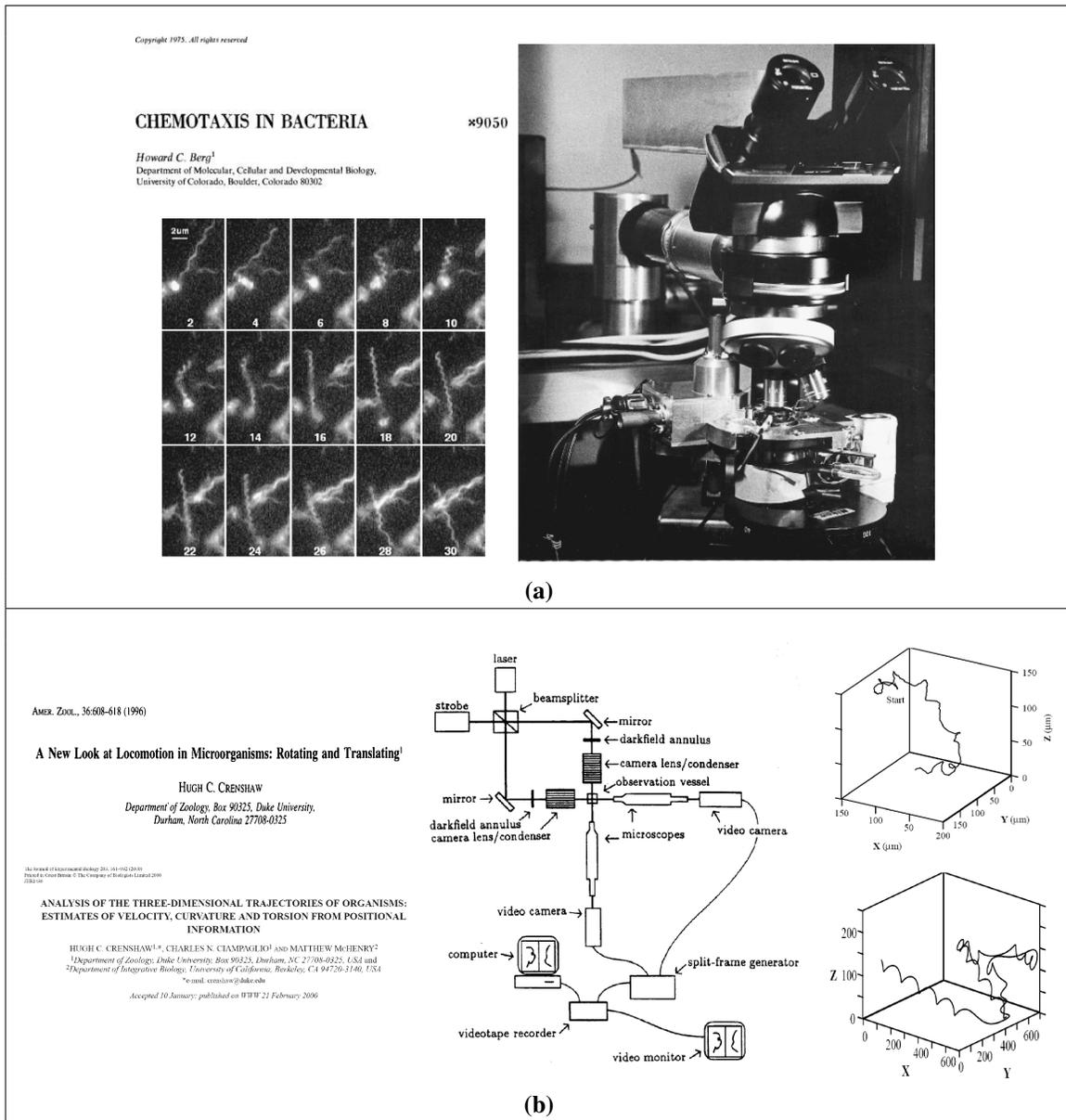


Figura 3.1: Estado del arte en sistemas de rastreo orientados a partículas microscópicas desplazándose en espacios tridimensionales. **(a)** En 1971 H. Berg [6] desarrolla el primer sistema para rastrear una bacteria *E. Coli* usando un sistema de platinas motorizadas y un algoritmo de enfoque y centrado. **(b)** En 1991, C. Crenshaw [105] propone un método que usando dos microscopios perpendiculares permite rastrear partículas rápidas en 3D.

3.2. Análisis del error experimental.

Comenzaremos nuestra descripción analizando los desplazamientos residuales del sistema acoplado objetivo / piezoeléctrico / microscopio.

3.2.1. Resonancia mecánica del piezoeléctrico.

Como hemos mencionado, la oscilación del objetivo es controlado por el generador de ondas a través del piezoeléctrico, si el movimiento resultante fuese ideal, el objetivo se desplazaría paralelo al eje óptico del microscopio (a lo largo del eje Z) siguiendo un movimiento periódico perfecto. Sin embargo, la realidad es que la vibración se propaga por todo el sistema mecánico e induce desplazamientos del objetivo en el plano de observación XY (perpendicular al eje óptico). Dado que la frecuencia de oscilación del piezoeléctrico es alta, una gran cantidad de energía mecánica se transmite a la estructura formada por el sistema acoplado piezoeléctrico/objetivo/microscopio (*SMA*). Construyendo el sistema para lograr que el acoplamiento mecánico entre las partes que forman el *SMA* sea fuerte, podemos aproximar su vibración a la de un cuerpo rígido que oscila en tres componentes: la oscilación definida por la señal del piezoeléctrico (principal), la vibración asociada a la resonancia (secundaria) y el ruido. Bajo esta hipótesis haremos las siguientes suposiciones:

- La vibración del objetivo a lo largo del eje óptico (eje Z) es una oscilación forzada, por lo tanto, su comportamiento será muy cercano al nominal que está definido por la señal del generador de onda (componente primaria).
- La respuesta del *SMA* (componente secundaria) se refleja como vibraciones del objetivo del microscopio en el plano perpendicular al eje óptico (plano XY). La magnitud y frecuencia de esta respuesta dependerá de la amplitud y frecuencia de la oscilación del piezoeléctrico y de las propiedades físicas del *SMA* (peso, geometría, densidad, etc).
- El ruido, usualmente asociado a una fuente externa y a las partes no rígidas o móviles del microscopio, se refleja como la parte estocástica de las vibraciones en el sistema y lo supondremos pequeño en magnitud comparado con las componentes primaria y secundaria.

Bajo estas consideraciones, podemos señalar que la componente secundaria de la vibración produce un desplazamiento del observador o cámara (objetivo el microscopio) que se refleja en la información de las imágenes contaminando los desplazamientos de las células. Dado que esta vibración se desarrolla a lo largo de toda la oscilación del piezoeléctrico, para determinar su forma y magnitud era necesario encontrar una referencia (objeto inmóvil) que no desapareciera cuando cambia el plano focal que explora el micro-volumen. Hemos solucionado este problema proponiendo como referencia el centro de masa de un pequeño orificio ($\sim 20\mu\text{m}$) perforado en una placa delgada de aluminio. Cuando se coloca este objeto en el microscopio y la luz pasa por el orificio, se forma una mancha blanca que crece cuando sale de foco pero no desaparece. Ajustando la oscilación a condiciones experimentales estándar (onda triangular de 30 Hz y $250\mu\text{m}$, adquirimos 16,385 cuadros a 2,000 cuadros/segundo, objetivo de 40X) hacemos un rastreo bidimensional del centro de masa del orificio. Nuestros resultados indican que la vibración del objetivo es aleatoria durante un transitorio de $\sim 0,25$ segundos y después alcanza el estado estacionario de oscilación que mostramos en la Fig. 3.6.a. Para obtener un promedio estadístico del desplazamiento realizamos 15 medidas con diferentes micro-orificios y obtenemos la curva que mostramos en la Fig. 3.6.b. Los resultados indican que el desplazamiento describe una trayectoria cíclica (con un periodo de $0,033 \pm 0,0035$ s) que sigue un desplazamiento tridimensional como el que se muestra en la Fig. 3.6.c. En la trayectoria que sigue el centro de masa del *SMA* existen zonas de desplazamiento recto y zonas curvas. La acumulación de puntos en la región curva refleja que en estas zonas la velocidad del dispositivo es significativamente menor que en las secciones rectas, por tanto, las imágenes tomadas en las curvas deben ser muy similares y un índice de correlación local debe ser mayor en estas zonas que en el resto de la trayectoria (Fig. 3.7.a). Usando este criterio es posible poner en fase una secuencia arbitraria de imágenes y la zona de la curva de corrección que le corresponde.

Midiendo el tamaño del píxel en micras, determinamos que el máximo desplazamiento es de alrededor de $20\mu\text{m}$ respecto a la posición inicial del objetivo. Finalmente, la dispersión de las trayectorias respecto al valor promedio es de $0,94\mu\text{m}$. Usando este método calculamos una corrección para un segmento de trayectoria descrita por una célula (Fig. 3.7.b.) [111]. Debe hacerse notar que entre el periodo nominal del piezoeléctrico y la oscilación real existe un ligero corrimiento de fase ($\pm 0,0035$ s) que no es sistemático, esto implica que a lo largo de todo el experimento, el piezoeléctrico tiene un comportamiento promedio cercano al nominal con una frecuencia de oscilación de 30 Hz, no

obstante, a lo largo de cada periodo ocurren cambios ligeros asociados a periodos más o menos cortos. En la siguiente sección analizaremos este aspecto y sus importantes repercusiones en los resultados de las trayectorias.

3.2.2. Periodo de la oscilación real.

Por el principio de adquisición de datos del sistema, conocer el desplazamiento real del dispositivo piezoeléctrico en el eje óptico Z es fundamental para conocer la posición real del plano focal dentro de la profundidad del microvolumen. Como hemos mencionado, al final de cada realización experimental contamos con una secuencia de N imágenes experimentales (en nuestro caso $N = 16385$), donde cada una de ellas tiene asociado un número n que determina su posición dentro de la secuencia ($n \in [0, \dots, N]$). Dado el movimiento oscilatorio del piezoeléctrico, el número n está relacionado con la profundidad o coordenada Z que el plano focal ocupaba cuando se adquirió esa imagen. Dicho de otra manera, teóricamente, existe una función \mathcal{F} que dado n devuelve la profundidad asociada a ese instante tal que $z = \mathcal{F}(n)$. Nominalmente esta función es de la siguiente forma,

$$\mathcal{F}(n) = \begin{cases} 2 Z_m \frac{t}{T} & t \in [0, T/2] , \\ 2 Z_m \left(1 - \frac{t}{T}\right) & t \in [T/2, T] . \end{cases} \quad (3.1)$$

donde Z_m denota la profundidad máxima que alcanza el plano focal en el desplazamiento, T es el periodo del piezoeléctrico en números de imágenes ($T = \frac{2000}{30}$) y $t = (n \bmod T)$. No obstante, como hemos mencionado, el desplazamiento del piezoeléctrico no es ideal y la relación real entre n y Z debe determinarse a partir de medidas experimentales. En este sentido, hemos digitalizado el desplazamiento real del piezoeléctrico y determinamos que la señal real es de distinta magnitud y esta desfasada respecto a la nominal (Fig. 3.8.a). Por otro lado y más importante aun, el periodo real tiene ligeras variaciones respecto al nominal, lo que implica que dado el número de imagen n la forma funcional \mathcal{F} de la Ec. 3.1 comete un error para asignar la profundidad de cada plano focal. Desafortunadamente, este error es acumulativo y rápidamente (~ 30 periodos) ocasiona un desajuste que afecta toda información sobre la correspondencia entre la profundidad y el número que identifica al plano focal.

En principio, la combinación de estos factores complican mucho el análisis y la obtención de la función experimental \mathcal{F}_E . Afortunadamente, basados en datos experimentales hemos podido implementar el siguiente tratamiento que nos permiten identificar el desfase del dispositivo en cada ciclo a partir de los mismos datos: dado que la resolución temporal que manejamos es alta, cuando el piezoeléctrico pasa dos veces por la misma profundidad el fondo, número y posición de los espermatozoides que aparecen en el par de imágenes es prácticamente el mismo, por lo que las imágenes son muy parecidas, esta característica permite ubicar profundidades equivalentes a partir de una secuencia de imágenes. Usando este criterio en combinación con la información del desplazamiento real (Fig. 3.6), podemos identificar las zonas del fondo (inicio del ciclo) y del desplazamiento máximo (Z_m). Como el error que comete el piezoeléctrico después de cada ciclo está acotado, una vez que establecimos la localización (n_0) de uno de los fondos podemos restringir la búsqueda del siguiente a una vecindad del cuadro $n_0 + T$, por lo tanto, en la práctica la correlación funciona como ajuste fino de la fase. En la Fig. 3.8.b mostramos el histograma del tamaño del período de los ciclos del piezoeléctrico obtenido a partir del criterio recién descrito.

Adicional a los ajustes de la fase, optimizamos la óptica del sistema experimental para ampliar el campo de observación, en consecuencia se dispone de un volumen más grande y se reduce notablemente el tamaño de las vibraciones secundarias. También construimos un sistema electrónico que sincroniza pulsos para iniciar la adquisición de imágenes cuando desaparece el transitorio de la oscilación (Fig. 3.6) y da al sistema la capacidad de controlar la liberación de un atrayente químico presente en el medio ambiente de nado. En la Fig. 3.9 mostramos el diseño de el circuito controlador de pulsos.

Usando el sistema de adquisición descrito hemos adquirido una importante colección de datos experimentales que aborda diferentes situaciones con importante interés biológico, posteriormente, en el capítulo 5 describiremos con detalle las situaciones analizadas.

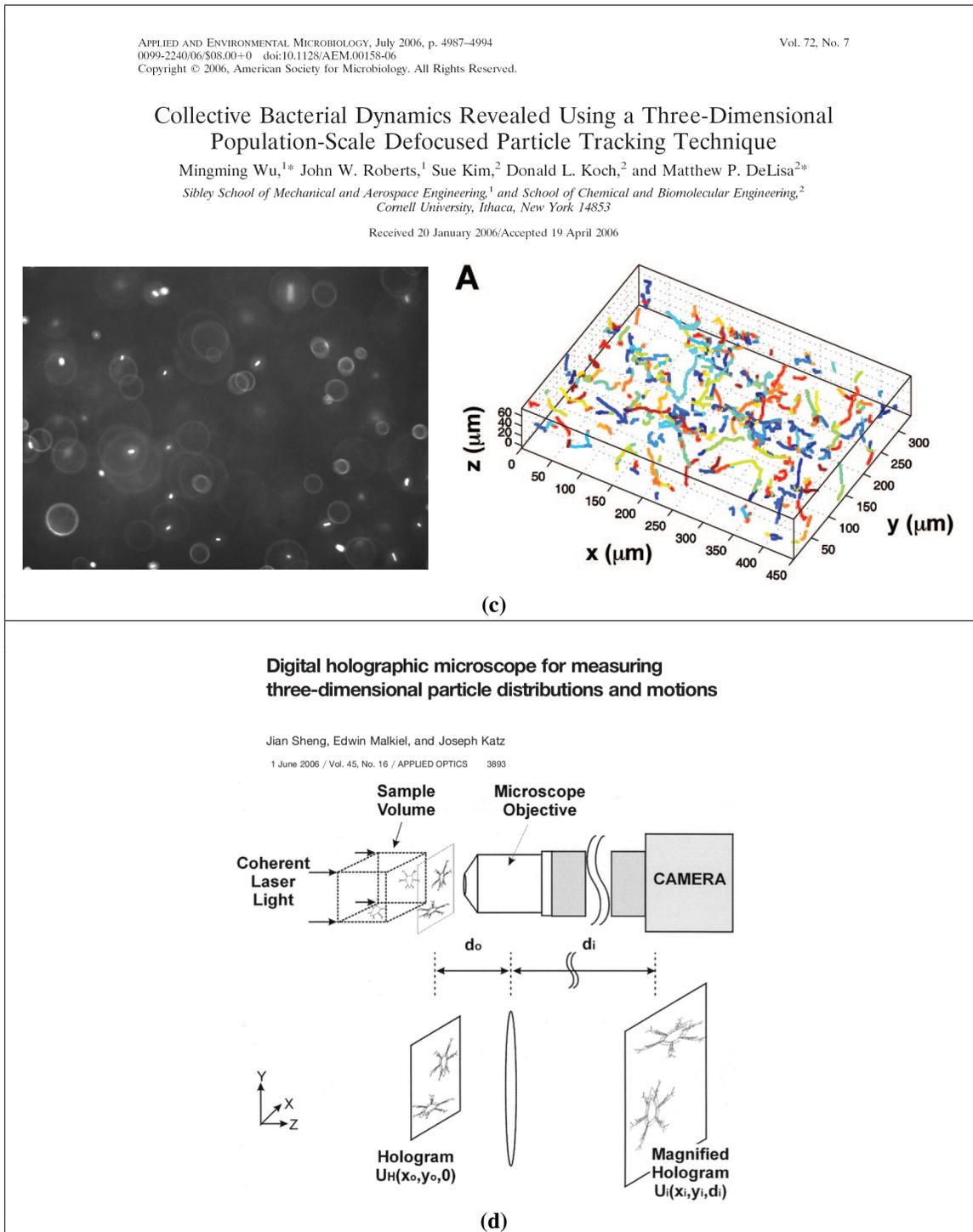


Figura 3.2: Estado del arte en sistemas de rastreo orientados a partículas microscópicas desplazándose en espacios tridimensionales. **(a)** En el año 2006 Wu *et al* [15] desarrollaron un sistema que basado en patrones de difracción permite inferir la posición 3D de bacterias *E. Coli*. **(b)** En el año 2006 Sheng *et al* [20] desarrollaron un sistema de rastreo tridimensional basado en holografía digital que permite registrar el nado simultáneo de partículas rápidas al nado libre.

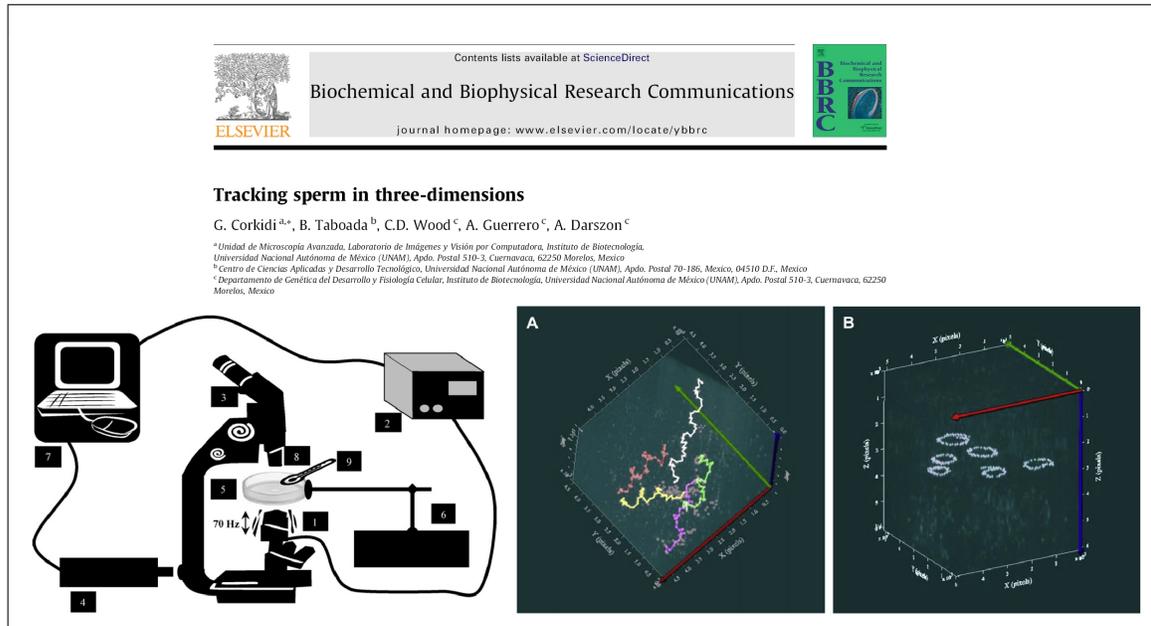


Figura 3.3: Estado del arte en sistemas de rastreo orientados a partículas microscópicas desplazándose en espacios tridimensionales. En el año 2008 Corkidi *et al* [22] desarrollaron un sistema de rastreo tridimensional para registrar el nado simultáneo de partículas rápidas al nado libre.

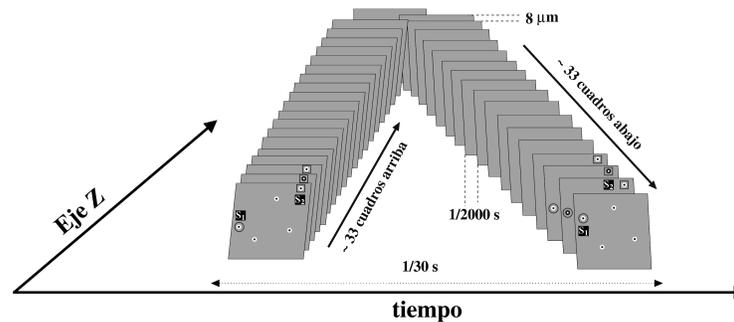


Figura 3.4: Representación del principio experimental para adquirir la información 3D de los desplazamientos descritos por los gametos. Un dispositivo basado en un cristal piezoeléctrico hace oscilar el plano focal de un objetivo y al mismo tiempo una cámara rápida adquiere una secuencia de 16385 imágenes que registran 8,19 segundos de evolución del sistema biológico. Cada $1/60$ de segundo, el plano focal recorre $\sim 250 \mu\text{m}$ en profundidad (Z) y simultáneamente una cámara rápida adquiere un grupo de 33 planos focales diferentes. La oscilación es suficientemente rápida para garantizar que entre dos recorridos consecutivos, hasta los espermatozoides más rápidos permanezcan en una vecindad menor a dos veces su longitud promedio ($8 \mu\text{m}$). Para ilustrar este punto, en la figura representamos un par de espermatozoides (objetos S_1 y S_2) en dos recorridos consecutivos a lo largo de la muestra.

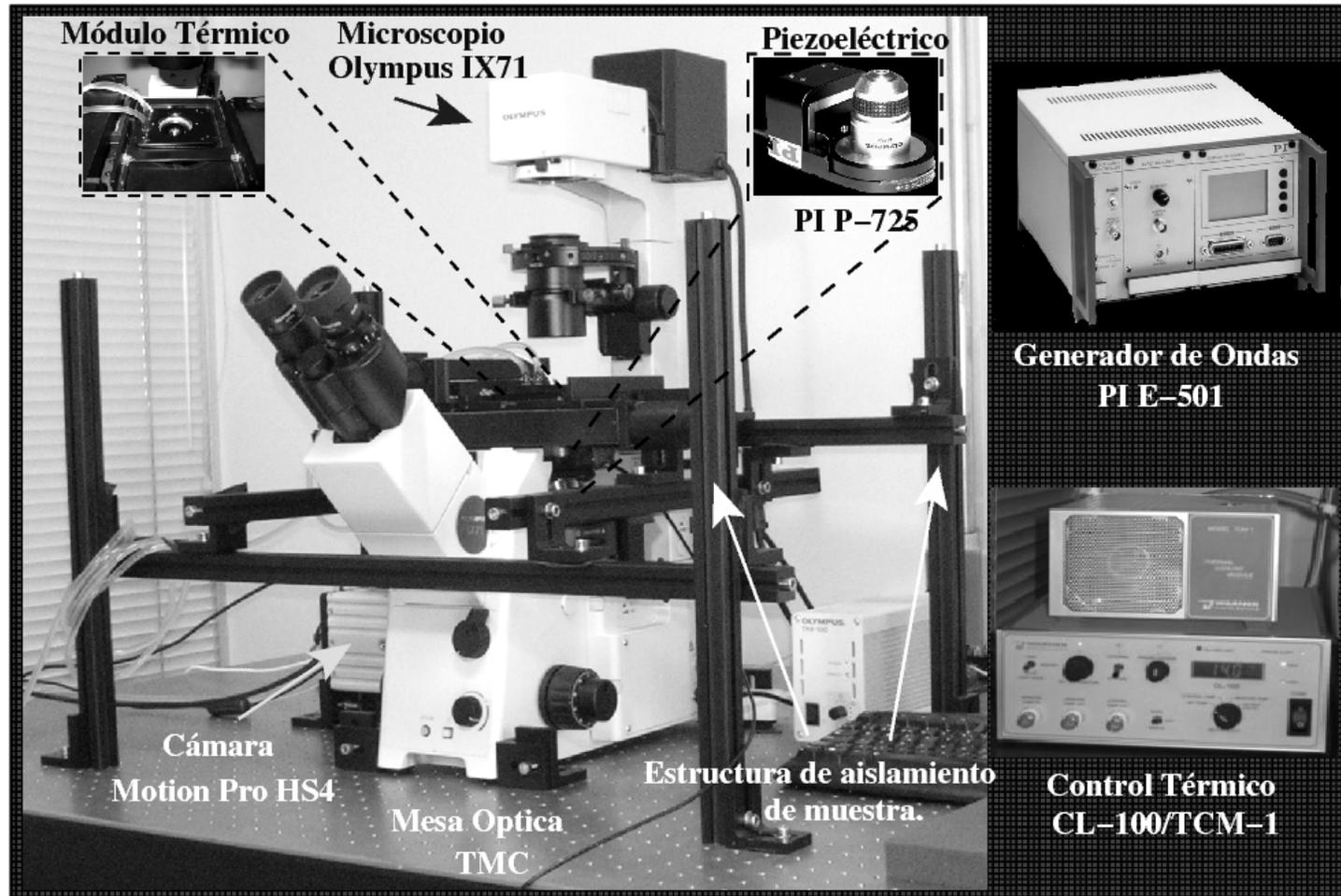


Figura 3.5: Sistema experimental para adquisición de imágenes. Un dispositivo piezoeléctrico desplaza el plano focal de un objetivo a lo largo de la profundidad de la muestra biológica y mientras tanto, una cámara rápida adquiere una secuencia de imágenes que registran el comportamiento de las células. El movimiento del piezoeléctrico sigue la señal de un amplificador que a su vez está controlado por el generador de ondas. El microscopio está fijo a una mesa óptica para aislar el sistema de vibraciones externas y la muestra biológica se coloca en un soporte externo que la aísla de la vibración del piezoeléctrico. El sistema incluye un controlador térmico para preservar las muestras biológicas.

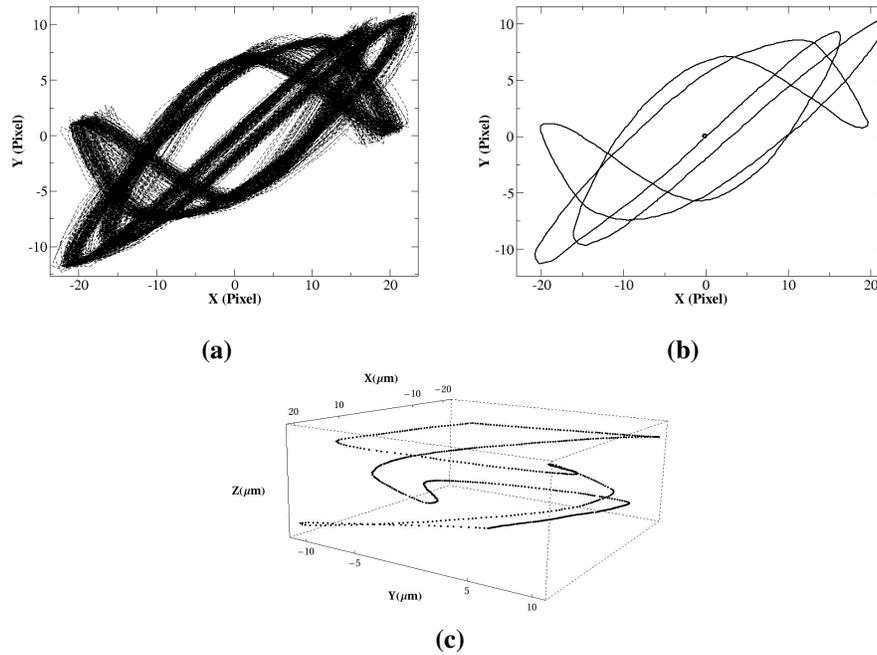


Figura 3.6: (a) Evolución temporal del desplazamiento del objetivo después del transitorio ~ 0.25 s (estado estacionario). (b) Trayectoria promedio del desplazamiento del objetivo (desviación estándar de $0.94 \mu\text{m}$). (c) Trayectoria 3D del centro de masa del objetivo del microscopio obtenido a partir del rastreo del micro-orificio y el desplazamiento nominal. La trayectoria es una curva cíclica con un periodo de $0,033 \pm 0,0035$ s.

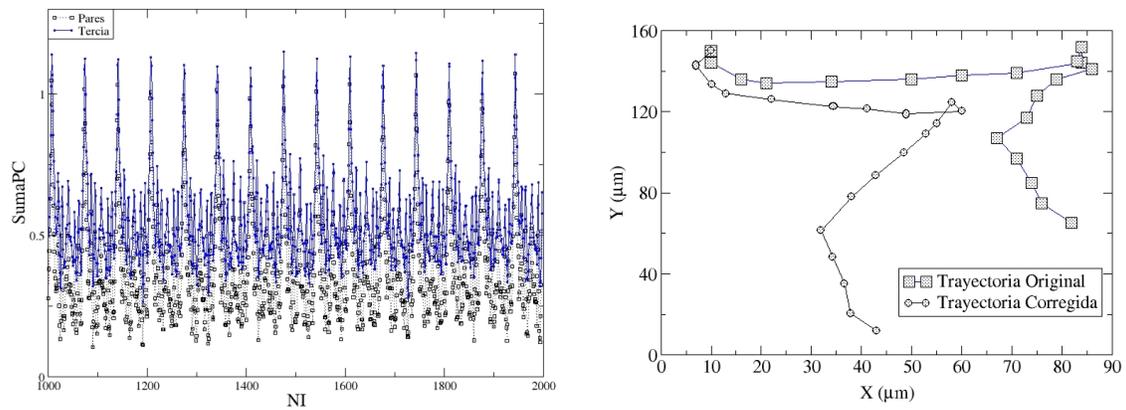


Figura 3.7: (a) El criterio de correlación por pares de imágenes adyacentes revela la presencia de zonas lentas asociadas a los puntos de retorno dentro de la curva de desplazamiento. (b) Comparación entre la trayectoria rastreada del nado de un espermatozoide y la trayectoria corregida usando el desplazamiento promedio de la Fig. 3.6.

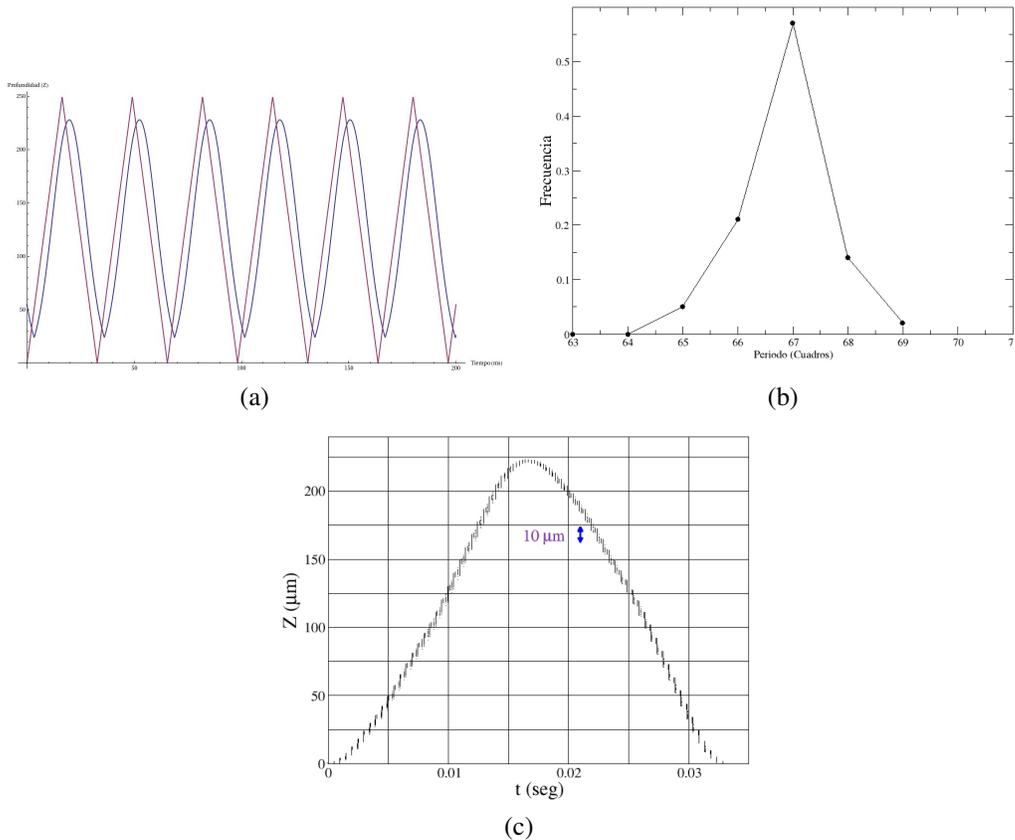


Figura 3.8: (a) Comparación entre la señal de entrada (triangular) para el generador de ondas y la señal de salida (real) medida experimentalmente. (b) Histograma del periodo real medido usando el criterio de correlación entre imágenes para ajuste fino de la fase. (c) Desplazamiento real del piezoeléctrico calculado a partir de la digitalización de la señal del reportada por el mismo dispositivo.

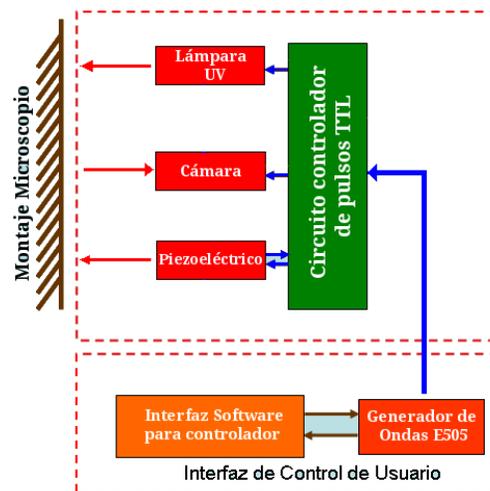


Figura 3.9: Secuencia de señales controladas por el circuito controlador de pulsos. Además de eliminar el transitorio del sistema hacia el estado estacionario, permite sincronizar la cámara rápida y controlar la duración de un flash de UV destinado a liberar un atrayente químico en el medio ambiente.

Algoritmo de rastreo 3D+t.

En este capítulo abordaremos una etapa clave en nuestro desarrollo: la descripción de los algoritmos que hemos diseñado para la detección y rastreo automatizado de las células. Comenzaremos por describir el procesamiento de las imágenes que las prepara para el proceso de segmentación, enseguida describiremos en detalle el procedimiento aplicado para detectar las secciones de células así como la forma en la que hemos integrado esta información para determinar la posición espacio-temporal de cada célula y finalmente describiremos el algoritmo de rastreo empleado y presentaremos los resultados obtenidos.

4.1. Caracterización de las células.

La segmentación de objetos móviles en vídeo es un tema recurrente en muy diversos contextos, asociado a este tema se han generado una gran cantidad de aplicaciones que como gactor común mantienen la búsqueda de criterios basados en parámetros como homogeneidad, textura, forma, tamaño o tipo de movimiento, etc, que permitan establecer la correspondencia espacio-temporal para determinar que píxeles pertenecen a cada uno de los objetos de interés [112–115]. Al respecto, son de uso frecuente métodos semiautomáticos o automáticos, que toman en cuenta las propiedades de sub-regiones, la conectividad y las características estructurales de los objetos [71, 116–119] o trabajan en base a propiedades de multi-resolución espacial o temporal donde realizan un refinamiento progresivo de la imagen. La elección del método adecuado y del costo computacional implícito, depende notablemente de la aplicación. En el contexto que nos ocupa que es el de imágenes de microscopia, la segmentación en vídeo es usual para el análisis de información relacionada con el movimiento 2D de microorganismos o células [16, 25, 38, 93, 109, 120–123], o para reconstruir la estructura 3D a partir de la proyección de los objetos en el plano focal [15, 124–127]¹. En contraparte, como se discutió en el capítulo 2, los métodos de segmentación orientados a detectar objetos en movimiento 3D se limitan a casos donde la apariencia del objeto presenta una variabilidad relativamente sencilla [13, 42, 46, 98, 108, 128–130], y no abordan los problemas donde los objetos cambian su apariencia en función del punto de observación. Es en este contexto donde nuestra propuesta cobra relevancia, porque es un método de detección que combina la información 2D con una serie de cambios sistemáticos en la apariencia del objeto (considerado inmóvil en la escala de tiempo t_2) para construir un patrón de cambios que permite identificar de forma precisa los objetos de interés.

Al respecto, hemos visto que nuestro sistema experimental involucra dos diferentes escalas de tiempo: la primera $t_1 \sim 1/30$ s, asociada al tiempo que tarda el sistema en hacer un escaneo completo del volumen, está definida por la velocidad de desplazamiento del espermatozoide. La segunda $t_2 \sim 1/2000$ s asociada a la frecuencia de la cámara es el tiempo que transcurre entre dos imágenes sucesivas. Dada su magnitud, en la escala t_2 las células contenidas en el micro-volumen permanecen prácticamente inmóviles, sin embargo, debido al cambio de perspectiva asociado al movimiento del observador (inducido por el cristal piezoeléctrico) como se ilustra en la Fig. 4.1.I.a.i, las apariencias de estas células cambian siguiendo un patrón específico, patrón que se muestra en la Fig. 4.1.I.a.ii [15, 108]. Conforme el piezoeléctrico registra las diversas profundidades del micro-volumen la célula cambia su apariencia siguiendo un patrón específico: cuando el espermatozoide entra en foco aparece como una mancha circular brillante rodeada por un anillo oscuro, por el contrario, cuando la célula está fuera de foco pero aún es visible, el contraste se invierte y la célula luce como una mancha circular negra rodeada por un anillo blanco (ver Fig. 4.1.I.b). Este patrón de cambios con

¹La técnica para estimar la estructura o profundidad de un objeto a partir de una secuencia de imágenes que corresponden a diferentes planos focales se denomina *Shape from Focus* (SFF). El punto clave de esta técnica consiste en establecer criterios que indiquen la forma en que un objeto aparece en función de su distancia al plano focal.



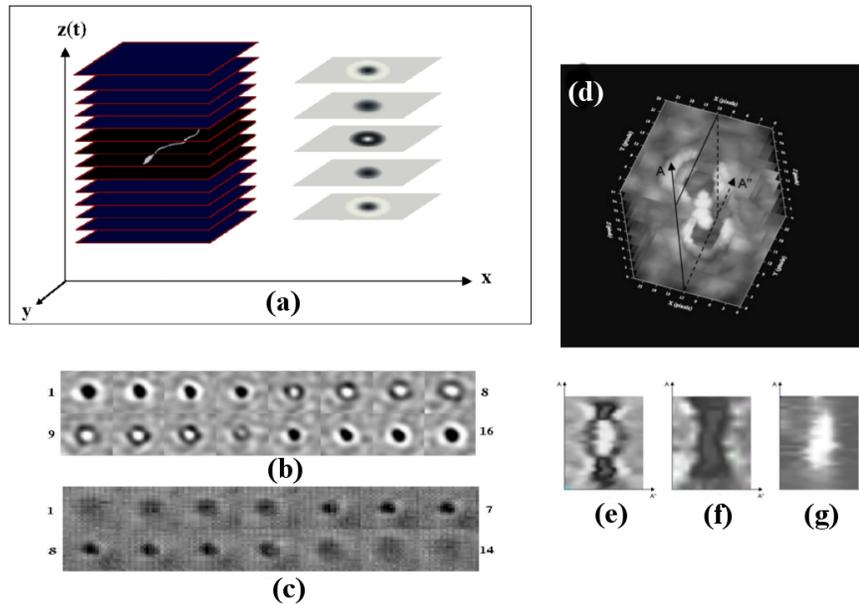


Figura 4.1: Representación esquemática del método de adquisición utilizado para adquirir información 3D+t de los desplazamientos celulares y del patrón de difracción asociado a una célula en tres dimensiones. **(a)** La información instantánea del microvolumen se adquiere en forma de una secuencia de cortes correspondientes a varios planos focales. Dependiendo de su distancia al plano focal, la misma célula exhibe diferentes apariencias durante el escaneo del micro-volumen realizado por el piezoeléctrico. **(b)** Secuencia experimental que ilustra el patrón de evolución (definido por la inversión de contraste) que exhibe una célula a lo largo del escaneo del volumen, el orden de la secuencia está indicado por las etiquetas. **(c)** Secuencia análoga al patrón de apariencias del inciso anterior, pero en este caso para un artefacto (partícula de polvo en la muestra). Obsérvese que existe una importante similitud en tamaño y forma entre algunas etapas de la célula y el polvo, sin embargo el polvo no presenta la inversión de contraste que la célula sí exhibe. **(d)** Patrón de difracción 3D formado por la secuencia de imágenes que contienen la inversión de contraste negro/blanco/negro que caracteriza el espermatozoide. **(e)** plano de corte del patrón 3D correspondiente al plano AA'' de la estructura del inciso anterior, el plano muestra el cambio de contraste de la célula. **(f)** Patrón 2D que corresponde a un artefacto oscuro típico (partícula de polvo) que no presenta inversión de contraste. **(g)** Patrón 2D de un artefacto brillante asociado a un reflejo de la fuente de luz.

inversión de contraste es específico de estructuras translúcidas que por su composición se comportan como condensadores de luz² y no se presenta asociado a otros tipos de objetos como polvo, sombras o brillos que se presentan en las imágenes (Fig. 4.1.I.c). Para ilustrar este aspecto, en la Fig. 4.1.II mostramos la evolución del patrón de apariencias exhibido por las células y lo comparamos con el que presentan artefactos como polvo o brillos asociados a la fuente de luz. En la sección 4.2 mostraremos la forma en que aprovechamos el patrón de inversión de contraste que distingue a las células de los artefactos para implementar un método automático de segmentación, antes que eso, mostraremos algunas de las propiedades estadísticas que caracterizan al objeto de interés.

4.1.1. Propiedades estadísticas de los objetos.

Analizando la evolución que la apariencia de los espermatozoides a lo largo de varios cuadros consecutivos (diferentes posiciones en Z) observamos que en el proceso de refracción por el que pasa el objeto, la apariencia registrada

²Una parte de la luz que incide sobre la célula se transmite al interior de la estructura (compuesta por agua dentro de una capa lipídica), una vez dentro, una fracción de esta luz sufre múltiples reflexiones internas de tal forma que la luz se condensa en el interior de la célula, resultando en una apariencia brillante con respecto al fondo [131].

por el sistema óptico y la cámara muestra una serie de cambios sistemáticos que en conjunto forman un patrón. Esta información y su tamaño aparente puede ayudar a identificar a los objetos. Una aproximación interesante para su identificación automática es tratar de representarlos en términos de su distribución espacial de grises. En este sentido hemos construido una serie de funciones analíticas basadas en *wavelets* que logran describirlos de forma precisa ³:

$$I(x, y; \sigma, M, B) = B + (M - B) \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{\sigma^2} \right] e^{-\frac{x^2 + y^2}{\sigma^2}}, \quad (4.1)$$

donde M corresponde al nivel mas alto o bajo de intensidad en el objeto, B es el nivel promedio de gris de la imagen B y σ es la desviación de intensidades de los píxeles que pertenecen al objeto ⁴. En varios casos para ajustar la apariencia del objeto es necesario usar una combinación lineal de dos funciones como se muestra enseguida,

$$\begin{aligned} I(x, y; \sigma_1, M_1, \sigma_2, M_2, B) &= I_1(x, y; \sigma_1, M_1) + I_2(x, y; \sigma_2, M_2) + B \\ &= M_1 \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{\sigma_1^2} \right] e^{-\frac{x^2 + y^2}{\sigma_1^2}} + M_2 \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{\sigma_2^2} \right] e^{-\frac{x^2 + y^2}{\sigma_2^2}} + B. \end{aligned} \quad (4.2)$$

Para ilustrar la evolución temporal de la apariencia de células en imágenes experimentales y comparar las sintéticas producidas con las funciones analíticas que hemos propuesto en la Fig. 4.2 mostramos un ciclo completo del proceso de enfoque-desenfoque. El caso que presentamos corresponde al movimiento descendente del objetivo del microscopio, como es de esperarse, su contra-parte ascendente corresponde a la secuencia de imágenes invertida. La

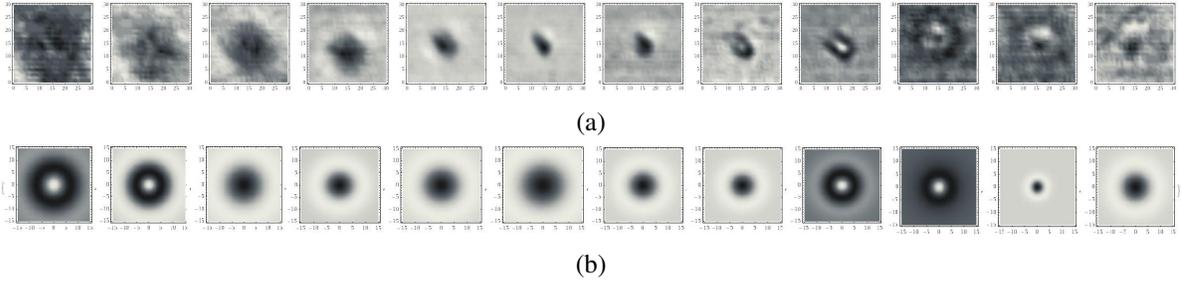


Figura 4.2: Secuencia de imágenes que ilustra la evolución en las apariencias de los objetos conforme el plano focal barre la profundidad de la muestra. (a) Grupo de 12 imágenes experimentales consecutivas (izquierda a derecha) que corresponden al proceso de enfoque-desenfoque en el movimiento descendente del objetivo. (b) grupo de imágenes sintéticas construidas a partir de las funciones analíticas mostradas en la Ec. 4.1.

lista de parámetros usados para generar los objetos sintéticos mostrados en la Fig. 4.2 se muestra en la tabla 4.1. En base a a estos parámetros determinamos la evolución temporal de la desviación estándar asociada al objeto $\sigma(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [x_i^2(t) - \bar{x}^2(t)]^2}$, donde $x_i(t)$, es la intensidad de un píxel que pertenece a la región \mathcal{R} que incluye al objeto y a su vecindad. El tamaño de esta región dependerá de la resolución espacial del sistema óptico, que en nuestro caso es de 30^2 píxeles cuadrados $\sim 23^2 \mu m^2$. Determinamos además la evolución temporal del valor medio del cuadrado de su intensidad; $\bar{x}(t) = \frac{1}{N} \sum_{x_i \in \mathcal{R}} x_i(t)$. Calculado el valor de estos dos parámetros para una colección de objetos con diferentes apariencias y obtuvimos los resultados que mostramos en la Fig. 4.3. Las funciones de interpolación que aparecen en la gráfica corresponden a combinación lineal de Gaussianas que describen la evolución temporal de la desviación estándar $\sigma(t)$,

$$\sigma(t) = \sum_{k=1}^3 a_k \exp \left[-\ln(2) \left(\frac{t - b_k}{c_k} \right)^2 \right],$$

³Para una revisión de métodos de reconocimiento de patrones basados en *wavelets* se puede revisar el trabajo de Brooks del año 2000 [132]

⁴Como detallaremos más adelante, hemos definido la vecindad para calcular la dispersión como un cuadrado de 30 píxeles centrado en el centro de masa del objeto.

Frame	σ_1	M_1	σ_2	M_2
1	10	-13	7	-17
2	10	-34	5	-39
3	10	178	0	0
4	15	3	7	49
5	9	-100	8	0
6	11	140	0	0
7	7	164	0	0
8	6	174	0	0
9	6	174	0	0
10	15	-7	4	-21
11	3	184	0	0
12	7	181	0	0

Cuadro 4.1: Parámetros de las *wavelets* que, a partir de la Ec. 4.2, permiten reconstruir la forma sintética de la evolución temporal asociada a la apariencia del espermatozoide a lo largo del desplazamiento del piezoelectrico.

donde los coeficientes son,

k	a_k	b_k	c_k
1	820.8	5.4	0.93
2	1016.1	19.5	0.99
3	21.2	10.3	8.2

En el caso de la intensidad media, su evolución está descrita por,

$$\bar{x}(t) = \sum_{k=1}^3 a_k \exp \left[-\ln(2) \left(\frac{t - b_k}{c_k} \right)^2 \right]$$

con los correspondiente coeficientes,

k	a_k	b_k	c_k
1	634.95	5.20	0.63
2	862.92	19.42	0.91
3	82.16	7.55	-2.76

Esta serie de datos describen la evolución temporal de los parámetros estadísticos asociados a todas las posibles apariencias de un mismo objeto a lo largo de todo el desplazamiento del piezoelectrico. En la siguiente sección veremos la forma en que utilizaremos esta información.

4.2. El algoritmo de segmentación.

En la Fig. 4.6 se muestra una imagen típica donde aparecen las células (objetos) y artefactos brillantes u oscuros con equivalente tamaño y forma (flechas verdes para los espermatozoides y flechas rojas para los artefactos). Después del proceso de eliminación de fondo y realce se obtienen imágenes como la que se muestra en la Fig. 4.6.b. Manualmente hemos clasificado los espermatozoides rodeándolos de cuadros verdes y los artefactos con hexágonos. Tomamos esta imagen y los cuadros que lo rodean (dentro de una vecindad ΔZ); calculamos la correlación entre las

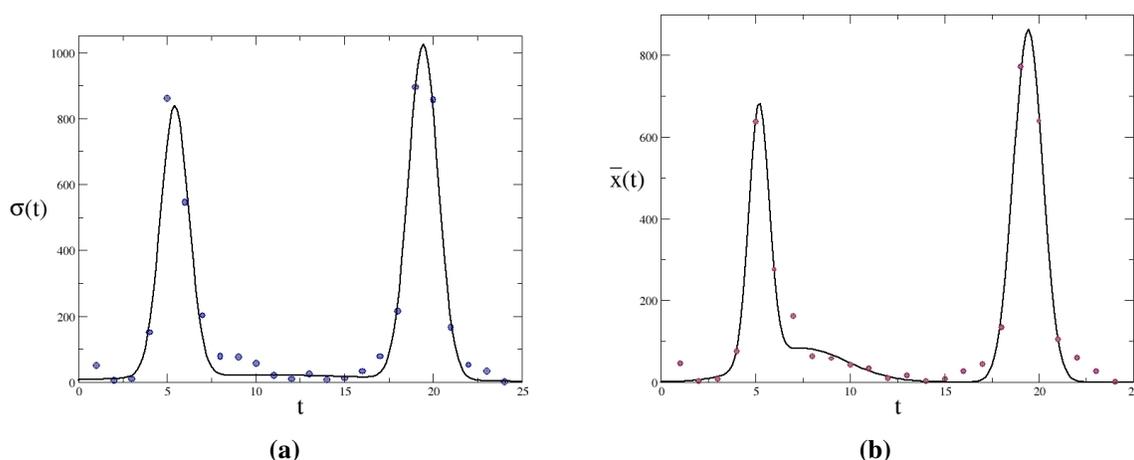


Figura 4.3: (a): Evolución temporal de la dispersión $\sigma(t)$ a través de 24 cuadros (dos ciclos). (b): Evolución de la intensidad promedio \bar{x}_i para la misma secuencia del inciso (a). Los puntos corresponden a los datos obtenidos a partir de las funciones *wavelets* y las funciones de interpolación son combinación lineal de Gaussianas.

máscaras brillante y oscura con todos los candidatos, eliminando aquellos para los que se obtiene un coeficiente de correlación bajo (≤ 0.5). La salida de este procedimiento son un par de imágenes, la primera contiene las proyecciones de las correlaciones positivas con la máscara blanca y la segunda las equivalentes con la máscara oscura (Fig. 4.6.c y Fig. 4.6.d respectivamente). Finalmente, correlacionando ambas imágenes se produce una tercera que indica cuáles objetos presentaron inversión de contraste (Fig. 4.6.e). Para ilustrar los resultados, en la Fig. 4.6.f mostramos la imagen original donde señalamos con círculos verdes los espermatozoides (verdaderos positivos) que exhibieron inversión de contraste en la secuencia de imágenes contenida en ΔZ . Los cuadros rojos indican las células reales que no son detectadas (falsos negativos), mientras los círculos rojos etiquetan los artefactos que se etiquetaron como células (falsos positivos) y con hexágonos azules los artefactos oscuros y brillantes que se eliminaron por no exhibir la inversión de contraste. En base a estas observaciones hemos diseñado un algoritmo de segmentación que identifican el patrón que contiene el cambio de contraste por el que transita la apariencia de la célula (Fig. 4.1), enseguida describimos en forma general este procedimiento.

4.2.1. Proceso secuencial de segmentación.

4.2.1.1. Ecuación lineal y eliminación de fondo.

Con el fin de eliminar la componente constante en el fondo de las imágenes y realzar el contraste de los objetos, el primer proceso que se aplica a cada una de las secuencias de imágenes experimentales consiste en calcular la intensidad promedio \bar{I}_k de cada píxel k a lo largo de toda la secuencia de 16385 imágenes. Posteriormente, para cada píxel k , se sustituye el nivel de gris I_k por el valor $I'_k = |\bar{I}_k - I_k|$ que es la diferencia entre el valor promedio calculado y la correspondiente intensidad del píxel. Al resultado se le añade un valor constante B tal que $I''_k = I'_k + B$, para finalmente ecualizar linealmente cada imagen entre dos valores límites arbitrarios.

4.2.1.2. Segmentación por multinivel.

Aplicado en las imágenes obtenidas en la etapa anterior, el algoritmo de segmentación por umbrales multinivel permite construir una lista de objetos (denominados candidatos a células) conformada por cúmulos de píxeles brillantes u oscuros referidos al nivel de gris del fondo [38, 133, 134]. Dada una imagen compuesta por N píxeles etiquetados

por un índice k , el primer paso de su implementación consiste en calcular el nivel de gris promedio del fondo de la imagen denominado I_B , posteriormente, se define una vecindad ΔI_m y se segmentan los píxeles que cumplan la siguiente condición:

$$|I_k - I_B| \leq \Delta I_m, \quad (4.3)$$

donde I_k representa la intensidad asociada al píxel k . Al grupo de píxeles segmentados se les aplican criterios de vecindad para determinar si existen subconjuntos conectados entre sí. Una vez construidos los subconjuntos se redefine el valor del umbral I_m cambiándolo por $I_{m+1} = I_m - \Delta I$ y se repite la operación de segmentación y agrupamiento. Este proceso se itera siempre y cuando la distancia entre I_m y I_B esté por encima de un valor crítico definido por un parámetro ΔI . Mientras los umbrales I_m se desplazan, los cúmulos crecen agrupando píxeles deteniendo su crecimiento cuando su tamaño corresponde al de un espermatozoide promedio (16 ± 4 píxeles). Al final del proceso, al conjunto de cúmulos resultante se le denomina lista de candidatos a ser sección de célula y es la entrada del siguiente paso donde se eliminan los artefactos que son brillantes u oscuros pero que no poseen apariencia de célula.

4.2.1.3. Detección de secciones de células.

Cada elemento de la lista de candidatos recién obtenida puede ser evaluado por dos métodos distintos: correlación con máscaras promedio o por componentes principales (*eigenfaces*). Como discutiremos posteriormente, la elección del método empleado en esta etapa se hace tomando en cuenta el costo beneficio que cada técnica en base a la naturaleza del sistema analizado.

Correlación con máscaras promedio. Usando las máscaras que aparecen en los cuadros 8 y 2 de la Fig. 4.1.b que corresponden a las apariencias promedio del espermatozoide en foco (brillante) y el espermatozoide fuera de foco (oscuro) se determina el coeficiente de correlación de Pearson que cada elemento x de la lista de candidatos tiene con cada una de las máscaras y :

$$\rho_{x,y} = \frac{\text{Cov}(x, y)}{\sigma_x \sigma_y}, \quad (4.4)$$

expresión que es equivalente a:

$$\rho_{x,y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4.5)$$

A los elementos que alcanzan un coeficiente de correlación de Pearson por encima de cierto umbral (un parámetro del algoritmo), se les asigna como elementos de la lista de secciones de célula (LSC).

Reconocimiento por PCA. Propuesto por Turk en 1991 [135], el reconocimiento de patrones por *principal component analysis* (PCA) mejor conocido como *eigenfaces* por tener sus antecedentes en un problema de reconocimiento de rostros, es una interesante propuesta en el contexto de que nos ocupa, porque sería interesante considerar que cada una de las secciones de célula pueden ser interpretada como un “rostro” que puede reconocerse, de forma que, la célula completa puede entenderse como un elemento que cambia de rostro de forma sistemática. Para aplicar esta interesante idea se construye una librería de entrenamiento que contiene una muestra estadísticamente representativa de todas las apariencias posibles de las secciones de células. A esta librería se le aplica un análisis de componentes principales (PCA) y se determinan los eigenvectores del espacio de características que como su nombre lo indica, define las características representativas de la población. Para conseguir este objetivo, construimos una colección de entrenamiento formada por p secciones de célula seleccionadas manualmente de entre la lista de candidatos obtenidos y que representan homogéneamente a todas las apariencias en las que es posible encontrar a una célula (en nuestro caso $p = 140$ elementos). Para cada elemento i de esta colección se obtiene una imagen bidimensional de dimensión $n^2 = 21 \times 21$ que lo contiene, esta imagen se lleva a su forma unidimensional que llamaremos x^i que será de dimensión

$n = 441$. Agrupando los p vectores en su forma unidimensional construimos la siguiente matriz:

$$\mathbb{E} = \begin{pmatrix} \mathbf{x}^1 \\ \mathbf{x}^2 \\ \vdots \\ \mathbf{x}^{p-1} \\ \mathbf{x}^p \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1^1 & x_2^1 & x_3^1 & \cdots & x_{n-1}^1 & x_n^1 \\ x_1^2 & x_2^2 & x_3^2 & \cdots & x_{n-1}^2 & x_n^2 \\ x_1^3 & x_2^3 & x_3^3 & \cdots & x_{n-1}^3 & x_n^3 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \cdots & \vdots & \vdots \\ x_1^{p-2} & x_2^{p-2} & x_3^{p-2} & \cdots & x_{n-1}^{p-2} & x_n^{p-2} \\ x_1^{p-1} & x_2^{p-1} & x_3^{p-1} & \cdots & x_{n-1}^{p-1} & x_n^{p-1} \\ x_1^p & x_2^p & x_3^p & \cdots & x_{n-1}^p & x_n^p \end{pmatrix}, \quad (4.6)$$

enseguida, se obtienen el promedio y la varianza de cada elemento i de la matriz,

$$\bar{x}^i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j^i, \quad s^i = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_j^i - \bar{x}^i)^2}.$$

Normalizando las variables (media cero, desviación estándar 1) de acuerdo a la expresión

$$z_j^i = \frac{x_j^i - \bar{x}^i}{S^i},$$

se obtienen los elementos de la matriz normalizada \mathbb{Z} a partir de la cual es posible obtener la matriz de covarianza \mathbb{M} de las variables normalizadas.

$$\mathbb{M} = \frac{1}{n} \mathbb{Z}' \times \mathbb{Z}. \quad (4.7)$$

Esta es la matriz de características a partir de la cual podemos obtener los valores y vectores propios de la población de entrenamiento:

$$\det(\mathbb{M} - \lambda \mathbb{I}) = 0 \quad \text{Ec. Eigenvalores}, \quad (4.8)$$

$$(\mathbb{M} - \lambda \mathbb{I}) \cdot \mathbf{v}_i = 0 \quad \text{Ec. Eigenvector } \mathbf{v}_i. \quad (4.9)$$

En la Fig. 4.4 mostramos la representación de los eigenvectores seleccionado como más representativos de la apariencia de la población de espermatozoides. El orden de representatividad es de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. La representatividad de cada vector propio \mathbf{v}_i esta dada por su correspondiente eigenvalor λ_i , criterio que nos



Figura 4.4: Representación en el espacio de configuraciones de los eigenvectores más representativos de la población calculados con el método de eigenfaces a partir de la colección de entrenamiento de secciones de espermatozoides supervisada manualmente. Se seleccionan solo los 30 eigenvectores más representativos de acuerdo a los eigenvalores obtenidos.

permite seleccionar solo los 30 vector propio es más significativos, En este punto ya podemos usar el detector PCA para detectar secciones de espermatozoide de la siguiente manera: dada la proyección \mathbf{w} en el espacio de características de una imagen arbitraria de dimensión n , se calcula la distancia de Mahalanobis ⁵[136], entre este vector y cada uno de los vector propios es:

$$dMaha_i = \frac{1}{\sqrt{\lambda_i}} |\boldsymbol{\nu}^i \cdot \mathbf{w}|. \quad (4.10)$$

⁵En nuestro trabajo encontramos que la distancia de Mahalanobis es la que mejor clasifica las secciones de espermatozoides, un análisis comparativo de los efectos de las normas utilizadas en esta clase de aplicaciones se puede encontrar en el trabajo de Moon y Phillips en 2001.

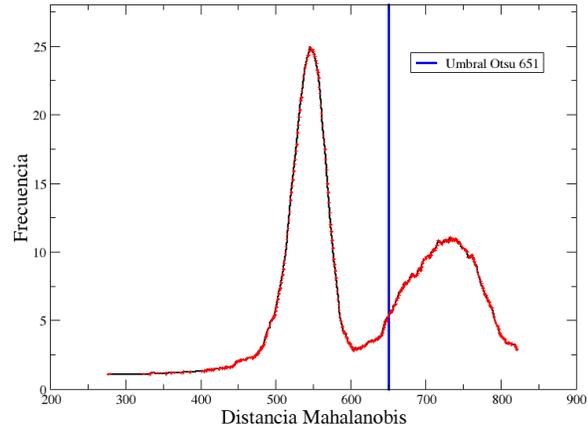


Figura 4.5: Histograma de la distancia de Mahalanobis calculada para una colección de prueba conformada por 2600 elementos que mezclan secciones de células y regiones seleccionadas aleatoriamente de entre las imágenes experimentales (artefactos). La línea azul muestra el valor obtenido mediante el análisis de varianza de Otsu permite discriminar entre elementos de ambas clases.

para determinar si la imagen arbitraria comparte rasgos relevantes con alguno de los vector propios del espacio de características, lo que indicaría que es una sección de célula, es conveniente establecer un criterio automático que permita discriminar cuáles de los elementos de la lista corresponden a secciones de célula y cuáles son artefactos, en nuestro caso, el criterio implementado es el análisis de varianza de Otsu [137] aplicado sobre los histogramas de la distancia mínima entre cada candidato w y el conjunto de eigenvectores v^i . En la Fig.4.5 mostramos los resultados obtenidos con este criterio. La lista de secciones de célula identificadas por PCA conformarán la lista de secciones de célula (LSC), lista que es la entrada de la siguiente etapa donde se utiliza el criterio de inversión de contraste.

4.2.1.4. Detección por inversión de contraste.

Cada elemento de la LSC es un objeto que tiene el tamaño, forma y apariencia de un espermatozoide en foco (brillante) o fuera de foco (oscuro), por tanto, para validar que dicho objeto es un espermatozoide solo resta encontrar el correspondiente estado complementario que implica la inversión de contraste. Para ello, para cada objeto de la lista LSC buscamos su estado complementario en una vecindad ΔZ (definida como el número promedio de cuadros en los que una célula permanece visible), si el patrón de inversión de contraste se completa, el objeto se etiqueta como espermatozoide, se retira de la LSC y pasa a formar parte de la lista de detecciones (LD). En la siguiente sección veremos los resultados obtenidos mediante este procedimiento.

4.2.1.5. Resultados de la segmentación.

Aplicamos la metodología propuesta en secuencias de imágenes experimentales (16385 imágenes) que contiene 8.19 segundos (~ 246 ciclos del piezoeléctrico) de información sobre el nado libre de espermatozoide de erizo marino de la especie *L. Pictus*. Para evaluar el comportamiento del método durante las diferentes etapas que lo constituyen (umbrales multinivel, correlación de máscaras y validación del patrón de inversión de contraste), hemos tomado una secuencia de vídeo de 100 cuadros y manualmente clasificamos los objetos para construir un estándar contra el cual se compare el método. Es muy importante hacer notar que en las primeras dos etapas los valores calculados corresponden a la eficiencia para detectar secciones de células en base a información 2D; pidiéndole al experto que sin usar la información 3D de los cuadros vecinos, indique si la imagen presentada le parece ser una sección de célula. Por supuesto, dado que la información disponible en una máscara 2D aislada es escasa (ver Fig. 4.1); la evaluación del experto tendrá un cierto grado de subjetividad. Por esta razón, es necesario aclarar que la eficiencia de las primeras dos etapas se refiere a la capacidad de detectar **candidatos** a ser células y que su eficiencia solo repercutirá en la cantidad de detecciones o candidatos que ingresan a la última etapa, sin establecer una categoría definitiva para sus elementos. En este contexto, para etiquetar a un conjunto de detecciones como pertenecientes a una célula, es necesario que la

		Predic. Correlación		Predic. EigenFaces	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Manual	Positivo	TP=372	FN=93	TP=1340	FN=325
	Negativo	FP=7	TN=510	FP=0	TN=1443
		SN: 80 %	SP: 98.6 %	SN: 80 %	SP: 100 %
		PPV: 98.2 %	NPV: 84.6 %	PPV: 100 %	NPV: 81.6 %

Cuadro 4.2: Matriz de Confusión para la secuencia de métodos de segmentación propuestos (correlación y eigenfaces). PPV: Valor de predicción positivo, NPV: valor de predicción negativo, SN: Sensitividad, SP: Especificidad.

clasificación del experto se apoye en la información 3D de inversión de contraste, como se hace en la tercera etapa del algoritmo donde el experto tiene acceso a los cuadros vecinos de cada sección de célula y puede evaluar si se presenta la inversión de contraste, característica que le permite determinar la efectividad global del algoritmo. Los resultados se muestran en la Fig. 4.7, donde se indica la eficiencia de cada método relativa a la entrada que recibe de la etapa anterior. En la primera etapa (Umbral multinivel) el porcentaje de secciones de célula correctamente clasificadas (PPV) es comparable con el de artefactos clasificados erróneamente (47 % y 53 % respectivamente) mientras que una fracción de los espermatozoides no se detecta (0.9 %) principalmente porque están fuera del rango de tamaños preestablecido. En la segunda etapa comparamos los resultados generados por el método de correlación de máscaras vs eigenfaces:

- Correlación con máscaras promedio: el porcentaje de PPV (*Positive Predicted Value*) se incrementa a 62 %, mientras que 1-PPV llega a 38 %, no obstante, el porcentaje de secciones de células que se clasifican como artefactos (falsos negativos) alcanza un valor de 5 %, lo que significa que se están perdiendo fracciones de células reales.
- EigenFaces: PPV alcanza un valor de 100 %, de forma que todos los candidatos etiquetados por el detector como sección de célula fueron validados por el experto como secciones de célula, Por otro lado, cuando se le pide al experto que evalúe el desempeño del detector en la colección de imágenes rechazadas, el experto indica que, del total de secciones de célula evaluadas, el 18.4 % fueron mal clasificadas como artefactos (1-NPV). Este desempeño indica que el filtro PCA entrega un número de detecciones claramente superior al método de correlación, lo que significa que para algunas aplicaciones es posible implementar un grado de control adicional sobre la densidad de puntos que se obtienen.

Es en la tercera etapa (validación de inversión de contraste) donde se integra la información 3D y a diferencia de las anteriores podemos determinar cuales elementos de la lista de candidatos efectivamente son células, encontrando que el criterio incrementa hasta el 98 % mientras que la clasificación de artefactos como células decrece hasta el 2 %. No obstante el número de falsos negativos también se incrementa hasta el 15 %, lo que implica que cierta cantidad de información relacionada con fracciones de células que recibe de la segunda etapa se pierde por ser mal clasificada. Esto podría ser un problema, sin embargo hay múltiples detecciones asociadas a la misma célula y podemos combinar los resultados de las listas que hemos construido, interpolando la información perdida. La eficiencia del método en conjunto se puede evaluar por medio de la matriz de confusión que mostramos enseguida en el cuadro 5.1. donde,

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}; \quad \text{Positive predicted value,} \quad (4.11a)$$

$$NPV = \frac{TN}{FN + TN}; \quad \text{Negative predicted value,} \quad (4.11b)$$

$$SN = \frac{TP}{TP + FN}; \quad \text{Sensitivity,} \quad (4.11c)$$

$$SP = \frac{TN}{FP + TN}; \quad \text{Specificity.} \quad (4.11d)$$

Estos resultados muestran que el detector tiene un desempeño confiable para etiquetar células (PPV= 98.2 %), pero falla significativamente para identificar correctamente todas las apariencias posibles de las células del sistema (SN = 80 %), lo que significa que del total de cortes que conforman la secuencia de una sola célula, solo el 80.0 % se detecta. Esto no necesariamente implica que la célula no sea detectada, siempre y cuando las detecciones realizadas incluyan al menos un par que exhiba la inversión de contraste que etiqueta a las células. Por otro lado, como veremos enseguida, el hecho de que el método de inversión de contraste sea tan selectivo para etiquetar objetos como secciones de células tiene importantes consecuencias en términos de la densidad de puntos que se entregarán como entrada del siguiente paso, el rastreo de trayectorias.

4.3. Rastreo de trayectorias.

En la Fig. 4.8 mostramos un ejemplo del tipo de datos que se obtienen después de cada una de las tres etapas del método de segmentación. Observamos que tanto la salida de la segmentación por umbral multinivel como la salida del método de correlación de máscaras tienen alta densidad de detecciones, situación que complica notablemente el rastreo. La primer etapa (umbral multinivel) está restringida a seleccionar objetos con niveles de intensidad diferentes al del fondo y que correspondan con el tamaño de los objetos, pero no tiene capacidad para evaluar la apariencia del objeto, además de que no puede distinguir si el candidato es parte de una sombra o brillo (Fig. 4.8.a). La segunda etapa (correlación de máscaras) toma en cuenta la apariencia del objeto pero no resuelve el problema de objetos embebidos en manchas, situación que no es rara dado que el número de píxeles que componen al objeto es pequeño (16 ± 4). Por otro lado, en esta etapa se eliminan muchos objetos relacionados con alguna de las etapas de la célula que no son muy parecidos a las máscaras (Fig. 4.8.b). En la tercera etapa, la validación del patrón de inversión de contraste demostró ser un criterio muy efectivo para clasificar células y eliminar artefactos. El carácter secuencial de nuestro proceso de segmentación permite construir un detector con muy alta selectividad, lo que reduce dramáticamente la densidad de puntos, preservando la información importante (Fig. 4.8.c).

Tomando la salida de la tercera etapa, implementamos un algoritmo simple de rastreo que como primer paso y en base a criterios de proximidad espacio-tiempo (*Nearest Neighbor*), determina el centro de masa de las multi-detecciones asociadas a una misma célula durante el barrido del piezoeléctrico, enseguida, se calcula el desplazamiento mínimo entre cada par de puntos en la colección de centros de masa recién creada y se determinan los desplazamientos probables en las trayectorias, privilegiando aquellos que se encuentran temporalmente más próximos y rechazando aquellos que son físicamente incompatibles con la velocidad reportada para estas células [38, 105]. El algoritmo incluye algunas funciones de costo para eliminar partículas inmóviles (espermatozoides muertos), trayectorias de poca longitud que corresponden a células dañadas que se agitan sin nadar o que no permanecieron (salieron o entraron) suficiente tiempo dentro del volumen de registro (Fig. 4.8.d). Una situación inesperada que pone una interesante prueba para el detector ocurre cuando la metodología experimental incluye dos o más fuentes de luz simultáneas, como en nuestro caso ocurre cuando una fuente de luz ultravioleta se activa para liberar un atrayente químico en el campo de observación, evento que aparece en un segmento de la secuencia de imágenes como un círculo luminoso centrado en el campo de observación. En estas condiciones, la salida de la segmentación multinivel incluye una gran cantidad de artefactos asociados a regiones brillantes, no obstante, la correlación con máscaras maneja adecuadamente esta condición y filtra la gran mayoría de estos artefactos [138].

4.3.1. Precisión de las trayectorias automáticas.

Evaluamos la precisión de las trayectorias rastreadas comparando un conjunto de 20 trayectorias rastreadas manualmente contra las correspondientes obtenidas automáticamente. Dado un punto P_1 de una trayectoria \mathcal{T}_m obtenida manualmente, se calcula su distancia al correspondiente punto p_1 de su contra-parte automática \mathcal{T}_a (el punto p_1 se identifica por ser el punto más espacio-temporalmente referido al punto P_1). El resultado para todos los pares de puntos se promedia y se obtiene el error para la trayectoria \mathcal{T} . Repitiendo el procedimiento descrito para todos los puntos de 20 trayectorias, hemos obtenidos la curva de error que se muestra en la Fig. 4.9.a. Puede observarse que el

error está acotado a $25 \mu m$, considerando que el tamaño promedio de un espermatozoide es de $4 \mu m$, este valor indica que la precisión obtenida automáticamente es una excelente aproximación a los resultados manuales. Para realizar el procesamiento completo de datos hasta obtener las trayectorias, hemos implementado una interfaz gráfica multi-plataforma y multi-proceso que permite a un usuario realizar la segmentación y rastreo de los microorganismos a partir de las imágenes originales (Fig. 4.9b). Finalmente, en la Fig. 4.10 mostramos la salida final de nuestro algoritmo aplicado al nado simultáneo de espermatozoides de erizo marino de la especie *L. Pictus*, nuestros resultados coinciden cuantitativamente con las trayectorias individuales mostradas por Creenshaw para microorganismos semejantes [105].

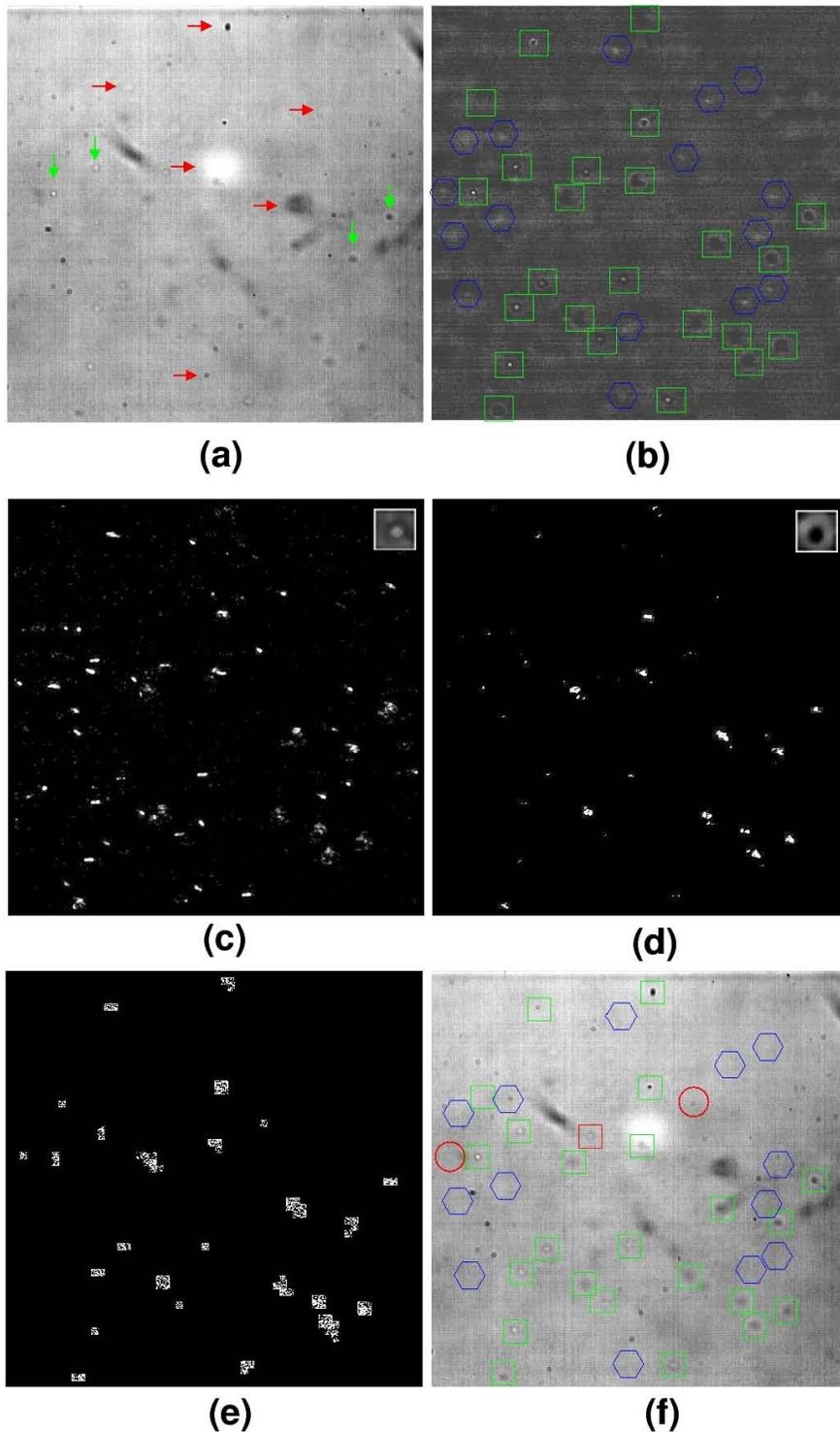


Figura 4.6: Etapas de la segmentación de células. **(a)** Imagen experimental que muestra algunos ejemplos de las tres clases principales de objetos: artefactos brillantes u oscuros (flechas rojas) y células en diferentes etapas del enfoque (flechas verdes). **(b)** Ejemplo de las imágenes de salida del proceso de pre-procesamiento para eliminar el fondo y realzar los objetos. Clasificamos manualmente los objetos de esta imagen etiquetando los espermatozoides reales (cuadros verdes) y los artefactos (hexágonos azules). **(c)** y **(d)** muestran el resultado de la correlación entre la secuencia de imágenes que rodean a la imagen del inciso anterior (ΔZ) y las máscaras brillante y oscura. **(e)** Imagen formada por aquellos objetos que tienen una alta correlación con las dos máscaras en la secuencia, tal que exhiben la inversión de contraste que etiqueta a las células. **(f)** Resultados finales de la segmentación: los cuadros verdes corresponden a detecciones positivas de células (verdaderos positivos), hexágonos azules para los artefactos correctamente detectados (verdaderos negativos), círculos rojos para las células falsas detectadas (falsos positivos) y cuadros rojos para las células reales que no se detectaron (falsos negativos).

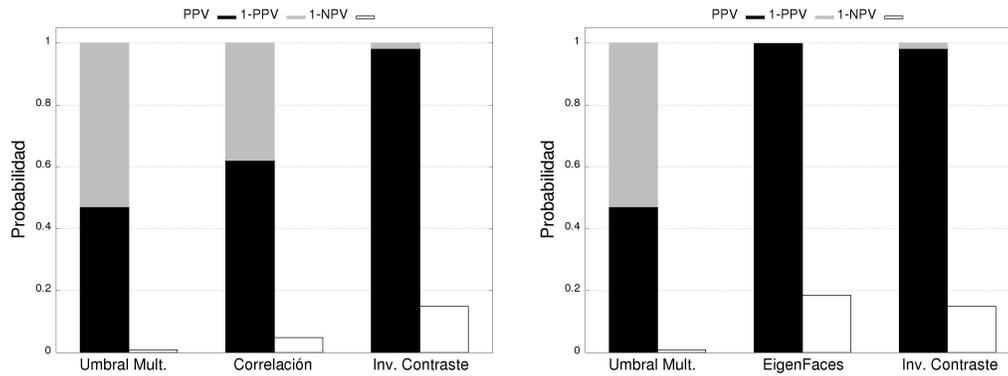


Figura 4.7: Comparación de la eficiencia de las tres etapas secuenciales para los dos métodos de segmentación implementados. Es muy importante hacer notar que en las primeras dos etapas el experto sólo está usando información 2D, sin acceder a la información de inversión de contraste, por lo que para estas etapas, el experto solo evalúa si concuerda con el detector para considerar que la imagen evaluada es una sección de célula. La confirmación de que cada sección corresponde realmente a una célula la realiza el usuario hasta que observa la inversión de contraste, tarea que realiza en la tercera etapa a partir de información 3D. La etiqueta **PPV** denota la probabilidad de una clasificación correcta, **1-PPV** denota la probabilidad de error en la clasificación de artefactos y **1-NPV** especifica la cantidad de detecciones positivas que se pierden.

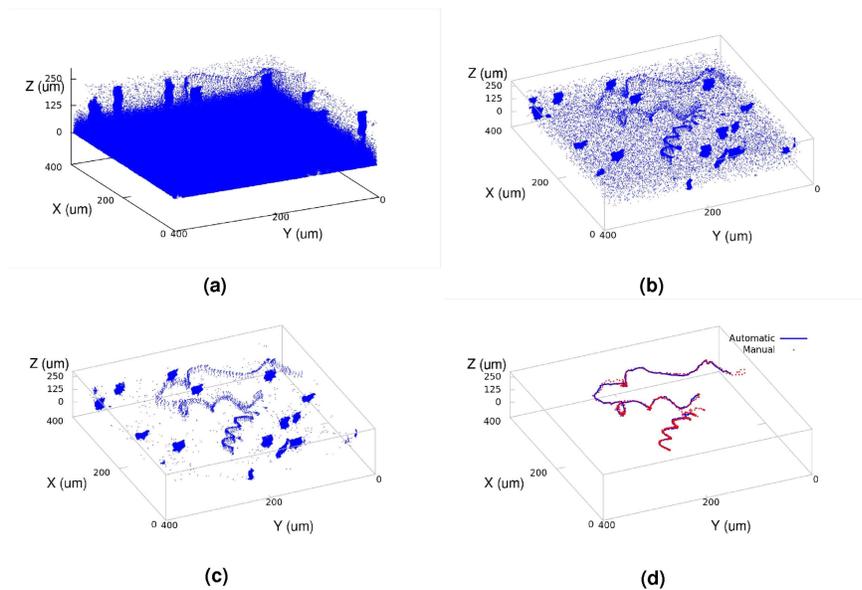


Figura 4.8: Secciones de células detectadas aplicando el algoritmo secuencial de segmentación en un experimento típico de nado 3D de espermatozoides de erizo marino de la especie *L.Pictus* ($4 \mu\text{m}$ de tamaño y $250 \mu\text{m/s}$ de velocidad). La salida de la etapa de segmentación por umbrales multinivel (a), es la entrada de la etapa de validación por criterios de correlación con máscaras promedio (b). Finalmente, la salida de esta etapa ingresa a la validación por inversión de contraste (c). En la parte (d) se muestra una comparación entre trayectoria obtenida manualmente y la calculada automáticamente.

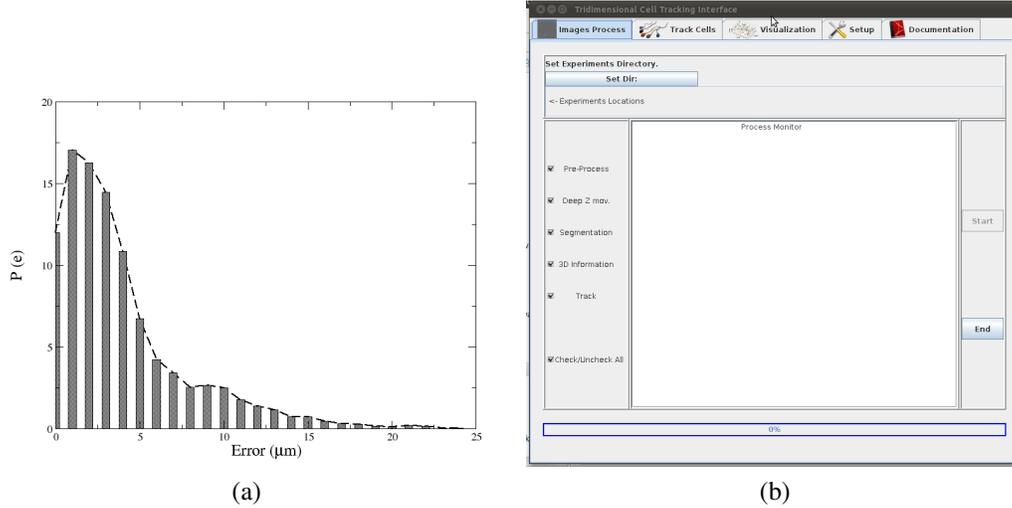


Figura 4.9: (a) Histograma que muestra el error de 20 trayectorias obtenidas automáticamente relativo a las correspondientes rastreadas manualmente. La curva expresa la probabilidad (en porcentaje) de obtener un error dada una distancia arbitraria. El valor medio obtenido para el error corresponde a $5 \mu\text{m}$. (b) Interfase gráfica diseñada para el rastreo multi-partícula de microorganismos al nado libre.

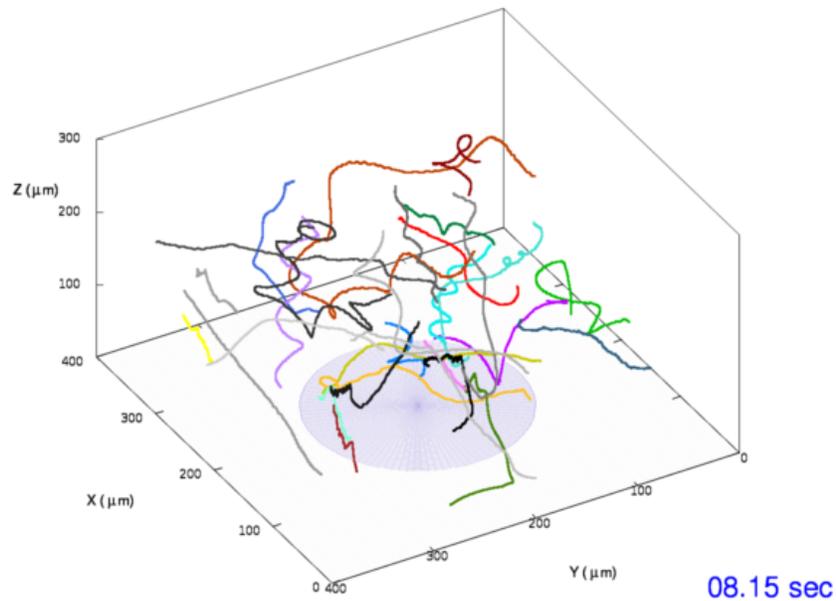


Figura 4.10: Trayectorias reconstruidas usando nuestro algoritmo de segmentación multi-partícula aplicado al nado simultáneo de espermatozoides de erizo marino *L. Pictus*. Nuestros resultados coinciden de forma cuantitativa con los publicados para trayectorias individuales descritos por Crenshaw [105].

Análisis de Trayectorias.

En colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Alberto Darszon y la estudiante de maestría en Ciencias Biológicas Tatiana Luna, pertenecientes al Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, hemos aplicado nuestro algoritmo de rastreo para obtener información que permita caracterizar de forma estadística el nado tridimensional de dos especies de espermatozoides de erizo marino: *L. Pictus* y *S. Purpuratus*. Hemos diseñado una serie de experimentos para determinar el efecto que diferentes ambientes químicos ejercen sobre el comportamiento de los espermatozoides al nado libre. Entre las condiciones analizadas se incluyen aquellas que reproducen (en lo posible) las condiciones en las que los espermatozoides nadan en su medio silvestre además de condiciones reportadas como quimiotácticas¹ en el caso bidimensional [36]. Específicamente, las condiciones que hemos analizado son las siguientes:

- A. 500 μl de agua de mar artificial (ASW)² (ASW).
- B. 500 μl de agua de ASW, 0,1 μm de Speract enjaulado (CS).
- C. 500 μl agua de mar sin calcio (ASW-free- Ca^{2+}), CS 0,1 μm .
- D. 500 μl ASW-free- Ca^{2+} , sin CS.

En el cuadro 5.1 mostramos el número de realizaciones realizadas para cada condición experimental.

		L. Pictus				S. Purpuratus			
		UV	CS	UV+CS	\emptyset	UV	CS	UV+CS	\emptyset
Medio	ASW	23	8	14	9	8	0	15	0
	ASW free Ca^{2+}	20	0	11	8	14	0	9	0

Cuadro 5.1: Condiciones experimentales analizadas para explorar los factores que modifican los patrones de nado del espermatozoide. Las entradas en la matriz denotan el número de experimentos realizados. Cada experimento tiene 4 trayectorias en promedio. En el caso de *L. Pictus* existen dos series de experimentos adicionales: ASW + CS + 1s UV, ASW + CS + 1.5s UV, con 11 realizaciones cada una de ellas.

Dentro de estos experimentos, uno de los factores de más relevancia en los efectos del ambiente químico es el speract, un quimiotrayante artificial que ha probado ser capaz de inducir efectos sobre los espermatozoides semejantes a los que un ovulo produciría. Para aprovecharlo, hemos adaptado en el sistema experimental la posibilidad de liberar speract en una región y tiempo específico dentro de la zona de observación. Haciendo un análogo, controlar este evento es como hacer “aparecer” un ovulo en el centro del campo de observación en un instante de tiempo preciso y mientras tanto se registra la reacción de los espermatozoides. Para lograr hacerlo se diluye una preparación de speract atenuado dentro

¹La quimiotaxis, quimiotaxia o quimiotaxismo es un mecanismo empleado por bacterias y otras células de organismos uni o multicelulares para dirigir sus movimientos de acuerdo a la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente. Permite a las bacterias dirigir sus movimientos hacia direcciones específicas para acercarse a moléculas alimentarias como la glucosa, o alejarse de venenos como el fenol. En los organismos multi-celulares es fundamental tanto en las fases tempranas del desarrollo (por ejemplo en el movimiento de los espermatozoides hacia el óvulo) como en las fases más tardías como la migración de neuronas o linfocitos.

²Artificial sea water (ASW), 950/1000 mOsm, contiene (mM): 486 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl₂, 26 MgCl₂, 30 MgSO₄, 2.5 NaHCO₃, 10 HEPES, 1 EDTA (pH 8.0) para *S. purpuratus*, con *L. pictus*: ASW (pH 7.4).



del medio donde el espermatozoide se desplaza, para activar este esperact es necesario disociarlo de su molécula atenuadora y para lograrlo se expone el medio a un haz de luz UV enfocado mediante una sonda de fibra óptica. Experimentalmente hemos determinado la geometría del gradiente de haz de luz mismo que mostramos en la Fig. 5.1.

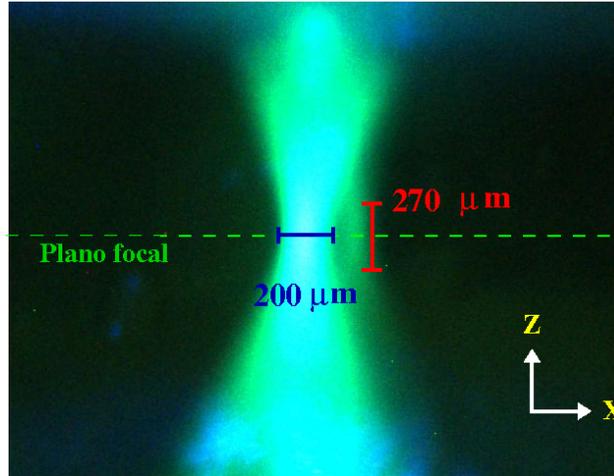


Figura 5.1: Imagen experimental que muestra el gradiente de luz UV que activa el speract. Dada su geometría, cuando el plano focal está fijo, el haz de luz activa uniformemente el quimio-atrayente en una región cilíndrica de $100 \mu\text{m}$ de radio y $270 \mu\text{m}$ de altura con centro en la posición Z_f del plano focal. Cuando el piezoeléctrico oscila en la dirección z , el plano focal desplaza el haz de luz a lo largo de $220 \mu\text{m}$ en z , de forma que, el gradiente resultante de speract dentro de la muestra tiene una forma cilíndrica uniforme en z y radio $100 \mu\text{m}$.

En este capítulo describiremos los resultados obtenidos a partir de una serie de condiciones experimentales; en la primera parte determinamos las propiedades estadísticas de la cinética descrita por los gametos al nado libre en un espacio tridimensional. En la segunda, describimos de forma cuantitativa los efectos que un gradiente de quimiotrayente induce sobre el patrón de nado de la población y contrastamos estos efectos contra un conjunto de condiciones control. En la tercera parte, analizamos un par de parámetros orientados identificar y cuantificar la quimiotaxis descrita por una célula cuando responde a la exposición a un estímulo quimiotáctico específico.

5.1. Caracterización estadísticas del nado tridimensional.

En base al conjunto de datos descritos en el cuadro 5.1, aplicamos el algoritmo de segmentación y rastreo descrito en [26], obteniendo un conjunto de trayectorias tridimensionales asociadas a cada uno de los ambientes químicos ya descritos. Para caracterizar geoméricamente cada trayectoria se utiliza el procedimiento descrito por Crenshaw donde, dados 4 puntos en un segmento de trayectoria tridimensional y usando las formulas de Frenet-Serret descritas en la Fig. 5.2), es posible obtener tres vectores normales entre sí asociados a un punto de la trayectoria. [106, 139].

Bajo estas definiciones es posible calcular tres parámetros que caracterizan cada segmento de trayectoria en el espacio:

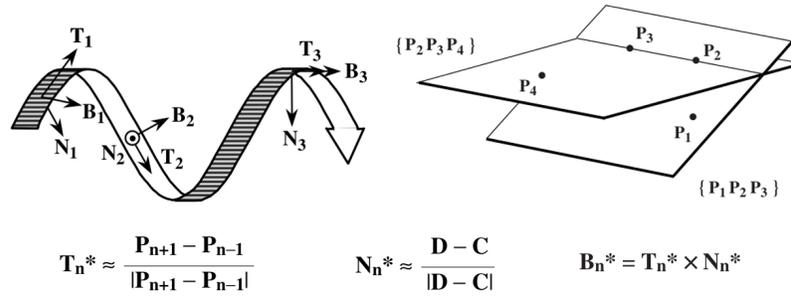


Figura 5.2: Formulas discretas de Frenet-Serret para definir el vector tangencial T_n , normal N_n y bi-normal B_n a partir de cuatro puntos consecutivos en una trayectoria arbitraria en tres dimensiones [106].

curvatura κ , torsión τ velocidad s :

$$s_{(n)} = \frac{|(P_n - P_{n-1})| + |(P_{n+1} - P_n)| + |(P_{n+2} - P_{n+1})|}{3 \Delta t}, \quad (5.1)$$

$$\kappa_{(n)} \approx \frac{\cos^{-1}(T_{n+1} \cdot T_n)}{|(P_{n+1} - P_n)|}, \quad (5.2)$$

$$\tau_{(n)} \approx \frac{\cos^{-1}(B_{n+1} \cdot B_n)}{|(P_{n+1} - P_n)|}. \quad (5.3)$$

Dada una trayectoria, estos parámetros especifican sus propiedades geométricas a lo largo del tiempo. Conjuntando los resultados para un grupo de trayectorias se obtiene una colección de datos de donde se construyen las distribuciones de probabilidad que caracterizan los patrones de nado. Repitiendo este procedimiento en diferentes ambientes químicos es posible determinar y cuantificar la forma en que la presencia o ausencia de componentes específicos modifican la distribución de probabilidad asociada a cada uno de los parámetros de nado (curvatura, torsión y velocidad). En la gráfica de la Fig. 5.3 mostramos el histograma correspondiente a la velocidad de la población de espermatozoides en diferentes ambientes químicos. Las tres curvas presentes en cada gráfica corresponden tres diferentes periodos de tiempo que se presentan en un mismo experimento: **antes** del flash de UV, que comprende 2 segundos, **durante** el flash que va del segundo 2 al 4 y **después** del flash que comprende del segundo 4 al 8.19. El análogo para la curvatura y la torsión se muestran en las gráficas de las Fig. 5.4 y Fig. 5.5, respectivamente.

5.2. Índice de quimiotaxis en población.

En las condiciones experimentales adecuadas es posible lograr que una célula expuesta a un estímulo químico específico exhiba una re-orientación en su movimiento para lograr orientarse acorde el gradiente de *speract* liberado por un impulso luminoso de luz UV. A esta reacción se le conoce como quimiotaxis y se ha cuantificado muy detalladamente para el caso 2D [19, 36], sin embargo no existe información sobre la forma en que la interacción con la superficie modifica la reacción quimiotáctica. En este contexto nuestro primer objetivo para procesar la información adquirida con nuestro sistema sobre el nado 3D de los espermatozoides es construir un criterio que permita identificar situaciones donde la población de células exhibe una respuesta al estímulo inducido, en este sentido, proponemos un parámetro que mide la agregación o acumulación celular en el espacio y tiempo $r_c(t)$. El grado de acumulación de las células permite identificar la respuesta de la población ante la liberación de *Speract*, estableciendo algunas diferencias cuantitativas. Para calcular un parámetro de agregación se usa la información del movimiento descrito por las trayectorias presentes en el campo de observación. Para definir este parámetro considérese un volumen de dimensión $L^3 \mu\text{m}^3$, dentro del cual, en cierto instante de tiempo t , existen $N(t)$ células en movimiento. Cada una de las células $i \in N$ posee

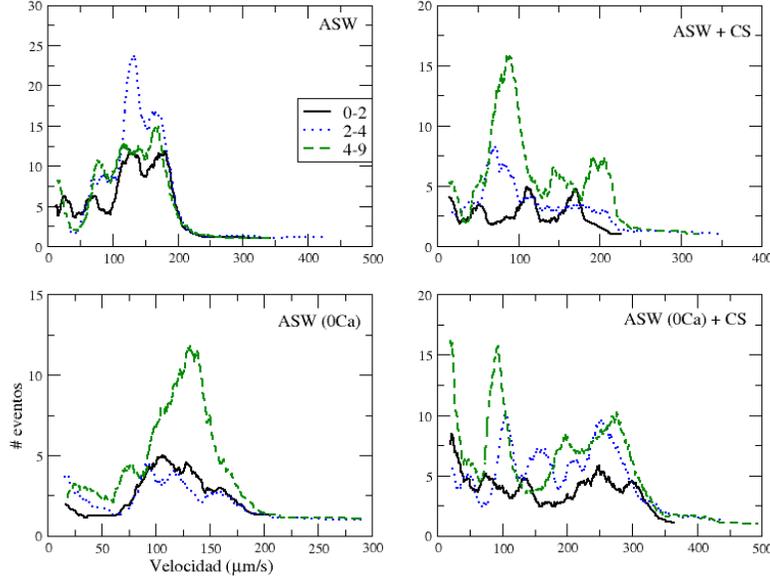


Figura 5.3: Distribución de probabilidad asociada a la **velocidad** s (Ec. 5.1) descrita por un conjunto de trayectorias correspondientes a células de *L. Pictus* en 4 diferentes ambientes químicos. Cada curva corresponde a un momento del experimento, **antes** (0 a 2 seg.), **durante** (2 a 4 seg) y **después** (4 a 8 seg) del flash de luz UV que genera el gradiente de speract.

una posición específica denotada por $r_i(t)$. Dadas estas condiciones, definimos el parámetro de agregación R_c como la distancia promedio entre células al tiempo t , (Ec. 5.4).

$$R_c(t) = \frac{2}{N(N-1)} \sum_{i,j}^N \|\vec{r}_i(t) - \vec{r}_j(t)\|. \quad (5.4)$$

donde $\sum_{i,j}^N$ denota la suma de las distancias entre todos los pares S_i, S_j de espermatozoides. La derivada temporal de $r_c(t)$ proporciona la tendencia que el grupo de células tiene al tiempo t :

$$\begin{aligned} \dot{r}_c(t) > 0 & \quad \text{Las células se acumulan,} \\ \dot{r}_c(t) = 0 & \quad \text{No hay cambios,} \\ \dot{r}_c(t) < 0 & \quad \text{Las células se separan.} \end{aligned}$$

En principio, aunque r_c pierde la información de las reacciones individuales, permite distinguir en forma cuantitativa entre situaciones donde la población de células redirigen su movimiento para acumularse entorno a un centro (quimiotaxis), se alejan entre sí, o mantienen una distribución uniforme. Además, su tendencia es independiente de las condiciones iniciales del grupo, del número de células y no presupone ninguna forma funcional para el gradiente de speract. Usando este parámetro analizamos las situaciones descritas en el cuadro 5.1. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección.

5.2.1. *Pictus*.

En la Fig. 5.6 mostramos el cálculo de $R_c(t)$ para los casos A) *ASW+UV*, B) *ASW+CS+UV* y C) *ASW Free Ca²⁺*. En cada etapa del experimento (observación/flash/respuesta) se realiza un ajuste lineal para obtener la tendencia del

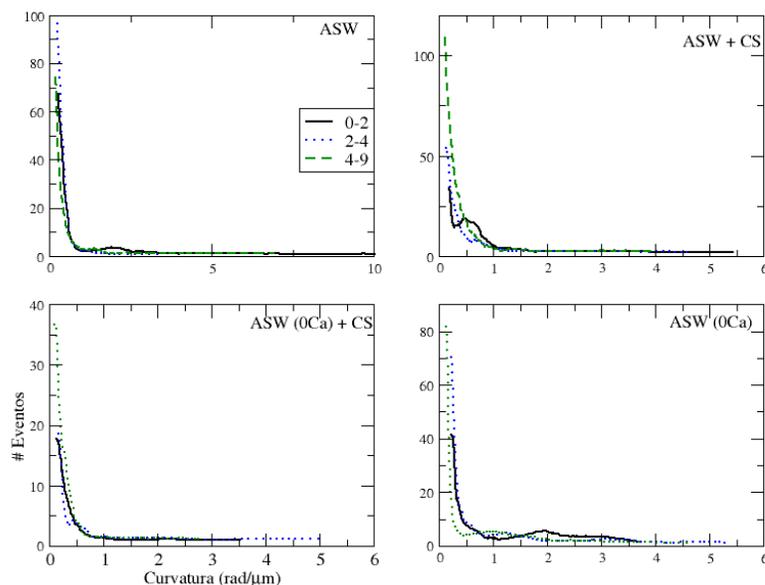


Figura 5.4: Distribución de probabilidad asociada a la **curvatura** (Ec. 5.2) calculada a partir de 50 trayectorias de *L. Pictus* en diferentes condiciones químicas. Cada curva corresponde a un momento del experimento, **antes** (0-2 seg.), **durante** (2-4 seg.) y **después** (4-8.19 seg.) del flash de luz UV que genera el gradiente de speract.

grupo (\bar{r}_c).

En la condición control **A** las células pasan por diferentes comportamientos: en la etapa 1 presentan una ligera tendencia a agruparse, sin embargo, cuando se activa el flash (etapa 2) los espermatozoides cambian su tendencia y se alejan entre sí, incrementando su velocidad³, finalmente, en la etapa de reacción (etapa 3) tienden a distribuirse homogéneamente en el campo de observación. El comportamiento global muestra que el grupo se mantiene distribuido homogéneamente en el espacio ($\bar{r}_c \sim cte$). Las primeras dos etapas de la condición **B**, (observación/flash) las células siguen una tendencia similar a la del caso A, sin embargo, cuando el speract se libera, las células reaccionan incrementando su velocidad y alejándose, sin embargo, en la etapa 3 (reacción) cambian dramáticamente su tendencia y realizan una acumulación efectiva ($\bar{r}_c < 0$) que corresponde a una respuesta quimiotáctica. Finalmente, en la condición **C**, las dos primera etapas tienen la misma tendencia de los casos A y B, pero después de la liberación de speract, las células reaccionan (etapa 3) incrementando su velocidad y alejándose, sin cambiar en ningún momento su tendencia. Para determinar los efectos que cada componente del ambiente químico induce en el comportamiento de las células, normalizamos el parámetro $R_c(t)$ usando el correspondiente parámetro pero calculado en una condición control. Las series de experimentos calculadas están descritas en la tabla 5.1. El resultado se muestra en la Fig. 5.7.

5.2.2. Purpuratus.

En la Fig. 5.8 mostramos el cálculo de $r_c(t)$ para los casos **A**, **B** y **C** correspondiente a 90 trayectorias de *S. Purpuratus* en las tres diferentes etapas del experimento (30 cada una). En cada etapa realizamos el ajuste lineal para obtener el comportamiento promedio \bar{r}_c . Puede observarse que la tendencia en los casos **A**, **B** y **C** es muy similar a las descritas en el caso A y B de *L. Pictus*, sin embargo ningún caso exhibe la acumulación de células que describe el caso B de *L. Pictus*. Experimentalmente hemos determinado que la geometría del gradiente de luz UV (ver Fig. 5.1)

³La amplitud en las fluctuaciones alrededor de la tendencia se relaciona con el radio de expansión o compresión promedio del grupo y la frecuencia de estas oscilaciones indica el tiempo empleado para realizar cada fluctuación.

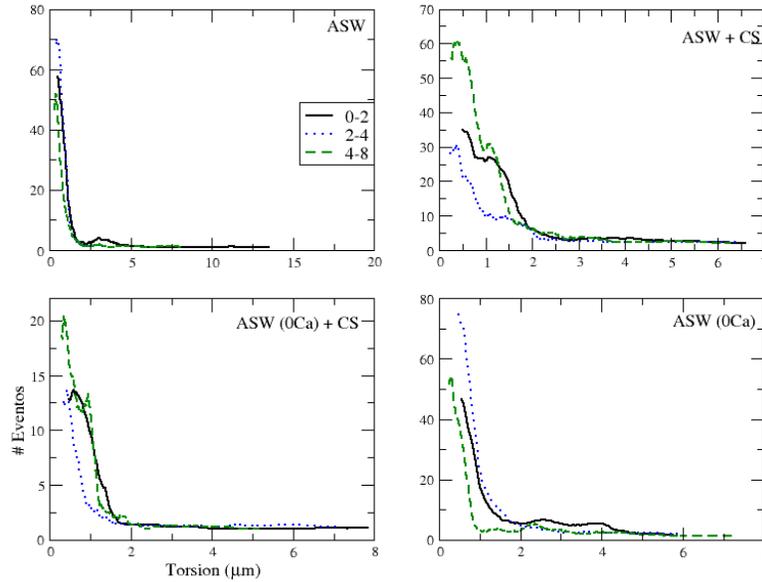


Figura 5.5: Distribución de probabilidad asociada a la **torsión** (Ec. 5.3) calculada partir de 50 trayectorias de *L. Pictus* en diferentes condiciones químicas. Cada curva corresponde a un momento del experimento, **antes** (0 a 2 seg.), **durante** (2 a 4 seg.) y **después** (4 a 8.19 seg.) del flash de luz UV que genera el gradiente de speract.

combinada con el movimiento del piezoeléctrico, permite afirmar que el gradiente de speract posee simetría angular y axial, de forma que la reacción de una célula al estímulo químico estaría modulada únicamente por la distancia de esta célula al centro del gradiente que sufre la célula dentro de la muestra depende solamente de su coordenada (x, y) . Bajo esta premisa, es razonable proponer que el grado de agregación del grupo r_c dependerá únicamente de la distancia bidimensional entre espermatozoides (Fig. 5.8).

5.2.3. Análisis estadístico de densidad.

Hemos analizado la variabilidad que exhibe la densidad de partículas en diferentes ambientes químicos por medio del criterio de similitud $\chi^2(t)$. El procedimiento realizado es el siguiente: supongamos que en cierto instante de tiempo t , existen $N(t)$ células transitando dentro del micro-volumen observado, supongamos también tres regiones bidimensionales con forma anular, concéntricas al origen del gradiente y denotadas por R_1, R_2 y R_3 . En estas condiciones, si la premisa de homogeneidad es válida, el número de células $n_i(t)$ que transitan por encima de la región R_i , debe ser proporcional al tamaño de esta área. A esta premisa se le conoce como hipótesis nula y es posible cuantificar su veracidad en base a las medidas experimentales de que disponemos. Para conseguirlo, de nuestros datos calculamos $N(t)$, las correspondientes fracciones $n_i(t)$ y usando el análisis $\chi^2(t)$ cuantificamos la veracidad de la hipótesis nula. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.5.9, donde mostramos el comportamiento del parámetro $\chi_i^2(t)$ para cada una de las tres regiones en los diferentes ambientes químicos ya descritos en la tabla 5.1.

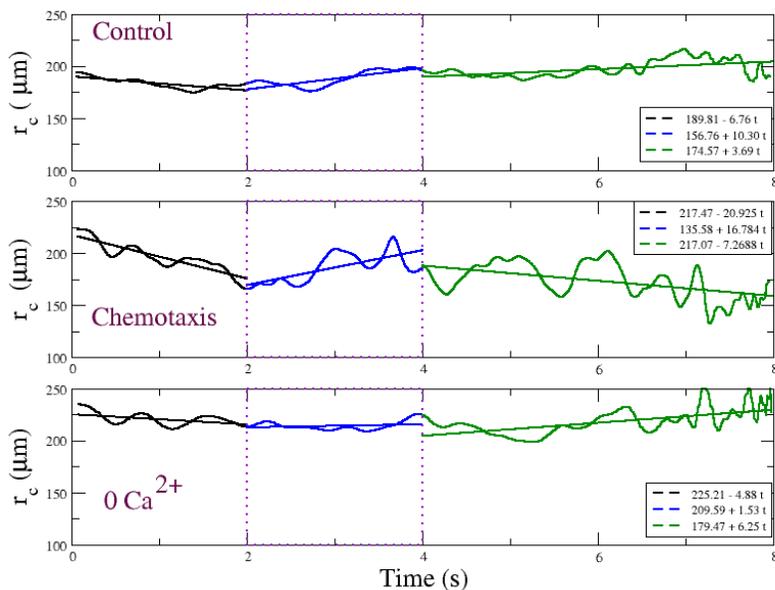


Figura 5.6: Evolución temporal del parámetro de agregación $r_c(t)$ calculado para 90 células de *L. Pictus* nadando en las condiciones descritas en A) *AS W + UV*, B) *AS W + CS + UV* y C) *AS W Free Ca²⁺ 30* en cada caso. Para cada etapa del experimento se ajusta la recta promedio \bar{r}_c para obtener la tendencia del grupo (expandirse, comprimirse o mantenerse homogéneo).

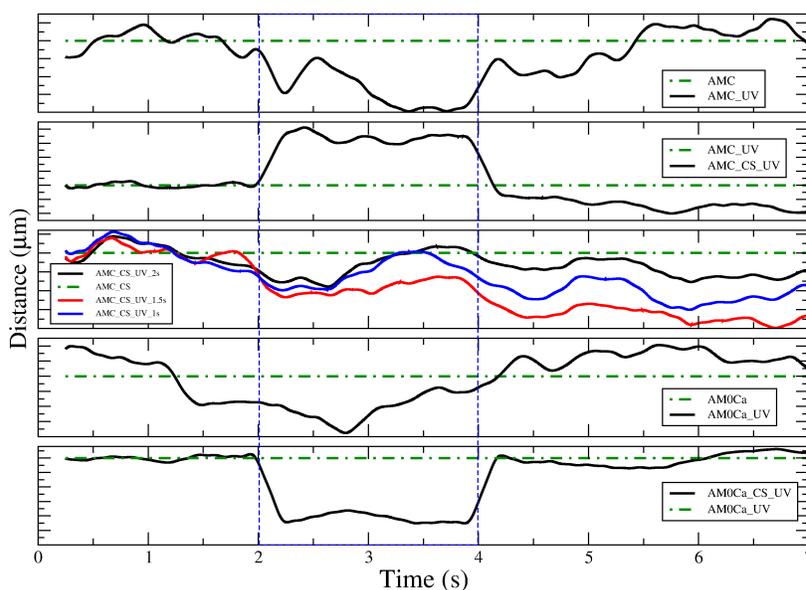


Figura 5.7: Evolución temporal del parámetro de agregación $R_c(t)$ calculado de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 5.1. En cada caso, el parámetro de agregación está normalizado por la correspondiente condición experimental.

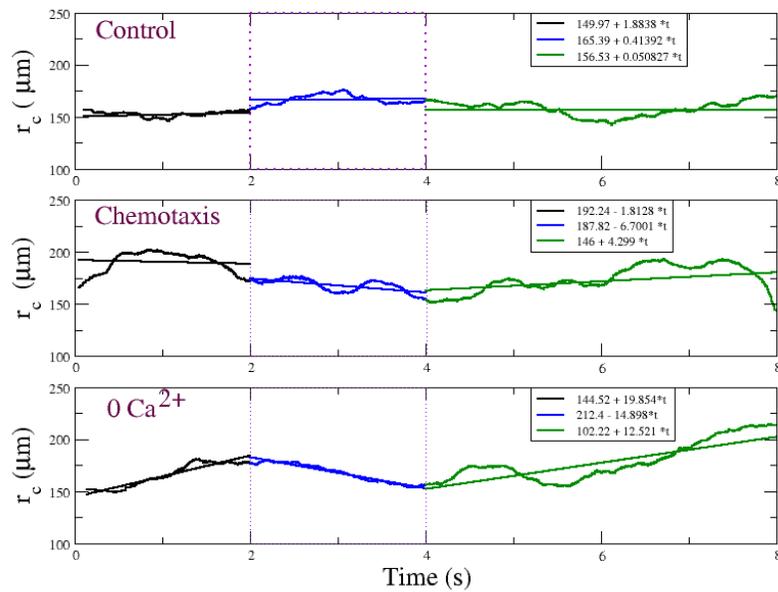


Figura 5.8: Evolución temporal del parámetro de agregación $r_c(t)$ calculado para 90 células de *S. Purpuratus* nadando en las condiciones descritas en A, B y C. Para cada etapa del experimento se calcula la recta promedio \bar{r}_c , la pendiente de esta recta indica si la tendencia del grupo es expandirse o comprimirse.

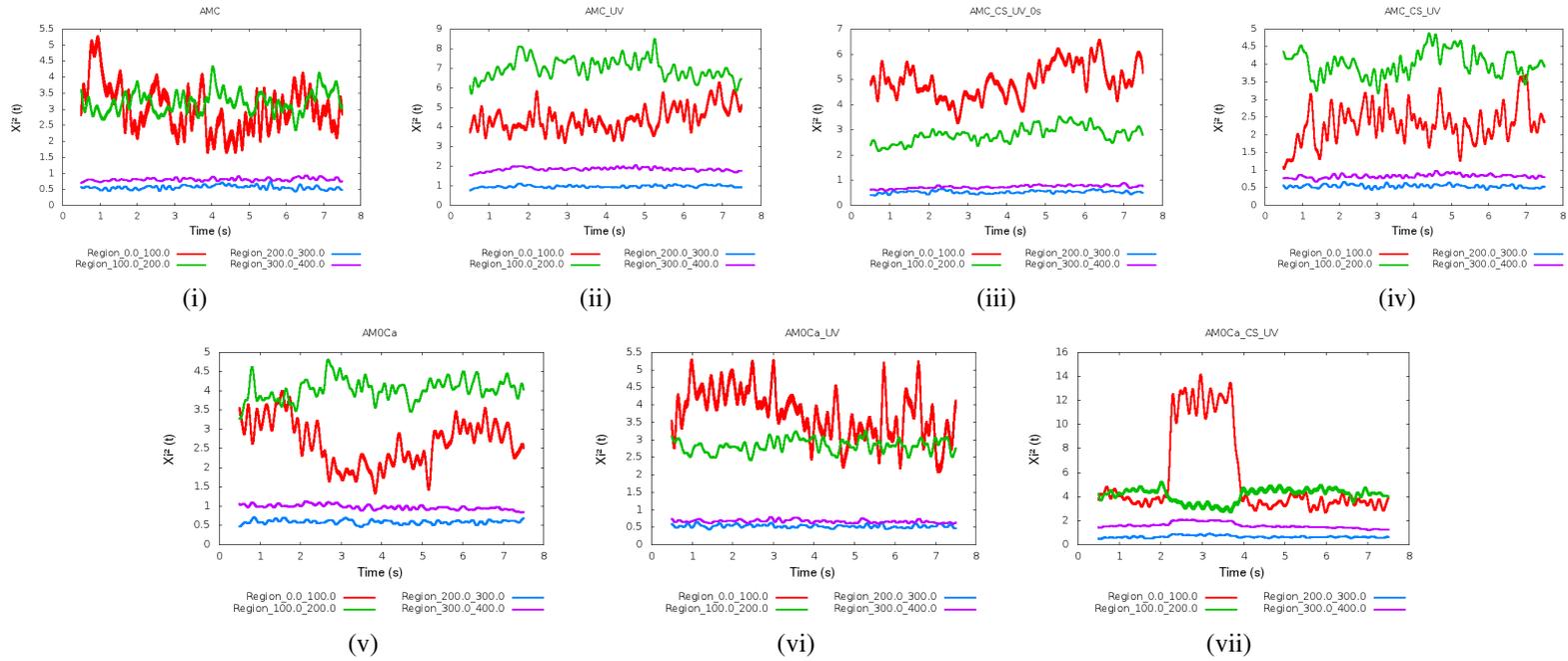


Figura 5.9: Variabilidad estadística de la densidad de partículas usando el criterio de homogeneidad $\chi^2(t)$. El parámetro se calcula usando la información de las densidades relativas de cada región respecto a la densidad promedio, en función del tiempo $r_i(t)$. Las condiciones experimentales analizadas corresponden a las series experimentales descritas en la tabla 5.1: i) *AMC*, ii) *AMC + UV*, iii) *AMC + CS + UV0s*, iv) *AMC + CS + UV*, v) *AM0Ca*, vi) *AM0Ca + UV*, vii) *AM0Ca + CS + UV*.

Discusión y conclusiones.

6.1. Evaluación General del Sistema.

En este proyecto presentamos un sistema automático para rastreo simultáneo de partículas microscópicas aplicado en la adquisición y análisis de desplazamientos tridimensionales de espermatozoides de erizo marino, células flageladas que se desplazan con alta velocidad ($\sim 250 \mu\text{m}/\text{s}$) dentro de un micro-volumen de aproximadamente $400 \mu\text{m}^2$ de área y $250 \mu\text{m}$ en profundidad. Dentro de nuestro conocimiento, este es el primer sistema integral que, basado en microscopía óptica, es capaz de adquirir, procesar y analizar de forma automática los desplazamientos tridimensionales de partículas que se desplazan en esta escala espacio-temporal. La flexibilidad de nuestro sistema hace que sea aplicable en una importante variedad de condiciones experimentales entre las que se incluyen condiciones de iluminación múltiple y rastreo de partículas inanimadas, por ejemplo rastreo de trazadores en dinámica de fluidos, aplicaciones en rastreo de células humanas como espermatozoides o linfocitos, etc. A lo largo de este documento discutimos las etapas de construcción del sistema experimental, adquisición de datos experimentales, procesamiento de imágenes, obtención de trayectorias 3D y finalmente, caracterización estadística de los parámetros geométricos asociados al nado. Finalizaremos este documento con una breve descripción del impacto que nuestro sistema tiene en el estado del arte en sistemas de rastreo de partículas microscópicas y mencionaremos algunas de las repercusiones que los datos generados tienen en el campo de fisiología celular.

6.1.1. Sistema experimental

El estado del arte en sistemas experimentales para rastreo de partículas microscópicas, puede dividirse en dos clases generales:

1. Los sistemas donde cada plano focal corresponde a una profundidad específica y la información asociada a una trayectoria 3D está contenida en un conjunto de planos focales: en esta clase, las lentes de los microscopios magnifican un campo de observación que incluye los objetos de interés y al mismo tiempo una o varias cámaras registran secuencias de planos focales que contienen un corte bidimensional del patrón de difracción 3D generado por la interacción de la luz proveniente de una fuente y la partícula observada.
2. Los sistemas de reconstrucción de información 3D a partir de la información registrada en imágenes bidimensionales: dentro de esta clase se encuentran sistemas que utilizan la información del patrón de difracción para reconstruir la posición 3D de varias partículas y los sistemas como los métodos basados en holografía, que utilizando el patrón de interferencia producido por la difracción de la luz en las partículas en un micro-volumen reconstruyen cualquier plano focal dentro del espacio tridimensional que contiene la muestra.

En la primer clase, ubicamos métodos como el implementado por H. Berg en 1971 [6] para rastreo individual de bacterias *E.Coli*, donde, utilizando platinas controladas por motores acoplados a un sistema de autoenfoque y localización bidimensional, trataba de mantener centrada y en foco la bacteria reajustando las coordenadas x, y, z de las platinas y el tornillo micrométrico de enfoque del microscopio. Posteriormente, colectaba la información registrada de los movimientos ejecutados por los motores y aplicando una reflexión espacial, obtenía las coordenadas espacio-tiempo de los desplazamientos descritos por la bacteria. Este sistema fue el primero en plantear y resolver el problema de analizar la dinámica 3D asociada a un microorganismo al nado libre, abriendo el campo a una gran cantidad de aplicaciones



donde la resolución temporal asociada a la respuesta de los motores es suficiente. Entre sus desventajas encontramos que está limitado al rastreo de una partícula por realización lo que complica el análisis estadístico del nado e impide estudiar condiciones experimentales que impliquen el análisis de comportamientos colectivos. Adicionalmente, este sistema no es capaz de seguir partículas cuya velocidad de desplazamiento esté por encima de la resolución temporal asociada a la reacción de los motores de la platina.

En la misma categoría, el sistema propuesto por Creenshaw en 1991 [105] utiliza un sistema compuesto por dos microscopios ópticos con los ejes ópticos perpendiculares entre sí y a cada uno se le acopla una cámara capaz de adquirir 500 cuadros por segundo. La posición de los planos focales de ambos microscopios se configuran para que coincidan en el centro de la muestra analizada, de esta manera se consigue registrar la información de dos perspectivas del mismo objeto, lo que permite determinar su posición en el espacio y tiempo de forma precisa. Las principales desventajas de este método son su alta sensibilidad al ruido y su pobre desempeño en el rastreo simultáneo de partículas, lo que lo vuelve inadecuado para registrar poblaciones de células estadísticamente significativas.

En cuanto a la segunda clase, una aplicación representativa es la que realizaron Wu *et al* [15, 108] en el rastreo simultáneo de bacterias de *E. Coli* donde, a partir de los patrones de refracción de varias bacterias registrados en una imagen bidimensional y en base a un algoritmo de proyección del centro de gravedad del patrón de difracción 3D, puede hacer una estimación de la posición tridimensional de cada bacteria en un instante de tiempo específico. Entre las ventajas de este método es que su implementación experimental es sumamente sencilla, sus los algoritmos de reconstrucción son eficientes y funcionan bien en ambientes con densidades bajas de bacterias. Entre sus desventajas se encuentra que el método es muy sensible a las distorsiones que el ruido pueda tener sobre el patrón de difracción, no puede manejar oclusiones y la profundidad máxima a la que puede rastrear una partícula es relativamente corta ($\sim 60\mu m$), lo que complica registrar trayectorias largas para las que el comportamiento de las partículas sea significativo. Quizá el ejemplo más acabado de esta misma clase es la propuesta que en el año 2006 realizaron Sheng *et al* [20], donde utilizan técnicas de holografía para reconstruir la información tridimensional de los desplazamientos de microorganismos dino-flagelados en espacios tridimensionales. Las técnicas utilizadas registran en una cámara las proyecciones 2D de los patrones de interferencia asociados a la luz difractada por la muestra biológica y a partir de estos patrones, reconstruyen el espacio tridimensional donde se desplazan los microorganismos. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra que la amplitud y profundidad del campo de observación son un orden de magnitud superiores a los de las técnicas basadas en patrones de refracción y generalmente no requiere de cámaras de alta velocidad. Entre sus desventajas encontramos que no es factible de implementarse en sistemas experimentales donde se requieren dos o más fuentes de luz simultáneas, es dramáticamente sensible a fuentes de ruido de naturaleza luminosa y mecánica, tiene un alto costo computacional asociado a la reconstrucción de la información que dicho sea de paso, introduce ruido tipo *speckle* en las imágenes. Recientemente Su *et al* [140] implementaron una versión modificada de esta técnica se utilizó con éxito para reconstruir trayectorias 3D de espermatozoides de humano.

Comparando nuestro sistema experimental con los recién descritos, encontramos que las siguientes diferencias:

- En contraste a los métodos diseñados para una sola partícula, nuestro sistema de rastreo es capaz de registrar desplazamientos simultáneos de partículas de nado rápido.
- El sistema experimental que proponemos permite acoplar fuentes múltiples de iluminación, situación que los sistemas basados en holografía no pueden manejar.
- Nuestro sistema incluye algoritmos para determinar cuantitativamente la contaminación mecánica que los datos contienen, característica que permite implementar métodos automáticos de compensación para eliminar movimiento artificial en las trayectorias obtenidas.

Entre las desventajas comparativas, encontramos que los sistemas basados en holografía digital permiten explorar espacios de dimensión varias veces mayor que el nuestro, característica importante para determinar eficientemente el comportamiento dinámico de las partículas observadas. Por otro lado, el volumen de datos generado por nuestro sistema experimental es muy grande, lo que demanda protocolos especiales diseñados para el manejo eficiente de la

información.

Enseguida discutiremos brevemente las contribuciones, que al estado del arte en algoritmos de rastreo orientados a partículas microscópicas aporta nuestro desarrollo computacional.

6.1.2. Algoritmo de segmentación.

Parte esencial de este sistema es el método de segmentación que, basado en el patrón de difracción asociado a las propiedades translúcidas de las células y su interacción con luz, sigue tres etapas secuenciales para identificar a las células: segmentación por umbrales multinivel, correlación con máscaras promedio y validación por inversión de contraste. El procedimiento global demuestra ser muy eficiente para identificar células entre artefactos con tamaño y apariencia similares al de las células ($PPV \sim 98\%$) pero sin la inversión de contraste que caracteriza a las células. El fuerte criterio de selectividad tiene un costo reflejado en la pérdida de información relacionada con células desenfocadas ($SN \sim 80\%$), no obstante, dado que la información registrada por nuestro sistema incluye multiplicidad de detecciones asociadas a una sola célula (múltiples planos focales), la probabilidad de que todas las secciones de una misma célula no se detecten es baja. Además de que si fuera necesario, es posible recuperar información de las etapas previas en el método de segmentación. En contraste con los métodos clásicos descritos en el capítulo 2 que se dividen en criterios de segmentación en dos o tres dimensiones, nuestro método de segmentación se ubica en una zona media entre 2D y 3D:

- Por una parte el método aprovecha la flexibilidad que los métodos de segmentación 2D proporcionan. Por ejemplo permite ir de criterios simples como el caso del método basado en el coeficiente de correlación de Pearson que busca identificar los estados base (anillo negro con centro blanco y su complementaria, anillo blanco con centro negro) que definen a una célula a costa de perder algunas secciones de los extremos del patrón de difracción (Fig. 4.1) o implementar métodos estadísticamente más significativos como el caso de reconocimiento por PCA (eigenfaces) ¹ que puede incluir todas las apariencias de la célula pero tienen un costo computacional más alto ² y devuelve una densidad de detecciones más alta. Esta situación puede resultar muy conveniente en casos donde la información es escasa y no se dispone de multi-detecciones, permitiendo explorar niveles de densidad más bajos a los que es efectivo el algoritmo de correlación por máscaras. Finalmente la elección sobre el método más adecuado para usarse en la segunda etapa dependerá de factores como la densidad de células, el nivel de ruido en la señal y el nivel de muestreo de los objetos de interés.
- Por otra parte, existe la alternativa de aplicar versiones extendidas de los criterios mencionados en el capítulo 2 orientados a identificar patrones tridimensionales, no obstante, debe considerarse que construir una representación 3D de la información a partir de los planos focales implica un costo computacional adicional, lo que en casos como el nuestro donde la información asociada a cada realización experimental es bastante grande (4 GB) puede no ser la mejor alternativa. Además de este factor, el uso de patrones 3D implica la construcción de una máscara con propiedades estadísticamente significativas que hagan el proceso robusto al ruido, lo que parece redundante si sabemos que es precisamente el caso de la inversión de contraste. Finalmente, es pertinente reiterar que una importante característica de los métodos de segmentación secuenciales en 2D es que la información obtenida en cada etapa de la segmentación se puede usar para complementar la información que se pierde en la etapa siguiente, lo que en el caso de algoritmos basados en información 3D no es posible.

¹En este trabajo hemos implementado un análisis de componentes principales PCA para proponer un método con robustez estadística para identificar secciones de células, sin embargo existen otras alternativas como los modelos de apariencia activa (AAM) diseñados por Cootes, Edwards y Taylor en 1998 [141, 142] donde proponen un algoritmo de visión computacional que permite ajustar un modelo estadístico a una imagen arbitraria con una apariencia y forma específicos. Para construir el modelo se requiere de una colección de entrenamiento que provea datos sobre las características geométricas y de apariencia al algoritmo. Este método, basado en mínimos cuadrados aproxima coeficientes para lograr la representación de una imagen arbitraria en el modelo estadístico, por su eficiencia se emplea frecuentemente en aplicaciones de reconocimiento de rostros y en aplicaciones médicas.

²Independientemente de que es posible hacer más eficientes algunas etapas del proceso, en su estado actual, una estación de trabajo de 4 núcleos y 8 GB de RAM, toma aproximadamente 120 minutos usando correlaciones y 240 minutos usando eigenfaces en terminar los procesos paralelos y obtener la información asociada a las trayectorias de 4 diferentes experimentos con 16384 imágenes de 512x512 píxeles cada una.

En situaciones donde los requerimientos experimentales implican el uso de fuentes múltiples de iluminación (situación muy frecuente en el contexto de fisiología celular) como es el caso que muestra la Fig. 4.8, las imágenes son seriamente contaminadas por ruido luminoso más o menos aleatorio, lo que resulta en que cualquier criterio basado en mascarar 2D o 3D sean insuficientes para identificar positivamente células, situación en la que es necesario incluir criterios basados en la inversión de contraste. Concluimos entonces que la perspectiva que planteamos contiene los elementos para considerarse suficientemente flexible como aplicarse en casos donde hay altos o bajos niveles de ruido y suficientemente simple para que su costo computacional sea accesible, características que la hacen una excelente opción para sistemas de rastreo basados en microscopía. Cabe mencionar que, dentro de nuestro conocimiento, este es el primer método que, en el contexto del estado del arte en métodos de detección orientados al rastreo de partículas microscópicas, aprovecha la inversión de contraste como característica para construir un criterio de detección.

6.1.3. El algoritmo de rastreo.

Dentro de las clasificaciones mencionadas en el capítulo 2, el algoritmo de rastreo que hemos implementado es uno de los más sencillos, sin embargo, los filtros que lo conforman imponen fuertes criterios de selectividad que en su conjunto permiten identificar de forma precisa células en un contexto de imágenes ruidosas. Una consecuencia afortunada de esta alta selectividad es que se simplifica notablemente el proceso de rastreo, característica deseable en un sistema con volumen de información importante y con múltiples fuentes de ruido. Adicional a su sencillez, el algoritmo es suficientemente flexible como para adaptarse a una gran diversidad de sistemas de microscopía 3D, para ello solo es necesario entrenar los algoritmos con información sobre el patrón de difracción de los objetos de interés. En la práctica hemos observado su aplicabilidad en células y partículas inanimadas con propiedades traslucidas. Para terminar, es conveniente mencionar que en su estado actual el sistema reconstruye eficientemente trayectorias dentro de la proximidad espacio-tiempo ajustada en los parámetros de rastreo, sin embargo, no es capaz de manejar eficientemente excepciones a estos criterios, lo que redundará en pérdida de información. En esta situación es deseable dotar al sistema de un algoritmo que permita caracterizar y adaptar en tiempo real las fluctuaciones asociadas a la multi-detección que ocurre cuando el piezoeléctrico barre la profundidad de la muestra.

6.1.4. Contribución biológica

Como mostramos en el capítulo 5, el sistema propuesto es capaz de proveer información estadística sobre la dinámica de múltiples partículas desplazándose simultáneamente en espacios tridimensionales a velocidades de cientos de micras por segundo. En su estado actual este desarrollo es aplicable en diversos contextos; ciencias de la salud, investigación biomédica, fisiología celular, agronomía, pesca, etc. Al respecto, un ejemplo de aplicación en temas de particular impacto social y económico es el estudio del comportamiento dinámico del espermatozoide humano como respuesta a estímulos químicos específicos. Abordar este tema tiene múltiples aspectos: por un lado, en términos de infertilidad, las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud del 2004, revelan que la infertilidad es una situación que atañe al 15 % de las parejas en etapa reproductiva. Pese a que el 50 % de estos casos se asocian a problemas reproductivos del varón, las consecuencias sociales negativas trascienden al individuo que los padece [18]. En otro aspecto, en términos de contracepción, la mayoría de los anticonceptivos se diseñan para ser utilizados por mujeres, haciéndolas víctimas mayoritarias de los efectos colaterales.

En el contexto de investigación básica, el conocimiento de los procesos químicos involucrados en el diálogo químico que ocurre entre los gametos para coordinar su encuentro, las propiedades mecánicas del medio ambiente sobre la dinámica de la motilidad, entre otras, son importantes cuestiones que permanece sin resolverse. No obstante, los avances en ese sentido son notables, desde el desarrollo de herramientas para el análisis de la motilidad celular [11, 39, 83, 100, 109, 130, 143] hasta el progreso en el entendimiento de la forma en que diversos factores químicos y mecánicos afectan la motilidad de microorganismos y células [10, 21, 32, 33]. Particularmente abordado, la manera en que células integran información espacio-temporal para reorientar sus movimientos dirigiéndose a su objetivo [36, 144] es el contexto donde nuestra contribución abre una gama muy importante de posibilidades, entre las que se destacan:

- Proporcionar información experimental para construir modelos de desplazamiento mecánicos que excluyan los efectos de frontera que las superficies ejercen sobre el nado de las células [37, 110, 145, 146]. Al respecto, los modelos actuales están restringidos a este tipo de condiciones, que por supuesto difieren notablemente de las condiciones silvestres donde se realizan procesos como la fecundación [19].
- Acoplar los modelos mecánicos a los sistemas de señalización intracelular permitiría avanzar hacia la creación de modelos analíticos o computacionales que puedan estimar el comportamiento dinámico de las células en ambientes químicos específicos [16, 89, 122, 147–157]. Contar con esta clase de modelos constituiría un avance muy importante en áreas como fisiología celular y ciencias de la salud.
- Hipotéticamente, los modelos recién descritos permitirían analizar *in silico* diferentes condiciones químicas y mecánicas, lo que en principio permitiría determinar un conjunto de condiciones específicas que pueden atrofiar o inhibir el nado de espermatozoides de humano, un objetivo largamente buscado para el diseño teórico de fármacos anticonceptivos.

Hasta aquí la descripción del aspecto biológico de nuestra contribución, enseguida concluiremos este documento haciendo una breve reseña de nuestro trabajo y señalando algunas de las perspectivas.

6.1.5. Conclusiones y perspectivas.

Hemos desarrollado una interesante alternativa para el rastreo tridimensional de partículas microscópicas, en el contexto experimental actual. Dentro de nuestro conocimiento, nuestro método de rastreo es uno de los sistemas con mayor flexibilidad y robustez para abordar diferentes condiciones experimentales, siendo capaz por ejemplo, de manejar fuentes de iluminación múltiples y contaminación mecánica, aspectos que son frecuentes en las condiciones estándar de un laboratorio y que pueden desestimar el uso de otra clase de sistemas, por ejemplo los basados en holografía. A partir de la observación de los datos experimentales hemos podido determinar que cuando se colocan a las células bajo una fuente de luz y la distancia relativa entre el plano focal (observador) y el centro de masa del objeto (la célula observada) cambia, la célula presenta un cambio sistemático en su apariencia: anillo blanco con centro negro / anillo negro con centro blanco / anillo blanco con centro negro, al que hemos denominado inversión de contraste. Hemos encontrado literatura que indica que esta característica aparece en cualquier estructura translúcida sin embargo, dentro de nuestro conocimiento no había sido aprovechada en ningún algoritmo de segmentación, muy probablemente porque el rastreo de microorganismos en 3D es un área aún en desarrollo. Para aprovechar esta peculiaridad, hemos propuesto un algoritmo de segmentación compuesto por un proceso secuencial de filtros: el proceso comienza con un algoritmo de segmentación por umbrales multinivel que permite seleccionar los cúmulos brillantes y oscuros en toda la secuencia de imágenes, la salida de este algoritmo es la entrada de la etapa siguiente, que se ocupa de seleccionar los objetos que tengan apariencia y tamaño compatible con una sección de célula; para efectuar esta etapa hemos desarrollado dos alternativas con diferentes características, el filtro basado en correlación con mascarar promedio asociadas a la apariencia brillante y oscura de la célula y el filtro basado en análisis de componentes principales (PCA). La principal diferencia entre estas dos perspectivas es que el filtro por correlación está diseñado para detectar la fracción del patrón de difracción donde ocurre la inversión en contraste, mientras que el análisis basado en PCA permite detectar más cortes del mismo patrón pero tiene un costo computacional más importante (100 % más). En la versión final de nuestro algoritmo, la selección del método empleado depende de las características que el usuario estime convenientes, dejándolo a su criterio. La salida de la segunda etapa se dirige hacia la entrada del algoritmo que evaluará si las secciones de células detectadas, en su conjunto, presentan inversión de contraste. Nuestros resultados indican que la eficiencia del algoritmo es muy buena, hecho que permite implementar un algoritmo de rastreo basado en vecindad espacio-temporal con una forma muy simple, pero que proporciona resultados razonablemente buenos.

Las trayectorias obtenidas para las diferentes condiciones químicas analizadas nos permiten construir un análisis estadístico sobre la dependencia del comportamiento dinámico de las células como función de la especie y del ambiente químico donde nadan. Esta contribución al estado del arte no es menor, significando una herramienta muy interesante

en áreas como fisiología celular y ciencias de la salud.

Entre las características deseables a optimizar en nuestro sistema encontramos que el costo computacional es susceptible a reducirse mediante la implementación de procesos paralelos en las etapas de segmentación (que representan el 70 % del costo) y de rastreo; también debe considerarse como desventaja que el espacio de observación disponible no es tan amplio como los que permiten los sistemas basados en holografía digital, sin embargo, de nuestros datos podemos concluir que el espacio observado es suficiente para obtener información estadística sobre una de las células que es el paradigma en el estudio de la motilidad en fisiología celular, el espermatozoide de erizo marino.

Entre las perspectivas, quizás la más clara es la implementación de un algoritmo de rastreo más robusto al manejo de traslapes entre las nubes de puntos asociados a las diferentes secciones de las células. al momento lo hemos manejado imponiendo fuertes restricciones en los criterios de vecindad, sin embargo, usando este criterio perdemos información que puede robustecer nuestra estadística.

Bibliografía

- [1] **Willert, C.E.** y **Gharib, M.** (1991). «Digital particle image velocimetry». En *Experiments in Fluids*, 10:181–193. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00190388>. 10.1007/BF00190388. (Citado en pags. 1 y 53.)
- [2] **Adrian, R.J.** (2005). «Twenty years of particle image velocimetry». En *Experiments in Fluids*, 39:159–169. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00348-005-0991-7>. 10.1007/s00348-005-0991-7. (Citado en pags. 1 y 27.)
- [3] **Lao, J.Y., Huang, J.Y., Wang, D.Z.** y **Ren, Z.F.** (2003). «ZnO Nanobridges and Nanonails». En *Nano Letters*, 3 (2):235–238. doi:10.1021/nl025884u. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl025884u>. (Citado en pag. 1.)
- [4] **Nussinov, R.** y **Aleman, C.** (2006). «Nanobiology: from physics and engineering to biology». En *Physical Biology*, 3 (1). URL <http://stacks.iop.org/1478-3975/3/i=1/a=E01>. (Citado en pag. 1.)
- [5] **Kerr, J.N.D.D.W.** (2008). «Imaging in vivo: watching the brain in action». En *Nat Rev Neuroscience*, 9 (3):195–205. doi:10.1038/nrn2338. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2338>. (Citado en pags. 1 y 27.)
- [6] **Berg, H.C.** (jun 1971). «How to Track Bacteria». En *Review of Scientific Instruments*, 42 (6):868–871. doi:10.1063/1.1685246. (Citado en pags. 1, 27, 55, 57 y 89.)
- [7] **Schneider, W.** y **Doetsch, R.** (1974). «Effect of viscosity on bacterial motility». En *Journal of bacteriology*, 117 (2):696–701. (Citado en pags. 27 y 55.)
- [8] **Berg, H.** (1978). «The tracking microscope». En *Adv. Opt. Electron Microsc.*, 7:1–15. (Citado en pag. 27.)
- [9] **Berg, H.** y **Turner, L.** (1979). «Movement of microorganisms in viscous environments». En *Nature*, 278 (5702):349–351. (No citado.)
- [10] **Berg, H.C.** (2004). *E. coli in Motion*. Springer Verlag. (Citado en pags. 27 y 92.)
- [11] **Frymier, P.D., Ford, R.M., Berg, H.C.** y **Cummings, P.T.** (1995). «Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface». En *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (13):6195–6199. URL <http://www.pnas.org/content/92/13/6195.abstract>. (Citado en pags. 27, 55 y 92.)
- [12] **Vigeant, M.A.** y **Ford, R.M.** (1997). «Interactions between motile Escherichia coli and glass in media with various ionic strengths, as observed with a three-dimensional-tracking microscope». En *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (9):3474–3479. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/63/9/3474>. (No citado.)
- [13] **Thar, R., Blackburn, N.** y **Kühl, M.** (2000). «A new system for three-dimensional tracking of motile microorganisms». En *Applied and environmental microbiology*, 66 (5):2238. (Citado en pags. 55 y 65.)
- [14] **Soni, G.V., Ali, B.M.J., Hatwalne, Y.** y **Shivashankar, G.V.** (2003). «Single Particle Tracking of Correlated Bacterial Dynamics». En *Biophysical Journal*, 84 (4):2634–2637. doi:10.1016/S0006-3495(03)75068-1. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349503750681>. (Citado en pag. 27.)
- [15] **Wu, M., Roberts, J.W., Kim, S., Koch, D.L.** y **DeLisa, M.P.** (2006). «Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique.» En *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (7):4987–94. doi:10.1128/AEM.00158-06. (Citado en pags. 27, 60, 65 y 90.)

- [16] **Wessels, D., Kühl, S. y Soll, D.** (2009). «Light microscopy to image and quantify cell movement». En *Methods Mol. Biol.*, 571:455–471. (Citado en págs. 65 y 93.)
- [17] **Wessels, D., Kühl, S. y Soll, D.R.** (2010). «2D and 3D Quantitative Analysis of Cell Motility and Cytoskeletal Dynamics». En J.M. Walker y R.H. Gavin, eds., *Cytoskeleton Methods and Protocols*, tomo 586, cap. Methods in Molecular Biology, págs. 315–335. Humana Press. ISBN 978-1-60761-376-3. doi:10.1007/978-1-60761-376-3_18. (Citado en pag. 27.)
- [18] **Sembuya, R.** (12 2010). «Mother or nothing: the agony of infertility». En *Bulletin of the World Health Organization*, 88:881–882. URL http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0042-96862010001200005&nrm=iso. (Citado en págs. 1 y 92.)
- [19] **Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C.D., Corkidi, G. y Darszon, A.** (2011). «Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions». En *Molecular Human Reproduction*, 17 (8):511–523. doi:10.1093/molehr. URL <http://molehr.oxfordjournals.org/content/17/8/511.abstract>. (Citado en págs. 1, 81 y 93.)
- [20] **Sheng, J., Malkiel, E. y Katz, J.** (Jun 2006). «Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions». En *Appl. Opt.*, 45 (16):3893–3901. doi:10.1364/AO.45.003893. URL <http://ao.osa.org/abstract.cfm?URI=ao-45-16-3893>. (Citado en págs. 1, 27, 55, 60 y 90.)
- [21] **Dr. Spencer L. Shorte, D.F.F.**, ed. (2007). *Imaging Cellular and Molecular Biological Functions*. Principles and Practice. Springer Berlin Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1ª ed^{ón}. doi:10.1007/978-3-540-71331-9. URL <http://www.springerlink.com/content/978-3-540-71330-2>. (Citado en págs. 22, 27 y 92.)
- [22] **Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C., Guerrero, A. y Darszon, A.** (2008). «Tracking sperm in three-dimensions». En *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373 (1):125–129. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.189. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4SRD212-6/2/d5a082b33808d676ecfbca1f054e0ce2>. (Citado en págs. 55, 56 y 61.)
- [23] **Wu, Q., Merchant, F.A. y Castleman, K.R.** (2008). *Microscope image processing*. Academic Press, Elsevier. ISBN 978-0-12-372578-3. URL <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123725783>. (No citado.)
- [24] **Rittscher, J., Machiraju, R. y Wong, S.T.** (jul. 2008). *Microscopic image analysis for life science applications*. Artech House Series: Bioinformatics & Biomedical Imaging. Artech House Publishers, 1ª ed^{ón}. ISBN 9781596932364. URL <http://www.artechhouse.com/International/Books/Microscopic-Image-Analysis-for-Life-Science-Applic-1325.aspx>. (No citado.)
- [25] **Papkovsky, D.B.** (2010). *Living Cell Imaging: Methods and Protocols*, tomo 591 de *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1ª ed^{ón}. doi:10.1007/978-1-60761-404-3. URL <http://www.springerlink.com/content/978-1-60761-403-6>. (Citado en págs. 1 y 65.)
- [26] **Pimentel, J., Carneiro, J., Darszon, A. y Corkidi, G.** (2012). «A segmentation algorithm for automated tracking of fast swimming unlabelled cells in three dimensions.» En *Journal of microscopy*, 245 (1365-2818):72–81. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03545.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03545.x>. (Citado en págs. 1, 56 y 80.)
- [27] **Zernike, F.** (1955). «How I Discovered Phase Contrast». En *Science*, 121 (3141):345–349. doi:10.1126/science.121.3141.345. URL <http://www.sciencemag.org/content/121/3141/345.short>. (Citado en pag. 10.)

- [28] **Swedlow, J.R., Goldberg, I., Brauner, E. y Sorger, P.K.** (2003). «Informatics and Quantitative Analysis in Biological Imaging». En *Science*, 300 (5616):100–102. doi:10.1126/science.1082602. URL <http://www.sciencemag.org/content/300/5616/100.abstract>. (Citado en pag. 21.)
- [29] **Goldberg, I., Allan, C., Burel, J.M., Creager, D., Falconi, A., Hochheiser, H., Johnston, J., Mellen, J., Sorger, P. y Swedlow, J.** (2005). «The Open Microscopy Environment (OME) Data Model and XML file: open tools for informatics and quantitative analysis in biological imaging». En *Genome Biology*, 6 (5):R47+. doi:10.1186/gb-2005-6-5-r47. URL <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-5-r47>. (Citado en pags. 21 y 23.)
- [30] **Nascimento, J.M., Botvinick, E.L., Shi, L.Z., Durrant, B. y Berns, M.W.** (2006). «Analysis of sperm motility using optical tweezers». En *Journal of Biomedical Optics*, 11 (4):044001. doi:10.1117/1.2337559. URL <http://link.aip.org/link/?JBO/11/044001/1>. (Citado en pags. 27 y 55.)
- [31] **Göbel, W., Kampa, B.M. y Helmchen, F.** (2007). «Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning.» En *Nat. Methods*, 4 (1):73–9. doi:10.1038/nmeth989. (No citado.)
- [32] **Kaupp, U., Hildebrand, E. y Weyand, I.** (2006). «Sperm chemotaxis in marine invertebrates—molecules and mechanisms». En *Journal of cellular physiology*, 208 (3):487–494. (Citado en pag. 92.)
- [33] **Kaupp, U.B., Kashikar, N.D. y Weyand, I.** (2008). «Mechanisms of sperm chemotaxis.» En *Annu. Rev. Physiol.*, 70 (1):93–117. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654>. (Citado en pag. 92.)
- [34] **Miller, R.** (1985). «Sperm chemo-orientation in the metazoa». En *Biology of fertilization*, 2:275–337. (Citado en pag. 55.)
- [35] **Eisenbach, M. y Giojalas, L.** (2006). «Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg». En *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (4):276–285. (No citado.)
- [36] **Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C.D. y Darszon, A.** (2010). «Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing». En *Developmental Biology*, 344 (1):52–65. doi:10.1016/j.ydbio.2010.04.013. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160610002435>. (Citado en pags. 79, 81 y 92.)
- [37] **Friedrich, B. y Jülicher, F.** (Aug 2009). «Steering Chiral Swimmers along Noisy Helical Paths». En *Physical Review Letters*, 103 (6):068102. doi:10.1103/PhysRevLett.103.068102. (Citado en pags. 27, 55 y 93.)
- [38] **Corkidi, G., Diaz-Urbe, R., Folch-Mallol, J. y Nieto-Sotelo, J.** (1998). «An image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting». En *Applied and environmental microbiology*, 64 (4):1400. (Citado en pags. 27, 65, 69 y 74.)
- [39] **Armitage, J. y Packer, H.** (1997). «Bacterial motility and chemotaxis». En *Motion Analysis of Living Cells*. (Citado en pags. 27 y 92.)
- [40] **Corkidi, G., Rojas, A., Pimentel, A. y Galindo, E.** (2012). «Visualization of compound drops formation in multiphase processes for the identification of factors influencing bubble and water droplet inclusions in oil drops». En *Chemical Engineering Research and Design*, 90 (11):1727–1738. doi:10.1016/j.cherd.2012.03.021. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876212001335>. (Citado en pag. 27.)
- [41] **Qian, H.** (2000). «Single-Particle Tracking: Brownian Dynamics of Viscoelastic Materials». En *Biophysical Journal*, 79 (1):137–143. doi:10.1016/S0006-3495(00)76278-3. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349500762783>. (Citado en pags. 27 y 48.)

- [42] **Berg, H.C. y Brown, D.A.** (1972). «Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking». En *Nature*, 239 (5374):500–504. (Citado en pags. 27 y 65.)
- [43] **Chenouard, N.** (January 2010). *Advances in probabilistic particle tracking for biological imaging*. Tesis Doctoral, Ecole Doctorale d’Informatique, Télécommunications et Electronique de Paris. URL <http://www.bioimageanalysis.org/~chenouard/index.php/Main/HomePage>. (Citado en pag. 27.)
- [44] **Fionn D. Murtagh, J.L.S. y Bijaoui, A.** (1998). Cambridge University Press. ISBN 9780511564352. URL <http://dx.doi.org/10.1017/CB09780511564352>. (Citado en pag. 31.)
- [45] **Olivo-Marin, J.C.** (2002). «Extraction of spots in biological images using multiscale products». En *Pattern Recognition*, 35 (9):1989–1996. doi:10.1016/S0031-3203(01)00127-3. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031320301001273>. (No citado.)
- [46] **Genovesio, A., Liedl, T., Emiliani, V., Parak, W., Coppey-Moisan, M. y Olivo-Marin, J.C.** (2006). «Multiple particle tracking in 3-D+t microscopy: method and application to the tracking of endocytosed quantum dots». En *IEEE Transactions on Image Processing*, 15 (5):1062. doi:10.1109/TIP.2006.872323. (Citado en pags. 47 y 65.)
- [47] **Starck, J.L., Fadili, J. y Murtagh, F.** (feb. 2007). «The Undecimated Wavelet Decomposition and its Reconstruction». En *Image Processing, IEEE Transactions on*, 16 (2):297–309. doi:10.1109/TIP.2006.887733. (Citado en pag. 31.)
- [48] **Figueiredo, M. y Nowak, R.** (2001). «Wavelet-based image estimation: an empirical Bayes approach using Jeffrey’s noninformative prior». En *Image Processing, IEEE Transactions on*, 10 (9):1322–1331. (Citado en pag. 31.)
- [49] **Starck, J. y Murtagh, F.** (2001). «Astronomical image and signal processing: looking at noise, information and scale». En *Signal Processing Magazine, IEEE*, 18 (2):30–40. (No citado.)
- [50] **Singh, M.** (2011). *Denoising of natural images using the wavelet transform*. Proyecto Fin de Carrera, San Jose State University. URL http://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/3895. (Citado en pag. 31.)
- [51] **Anscombe, F.** (1948). «The transformation of Poisson, binomial and negative-binomial data». En *Biometrika*, págs. 246–254. URL <http://www.jstor.org/discover/10.2307/2332343?uid=3738664&uid=2134&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21101294515191>. (Citado en pag. 32.)
- [52] **Sage, D., Neumann, F.R., Hediger, F., Gasser, S.M. y Unser, M.** (sep. 2005). «Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics». En *IEEE Transactions on Image Processing*, 14 (9):1372–1383. doi:10.1109/TIP.2005.852787. URL <http://dx.doi.org/10.1109/TIP.2005.852787>. (Citado en pags. 32 y 52.)
- [53] **Meijering, E., Smal, I. y Danuser, G.** (may 2006). «Tracking in molecular bioimaging». En *Signal Processing Magazine, IEEE*, 23 (3):46–53. doi:10.1109/MSP.2006.1628877. (Citado en pag. 32.)
- [54] **Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Dirks, R.W. y Raz, V.** (2008). «Segmentation and analysis of the three-dimensional redistribution of nuclear components in human mesenchymal stem cells». En *Cytometry Part A*, 73A (9):816–824. doi:10.1002/cyto.a.20612. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20612>. (Citado en pag. 33.)
- [55] **Zhang, B., Fadili, J., Starck, J.L. y Olivo-Marin, J.C.** (16 2007–oct. 19 2007). «Multiscale Variance-Stabilizing Transform for Mixed-Poisson-Gaussian Processes and its Applications in Bioimaging». En *Image Processing, 2007. ICIP 2007. IEEE International Conference on*, tomo 6, págs. VI–233–VI–236. doi:10.1109/ICIP.2007.4379564. (Citado en pag. 33.)

- [56] **Viola, P. y Jones, M.** (2001). «Rapid object detection using a boosted cascade of simple features». En *Computer Vision and Pattern Recognition, 2001. CVPR 2001. Proceedings of the 2001 IEEE Computer Society Conference on*, tomo 1, págs. I-511–I-518 vol.1. doi:10.1109/CVPR.2001.990517. (Citado en pag. 35.)
- [57] **Jain, A., Duin, R. y Mao, J.** (jan 2000). «Statistical pattern recognition: a review». En *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 22 (1):4–37. doi:10.1109/34.824819. (Citado en pag. 36.)
- [58] **McLachlan, G.J.** (2004). *Discriminant analysis and statistical pattern recognition*, tomo 544. Wiley-Interscience. (Citado en pag. 36.)
- [59] **Smal, I., Loog, M., Niessen, W. y Meijering, E.** (feb. 2010). «Quantitative Comparison of Spot Detection Methods in Fluorescence Microscopy». En *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 29 (2):282–301. doi:10.1109/TMI.2009.2025127. (Citado en pags. 36 y 37.)
- [60] **Smal, I.** (June 2009). *Particle Filtering Methods for Subcellular Motion Analysis*. Tesis Doctoral, Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands. URL <http://hdl.handle.net/1765/16406>. (Citado en pag. 37.)
- [61] **Sethi, I.K. y Jain, R.** (jan. 1987). «Finding Trajectories of Feature Points in a Monocular Image Sequence». En *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, PAMI-9 (1):56–73. doi:10.1109/TPAMI.1987.4767872. (Citado en pag. 38.)
- [62] **Chetverikov, D. y Verestói, J.** (1999). «Feature Point Tracking for Incomplete Trajectories». En *Computing*, 62:321–338. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s006070050027>. 10.1007/s006070050027. (Citado en pag. 39.)
- [63] **Hwang, V.S.** (feb. 1989). «Tracking feature points in time-varying images using an opportunistic selection approach». En *Pattern Recogn.*, 22 (3):247–256. doi:10.1016/0031-3203(89)90073-3. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0031-3203\(89\)90073-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-3203(89)90073-3). (Citado en pag. 39.)
- [64] **Sbalzarini, I.F., Koumoutsakos, P. et al.** (2005). «Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology». En *Journal of structural biology*, 151 (2):182–195. doi:10.1016/j.jsb.2005.06.002. URL <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/16043363>. (Citado en pag. 39.)
- [65] **Rangarajan, K. y Shah, M.** (jun 1991). «Establishing motion correspondence». En *Computer Vision and Pattern Recognition, 1991. Proceedings CVPR '91., IEEE Computer Society Conference on*, págs. 103–108. doi:10.1109/CVPR.1991.139669. (Citado en pag. 39.)
- [66] **Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S. y Danuser, G.** (2008). «Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences». En *Nature methods*, 5 (8):695–702. URL http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n8/supinfo/nmeth.1237_S1.html. (Citado en pag. 39.)
- [67] **Jonker, R. y Volgenant, A.** (1987). «A shortest augmenting path algorithm for dense and sparse linear assignment problems». En *Computing*, 38:325–340. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF02278710>. 10.1007/BF02278710. (Citado en pag. 40.)
- [68] **Burkard, R.E.** (2002). «Selected topics on assignment problems». En *Discrete Applied Mathematics*, 123 (1–3):257–302. doi:10.1016/S0166-218X(01)00343-2. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166218X01003432>. (No citado.)
- [69] **Apgar, J., Tseng, Y., Fedorov, E., Herwig, M.B., Almo, S.C. y Wirtz, D.** (2000). «Multiple-Particle Tracking Measurements of Heterogeneities in Solutions of Actin Filaments and Actin Bundles». En *Biophysical Journal*, 79 (2):1095–1106. doi:10.1016/S0006-3495(00)76363-6. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349500763636>. (Citado en pag. 40.)

- [70] **Bonneau, S., Dahan, M. y Cohen, L.** (sept. 2005). «Single quantum dot tracking based on perceptual Grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume». En *Image Processing, IEEE Transactions on*, 14 (9):1384–1395. doi:10.1109/TIP.2005.852794. (Citado en pag. 41.)
- [71] **Kass, M., Witkin, A. y Terzopoulos, D.** (1988). «Snakes: Active contour models». En *International journal of computer vision*, 1 (4):321–331. (Citado en pags. 41 y 65.)
- [72] **Anderson, C., Georgiou, G., Morrison, I., Stevenson, G. y Cherry, R.** (1992). «Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. Low-density lipoprotein and influenza virus receptor mobility at 4 degrees C». En *Journal of Cell Science*, 101 (2):415–425. URL <http://jcs.biologists.org/content/101/2/415.abstract>. (Citado en pag. 42.)
- [73] **Crocker, J.C. y Grier, D.G.** (1996). «Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies». En *Journal of Colloid and Interface Science*, 179 (1):298–310. doi:10.1006/jcis.1996.0217. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979796902179>. (Citado en pag. 42.)
- [74] **Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H. y Marguet, D.** (2008). «Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes». En *Nature Methods*, 5 (8):687–694. (Citado en pag. 43.)
- [75] **Cox, I.J.** (1993). «A review of statistical data association techniques for motion correspondence». En *International Journal of Computer Vision*, 10:53–66. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF01440847>. 10.1007/BF01440847. (Citado en pag. 44.)
- [76] **Trees, H.L.V.** (2002). *Classical Detection and Estimation Theory, Part I: Detection, Estimation, and Linear Modulation Theory*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-09517-6. doi:10.1002/0471221082. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471221082>. (Citado en pag. 44.)
- [77] **Kalman, R.E. et al.** (1960). «A new approach to linear filtering and prediction problems». En *Journal of basic Engineering*, 82 (1):35–45. (Citado en pag. 44.)
- [78] **Blom, H. y Bar-Shalom, Y.** (aug 1988). «The interacting multiple model algorithm for systems with Markovian switching coefficients». En *Automatic Control, IEEE Transactions on*, 33 (8):780–783. doi:10.1109/9.1299. (Citado en pag. 46.)
- [79] **Ngoc, S.N., Briquet-Laugier, F., Boulin, C. y Olivo, J.** (oct 1997). «Adaptive detection for tracking moving biological objects in video microscopy sequences». En *Image Processing, 1997. Proceedings., International Conference on*, tomo 3, págs. 484–487. doi:10.1109/ICIP.1997.632163. (Citado en pag. 47.)
- [80] **Genovesio, A. y Olivo-Marin, J.C.** (2003). «Tracking fluorescent spots in biological video microscopy». En , págs. 98–105. doi:10.1117/12.478040. URL <http://dx.doi.org/10.1117/12.478040>. (No citado.)
- [81] **Smal, I., Draegestein, K., Galjart, N., Niessen, W. y Meijering, E.** (2008). «Particle filtering for multiple object tracking in dynamic fluorescence microscopy images: application to microtubule growth analysis.» En *IEEE Trans Med Imaging*, 27 (6):789–804. doi:10.1109/TMI.2008.916964. (Citado en pag. 47.)
- [82] **Lakadamyali, M., Rust, M.J., Babcock, H.P. y Zhuang, X.** (2003). «Visualizing infection of individual influenza viruses». En *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (16):9280–9285. doi:10.1073/pnas.0832269100. URL <http://www.pnas.org/content/100/16/9280.abstract>. (Citado en pag. 48.)
- [83] **Meijering, E., Dzyubachyk, O. y Smal, I.** (2012). «Chapter nine - Methods for Cell and Particle Tracking». En P.M. Conn, ed., *Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells Optical and Spectroscopic Techniques*, tomo 504 de *Methods in Enzymology*, págs. 183–200. Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00009-4. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123918574000094>; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00009-4>. (Citado en pags. 49, 51, 52, 53 y 92.)

- [84] **Carpenter, A., Jones, T. et al.** (oct. 2006). «CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes». En *Genome Biology*, 7 (10):R100+. doi:10.1186/gb-2006-7-10-r100. URL <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>. (Citado en pags. 50 y 52.)
- [85] **Sacan, A., Ferhatosmanoglu, H. y Coskun, H.** (jul. 2008). «CellTrack: an open-source software for cell tracking and motility analysis». En *Bioinformatics*, 24 (14):1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics. URL <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn247>. (Citado en pags. 50 y 52.)
- [86] **Shen, H., Nelson, G., Kennedy, S., Nelson, D., Johnson, J., Spiller, D., White, M. y Kell, D.** (mayo 2006). «Automatic tracking of biological cells and compartments using particle filters and active contours». En *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 82 (1-2):276–282. doi:10.1016/j.chemolab.2005.07.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.07.007>. (Citado en pag. 52.)
- [87] **Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G. y Wittmann, T.** (sep. 2010). «Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker.» En *Nature methods*, 7 (9):761–768. doi:10.1038/nmeth.1493. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1493>. (Citado en pag. 52.)
- [88] **Li, F., Zhou, X., Ma, J. y Wong, S.T.** (ene. 2010). «Multiple nuclei tracking using integer programming for quantitative cancer cell cycle analysis.» En *IEEE transactions on medical imaging*, 29 (1):96–105. doi:10.1109/TMI.2009.2027813. URL <http://dx.doi.org/10.1109/TMI.2009.2027813>. (Citado en pag. 52.)
- [89] **Wessels, D., Kuhl, S. y Soll, D.R.** (jul. 2006). «Application of 2D and 3D DIAS to Motion Analysis of Live Cells in Transmission and Confocal Microscopy Imaging Dictyostelium discoideum Protocols». En L. Eichinger, F. Rivero, J.M. Walker y J.M. Walker, eds., *Dictyostelium discoideum Protocols*, tomo 346 de *Methods in Molecular Biology*TM, págs. 261–279. Humana Press, New Jersey. ISBN 1-59745-144-4. doi:10.1385/1-59745-144-4:261. URL <http://dx.doi.org/10.1385/1-59745-144-4:261>. (Citado en pags. 52 y 93.)
- [90] **Mosig, A., Jager, S., Wang, C., Nath, S., Ersoy, I., Palaniappan, K.P. y Chen, S.S.** (jul. 2009). «Tracking cells in Life Cell Imaging videos using topological alignments». En *Algorithms for Molecular Biology*, 4 (1):10+. doi:10.1186/1748-7188-4-10. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1748-7188-4-10>. (Citado en pag. 52.)
- [91] **Bjornsson, C.S., Lin, G., Al-Kofahi, Y., Narayanaswamy, A., Smith, K.L., Shain, W. y Roysam, B.** (mayo 2008). «Associative image analysis: A method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain tissue». En *Journal of Neuroscience Methods*, 170 (1):165–178. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.12.024. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.024>. (Citado en pag. 52.)
- [92] **de Chaumont, F., Dallongeville, S. et al.** (jun. 2012). «Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research». En *Nature Methods*, 9 (7):690–696. doi:10.1038/nmeth.2075. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2075>. (Citado en pag. 52.)
- [93] **Dzyubachyk** (mar. 2010). «Advanced Level-Set-Based Cell Tracking in Time-Lapse Fluorescence Microscopy». En *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 29:852–867. doi:10.1109/TMI.2009.2038693. URL <http://dx.doi.org/10.1109/TMI.2009.2038693>. (Citado en pags. 52 y 65.)
- [94] **Niu, L. y Yu, J.** (ago. 2008). «Investigating Intracellular Dynamics of FtsZ Cytoskeleton with Photoactivation Single-Molecule Tracking». En *Biophys. J.*, 95 (4):2009–2016. doi:10.1529/biophysj.108.128751. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.128751>. (Citado en pag. 52.)
- [95] **Sbalzarini, I.F. y Koumoutsakos, P.** (ago. 2005). «Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology». En *Journal of Structural Biology*, 151 (2):182–195. doi:10.1016/j.jsb.2005.06.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.002>. (Citado en pag. 52.)

- [96] **Bosgraaf L, V.H.P.** (2010). «Quimp3, an automated pseudopod-tracking algorithm». En *Cell Adhesion & Migration*, 4:46–55. doi:10.4161/cam.4.1.9953. URL <http://dx.doi.org/10.4161/cam.4.1.9953>. (Citado en pag. 52.)
- [97] **Murray, J.I., Bao, Z., Boyle, T.J. y Waterston, R.H.** (2006). «The lineaging of fluorescently-labeled *Caenorhabditis elegans* embryos with StarryNite and AceTree.» En *Nat Protoc*, 1:1468–1476. URL <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406437>. (Citado en pag. 52.)
- [98] **Bacher, C., Reichenzeller, M., Athale, C., Herrmann, H. y Eils, R.** (2004). «4-D single particle tracking of synthetic and proteinaceous microspheres reveals preferential movement of nuclear particles along chromatin - poor tracks». En *BMC Cell Biology*, 5 (1):45+. doi:10.1186/1471-2121-5-45. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-5-45>. (Citado en pags. 52 y 65.)
- [99] **Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L. y Danuser, G.** (jul. 2008). «Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences». En *Nature Methods*, 5 (8):695–702. doi:10.1038/nmeth.1237. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1237>. (Citado en pag. 52.)
- [100] **Kime, D., Look, K.V., McAllister, B., Huyskens, G., Rurangwa, E. y Ollevier, F.** (2001). «Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish». En *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130 (4):425–433. doi:10.1016/S1532-0456(01)00270-8. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045601002708>. (Citado en pags. 52 y 92.)
- [101] **Haralick, R.M., Shanmugam, K. y Dinstein, I.** (nov. 1973). «Textural Features for Image Classification». En *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 3 (6):610–621. doi:10.1109/TSMC.1973.4309314. URL <http://dx.doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>. (Citado en pag. 50.)
- [102] **Sun, Y., Duthaler, S. y Nelson, B.J.** (2004). «Autofocusing in computer microscopy: Selecting the optimal focus algorithm». En *Microscopy Research and Technique*, 65 (3):139–149. doi:10.1002/jemt.20118. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20118>. (Citado en pag. 50.)
- [103] **Zhang, J.H., Chung, T.D.Y. y Oldenburg, K.R.** (1999). «A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays». En *Journal of Biomolecular Screening*, 4 (2):67–73. doi:10.1177/108705719900400206. URL <http://jbx.sagepub.com/content/4/2/67.abstract>. (Citado en pag. 50.)
- [104] **Crenshaw, H.** (1990). «Helical orientation-a novel mechanism for the orientation of microorganisms.» En *Biological motion: proceedings of a workshop held in Königswinter, Germany, March 16-19, 1989*, pág. 361. Springer-Verlag. ISBN 3540535209. (Citado en pag. 55.)
- [105] **Crenshaw, H.** (1991). «A technique for tracking spermatozoa in three dimensions without viscous wall effects». En *Comparative Spermatology 20 Years After*, págs. 353–357. (Citado en pags. 55, 57, 74, 75, 78 y 90.)
- [106] **Crenshaw, H.C., Ciampaglio, C.N. y McHenry, M.** (2000). «Analysis of the three-dimensional trajectories of organisms: estimates of velocity, curvature and torsion from positional information». En *Journal of Experimental Biology*, 203 (6):961–982. URL <http://jeb.biologists.org/content/203/6/961.abstract>. (Citado en pags. 55, 80 y 81.)
- [107] **Poole, P.S., Sinclair, D.R. y Armitage, J.P.** (1988). «Real time computer tracking of free-swimming and tethered rotating cells». En *Analytical Biochemistry*, 175 (1):52–58. doi:10.1016/0003-2697(88)90359-4. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269788903594>. (Citado en pag. 55.)

- [108] **Wu, M., Roberts, J.W. y Buckley, M.** (2005). «Three-dimensional fluorescent particle tracking at micron-scale using a single camera». En *Experiments in Fluids*, 38 (4):461. doi:10.1007/s00348-004-0925-9. (Citado en pags. 65 y 90.)
- [109] **Wu, K., Gauthier, D. y Levine, M.D.** (jan. 1995). «Live cell image segmentation». En *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 42 (1):1–12. doi:10.1109/10.362924. (Citado en pags. 55, 65 y 92.)
- [110] **Friedrich, B.M. y Jülicher, F.** (2008). «The stochastic dance of circling sperm cells: sperm chemotaxis in the plane». En *New Journal of Physics*, 10 (12):123025. doi:10.1088/1367-2630. URL <http://stacks.iop.org/1367-2630/10/i=12/a=123025>. (Citado en pags. 55 y 93.)
- [111] **Pimentel, A. y Corkidi, G.** (sept. 2009). «Mechanical vibration compensation method for 3D+t multi-particle tracking in microscopic volumes». En *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE*, págs. 1429–1432. doi:10.1109/IEMBS.2009.5334169. (Citado en pag. 58.)
- [112] **Takaya, K.** (2006). «Detection and Segmentation of Moving Objects in Video». En *Electrical and Computer Engineering, 2006. CCECE'06. Canadian Conference on*, págs. 2069–2073. (Citado en pag. 65.)
- [113] **Zhang, D. y Lu, G.** (2001). «Segmentation of moving objects in image sequence: A review». En *Circuits, Systems, and Signal Processing*, 20 (2):143–183. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF01201137>. 10.1007/BF01201137. (No citado.)
- [114] **Liew, A.W.C., Yan, H. y Yang, M.** (2005). «Pattern recognition techniques for the emerging field of bioinformatics: A review». En *Pattern Recognition*, 38 (11):2055–2073. doi:10.1016/j.patcog.2005.02.019. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031320305001263>. (No citado.)
- [115] **Bamford, P. y Lovell, B.** (1998). «Unsupervised cell nucleus segmentation with active contours». En *Signal Processing*, 71 (2):203–213. doi:10.1016/S0165-1684(98)00145-5. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165168498001455>. (Citado en pag. 65.)
- [116] **Caselles, V., Catté, F., Coll, T. y Dibos, F.** (1993). «A geometric model for active contours in image processing». En *Numerische Mathematik*, 66 (1):1–31. (Citado en pag. 65.)
- [117] **McInerney, T. y Terzopoulos, D.** (2000). «T-snakes: Topology adaptive snakes». En *Medical Image Analysis*, 4 (2):73–91. (No citado.)
- [118] **Matwyschuk, A., Ambs, P. y Christnacher, F.** (2003). «Target tracking correlator assisted by a snake-based optical segmentation method». En *Optics Communications*, 219 (1-6):125–137. (No citado.)
- [119] **Li, Y., Zhu, Q., Cao, Y. y Wang, C.** (2006). «A leaf vein extraction method based on snakes technique». En *Neural Networks and Brain, 2005. ICNN&B'05. International Conference on*, tomo 2, págs. 885–888. IEEE. ISBN 0780394224. (Citado en pag. 65.)
- [120] **da Silva, P.A.P.** (2011). *Supervised and unsupervised spermatozoa detection, classification and tracking in imaging data*. Proyecto Fin de Carrera, Mestrado em Bionfórmica e Biología Computacional, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. URL <http://hdl.handle.net/10451/5682>. (Citado en pag. 65.)
- [121] **Ostergaard, J. y Sorensen, L.** (Mayo 2007). *Multi-object Tracking of Human Spermatozoa Using a Particle Filter*. Proyecto Fin de Carrera, Computer Science Department, University of Copenhagen. URL <ftp://130.225.96.5/diku/image/publications/oestergaard.060513.pdf>. (No citado.)

- [122] **Yang, F., Mackey, M.A., Ianzini, F., Gallardo, G. y Sonka, M.** (2005). «Cell segmentation, tracking, and mitosis detection using temporal context». En *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention, MICCAI2005*, págs. 302–309. (Citado en pag. 93.)
- [123] **Mukewar, P., Wang, G., Henning, P., Bao, G. y Wang, M.** (2005). «Segmentation of bionano images for understanding cell dynamics». En *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS'04. 26th Annual International Conference of the IEEE*, tomo 1, págs. 1759–1762. IEEE. ISBN 0780384393. (Citado en pag. 65.)
- [124] **Noguchi, M. y Nayar, S.** (1996). «Microscopic shape from focus using a projected illumination pattern». En *Mathematical and computer modelling*, 24 (5-6):31–48. (Citado en pag. 65.)
- [125] **Niederroest, M., Niederroest, J. y Scucka, J.** (2003). «Shape From Focus: Fully Automated 3D Reconstruction and Visualization of Microscopic Objects». En *6th International Conference on Optical*, págs. 236–243. Citeseer. (No citado.)
- [126] **Levi, V., Ruan, Q. y Gratton, E.** (2005). «3-D particle tracking in a two-photon microscope: application to the study of molecular dynamics in cells.» En *Biophys. J.*, 88 (4):2919–28. doi:10.1529/biophysj.104.044230. (No citado.)
- [127] **Delaby, A., Espinosa, L., Lépolard, C., Capo, C. y Mège, J.L.** (2010). «3D reconstruction of granulomas from transmitted light images implemented for long-time microscope applications». En *Journal of Immunological Methods*, 360 (1-2):10–19. doi:10.1016/j.jim.2010.06.008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175910001730>. (Citado en pag. 65.)
- [128] **Thomann, D.M.** (2003). *Algorithms for detection and tracking of objects with super-resolution in 3D fluorescence microscopy*. Tesis Doctoral, Swiss Federal Instituto Of Technology Zurich. doi:10.3929/ethz-a-004519113. Diss., Naturwissenschaften ETH Zürich, Nr. 14998, 2003. (Citado en pag. 65.)
- [129] **Fischer, R.S., Wu, Y., Kanchanawong, P., Shroff, H. y Waterman, C.M.** (2011). «Microscopy in 3D: a biologist's toolbox». En *Trends in Cell Biology*, 21 (12):682–691. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096289241100198X>. (No citado.)
- [130] **Dufour, A., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Guillen-Aghion, N., Olivo-Marin, J.C. y Zimmer, C.** (2005). «Segmenting and tracking fluorescent cells in dynamic 3-D microscopy with coupled active surfaces». En *IEEE Transactions on Image Processing*, 14 (9):1396. doi:10.1109/TIP.2005.852790. (Citado en págs. 65 y 92.)
- [131] **Anthore, R., Flament, P., Gouesbet, G., Rhazi, M. y Weill, M.E.** (1982). «Interaction between a laser beam and some liquid media». En *Appl. Opt.*, 21 (2):6–4. (Citado en pag. 66.)
- [132] **Brooks, R., Grewe, L. y Iyengar, S.** (2001). «Recognition in the wavelet domain: a survey». En *Journal of Electronic Imaging*, 10:757. (Citado en pag. 67.)
- [133] **Luo, D., Barker, J., McGrath, J. y Daly, C.** (1998). «Iterative multilevel thresholding and splitting for three-dimensional segmentation of live cell nuclei using laser scanning confocal microscopy». En *Journal of Computer-Assisted Microscopy*, 10 (4):151–162. (Citado en pag. 69.)
- [134] **Virmajoki, O. y Franti, P.** (2003). «Fast pairwise nearest neighbor based algorithm for multilevel thresholding». En *Journal of Electronic Imaging*, 12:648. (Citado en pag. 69.)
- [135] **Turk, M. y Pentland, A.** (1991). «Eigenfaces for recognition». En *Journal of cognitive neuroscience*, 3 (1):71–86. doi:10.1162/jocn.1991.3.1.71. URL <http://dx.doi.org/10.1162/jocn.1991.3.1.71>. (Citado en pag. 70.)

- [136] **Moon, H.** y **Phillips, P.J.** (2001). «Computational and performance aspects of the PCS-based face-recognition algorithms.» En *Perception*, 30:303–321. doi:10.1068/p2896. (Citado en pag. 71.)
- [137] **Otsu, N.** (1975). «A threshold selection method from gray-level histograms.» En *Automatica*, 11:285–296. (Citado en pag. 72.)
- [138] **Pimentel, J.A.** y **Corkidi, G.** (31 2010-sept. 4 2010). «Three dimensional template matching segmentation method for motile cells in 3D+t video sequences.» En *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE*, págs. 4777–4780. doi:10.1109/IEMBS.2010.5626633. (Citado en pag. 74.)
- [139] **Frenet, F.** (1852). «Sur les courbes à double courbure.» En *Journal des mathématiques pures et appliquées*, 17:437–447. (Citado en pag. 80.)
- [140] **Su, T.**, **Xue, L.** y **Ozcan, A.** (2012). «High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories.» En *Proceedings of the National ...*, págs. 3–7. doi:10.1073/pnas.1212506109. URL <http://www.pnas.org/content/early/2012/09/10/1212506109.short>. (Citado en pag. 90.)
- [141] **Cootes, T.**, **Taylor, C.**, **Cooper, D.**, **Graham, J.** et al. (1995). «Active shape models-their training and application.» En *Computer vision and image understanding*, 61 (1):38–59. (Citado en pag. 91.)
- [142] **Cootes, T.**, **Edwards, G.** y **Taylor, C.** (1998). «Active appearance models.» En H. Burkhardt y B. Neumann, eds., *Computer Vision — ECCV'98*, tomo 1407 de *Lecture Notes in Computer Science*, págs. 484–498. Springer Berlin / Heidelberg. ISBN 978-3-540-64613-6. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BFb0054760>. 10.1007/BFb0054760. (Citado en pag. 91.)
- [143] **Vonesch, C.**, **Aguet, F.**, **Vonesch, J.** y **Unser, M.** (2006). «The colored revolution of bioimaging.» En *Signal Processing Magazine, IEEE*, 23 (3):20–31. (Citado en pag. 92.)
- [144] **Servin-Vences, M.R.**, **Tatsu, Y.**, **Ando, H.**, **Guerrero, A.**, **Yumoto, N.**, **Darszon, A.** y **Nishigaki, T.** (2012). «A caged progesterone analog alters intracellular Ca²⁺ and flagellar bending in human sperm.» En *Reproduction*, 144 (1):101–109. doi:10.1530/REP-11-0268. URL <http://www.reproduction-online.org/content/144/1/101.abstract>. (Citado en pag. 92.)
- [145] **Friedrich, B.M.** y **Jülicher, F.** (2007). «Chemotaxis of sperm cells.» En *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (33):13256–13261. doi:10.1073/pnas.0703530104. URL <http://www.pnas.org/content/104/33/13256.abstract>. (Citado en pag. 93.)
- [146] **Organization, W.H.** (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Published on behalf of the World Health Organization [by] Cambridge University Press, Fifth ed^{ón}. (Citado en pag. 93.)
- [147] **Wood, C.D.**, **Nishigaki, T.**, **Tatsu, Y.**, **Yumoto, N.**, **Baba, S.A.**, **Whitaker, M.** y **Darszon, A.** (2007). «Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility.» En *Developmental Biology*, 306 (2):525–537. doi:10.1016/j.ydbio.2007.03.036. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160607002357>. (Citado en pag. 93.)
- [148] **Nascimento, J.M.**, **Shi, L.Z.**, **Meyers, S.**, **Gagneux, P.**, **Loskutoff, N.M.**, **Botvinick, E.L.** y **Berns, M.W.** (2008). «The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates.» En *J R Soc Interface*, 5 (20):297–302. doi:10.1098/rsif.2007.1118. URL <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/5/20/297.abstract>. (No citado.)
- [149] **Morisawa, M.** (1994). «Cell signaling mechanisms for sperm motility.» En *Zoological science*, 11 (5):647. (No citado.)

- [150] **Tortora, G., Funke, B. y Case, C.** (1997). «Environmental Microbiology». En *Microbiology: An introduction*, 6th edn. Benjamin/Cummings Publishing Co, California, págs. 714–725. (No citado.)
- [151] **David, G., Serres, C. y Jouannet, P.** (1981). «Kinematics of human spermatozoa». En *Gamete Research*, 4 (2):83–95. doi:10.1002/mrd.1120040202. URL <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1120040202>. (No citado.)
- [152] **Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C.V., Barratt, C.L.R. y Publicover, S.J.** (2006). «Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores.» En *Hum. Reprod. Update*, 12 (3):253–67. doi:10.1093/humupd. (No citado.)
- [153] **Suarez, S.S.** (2008). «Control of hyperactivation in sperm.» En *Hum. Reprod. Update*, 14 (6):647–57. doi:10.1093/humupd. (No citado.)
- [154] **Aderem, A.** (2005). «Systems biology: its practice and challenges.» En *Cell*, 121 (4):511–3. doi:10.1016/j.cell.2005.04.020. (No citado.)
- [155] **Chen, H., Swedlow, J.R., Grote, M., Sedat, J.W. y Agard, D.A.** (1995). «The collection, processing, and display of digital three-dimensional images of biological specimens». En *Handbook of biological confocal microscopy*, págs. 197–210. (No citado.)
- [156] **Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. y Treviño, C.L.** (2011). «Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa». En *Physiological Reviews*, 91 (4):1305–1355. doi:10.1152/physrev.00028.2010. URL <http://physrev.physiology.org/content/91/4/1305.abstract>. (No citado.)
- [157] **Olson, S.D., Suarez, S.S. y Fauci, L.J.** (2010). «A model of CatSper channel mediated calcium dynamics in mammalian spermatozoa.» En *Bull. Math. Biol.*, 72 (8):1925–46. doi:10.1007/s11538-010-9516-5. (Citado en pag. 93.)

Publicaciones generadas.

1. **Pimentel, J., Carneiro, J., Darszon, A. y Corkidi, G.** (2012).
«A segmentation algorithm for automated tracking of fast swimming unlabelled cells in three dimensions.»
En *Journal of microscopy*, 245 (1365-2818):72–81. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03545.x.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03545.x>.
2. **Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C.D., Corkidi, G. y Darszon, A.** (2011).
« Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions ».
En *Molecular Human Reproduction*, 17 (8):511–523. doi:10.1093/molehr.
URL <http://molehr.oxfordjournals.org/content/17/8/511.abstract>.
3. **Pimentel, J.A. y Corkidi, G.** (Sept. 2010).
« Three dimensional template matching segmentation method for motile cells in 3D+t video sequences ».
En *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE*,
págs. 4777–4780. doi:10.1109/IEMBS.2010.5626633.a
4. **Pimentel, A. y Corkidi, G.** (Sept. 2009).
« Mechanical vibration compensation method for 3D+t multi-particle tracking in microscopic volumes ».
En *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE*,
págs. 1429–1432. doi:10.1109/IEMBS.2009.5334169.

A segmentation algorithm for automated tracking of fast swimming unlabelled cells in three dimensions

J. A. PIMENTEL*, J. CARNEIRO†, A. DARSZON‡
& G. CORKIDI*

*Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 510–3, Cuernavaca, 62250 Morelos, Mexico

†Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781–901 Oeiras, Portugal

‡Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Celular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 510–3, Cuernavaca, 62250 Morelos, Mexico

Key words. Motility, segmentation, sperm tracking, three-dimensional analysis.

Summary

Recent advances in microscopy and cytolabelling methods enable the real time imaging of cells as they move and interact in their real physiological environment. Scenarios in which multiple cells move autonomously in all directions are not uncommon in biology. A remarkable example is the swimming of marine spermatozoa in search of the conspecific oocyte. Imaging cells in these scenarios, particularly when they move fast and are poorly labelled or even unlabelled requires very fast three-dimensional time-lapse (3D+t) imaging. This 3D+t imaging poses challenges not only to the acquisition systems but also to the image analysis algorithms. It is in this context that this work describes an original automated multiparticle segmentation method to analyse motile translucent cells in 3D microscopical volumes. The proposed segmentation technique takes advantage of the way the cell appearance changes with the distance to the focal plane position. The cells translucent properties and their interaction with light produce a specific pattern: when the cell is within or close to the focal plane, its two-dimensional (2D) appearance matches a bright spot surrounded by a dark ring, whereas when it is farther from the focal plane the cell contrast is inverted looking like a dark spot surrounded by a bright ring. The proposed method analyses the acquired video sequence frame-by-frame taking advantage of 2D image segmentation algorithms to identify and select candidate cellular sections. The crux of the method is in the sequential filtering of the candidate sections, first by

template matching of the in-focus and out-of-focus templates and second by considering adjacent candidates sections in 3D. These sequential filters effectively narrow down the number of segmented candidate sections making the automatic tracking of cells in three dimensions a straightforward operation.

Introduction

In the last four decades, efforts have been made to do three-dimensional time-lapse (3D+t) imaging of microorganisms and cells, notably to study kinematic behaviour of motile bacteria in different chemical environments (Berg, 1971, 1978; Berg & Brown, 1972; Frymier *et al.*, 1995; Vigeant & Ford, 1997; Thar *et al.*, 2000; Soni *et al.*, 2003; Wessels *et al.*, 2009). However, the low-temporal resolution of these systems precludes tracking cells or particles with velocities greater than $100 \mu\text{m s}^{-1}$, such as spermatozoa. The difficulties are particularly notorious in the case of spermatozoa of marine species, such as the sea urchin, that can swim with an average speed up to $200 \mu\text{m s}^{-1}$ (Miller, 1985; Nascimento *et al.*, 2006). When multiple cells can swim freely in all directions, such as in their natural environment, the task of tracking them in a 3D microscopical volume requires a high-image acquisition rate. On the one hand, fluorescence-labelled fast moving cells cannot be easily detected in a 3D environment because they do not emit enough photons to be distinguished from noise. By contrast, unstained cells are often not sufficiently differentiated from background or from artefacts with similar size and shape, demanding special imaging and segmentation strategies (see review from Zimmer *et al.*, 2006).

Crenshaw (1990) proposed the first system capable of tracking 3D trajectories of a single sea urchin spermatozoon

Correspondence to: Gabriel Corkidi, Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 510–3, Cuernavaca, 62250 Morelos, Mexico. Tel: +52-777-329-1710; fax: +52-777-317-2388; e-mails: corkidi@ibt.unam.mx, corkidi@sgima.ceingebi.unam.mx

Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions

Adán Guerrero¹, Jorge Carneiro², Arturo Pimentel³,
Christopher D. Wood¹, Gabriel Corkidi³, and Alberto Darszon^{1,*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México ²Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal ³Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

*Correspondence address. E-mail: darszon@ibt.unam.mx

Submitted on February 23, 2011; resubmitted on April 20, 2011; accepted on May 18, 2011

ABSTRACT: The spermatozoon must find its female gamete partner and deliver its genetic material to generate a new individual. This requires that the spermatozoon be motile and endowed with sophisticated swimming strategies to locate the oocyte. A common strategy is chemotaxis, in which spermatozoa detect and follow a gradient of chemical signals released by the egg and its associated structures. Decoding the female gamete's positional information is a process that spermatozoa undergo in a three-dimensional (3D) space; however, due to their speed and small size, this process has been studied almost exclusively in spermatozoa restricted to swimming in two dimensions (2D). This review examines the relationship between the mechanics of sperm propulsion and the physiological function of these cells in 3D. It also considers whether it is possible to derive all the 3D sperm swimming characteristics by extrapolating from 2D measurements. It is concluded that full insight into flagellar beat dynamics, swimming paths and chemotaxis under physiological conditions will eventually require quantitative imaging of flagellar form, ion flux changes, cell trajectories and modelling of free-swimming spermatozoa in 3D.

Key words: chemotaxis / Ca²⁺ signaling / sperm motility / axoneme / 3D flagellar beat

Introduction

The singular purpose of the sperm cell is to find the female gamete of its species and deliver its genetic material. Spermatozoa often display sophisticated swimming strategies in fulfilling this role. In many species, including mammals, spermatozoa locate female gametes by recognizing chemical signals released from the gametes themselves or from their associated structures—a mechanism known as chemotaxis (Publicover *et al.*, 2007; Darszon *et al.*, 2008; Kaupp *et al.*, 2008; Chang and Suarez, 2010; Guerrero *et al.*, 2010b). Spawning marine animals are commonly exploited to study sperm swimming strategies, as they provide a vast number of gametes from each individual, their physiological milieu is easy to reproduce in the laboratory and, in many instances, their sperm swim in circles close to surfaces (Miller, 1985; Cosson *et al.*, 2003; Woolley, 2003; Elgeti *et al.*, 2010)—an ideal characteristic for imaging studies (Darszon *et al.*, 2008, Kaupp *et al.*, 2008). When exposed to a chemoattractant, their sperm

often redirect their swimming paths towards its source through stereotypical sequences of turns interspersed by periods of straighter swimming. Sperm redirect their trajectory by alternately increasing flagellar beating asymmetry during turns, and decreasing flagellar asymmetry during straighter swimming episodes.

Technological difficulties related to the speed (30–200 $\mu\text{m s}^{-1}$) and small size ($\approx 4 \mu\text{m}$ head diameter) of sperm have determined that their swimming has mostly been studied in two dimensions (2D). Nevertheless, their physiological functions are performed in three-dimensional (3D) environments, and any attempt to fully characterize their function must take such considerations into account. The first report to describe how sperm swim in 3D was by Jennings (1901), whose observations indicated that sperm qualitatively display a helical trajectory in 3D. Thereafter, in 1978, Hiramoto and Baba compared the speed and diameter of 2D sperm paths when focusing a microscope at two different depths (close to the microscope slide and 300 μm above). They observed that the speed and curvature of the

Three dimensional template matching segmentation method for motile cells in 3D+t video sequences.

Pimentel J.A. and Corkidi G.

Abstract—In this work, we describe a segmentation cell method oriented to deal with experimental data obtained from 3D+t microscopical volumes. The proposed segmentation technique takes advantage of the pattern of appearances exhibited by the objects (cells) from different focal planes, as a result of the object translucent properties and its interaction with light. This information allows us to discriminate between cells and artifacts (dust or other) with equivalent size and shape that are present in the biological preparation. Using a simple correlation criteria, the method matches a 3D video template (extracted from a sample of cells) with the motile cells contained into the biological sample, obtaining a high rate of true positives while discarding artifacts. In this work, our analysis is focused on sea urchin spermatozoa cells but is applicable to many other microscopical structures having the same optical properties.

I. INTRODUCTION

The acquisition and analysis related with the dynamic behavior of 3D+t microscopical systems have been an important field of research in the last decade. In this context, the segmentation of moving objects from video sequences is a necessary stage. Particularly, biological applications related to moving cells day by day require better performing algorithms to acquire, track and analyze their 3D trajectories in given volumes. It is in this context that we have recently developed a system permitting to visualize and analyze 3D paths of multiple sperm swimming simultaneously [1]. This system was based on a piezoelectric device displacing a large focal distance objective mounted on a microscope to acquire 3D stacks of images at a high rate of 4200 fps, spanning a depth of $100\ \mu\text{m}$. For the first time with this system, it was demonstrated quantitatively that the proximity to a nearby surface impacts the motile behavior of sea urchin spermatozoa, having important implications for currently published analyzes of spermatozoa swimming parameters and their dynamic regulation during processes such as chemotaxis, which have been nearly universally obtained with sperm swimming in 2D [2]. Nevertheless, in that work, only few spermatozoa were analyzed since their 3D segmentation and tracking were made semi-automatically due to the inherent difficulty to recognize them automatically. For a higher number of cells to be analyzed, an automatic segmentation method is highly suited. Methods as Shape from Focus (SFF) use information related to the appearance change of microscopic objects under focal plane variations

but are mainly devoted to determine the shape of static 3D structures ([3], [4], [5], [6]). In this work, we propose an original cell segmentation approach that gains profit from the peculiar pattern of appearances exhibited by the cells when observed at different focal planes, as a result of their translucent properties and their interaction with light. This pattern is used to create a 3D video sequence template that matches very well with true sperm, discarding artifacts with equivalent size and shape contained inherently in the biological preparation. With this method, the automatic 3D tracking of this kind of cells becomes a straightforward operation.

II. EXPERIMENTAL SYSTEM DESCRIPTION.

The experimental method employed to acquire the 3D+t spermatozoa displacement information is based on a piezoelectric device attached to a microscope objective that oscillates meanwhile a high speed camera acquires the images sequences that contain the 3D+t information (for more detail see [1]). For the simplicity of a further tracking procedure, the piezoelectric oscillation frequency and the camera frame rate are set so as to assure that between successive volumetric scans, the two consecutive x,y,z positions of a spermatozoon is separated as far as two bodies diameter¹ (Fig. 1).

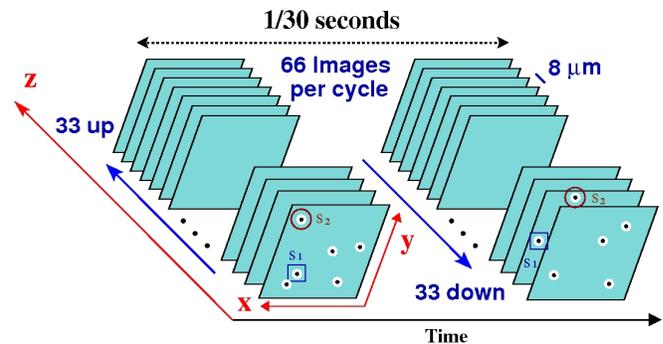


Fig. 1. Data acquisition scheme used to store the volumetric information about the spermatozoa displacement. For tracking purposes, the piezoelectric frequency (30 Hz) and the camera frame rate (2000 fps) are adjusted to assure that between two successive volumetric scans, each spermatozoon remains into a vicinity of two bodies¹ length relative to its previous position. This principle is illustrated labeling two different spermatozoa as S_1 and S_2 in two consecutive scans.

Pimentel J.A. is with the PhD program in Engineering and Computer Science, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CU Distrito Federal, Mexico. arturo.pimentel@gmail.com

Corkidi G. is with the Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Cuernavaca, MOR 62250, Mexico. corkidi@ibt.unam.mx

¹The images are acquired using a long working distance objective of 40 X mounted on a piezoelectric device that oscillates at 30 Hz, spanning a depth of $250\ \mu\text{m}$ while the camera acquisition rate is of 2000 fps. The average size of the sea urchin spermatozoon is $4\ \mu\text{m}$ of body diameter and $50\ \mu\text{m}$ of tail, its average velocity is on the order of $250\ \mu\text{m}/\text{s}$. See also [7] for details of secondary (resonance) piezoelectric vibrations removal.

Mechanical Vibration Compensation Method for 3D+t Multi-Particle Tracking in Microscopic Volumes.

Pimentel A. and Corkidi G.

Abstract—The acquisition and analysis of data in microscopic systems with spatiotemporal evolution is a very relevant topic. In this work, we describe a method to optimize an experimental setup for acquiring and processing spatiotemporal (3D+t) data in microscopic systems. The method is applied to a three-dimensional multi-tracking and analysis system of free-swimming sperm trajectories previously developed. The experimental set uses a piezoelectric device making oscillate a large focal-distance objective mounted on an inverted microscope (over its optical axis) to acquire stacks of images at a high frame rate over a depth on the order of 250 microns. A problem arise when the piezoelectric device oscillates, in such a way that a vibration is transmitted to the whole microscope, inducing undesirable 3D vibrations to the whole set. For this reason, as a first step, the biological preparation was isolated from the body of the microscope to avoid modifying the free swimming pattern of the microorganism due to the transmission of these vibrations. Nevertheless, as the image capturing device is mechanically attached to the “vibrating” microscope, the resulting acquired data are contaminated with an undesirable 3D movement that biases the original trajectory of these high speed moving cells. The proposed optimization method determines the functional form of these 3D oscillations to neutralize them from the original acquired data set. Given the spatial scale of the system, the added correction increases significantly the data accuracy. The optimized system may be very useful in a wide variety of 3D+t applications using moving optical devices.

I. INTRODUCTION

Automated tracking and analysis of moving objects in image sequences has been and continues to be a major theme in digital image analysis research. Within this field, one important and relatively novel area with applications in several knowledge fields is the study of microscope based systems with spatiotemporal evolution (3D+t). Results in this area are promoting important social and economic impact, specially concerning the human reproduction field. Achieving robustness and high accuracy in tracking and motion analysis in images is hampered by factors that limits the spatial resolution of the microscope, the signal noise embedded in the measurements and the large variability of the systems image data attributed to the intrinsic heterogeneity of the systems under study [1].

Despite many challenges remaining, there are notable technical advances in 3D+t data acquisition. As an example, an

This work was supported by DGAPA-UNAM under Grant IN111909 to Corkidi G.

Pimentel A. is with the PhD program in Engineering and Computer Science, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CU Distrito Federal, Mexico. arturo.pimentel@gmail.com

Corkidi G. is with the Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Cuernavaca, MOR 62250, Mexico. corkidi@ibt.unam.mx

interesting case is the work of Göbel *et al* [2] that introduces an experimental system based in two photon microscopy that permits fast fluorescence measurements from several hundred cells distributed in a 3D space. They combined sinusoidal vibration of the microscope objective at 10 Hz with movements of galvanometric x-y scanners to repeatedly scan the laser focus along a closed 3D trajectory. Likewise, in their work, Cang *et al* [3] introduces an experimental device based on confocal microscopy that uses a near-infrared laser and a dark-field condenser for illumination of a gold nanoparticle. By monitoring the scattered light from the nanoparticle with the use of a piezoelectric stage, the system was able to continuously bring the diffusive particle in a glycerol/water solution back to the focal volume with spatial resolution and response time of less than 210 nm and a millisecond, respectively.

More recently, we have developed a new image acquisition approach for 3D multi-tracking of spermatozoa using a single camera and a single optical microscope [4], [5]. In this system, a piezoelectric device was mounted between the long distance objective of the microscope and the turret. This device was driven with an amplified ramp signal to make it oscillate at up to 70 cycles per second, while acquiring synchronously at different focal planes (in a depth of 100 μm) the images of free-swimming spermatozoa at a rate of 4,200 images per second. This produced the necessary data to track their trajectories in three dimensions. In several other experimental systems for analysis of the systems 3D+t, the piezoelectric is employed to achieve nano-metric displacements of the microscope objective, [6], [7], [8], [9], [10], [11].

Nevertheless, when the piezoelectric oscillation reaches high frequencies (with high loads as the microscope objectives), the mechanical vibration transmitted to the microscope could become an important factor into the noise sources for the data. One work that take into account this factor and evaluate the total error of the tracking procedure in the determination of the particle position is presented by Levi *et al* in [7], where a method for three-dimensional fluorescent particle tracking using a two-photon excitation microscope is proposed. The standard deviation of the positions of the particles is estimated by measuring the trajectory of 500 nm fluorescent beads, nevertheless, no correction is proposed.

In this work we introduce an original and useful method to determine and eliminate the artificial data component induced by the piezoelectric device through mechanical vibrations in optical microscope-based systems for three-dimensional scanning in micro volumes.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA
COMPUTACIÓN

TESIS DOCTORAL

para obtener el grado de

Doctor en Ciencias (Computación)

de la Universidad Nacional Autónoma de México

Presenta

Jaime Arturo PIMENTEL CABRERA

Sistema de rastreo tridimensional de micro-partículas: aplicación en el rastreo de espermatozoides al nado libre

Director de Tesis: Dr. Gabriel I. CORKIDI BLANCO

Jurado

- ▶ Dr. Boris ESCALANTE RAMÍREZ - Facultad de Ingeniería, UNAM.
- ▶ Dr. Gabriel I. CORKIDI BLANCO - Instituto de Biotecnología, UNAM.
- ▶ Dr. Francisco GARCÍA UGALDE - Facultad de Ingeniería, UNAM.
- ▶ Dr. Fernando ARÁMBULA COSIO - CCADET, UNAM.
- ▶ Dr. Joaquín AZPIROZ LEEHAN - CIIM, UAM-Iztapalapa.

