



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA - PROCESAMIENTO DIGITAL DE SEÑALES

RASTREO DE PARTÍCULAS EN IMÁGENES DE
MICROSCOPIA DE LUZ REFLEJADA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

EFRAÍN ALBOR RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR GARDUÑO ÁNGELES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATEMÁTICAS APLICADAS Y EN SISTEMAS

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Ante todo, me gustaría agradecer al campo disciplinario de Procesamiento Digital de Señales del Posgrado en Ingeniería Eléctrica por darme la oportunidad de realizar mis estudios, por proporcionarme todo lo necesario para cumplir con mis obligaciones académicas y brindarme todas las herramientas para mi formación.

Estoy especialmente agradecido con los doctores Edgar Garduño Ángeles y Luis Alfonso Vaca Domínguez por aceptarme como su tutorado, por asesorarme, por su paciencia, por todos los consejos que me dieron y haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto que me permitió conocer un área de la ingeniería biomédica de la cual quedé fascinado.

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que se me proporcionó, mediante la beca asignada con Número de Apoyo: 724396.

Agradezco al equipo del Dr. Garduño, César, Rosario, Jeison, Miguel y Daniel por su ayuda en este proyecto al igual que el laboratorio del Dr. Vaca, Jesús, Daniel, Margarita, Adolfo, la Dra. Alicia y a doña Salus por su apoyo y consejos para mejorar en mi proyecto y en mi formación. También quiero agradecer a todos los profesores que me dieron clase y sobretodo a la Dra. Jimena Olveres Montiel por toda la ayuda que me brindó en la parte teórica de mi proyecto y de igual forma agradezco tanto a la Dra. Jimena como al Dr. Jesús Savage Carmona por todo su apoyo en mis estudios del posgrado.

Finalmente quiero darles las gracias a mi familia por apoyarme en mis decisiones, escucharme, aconsejarme y confiar en mí. Le agradezco mucho a mi novia Carmina por apoyarme desde un inicio en este proyecto, escuchandome, dandome consejos, no

permitir que me rindiera y dandome fuerzas para cumplir esta meta.

Resumen.

El Análisis de Seguimiento de Nanopartículas, denominado NTA por sus siglas en inglés, es una técnica de microscopía utilizada para determinar el tamaño de las partículas por medio de la ecuación de Stoke-Einstein donde se contempla a las partículas suspendidas en un líquido con un movimiento Browniano. Para realizar el cálculo, primero se requiere obtener la velocidad de desplazamiento de cada partícula por medio de su seguimiento a través de una cámara de video utilizando microscopía de luz reflejada o de fluorescencia.

Para el seguimiento se propone la implementación de una técnica diferente a la utilizada en la mayor parte de la literatura donde se realiza un análisis espacio-temporal del video. Lo que proponemos en este trabajo es cambiar el seguimiento de partículas en movimiento a un seguimiento de ramificaciones, convirtiendo el video en una imagen tridimensional y cambiando el problema espacio-temporal a un problema únicamente espacial. Para esto se plantea utilizar un método basado en seguimiento de vasos sanguíneos en imágenes tridimensionales [26] implementando un método de aprendizaje de máquina que combina el algoritmo *Random Forest* con el método *Steerable Filters* para la obtención de los vectores característicos y complementado con el algoritmo *Fast Marching* para determinar la trayectoria de cada partícula o línea central de la ramificación.

Abstract.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) is a microscopy technique which is used to determine the size of particle using the Stoke-Einteins equation, where the particles envisaged are suspended in fluid with a Brownian movement. To perform the estimate, first it is required to obtain the displacement velocity of each particle, this is typically done ussing a videocamera tracking system based on reflected light microscopy or fluorescence microscopy.

For tracking the particles in the acquired videos, we propose an implementation with a different technique to the one used in many papers where a temporal-space analysis of the video is performed. Our proposal here is to change the tracking of particle movements in the acquired videos to the analysis of branches in 3D images, for this we convert a video to a 3D image thus changing the temporal-spatial problem into a spatial-only one. To achieve this goal, we use a method to track blood vessel in three-dimensional images [26]; this method implements a machine learning approach that combines *Random Forest* and *Steerable Filters* techniques to obtain feature vectors. These vectors are in turn processed by the *Fast Marching* algorithm to determinate the path followed by particles or the central lines of the branches.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Objetivo.	5
1.2. Justificación.	5
2. Microscopía Óptica	7
2.1. Principios de Óptica.	9
2.2. Máxima Resolución	11
3. Seguimiento de Partículas	17
3.1. Estado del arte.	17
3.2. Propuesta	21
3.2.1. Filtros Orientables (<i>Steerable Filters</i>)	23
3.2.2. Bosques Aleatorios (<i>Random Forest</i>)	25
3.2.2.1. Árboles de clasificación y regresión	26
3.2.2.2. Bosque aleatorios	30
3.2.3. <i>Fast Marching</i>	31
4. Metodología y Resultados	37
4.1. Preprocesamiento y Filtros orientables.	37
4.2. Etapa de aprendizaje de máquina.	40
4.3. <i>Fast Marching</i> y <i>Radial Symmetry center</i>	44
4.4. Evaluación del algoritmo.	48
5. Conclusiones y Trabajo Futuro	55

5.1. Aportaciones.	57
5.2. Perspectivas.	57
Bibliografía	59

Índice de figuras

2.1.	Esquemas del comportamiento de la luz en (a) el microscopio de luz transmitida y (b) el microscopio de luz reflejada.	8
2.2.	Esquema del fenómeno de reflexión y refracción de un rayo incidente, representado por la flecha \bar{a} , que viaja por el medio con índice refractivo n_a que resulta en un rayo reflejado, flecha \bar{b} , y un rayo refractado, flecha \bar{c} , que viaja por el medio con índice refractivo n_c	10
2.3.	Esquema del patrón de difracción de Fraunhofer que se presenta con una pequeña ranura rectangular.	13
2.4.	Esquema de un patrón de difracción de Fraunhofer circular.	14
2.5.	Patrones de difracción con diferentes diámetros de abertura [27]. Las aberturas de la imagen (a) son mas pequeñas que la abertura (b) y (c) siendo la última imagen la que tiene las aberturas mas grandes.	14
3.1.	Primera etapa para el seguimiento de partículas, (a) de las muestras obtenidas para cada frame de todo el video (b) se busca separar las partículas del fondo para posteriormente (c) identificar cada partícula por medio de la coordenada de su centro. (Las partículas presentadas en la imagen (a) fueron adquiridas en el laboratorio del Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.)	18
3.2.	Segunda etapa para el seguimiento de partículas. Con las partículas localizadas durante todo el video se implementa un método para enlazar a cada partícula entre cada cuadro.	20

3.3.	Ramificación generada a partir de un conjunto de parches consecutivos de un video de las muestras obtenidas en el laboratorio, donde se visualiza la misma partícula en movimiento cambiando el dominio del tiempo por el eje z (eje vertical).	22
3.4.	Diagrama de bloques del método propuesto para el seguimiento de partículas.	22
3.5.	Diagrama de un árbol del metodo CART para clasificación.	25
3.6.	Medidas de impureza, el eje horizontal equivale a la probabilidad de la clase $P(y = 1)$ y el eje vertical equivale al índice de impureza.	28
3.7.	Diagrama del método Random Forest.	30
3.8.	Implementación del algoritmo Fast Marching para obtener el camino hacia la salida en un laberinto.	34
4.1.	Filtrado del parche con ramificación, mostrando un cuadro del parche donde se visualiza la partícula y la respuesta del filtrado en el mismo cuadro. El primer cuadro se muestra la partícula detectada, los siguientes nueve cuadros con secuencia $(1, 0, 0)$, $(1, 1, 0)$, \dots , $(2, 2, 2)$ son el resultado de el primer cuadro filtrado con el filtro Gaussiano cuyo orden de derivada m, a, b corresponde a los digitos superiores y varianza de 1.7. Los siguientes nueve cuadros son el resultado del primer cuadro filtrado utilizando una varianza de 4.2.	38
4.2.	Muestra de los nueve filtros con varianza de 1.7 para el método de <i>Steerable Filters</i> .	39
4.3.	Diagrama para el cálculo de los vectores característicos con diferentes rotaciones. Ya que se desconoce la dirección de desplazamiento de la ramificación, para el parche $\mathcal{P}_c(x, y, z)$ se obtiene multiples vectores característicos realizando la convolución $\mathcal{P}_c * G_{m,a,b}$ con diferentes ángulos. El ángulo con mayor probabilidad designará el valor categórico del parche.	40
4.4.	Resultado de la etapa de clasificación mostrando un cuadro del video.	41

4.5.	Etapa de Random Forest para el cálculo del centro de la ramificación por medio de la distancia mínima entre el centro c del parche y el centro o de la ramificación.	42
4.6.	Etapa de Mapa de centros mostrando los cuadros con propuestas de centros de un parche identificado como ramificación. (a) Se muestran todos los centros propuestos, con puntos rojos, dentro de un parche obtenidos por el método de <i>Random Forest</i> , (b) en cada cuadro del parche donde hubo asignación de centros se eliminan todas las propuestas de centros ubicados fuera del área de la partícula que posee mayor intensidad. (c) En cada parche se realiza un promedio de todos los centros ubicados dentro del área obteniendo un centro por cada cuadro, (d) seleccionando el cuadro con mayor número de propuestas de centros.	43
4.7.	Resultado del método de <i>Fast Marching</i> mostrando la línea central uniendo dos centros pertenecientes a la misma ramificación. Conforme aumenta la expansión del frente de onda, asignando el origen en el cuadro 1, el tiempo de expansión va aumentando y su distribución depende de la función de velocidad asignada en cada cuadro. La línea central es adquirida buscando el camino con el menor tiempo a partir del centro ubicado en el cuadro 15 representado con un punto oscuro en la imagen donde se muestra la partícula.	46
4.8.	Comparación de los resultados obtenidos con el método de <i>Fast Marching</i> y <i>Radial Symmetry Center</i> mostrando tres partículas con diferentes desplazamientos hacia el fondo de la muestra cada uno. (a) La primera partícula tiene un desplazamiento momentaneo durante unos cuadros del video, (b) la segunda partícula no presenta desplazamientos significativo hacia el fondo y (c) la tercera partícula tiene un desplazamiento paulatino hasta desaparecer.	47
4.9.	Tiempo de procesamiento para cada parche desde la obtención de los vectores característicos hasta el cálculo de los centros en la etapa de <i>Random Forest</i>	49

4.10.	Evaluación del algoritmo para la detección de partículas. (a) Evaluación de todos los resultados obtenidos por cada video, (b) visualización del porcentaje de partículas detectadas correctamente contemplando únicamente los resultados de partículas correctas e incorrectas mostrados en la gráfica (a).	50
4.11.	Videos utilizados para la evaluación de la detección de partículas con diferente saturación de partículas y brillo.	51
4.12.	Simulación de video de partículas en movimiento para la evaluación de la estimación de los centros de cada partícula a través del tiempo. . . .	52
4.13.	Evaluación del seguimiento de partículas comparando la distancia Manhattan entre el centro obtenido y el centro real, utilizando los métodos Fast Marching (FM)y Radial Symmetry Center (RSC) con cuatro partículas.	54

Capítulo 1

Introducción

La microscopía es un conjunto de técnicas e instrumentos que desempeñan un papel importante para la observación de objetos que se encuentran más allá del rango de resolución del ojo humano (una buena agudeza visual puede resolver objetos separados 1.75mm a una distancia de 6 metros). Por lo tanto, estas técnicas e instrumentos son muy importantes en los ámbitos científico y médico; en particular, son esenciales para la investigación en biología en donde tienen una función relevante para el estudio y análisis de eventos a nivel celular y de partículas. De hecho, la invención del microscopio óptico y las observaciones realizadas por Hooke y van Leeuwenhoek permitieron acuñar el término “célula” y marcaron el inicio de la imagenología en biología [25].

El desarrollo de los campos físico y biológico han estimulado la necesidad de encontrar métodos novedosos de microscopía para visualizar cierto tipo de partículas e identificar sus propiedades físicas sobre todo considerando que la microscopía óptica tiene una resolución máxima de 200 nanómetros que limita las observaciones que se pueden hacer de partículas u objetos biológicos cuyo tamaño es menor a dicha resolución limite, en el Capítulo 2 abundaremos sobre este tema.

Uno de los grandes avances para poder obtener observaciones a mayor resolución consistió en descubrir la forma de poder utilizar longitudes de onda menores a las del espectro visible, en particular en el rango 380-740 nm. Uno de los instrumentos que ha permitido esta capacidad es el microscopio electrónico de transmisión el cual puede lograr imágenes con un poder de resolución máximo, en condiciones ideales, cercano a los 0.5 nm [30, 16]. Estos avances no fueron únicamente en el desarrollo de nuevos

instrumentos, también se ha incorporado tecnología que involucra la implementación de métodos de procesamiento digital de señales e imágenes; por ejemplo, gracias a esta idea se diseñó el microscopio de efecto túnel que se utiliza para obtener imágenes de la materia a escala nanométrica, pudiendo alcanzar resolución de 0.1 nm. Su principio se basa en el concepto de efecto túnel que brevemente consiste en colocar una punta conductora muy cerca de la superficie a ser examinada, una corriente de polarización aplicada entre la punta y la superficie permite a los electrones pasar de un lado a otro a través del vacío entre ellas. La información que contienen las imágenes producidas con este instrumento están relacionadas a la información de los cambios de la corriente conforme la punta barre la superficie.

El seguimiento de partículas es otra técnica de microscopía que cobra cada vez mas importancia ya que permite la obtención de datos de partículas o células a una escala micro y nanométrica. Por medio de esta técnica se puede revelar información crítica sobre el transporte de moléculas (por ejemplo, proteínas) dentro de las células o acerca de propiedades mecánicas y estructurales del entorno celular. En el segundo capítulo de este trabajo se presentarán los avances en el desarrollo de algoritmos para el seguimiento de partículas.

Una técnica muy utilizada para el análisis de nanopartículas, especialmente para determinar sus tamaños, es la Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés) que consiste en incidir un rayo de luz al recipiente que contiene a las partículas, que se encuentran suspendidas en un líquido y las cuales se mueven aleatoriamente (movimiento Browniano), y medir con los sensores del instrumento la luz dispersada por ellas; la señal adquirida permite obtener la distribución de los tamaños de las partículas en la muestra. Esta técnica es preferida por su bajo tiempo de medición, su bajo costo y por su capacidad de analizar un mayor número de partículas en una sola muestra, aunque también existe el inconveniente de tener una alta sensibilidad con partículas grandes que pueden ser ajenas a la muestra que se desea analizar. Por otra parte, existe un método similar nombrado Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) que utiliza la dispersión de la luz causada por las partículas con movimiento Browniano pero cambiando la medición de la dispersión

por su seguimiento a través de una cámara de video; el tamaño de cada partícula se calcula por medio de la ecuación de Stoke-Einstein [6, 3].

Existen diversas otras técnicas de microscopía para el estudio de partículas de tamaño nanométrico y el uso de cada técnica dependerá tanto de las mediciones que se desean realizar como las propiedades físicas de la muestra ya que todas las técnicas tienen sus ventajas y desventajas.

Lamentablemente, los métodos e instrumentos de microscopía que se encuentran en el mercado capaces de hacer el seguimiento de partículas tienen un elevado costo económico, además de presentar problemas en el seguimiento a causa de partículas en el fondo, por el cruce entre partículas, entre otros problemas habituales que se explicarán con mayor detalle en el Capítulo 3. Es por ello que este trabajo plantea el desarrollo de un sistema de seguimiento de partículas que implemente métodos modernos de procesamiento de imágenes y que opere en un instrumento existente en los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Para este trabajo se utilizaron partículas fabricadas en laboratorio que se denominan poliedras porque están conformadas por la proteína poliedrina, cuyo tamaño es menor a los 200 nanómetros ($28.642 \text{ kDa} \approx 4.047 \text{ nm}$). La investigación y fabricación de estas poliedras son de suma importancia para la producción de vacunas [33]. Dentro del proceso de su fabricación, es importante conocer el tamaño de las poliedras que se producen para su buen funcionamiento en las vacunas pero se tiene el inconveniente de no poder visualizarlas en ningún tipo de microscopio óptico (de campo claro, estereoscópico, de campo oscuro, contraste de fases, invertido, de luz polarizada/polarizante, Nomarski, o confocal) debido a que el tamaño de la partícula es menor a la longitud de onda de la luz visible, imposibilitando la medición de su tamaño. Por otro lado, existen los microscopios electrónicos (de transmisión y de barrido) capaces de visualizar estas partículas, el inconveniente de usar éstos para la visualización de estas partículas se encuentra en la alta potencia energética que poseen los electrones, como consecuencia hay que realizar una preparación previa de la muestra que implican fijación y deshidratación química que pueden afectar el tamaño de las partículas [3, 8], a diferencia de las técnicas como DLS y NTA que solo

requieren de las partículas suspendidas en un medio líquido como una solución buffer de fosfatos que no altera sus propiedades físicas. La posible alteración de la estructura de las poliedras es uno de los principales problemas para su medición, es por eso que tampoco resulta útil el microscopio de efecto tunel ni de fuerza atómica.

Como solución a este problema, se ha planteado determinar el tamaño de las partículas usando la técnica NTA en conjunto con la ecuación de Stoke-Einstein definida como [23]

$$d_h = \frac{K_B T t_s}{3\pi\eta D},$$

donde d_h es el diámetro hidrodinámico de una partícula, T es la temperatura de la muestra en grados Kelvin, K_B es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad del medio, D es el desplazamiento medio cuadrático y t_s es el tiempo que toma el desplazamiento de la partícula. Como se puede ver de la ecuación anterior, para obtener el diámetro de una partícula se necesitan conocer el tiempo de desplazamiento y el desplazamiento medio cuadrático. Para obtener dichos valores, se ha propuesto el desarrollo y la implementación de algoritmos para el seguimiento de partículas que utilizan secuencias de imágenes obtenidas por una cámara de video a partir de la información generada en microscopía de luz reflejada, dicha información consiste en la dispersión de la luz de cada partícula lo cual permite visualizarlas para su seguimiento.

El objetivo principal de este proyecto es realizar el seguimiento de partículas utilizando un algoritmo diferente. Para el desarrollo de este algoritmo, se ha propuesto analizar el movimiento de las poliedras como si sus trayectorias fuesen ramificaciones y utilizar un método de aprendizaje de máquina que combina el algoritmo *Random Forest* con el método *Steerable Filters* para la obtención de los vectores característicos cuyos resultados se complementan con el algoritmo de *Fast Marching* para el trazado de las ramificaciones (trayectorias), tal y como se propone en el artículo [26] en el cual se realiza el seguimiento de vasos sanguíneos en imágenes tridimensionales usando dicha combinación de métodos. En este trabajo se proponen algunas modi-

ficaciones para la obtención adecuada del centro de una partícula en cada recuadro (*frame*) de un video. En el Capítulo 4 se dará una explicación más detallada sobre esta propuesta y sobre los algoritmos implementados.

En el siguiente capítulo se dará una breve explicación del principio del microscopio óptico y la causa de su máxima resolución. En el Capítulo 3 se mostrará el estado del arte para seguimiento de partículas y se dará una explicación más detallada de la propuesta de este proyecto. Después, en el Capítulo 4 se expondrá la metodología con sus respectivos resultados, para concluir la presentación en el Capítulo 5 se presentarán las conclusiones de este proyecto junto con las perspectivas y las aportaciones.

1.1. Objetivo.

Desarrollar un algoritmo para seguimiento de partículas buscando analizar el movimiento de las poliedras (partículas fabricadas en laboratorio) como si sus trayectorias fuesen ramificaciones utilizando un método de aprendizaje de máquina propuesto en el artículo [26] en el cual se realiza el seguimiento de vasos sanguíneos en imágenes tridimensionales.

1.2. Justificación.

Todas las técnicas de microscopía tienen ventajas y desventajas dependiendo de las propiedades físicas de las muestras y las mediciones que se desean realizar. La técnica NTA resulta apropiada para determinar el tamaño de las nanopartículas sin alterar sus propiedades físicas.

Debido a que las partículas se encuentran suspendidas en un líquido, estas tienen libertad de movimiento dificultando su seguimiento ya que pueden desaparecer durante el video, esto a causa de diferentes fenómenos como superposición entre partículas, un desplazamiento hacia el fondo, saturación de las muestras, ruido luminoso entre otras cosas. Es por ello que este trabajo plantea el desarrollo de un sistema de seguimiento de partículas que implemente métodos modernos de procesamiento de

imágenes y que opere en un instrumento existente en los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Capítulo 2

Microscopía Óptica

Existen básicamente dos tipos de microscopios cuyo funcionamiento básico utiliza a la luz (se entiende como luz a las longitudes de onda que comprenden el espectro visible) como fuente de energía para formar las imágenes aumentadas y detalladas de todos los elementos que componen una partícula y que el ojo humano no logra observar: el microscopio fotónico/óptico simple, o lupa, y el microscopio fotónico/óptico compuesto; este tipo de clasificación se basa en el número de lentes que se utilizan en cada instrumento para visualizar una muestra. Ambos esquemas se conocen como microscopía óptica [16].

Los microscopios ópticos también pueden ser clasificados como microscopios de luz transmitida, ver Figura 2.1(a), y microscopios de luz reflejada, ver Figura 2.1(b), los cuales se diferencian entre sí en la forma en que la muestra interactúa con la luz emitida; como se observa en el esquema de la Figura 2.1(a), el rayo de luz emitido atraviesa la muestra hasta llegar al ocular, a diferencia del esquema de la Figura 2.1(b) en donde la dispersión de la luz que incide sobre la muestra se visualiza en el ocular [16].

Para una mejor comprensión del concepto de resolución máxima, en este capítulo se explicarán únicamente los fenómenos físicos que se presentan en el microscopio de luz transmitida.

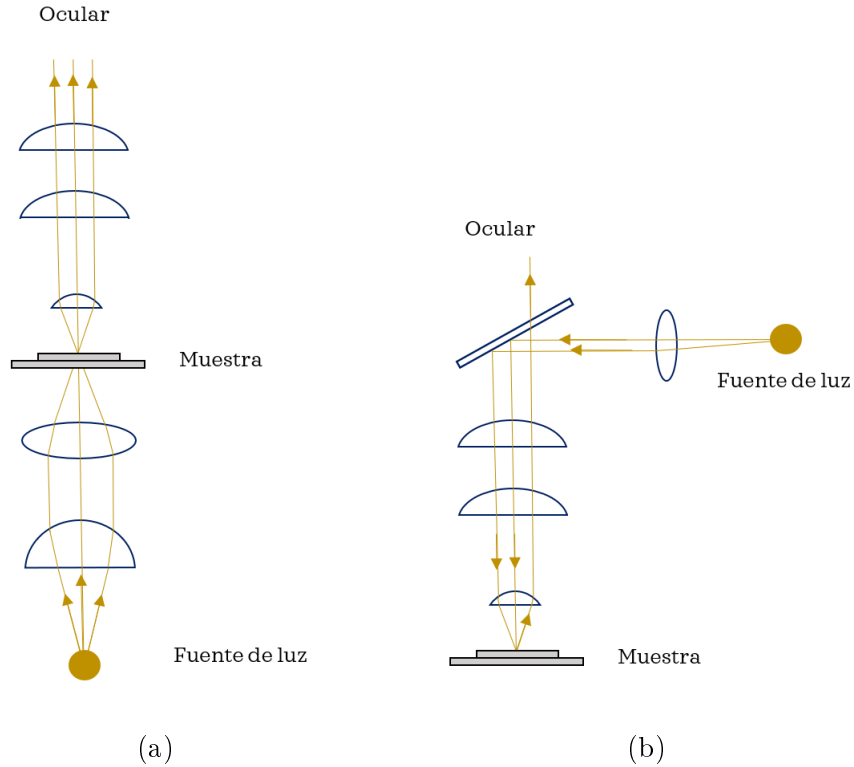


Figura 2.1: Esquemas del comportamiento de la luz en (a) el microscopio de luz transmitida y (b) el microscopio de luz reflejada.

Este tipo de microscopía tiene como base la óptica (estudio del comportamiento y de las propiedades de la luz y su interacción con la materia), la cual permite comprender las principales limitantes físicas que tiene esta modalidad como es el caso de la máxima resolución obtenible. Para una mejor comprensión de la óptica básica y de la luz es indispensable conocer primero el concepto de onda electromagnética.

Se puede considerar que una onda electromagnética es una onda formada a partir de un campo eléctrico y un campo magnético con variabilidad sinusoidal, los cuales son perpendiculares entre sí y ambos campos son perpendiculares a la dirección de propagación de la onda cuya velocidad es de $299,792.458 \text{ km/s}$ y no requiere de un medio para propagarse permitiendo a ésta radiación viajar a través del espacio, a diferencia de una onda mecánica como el sonido que si requiere de un medio de propagación como el aire [27, 12, 7].

Dos características muy importantes de una onda electromagnética son la distancia entre las repeticiones de la forma de onda denominado longitud de onda y el número

de oscilaciones por segundo también nombrado frecuencia; la frecuencia y la longitud de onda están reciprocamente relacionadas. Por otra parte, la energía que transporta una onda electromagnética depende del número de oscilaciones (mientras mayor sea su frecuencia, la energía transportada crece) y dicha energía es un factor para la aplicación que se le puede dar a la onda electromagnética. Por lo tanto, el comportamiento de una onda electromagnética está determinado por su frecuencia o longitud de onda ya que su energía se encuentra directamente relacionada a ellas. El espectro electromagnético representa el rango de todos los tipos de radiación electromagnética y representa la distribución de la energía transportada de una onda electromagnética en relación tanto de su frecuencia como de su longitud de onda [5, 12, 7].

2.1. Principios de Óptica.

La óptica es una rama de la física que estudia el comportamiento de la luz y las ondas electromagnéticas y realiza dichos estudios en dos grandes áreas: la óptica física encargada del estudio de la naturaleza ondulatoria de la luz y la óptica geométrica que estudia los rayos luminosos y su propagación [27, 15]. Para el estudio de la óptica geométrica es de suma importancia conocer el concepto de reflexión y refracción.

Cuando un haz de luz incide sobre una superficie transparente se pueden generar una combinación de los fenómenos de reflexión y de refracción cuyo peso de cada uno depende del ángulo de incidencia y del tipo de material que compone la superficie y por lo tanto define sus propiedades ópticas [12]. Esto se puede ejemplificar mejor en la Figura 2.2 donde un rayo luminoso, representado por la flecha \bar{a} , incide sobre una superficie y se descompone en dos rayos con diferente dirección y ángulo respecto al mismo plano de la superficie, representados por las flechas \bar{b} y \bar{c} , respectivamente.

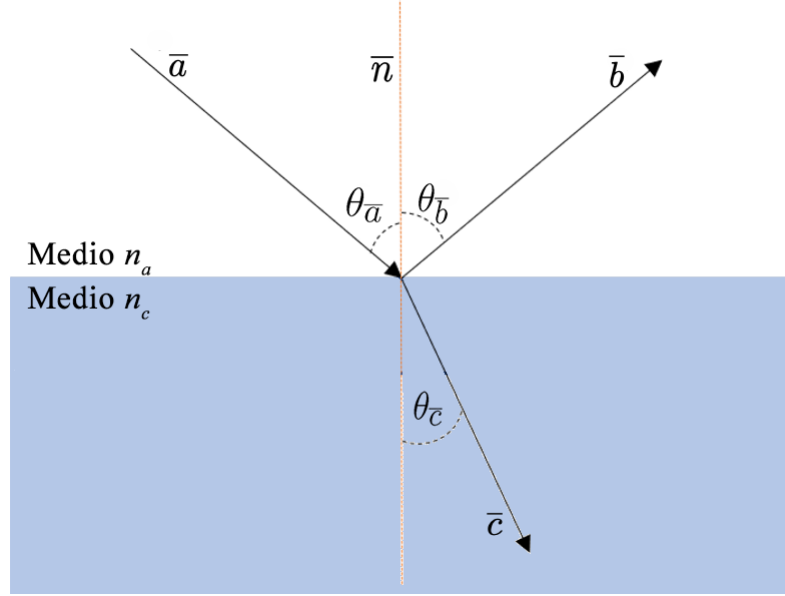


Figura 2.2: Esquema del fenómeno de reflexión y refracción de un rayo incidente, representado por la flecha \bar{a} , que viaja por el medio con índice refractivo n_a que resulta en un rayo reflejado, flecha \bar{b} , y un rayo refractado, flecha \bar{c} , que viaja por el medio con índice refractivo n_c .

El rayo reflejado \bar{b} tiene el sentido contrario al rayo incidente y también cambia la dirección, la cual está determinada por el ángulo $\theta_{\bar{b}}$, formado entre este vector y la normal a la superficie \bar{n} en el punto en que incidió el rayo \bar{a} , este ángulo es el mismo ángulo que existe entre los vectores \bar{a} y \bar{n} ($\theta_{\bar{a}}$); La Figura 2.2 es un ejemplo de reflexión especular que involucra una superficie lisa, por otra parte, existe la reflexión difusa que implica una dispersión de la luz reflejada a partir de una superficie aspera [27]. El rayo refractado \bar{c} atraviesa la superficie cambiando el ángulo con respecto a la normal \bar{n} , este cambio de dirección está determinado por la diferencia en índices de refracción entre los medios en los que viaja el rayo incidente \bar{a} y el refractado \bar{c} , si $n_c > n_a$ entonces el ángulo $\theta_{\bar{c}}$ será menor a $\theta_{\bar{a}}$ y si $n_c < n_a$ entonces el ángulo $\theta_{\bar{c}}$ será mayor [27]; cabe mencionar que el fenómeno de refracción no puede doblar el haz de luz tanto para que el rayo refractado se encuentre en la misma zona, respecto a la normal, del rayo incidente [12, 15]. Este cambio en el ángulo en el rayo refractado se debe a un cambio en la velocidad de propagación de la onda al pasar del medio en que viaja el rayo incidente y el medio en que viaja el rayo refractado. Para calcular el

ángulo del rayo refractado se utiliza típicamente la Ley de Snell o Ley de Refracción [27, 16]:

$$n_a \text{sen} \theta_{\bar{a}} = n_c \text{sen} \theta_{\bar{c}},$$

donde n_a y n_c representan los índices de refracción de los medios en que viajan los rayos \bar{a} y \bar{c} , respectivamente, y $\theta_{\bar{a}}$ y $\theta_{\bar{c}}$ son los ángulos del rayo \bar{a} de incidencia y del rayo refractado \bar{c} , respectivamente, ver Figura 2.2. El índice de refracción de un medio se define como:

$$n = \frac{c}{v},$$

donde c es la velocidad de la luz y v es la velocidad de la luz en el medio [27, 12].

Los fenómenos de reflexión y refracción son la base de la microscopía óptica pero en microscopía de óptica geométrica también es importante el análisis de la reflexión y refracción en objetos esféricos ya que es esencial para el entendimiento de lentes concavos y convexos, elementos que son fundamentales para la formación y amplificación de las imágenes.

Por razones teóricas y prácticas los microscopios ópticos geométricos presentan distorsiones y aberraciones (comportamientos que se desvían de lo correcto) los cuales impactan en el resultado de las imágenes finales; tales como aberraciones cromáticas, aberraciones geométricas, pérdida de definición o aberraciones provocadas por una mala fabricación de los lentes. Varios de estos fenómenos son estudiados en la óptica física.

2.2. Máxima Resolución

Dentro de los fenómenos que se estudian en la óptica física, la difracción y la interferencia son dos efectos fuertemente ligados a la resolución de una imagen en la microscopía óptica.

El fenómeno de interferencia ocurre cuando dos o mas ondas se sobrepone y el

resultado es otra onda cuyas propiedades dependerán de las amplitudes, frecuencias y fases de las ondas interactuando entre ellas. Para ejemplificar, consideremos dos ondas con la misma frecuencia, la onda que resulta de la interferencia de ambas ondas es igual a la suma de la amplitud de cada onda punto por punto. Por lo tanto, la mayor amplitud de la onda resultante se alcanza cuando las ondas interfiriendo tienen la misma fase (interferencia constructiva) y su amplitud menor se alcanza cuando hay una diferencia de un múltiplo impar de π entre las fases de las ondas interfiriendo.

Por otra parte, la difracción es el resultado de la luz pasando por una abertura o un borde, generando un patrón de franjas provocado por las interferencias constructivas y destructivas de la misma onda, esto se puede entender mejor con ayuda de la Figura 2.3. Este fenómeno se genera a partir de la naturaleza ondulatoria de la luz, que a diferencia de la óptica geométrica en la que se interpreta el comportamiento de la luz como un vector y por lo tanto se espera visualizar en una pantalla una sombra perfectamente definida generada por la luz al pasar por un borde o una abertura ubicado entre una fuente y una pantalla ; la naturaleza ondulatoria de la luz indica que la luz se esparce alrededor de los bordes de un obstáculo [31, 15]. Dependiendo de la superficie del frente de onda que se propaga es el tipo de difracción que se presenta, un frente de onda esférico implica una difracción de Fresnel y un frente de onda plano implica una difracción de Fraunhofer; ya que es de considerable importancia la difracción de Fraunhofer para poder determinar el poder de resolución de algunos instrumentos ópticos como el microscopio óptico, solo se explicará este tipo de difracción [31, 15]. Cuando la onda emitida por una sola fuente de luz atraviesa una apertura cuyo ancho es del orden de la longitud de onda de la luz, entonces se observa un patrón de difracción (varias franjas luminosas y oscuras) sobre una pantalla que se encuentre a una distancia mucho mayor al ancho de la apertura. Este fenómeno se puede analizar usando el principio de Huygens en el que cada punto del frente de onda se puede modelar como fuentes de ondas secundarias. Por lo tanto, el patrón de difracción es el resultado de estas ondas secundarias interfiriendo recíprocamente [15].

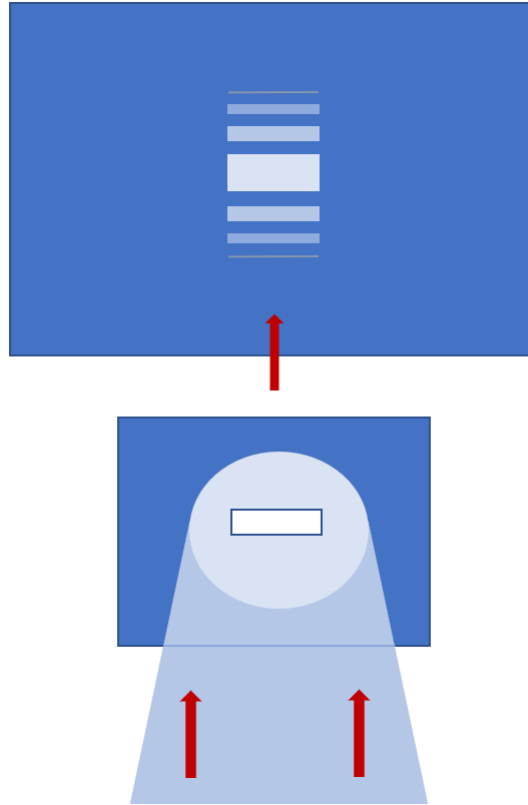


Figura 2.3: Esquema del patrón de difracción de Fraunhofer que se presenta con una pequeña ranura rectangular.

Los patrones de difracción se producen por aperturas y ranuras de varios tipos, en particular las de forma circular que tienen relevancia en el cálculo de la resolución de un microscopio óptico.

Como se muestra en la Figura 2.4, se genera un patrón compuesto de un círculo central brillante denominado disco de Airy, rodeado por anillos con diferentes intensidades los cuales son inversamente proporcional al radio angular definido como la separación en términos del ángulo entre cada anillo [27], donde el primer ángulo está dado por

$$\text{sen}\theta = 1,22\frac{\lambda}{d},$$

donde d es el diámetro de la abertura. Se puede observar que mientras aumenta el tamaño del diámetro, disminuye el radio angular y por lo tanto la intensidad del disco de Airy aumenta.



Figura 2.4: Esquema de un patrón de difracción de Fraunhofer circular.

Esto llega a afectar cuando se presenta más de una abertura como se muestra en la Figura 2.5, obtenida del libro [27], en la que se muestra que mientras disminuye el diámetro de la abertura, la capacidad de visualizar cada círculo va disminuyendo; en otras palabras, la resolución de la imagen va decayendo. Con base en el fenómeno de difracción y el disco de Airy, el físico inglés Lord Rayleigh estableció un criterio indicando el límite de la resolución cuando dos objetos son apenas distinguibles en el momento en que el centro de un patrón de difracción coincide con el primer mínimo del otro (criterio de Rayleigh) [27].

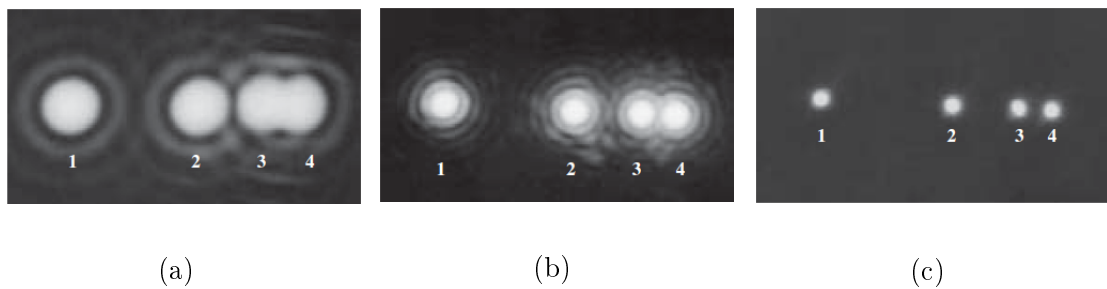


Figura 2.5: Patrones de difracción con diferentes diámetros de abertura [27]. Las aberturas de la imagen (a) son mas pequeñas que la abertura (b) y (c) siendo la última imagen la que tiene las aberturas mas grandes.

A partir de este criterio, a finales del siglo XIX el físico Ernst Karl Abbe definió una ecuación para determinar el poder de resolución de un microscopio óptico, la fórmula de Abbe se define como

$$PR = \frac{\lambda\epsilon}{NA},$$

donde λ es la longitud de onda que incide en la muestra, ϵ es la constante de Abbe, NA es la apertura numérica del objetivo del microscopio y PR es el poder de resolución definido como la distancia mínima entre dos centros de un patrón de difracción para que se puedan distinguir como dos objetos distintos [16].

Con base en la fórmula de Abbe, si se contempla el caso ideal en donde se tiene un lente objetivo con apertura numérica de 1.25, una iluminación con una longitud de onda de 400 nm (la longitud de onda más corta en el espectro visible) y la constante de 0.61, entonces se obtiene una resolución máxima de $195.2 \approx 200$ nm.

Por otra parte, como ya se hizo mención, existe el microscopio de luz reflejada el cual consiste en hacer incidir un rayo de luz sobre la muestra a analizar y observar la luz reflejada por la muestra. A pesar de que se busca analizar partículas cuyo tamaño son mucho menor a la máxima longitud de onda de la luz visible, su visualización por medio de la luz reflejada es posible gracias a la dispersión de Rayleigh en conjunto con la amplificación de los lentes del microscopio óptico. Aunque no es posible ver la estructura de la partícula ni medir su tamaño con la microscopía de luz reflejada, esta sí permite su seguimiento lo que permite la implementación de otros métodos como la técnica de Análisis de Seguimiento de Nanopartículas.

En el siguiente capítulo se dará una explicación sobre algunos métodos utilizados para el seguimiento de partículas y se expondrá la propuesta de este proyecto.

Capítulo 3

Seguimiento de Partículas

3.1. Estado del arte.

La técnica de seguimiento de partículas o también denominada *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA por sus siglas en inglés, es una técnica basada en *Dynamic Light Scattering* (DLS por sus siglas en inglés) la cual aprovecha el movimiento Browniano de las partículas suspendidas en un líquido utilizando microscopía de luz reflejada para poder visualizarlas.

Para la implementación de este método primero se requiere de la adquisición de una serie de imágenes consecutivas que capturen las partículas en movimiento y posteriormente obtener la trayectoria de cada partícula por medio de un procesamiento de las imágenes. Una vez que se ha adquirido la trayectoria de cada partícula se busca calcular su diámetro con base en la ecuación de Stoke-Einstein [6].

En la etapa de seguimiento de partículas de esta técnica se presentan fenómenos que pueden dificultar el rastreo de cada una de ellas, los más comunes son la aparición y desaparición de partículas durante el video debido a que éstas se encuentran en un medio líquido dentro de un recipiente y sus movimientos pueden ser en cualquier dirección. Otro fenómeno que puede provocar errores en el rastreo es la aparición de dos partículas en movimiento a una distancia muy pequeña entre ellas que eventualmente conduzca a su traslape, esta situación puede provocar ya sea que el método de seguimiento asuma que se trata de una sola partícula en lugar de dos o que asuma que se está siguiendo una partícula que se divide en cuadros (*frames*) posteriores. La

aparición de un halo de luz alrededor de una partícula es un fenómeno que puede obstaculizar el seguimiento de partículas al ocultar a partículas vecinas, ver Figura 3.1(a), y que puede aparecer en ciertas preparaciones. También, algunas partículas pueden desplazarse más rápido de la velocidad media lo que dificulta su seguimiento; en [2] sus autores han propuesto la siguiente solución a este problema, después de obtener una primera propuesta del seguimiento de las partículas, se trata de encontrar la trayectoria de cada partícula buscando la relación mínima entre su energía almacenada y la energía que disipan por medio de la utilización de una función de costo.

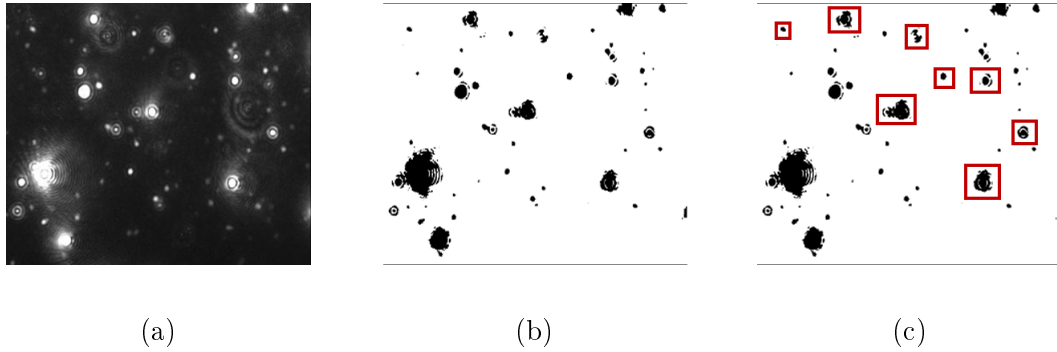


Figura 3.1: Primera etapa para el seguimiento de partículas, (a) de las muestras obtenidas para cada frame de todo el video (b) se busca separar las partículas del fondo para posteriormente (c) identificar cada partícula por medio de la coordenada de su centro. (Las partículas presentadas en la imagen (a) fueron adquiridas en el laboratorio del Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.)

En la mayor parte de la literatura que trata sobre algoritmos de seguimiento de partículas se proponen soluciones en dos etapas al problema de seguimiento de partículas. La primera etapa, ver la Figura 3.1, consiste en identificar cada partícula p_l en el n -ésimo cuadro del video y generar un arreglo p_l^n en el que se indican las ubicaciones de la partículas en el cuadro n ; para esta operación primero se requiere separar las partículas del fondo, frecuentemente utilizando una umbralización, y después asociar a cada una con las coordenadas de su centro. El método para obtener el centro dependerá de las características de las muestras a analizar, por ejemplo, existen muestras como se observan en la Figura 3.1 en donde se visualiza a cada partícula como un

brillo con distribución Gaussiana. En el artículo [32] aprovechan el comportamiento Gaussiano del brillo para realizar la detección de las partículas asumiendo que la intensidad máxima de una partícula equivale a la posición de su centro; implementando la técnica de *Radial Symmetry Center* determinan la intensidad máxima a partir de un cálculo de gradientes y definiendo el centro como la intersección de los vectores gradiente (o sea, vectores obtenidos al aplicar el gradiente a la imagen). Este método es complementado con una técnica para reajustar la región que contiene a la partícula a analizar a partir del centro previamente obtenido por el método de *radial symmetry center*, con la nueva región obtenida se vuelve a determinar la intensidad máxima. Con esta técnica se busca mejorar la precisión del cálculo del centro cuando se tiene dos partículas muy cercanas.

En el artículo [24] se hace otra propuesta en la cual las muestras no son presentadas como brillos Gaussianos y para obtener el centro de una partícula su intensidad se considera el resultado de la combinación lineal de varias funciones Gaussianas centradas en la posición de los píxeles.

Otras propuestas utilizan métodos de aprendizaje de máquina o de aprendizaje profundo para detectar a una partícula e identificar su centro tal como se hace en el artículo [18] donde proponen una red neuronal convolucional para la localización de las partículas.

Una vez que se ha obtenido el arreglo p_i^n se prosigue con la segunda etapa del análisis, ver Figura 3.2, en la que se asume que la partícula p_i^n y la partícula p_j^{n+1} son la misma por lo que se intenta enlazarlas generando un vector de su trayectoria.

El método más utilizado para realizar este enlace consiste en buscar la distancia mínima entre una partícula y sus vecinos ubicados dentro de un radio arbitrario, dos ejemplos de este método se encuentran en los artículos [24] y [20]; en el primero de estos artículos se realizan enlaces entre cada partícula del n -ésimo cuadro con todas las partículas del cuadro $n + 1$ que se hayan dentro de un radio arbitrario lo que genera una red de todos los enlaces posibles. La red de enlaces se poda usando una lógica basada en distancias mínimas y un criterio de enlace único hasta obtener la conexión más probable. Por otra parte, en el artículo [20] se busca la distancia mínima

entre los vectores característicos de cada partícula y sus vecinos pertenecientes al siguiente cuadro del video; para formar este vector característico se divide la región perteneciente a la partícula, limitada por un radio arbitrario, en un determinado número de cuadrantes, el vector característico contendrá el número de partículas ubicadas en cada cuadrante. Este análisis es complementado con una deformación y la comparación del área que ocupa la partícula analizada para asegurar que la conexión obtenida fue la adecuada.

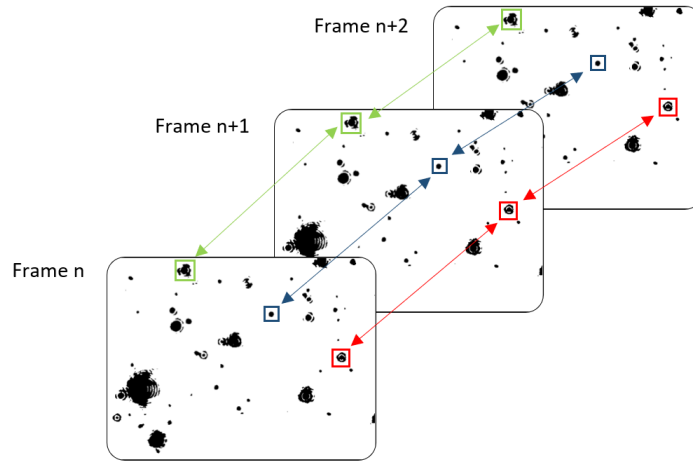


Figura 3.2: Segunda etapa para el seguimiento de partículas. Con las partículas localizadas durante todo el video se implementa un método para enlazar a cada partícula entre cada cuadro.

Otra propuesta muy utilizada para enlazar partículas es la implementación de esquemas probabilísticos buscando predecir el desplazamiento como se muestra en el artículo [10] en donde se propone la utilización de una distribución Gaussiana como modelo del seguimiento para la estimación de la ubicación de la partícula en el n -ésimo frame dado una secuencia de mediciones en *frames* posteriores y utilizando un filtro Kalman.

En el artículo [14] proponen un algoritmo capaz de obtener resultados tan buenos como el método de *Seguimiento de Múltiples Hipótesis* (MHT por sus siglas en inglés), un método también basado en esquemas probabilísticos. El algoritmo propuesto consiste en buscar la suma mínima de costos utilizando una matriz que indica los enlaces entre las partículas y una matriz de costo donde se asigna un peso a cada

enlace. En esta segunda matriz se contempla la desaparición y aparición de partículas por medio de la asignación de pesos a cada enlace.

En este proyecto seguimos una estrategia ligeramente diferente para el seguimiento de partículas, aprovechando tanto el desarrollo que se ha realizado recientemente para el seguimiento de ramificaciones en tres dimensiones y como sus buenos resultados, se busca implementar un método para seguimiento de vasos sanguíneos tomando como base el método presentado en [26] para seguimiento de la vascularización de la corteza somatosensorial de ratas en imágenes tri-dimensionales obtenidas por microscopía tomográfica de rayos X producidos por un sincrotrón.

3.2. Propuesta

Como ya se mencionó, gran parte de la literatura realiza el seguimiento de partículas en un video enlazando a las partículas detectadas en un cuadro con las correspondientes en el cuadro subsecuente realizando un análisis espacio-temporal.

Una de las suposiciones centrales de este proyecto es que cuando se realiza un “buen” muestreo en el tiempo durante la adquisición de un video del movimiento de partículas, entonces la secuencia de imágenes que conforman el video se puede considerar como una imagen tri-dimensional que captura el movimiento y la trayectoria de una partícula como un camino ramificación, por lo que la imagen 3D se puede considerar como las ramificaciones de vascularidad, ver Figura 3.3. De esta forma cambiamos a un análisis únicamente espacial donde solo se busca la línea central de una ramificación equivalente a los enlaces de una partícula entre los cuadros del video.

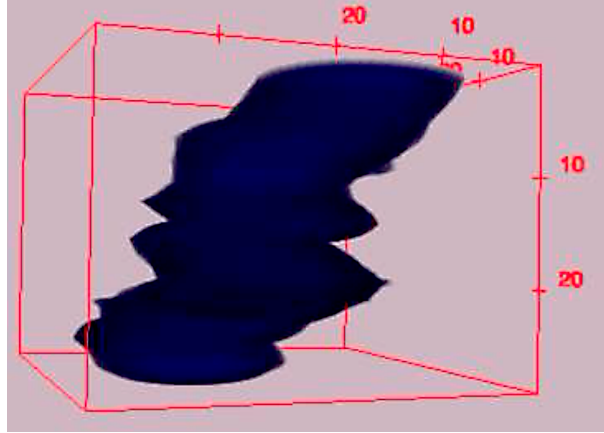


Figura 3.3: Ramificación generada a partir de un conjunto de parches consecutivos de un video de las muestras obtenidas en el laboratorio, donde se visualiza la misma partícula en movimiento cambiando el dominio del tiempo por el eje z (eje vertical).

Para la obtención de la línea central se ha optado por la implementación de un método de aprendizaje de máquina como se propone en el artículo [26] con algunas modificaciones para poder adaptarlo a un seguimiento de partículas y obtener buenos resultados.

El método se compone de siete etapas, ver Figura 3.4, cuyo funcionamiento se explicará a continuación.

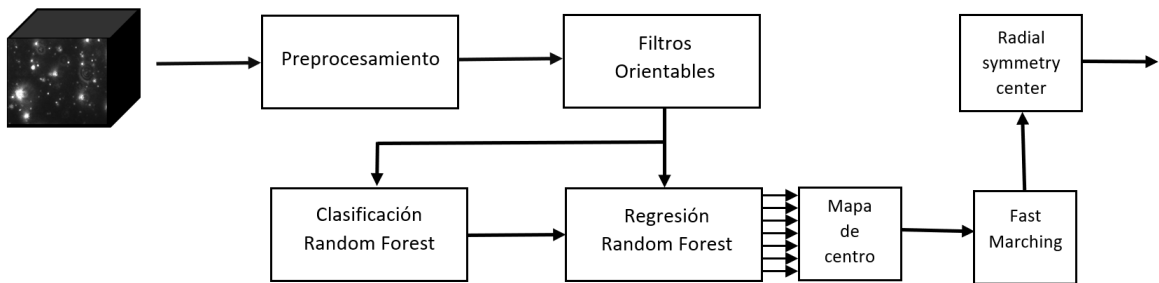


Figura 3.4: Diagrama de bloques del método propuesto para el seguimiento de partículas.

Una vez que un video es transformado en una imagen tridimensional, una operación que es trivial, la imagen se envía a la etapa de preprocesamiento que consiste en realizar un ventaneo de toda la imagen obteniendo parches de las mismas dimensiones $N \times N \times N$; posteriormente, a cada parche se le aplica un filtro Gaussiano y una estandarización de los datos; se discutirá este procedimiento con mayor detalle en el

Capítulo 4.

En la Figura 3.4 se muestran dos de las etapas del método las cuales implementan un algoritmo de aprendizaje de máquina denominado *Random Forest*; la primera etapa del algoritmo tiene como tarea la detección de una ramificación dentro del I -ésimo parche mientras la siguiente etapa se encarga de calcular el centro de esa ramificación. Para la implementación de los algoritmos de estas etapas se requiere del cálculo previo de los vectores característicos para cada parche, para esto se implementa la etapa de *Steerable Filters*.

3.2.1. Filtros Orientables (*Steerable Filters*)

Los vectores característicos que son utilizados son el resultado de filtrar los parches tri-dimensionales con filtros orientables, los cuales se componen de filtros paso altas (denominados en el área de imágenes como detectores de bordes) rotados

$$\Upsilon(\mathbf{x}) = I(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}\mathbf{x}), \quad (3.1)$$

donde $I(\mathbf{x})$ es el valor de la imagen en la posición determinada por el vector \mathbf{x} y h es el filtro aplicado sobre la posición transformada por la matriz de orientación \mathbf{R} . La ecuación (3.1) permite obtener con facilidad relativa la orientación en la que se encuentra una ramificación dentro de un parche.

Lamentablemente este método requiere de mucho procesamiento [13] y para solventar este problema William T. Freeman [9] ha propuesto una forma de reducir el tiempo de procesamiento utilizando el método *Steerable Filters*. Este método consiste en aproximar la convolución de (3.1) por medio de la combinación lineal de un número definido de filtros derivados

$$I(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}\mathbf{x}) = \sum_{k=1}^M \sum_{i=0}^k c_{k,i} I_{k,i}(\mathbf{x}), \quad (3.2)$$

en donde $\{c_{k,i}\}$ es el conjunto de coeficientes, o pesos, que multiplican a las funciones base $I_{k,i}(\mathbf{x})$, los valores de estos coeficientes dependen de la orientación. Para la

aproximación de (3.2) es común usar las derivadas parciales de funciones Gaussianas como las funciones base $I_{k,i}(\mathbf{x})$; para filtros orientables, tal como el $h(\mathbf{R}\mathbf{x})$, es común aproximar dichos filtros orientables por medio de derivadas parciales de funciones Gaussianas sopesadas por coeficientes cuyos valores dependen de la orientación. Estos filtros son utilizados porque las derivadas parciales de la función Gaussiana G^σ generan filtros orientados que permiten la detección de bordes en la función I pero para disminuir artefactos por la presencia de ruido se utilizan filtros paso-bajas.

Para este proyecto se plantea generar un vector característico conformado por el conjunto $\{G_{m,a,b}^\sigma(\mathbf{x})\}$ de derivadas parciales de funciones Gaussianas definidas en el espacio tri-dimensional, donde a , b y m son números enteros que cumplen con $m \geq 1$ y $0 \leq b \leq a \leq m \leq M$ siendo M el máximo orden de derivada para el vector característico; en otras palabras, se aplican varios filtros con diferentes orden de derivada, comenzando desde el orden 1, 0, 0 permutando los ordenes hasta llegar al orden M, M, M . El filtro derivado $G_{m,a,b}^\sigma$ con varianza σ se define de la siguiente manera

$$G_{m,a,b}^\sigma(e_1, e_2, e_3) = \sigma^m \frac{\partial^{m-a} \partial^{a-b} \partial^b}{\partial e_1^{m-a} \partial e_2^{a-b} \partial e_3^b} G^\sigma(e_1, e_2, e_3). \quad (3.3)$$

Por lo tanto, para el caso tridimensional, la aproximación de (3.2) queda de la siguiente forma

$$I(\mathbf{x}) * G_{m,a,b}^\sigma(\mathbf{R}_{\theta,\phi}\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=0}^i c_{m,a,b}^{i,j}(\theta, \phi) (I(e_1, e_2, e_3) * G_{m,i,j}^\sigma(e_1, e_2, e_3)), \quad (3.4)$$

donde $\{G_{m,i,j}^\sigma\}$ es el conjunto de filtros generados por (3.3), cuyo orden de derivada cambia con respecto a m , i y j , y que son ponderados por los coeficientes $\{c_{m,a,b}^{i,j}(\theta, \phi)\}$; es claro que la combinación lineal de los filtros $\{G_{m,i,j}^\sigma\}$ ponderados por los coeficientes $\{c_{m,a,b}^{i,j}(\theta, \phi)\}$ aproximan un filtro rotado $G_{m,a,b}^\sigma(\mathbf{R}_{\theta,\phi}\mathbf{x})$. El orden de las derivadas parciales depende de la tarea a resolver [13].

Los coeficientes $\{c_{m,a,b}^{i,j}(\theta, \phi)\}$ de (3.4) se calculan de la siguiente manera [26]

$$\begin{aligned}
 c_{m,a,b}^{i,j}(\theta, \phi) = & \sum_{p \in P_{m,a,b}^{i,j}} (-1)^{a-v_1-w_2} \binom{m-a}{u_1} \binom{a-b}{v_1} \binom{b}{w_1} \binom{u_1}{u_2} \binom{w_1}{w_2} \times \\
 & \cos(\theta)^{m-a-u_2-w_2} \cos(\phi)^{m-a+b-u_1+v_1-w_1} \times \\
 & \sin(\theta)^{b+u_2-w_2} \sin(\phi)^{a-b+u_1-v_1+w_1-u_2-w_2},
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

en donde la región $P_{m,a,b}^{i,j}$ está definida por el conjunto $\{(u_1, v_1, w_1, u_2, w_2)^T \in \mathbb{N}_0^5 \mid u_1 \leq m-a, v_1 \leq a-b, w_1 \leq b, u_2 \leq u_1, w_2 \leq w_1, u_1 + v_1 + w_1 = i, u_2 + w_2 = j\}$.

Una vez que los vectores característicos para cada parche han sido calculados se procede con la implementación del algoritmo de *Random Forest*.

3.2.2. Bosques Aleatorios (*Random Forest*)

Antes de explicar el algoritmo de *Random Forest*, primero es necesario entender el método de *Árbol de Clasificación y Regresión* (CART por sus siglas en inglés), también nombrado *Árbol de Decisión*.

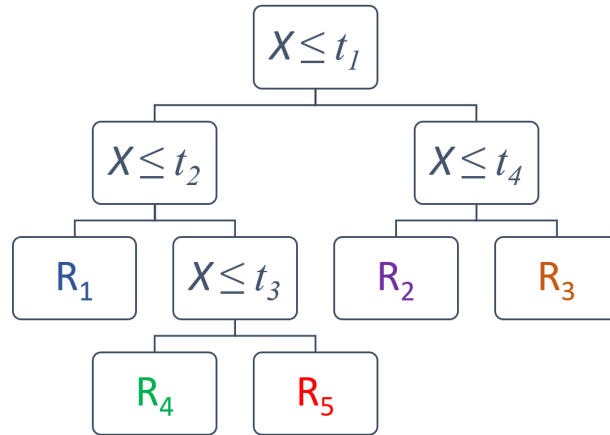


Figure 3.5: Diagrama de un árbol del metodo CART para clasificación.

La mejor manera de explicar el método CART es apoyandose en el diagrama de la Figura 3.5 la cual representa de forma gráfica la estructura de este algoritmo. Como su nombre lo indica, este método utiliza una estructura de datos conocida como

árbol la cual es una gráfica (un conjunto de nodos y aristas). Aunque hay varias formas de describir esta estructura de datos, nosotros seguiremos la siguiente porque la consideramos intuitiva. Un árbol se construye de arriba hacia abajo comenzando por uno de los nodos, el nodo raíz, desde el cual descienden el resto de los nodos. El resto de los nodos se dividen en nodos interiores y nodos hoja. Los nodos internos, o padre, se conectan a uno o más nodos, llamados nodos hijo (todos los nodos conectados a un mismo nodo padre son hermanos). Los nodos hoja no tienen descendencia y son los nodos que se encuentran más abajo de la estructura de datos. Un nodo raíz puede no tener descendencia (en cuyo caso también son un nodo hoja) o posee uno o varios nodos hijo que a su vez son el nodo raíz de un sub-árbol. Para nuestro proyecto, el árbol de un CART tiene en sus nodos no- hoja una condición de comparación y un umbral numérico; cada nodo divide el espacio de datos dependiendo de los umbrales asignados a los nodos no- hoja. Los nodos hoja poseen los valores de los datos de entrada ya divididos. Un CART recibe un conjunto de datos $\Omega = \{x_1, x_2, \dots, x_K\}$ y para cada dato de entrada x_k se toma una decisión a través de los umbrales asignados a los nodos no- hoja que va dirigiendo al dato a un nodo terminal. Como se muestra en la Figura 3.5, el proceso consiste en evaluar si el dato x_k es menor o mayor al umbral t_1 , si el dato es menor al umbral, entonces se prosigue a evaluar si el dato es menor al umbral t_2 , en caso de que el dato x_k resulte menor, entonces se llega a un nodo terminal que contiene un estimador utilizando una distribución condicional $p(y|x_k)$ donde y puede ser un valor continuo o categórico, dependiendo de la configuración del método CART (regresión o clasificación).

3.2.2.1. Árboles de clasificación y regresión

Como se mencionó anteriormente, el diagrama del clasificador o estimador se le denomina árbol por la forma que va obteniendo, en donde los posibles caminos que va formando el algoritmo forman las ramas de un árbol y las hojas equivalen a los nodos terminales que definen los resultados. Los puntos donde una rama se divide se le denominan nodos internos y es donde se hace la evaluación de los datos, los cuales serán introducidos a través del primer nodo o nodo raíz.

El diseño del algoritmo se puede dividir en dos pasos: la construcción del árbol saturado y la poda del árbol [28].

Construcción del árbol saturado

El primer paso para la construcción del árbol saturado es definir el método para obtener los umbrales de cada nodo. Para esto vamos a definir la variable y que representa nuestra región y a τ como un nodo, nosotros buscamos determinar que tanto pertenece y al nodo τ , es decir, $P(y|\tau) = 1$ o $P(y|\tau) = 0$ nos indica que y pertenece totalmente al nodo τ o no pertenece, si $P(y|\tau) = \frac{1}{2}$ no se tiene certeza si pertenece o no al nodo, que sería el peor de los casos [28].

Con base en el criterio anterior, se busca una función de costo que mida el nivel de pertenencia y con éste obtener la siguiente función objetivo Θ para determinar la mejor división en el nodo τ [4],

$$t^* = \arg \max_{t \in \Gamma_j} \Theta(S, \tau), \quad (3.6)$$

tal que nos permita obtener el mejor umbral t^* .

Las funciones de costo que cumplen con las condiciones anteriores dependerán de la aplicación que se le dé al método CART, clasificación o regresión [17].

Para el caso de la regresión, la función de costo más utilizada es

$$cost(S) = \sum_{i \in S} (y_i - \bar{y})^2,$$

la cual equivale a la varianza y en donde S representa a los datos en el nodo. Para el caso de la clasificación las tres funciones siguientes son las más utilizadas

- Función de Entropía

$$I_H(S) = - \sum_{i \in S} P(y_i|\tau) \log_2 P(y_i|\tau).$$

- Funcion Gini

$$I_G(S) = \sum_{i \in S} P(y_i|\tau)[1 - P(y_i|\tau)] = 1 - \sum_{i \in S} P(y_i|\tau)^2.$$

- Función de error de clasificación

$$I_E = 1 - \max\{P(y_i|\tau)\}.$$

Estas funciones de costo son comunmente nombradas como medidas de impureza [22]; si se observa la Figura 3.6 se puede notar en ella que las medidas de impureza cumplen con las condiciones anteriores.

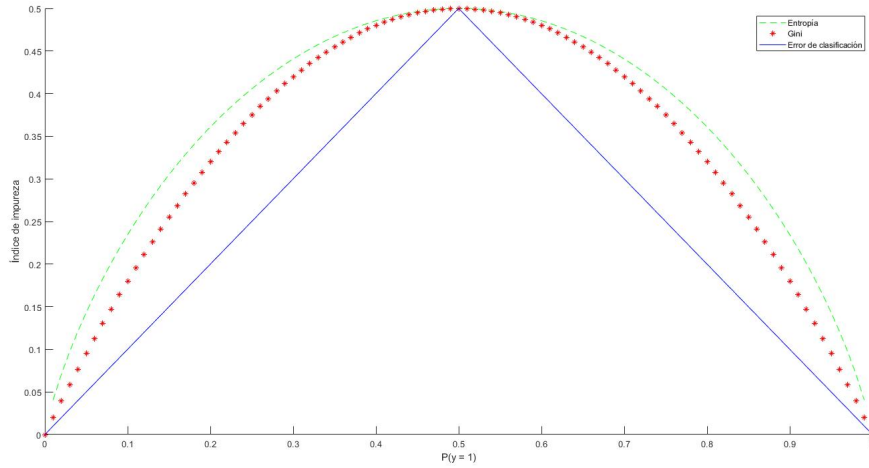


Figure 3.6: Medidas de impureza, el eje horizontal equivale a la probabilidad de la clase $P(y = 1)$ y el eje vertical equivale al índice de impureza.

Una vez seleccionada la forma de calcular la impureza se puede obtener el mejor umbral utilizando la función objetivo 3.6, definido como la ganancia de información [4, 22], que nos permite medir la reducción de la impureza cuando se pasan los datos S del nodo padre a los nodos hijos. Para llevar a cabo esta transferencia maximizando la ganancia de información se aplica la siguiente función

$$IG(S_p, f) = cost(S_p) - P(S_L)cost(S_L) - P(S_R)cost(S_R),$$

donde f son las características para la mejor división, S_L y S_R son los nodos hijos y S_p es el nodo padre.

De esta forma se introducen los datos de entrenamiento y se deja crecer el árbol hasta que no se puedan dividir mas los datos. En los nodos terminales se almacenan los valores categóricos o reales con los que se realizan el entrenamiento.

Poda del árbol. Una vez que se tiene el árbol construido hasta saturar, se prosigue a podarlo. De la misma forma en que se debe podar un árbol, cortando las hojas de afuera hacia adentro hasta obtener la forma deseada, igual se debe podar el árbol desde los nodos terminales evaluando cuales son los mejores nodos para mejorar el algoritmo y aumentar su precisión. Para lograr esto, se utiliza la función de costo-complejidad:

$$R_\alpha(\Psi) = R(\Psi) + \alpha|\tilde{\Psi}|,$$

donde $|\tilde{\Psi}|$ es el número de nodos terminales del árbol Ψ , α es el parametro de complejidad y $R(\Psi)$ se calcula de la siguiente forma:

$$R(\Psi) = \sum_{\tau \in \tilde{\Psi}} P(\tau)r(\tau)$$

siendo $P(\tau)$ la probabilidad de que el sujeto pertenezca al nodo τ y $r(\tau)$ es una medida de calidad del nodo.

El objetivo de la poda es eliminar los nodos terminales minimizando el costo-complejidad, mejorando el algoritmo disminuyendo su alta varianza y aumentando la precisión de la predicción [28].

El metodo CART apesar de ser muy útil por su fácil interpretación, poder manejar entradas continuas y discretas y adaptarse a grandes conjuntos de datos [17], resulta poco eficiente debido a su alta varianza y su inestabilidad, aun realizando el proceso de poda. Es por esto que se diseñó el método de bosques aleatorios (*Random Forest*) atacando esas principales desventajas del metodo CART.

3.2.2.2. Bosque aleatorios

Los bosques aleatorios o *Random Forest* son un método de clasificación y regresión basados en el método CART.

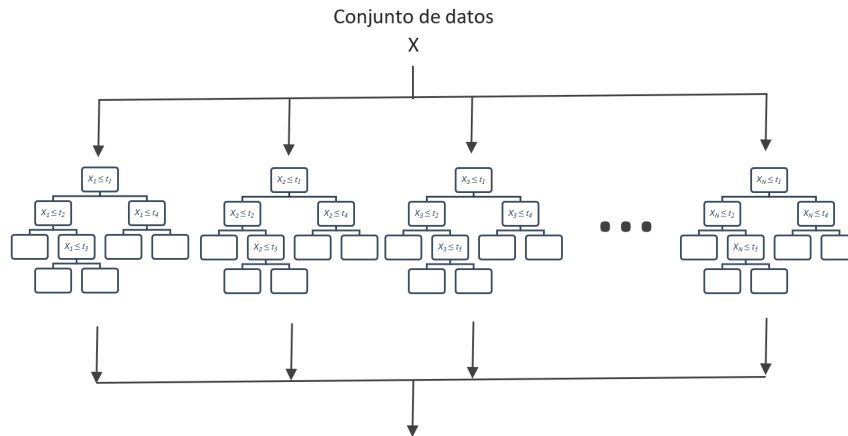


Figure 3.7: Diagrama del método Random Forest.

Se puede observar en la figura 3.7 que el algoritmo se conforma por un conjunto de árboles aleatorios construidos como se explicó anteriormente. Para la construcción de cada árbol primero se requiere distribuir los datos de entrenamiento a cada nodo raíz seleccionando de forma aleatoria con reposición un conjunto de muestras \tilde{X} tal que $\tilde{X} \subset X$ donde X es el conjunto de datos de entrenamiento, a este proceso se le denomina “*bagging*” por “*bootstrap aggregating*” que consiste en seleccionar el conjunto de datos de forma aleatoria y con reposición. El método *bootstrap* para seleccionar los datos de entrenamiento beneficia al algoritmo eliminando la correlación que puede existir entre los árboles y así reducir su alta varianza pero disminuyendo su interpretabilidad [17]. Gracias a la reducción de la varianza, se puede omitir el proceso de poda de cada árbol, dejando que crezcan hasta saturar y la región a seleccionar se obtiene promediando los resultados de cada árbol, en el caso de regresión, en cuanto a la clasificación se definirá la clase en base a una mayoría de voto, asignando la clase mas repetida entre los árboles [22].

Existen hiperparámetros que pueden mejorar el sistema como el número de árboles que se desean construir, teniendo en cuenta que mientras mayor es el número de

árboles mas tiempo de procesamiento se requiere, evitando llegar al sobreajuste. Otros hiperparametros son el número de nodos terminales y el número demuestras que se desea utilizar para el entrenamiento de cada árbol, comunmente se utiliza un valor de 63% del conjunto X , mostrando buenos resultados [22].

Para el cálculo de los centros en la etapa de regresión, el artículo [26] propone utilizar el método de *Hough Forest* pero debido a que no se obtienen los resultados deseados para las muestras que se plantean analizar se optó por modificar este método.

En lugar de promediar todos los centros \hat{c} propuestos por cada árbol del algoritmo de *Random Forest*, se realiza un promedio de todos los centros ubicados dentro del área de la ramificación por médio de una umbralización $A(e_1, e_2, e_3)$

$$\hat{c}_\mu = \frac{1}{N_c} \sum_{i=0}^{N_c} \hat{c}_i A(\hat{c}_i),$$

donde N_c indica el número de centros detectados dentro del área. A esta etapa se le denominó mapa de centros.

3.2.3. *Fast Marching*

Una vez teniendo todos los parches que contienen ramificaciones con su centro respectivo, a través de toda la imagen, se determina la linea central por medio del método *Fast Marching*.

Este método pertenece a un grupo de algoritmos denominados *Path Planning Algorithms* utilizados frecuentemente en robótica para obtener la trayectoria entre dos puntos. El objetivo de este algoritmo es simular la expansión de una superficie como un frente de onda resolviendo de forma rápida la ecuación de Eikonal

$$|\nabla T| F = 1 \tag{3.7}$$

la cual caracteriza el desplazamiento de la superficie en términos del tiempo de expansión T , en otras palabras, calcular el tiempo que tarda en llegar el frente de onda a una coordenada, contemplando un espacio Euclídeo con coordenadas (e_1, e_2, e_3) , apli-

cando una velocidad de desplazamiento F ; para poder utilizar la ecuación de Eikonal se requiere cumplir con la condición $F \geq 0$ [29]. Esto se puede observar en la Figura 3.8(b) donde se muestra la propagación del frente de onda en terminos del tiempo T que tarda en desplazarse de un punto a otro, contemplando una velocidad homogenea en toda el área.

La lógica que utiliza este método para expandir la superficie de forma rápida es la siguiente:

1. Primero se define un punto conocido el cual será el inicio de la expansión como se ejemplifica en la figura 3.8 en la imagen b) asignando el punto de inicio como el mínimo valor del arreglo.
2. Despues se busca los puntos vecinos cuya distancia es de un cuadro o píxel en e_1 o e_2 (para el caso de una imagen bidimensional) y se calcula el tiempo de expansión T en esos vecinos resolviendo la ecuación de Eikonal.
3. Se busca el punto i que tenga el menor tiempo.
4. A partir del punto i se repite el proceso desde el segundo paso.

El tiempo de expansión se puede obtener resolviendo la ecuación cuadratica mostrada en [29] y desarrollado en [1]

$$\left[\begin{array}{l} \text{máx} (D_{ijk}^{-e_1} T, 0)^2 + \text{mín} (D_{ijk}^{+e_1} T, 0)^2 \\ + \text{máx} (D_{ijk}^{-e_2} T, 0)^2 + \text{mín} (D_{ijk}^{+e_2} T, 0)^2 \\ + \text{máx} (D_{ijk}^{-e_3} T, 0)^2 + \text{mín} (D_{ijk}^{+e_3} T, 0)^2 \end{array} \right]^{1/2} = \frac{1}{F_{ijk}},$$

donde $D_{ijk}^{-e_1}$ y $D_{ijk}^{+e_1}$ son operadores diferenciales en el punto (i, j, k) de la siguiente forma

$$D_{ijk}^{-e_1} = \frac{t_{ijk} - t_{i-1jk}}{\nabla e_1},$$

$$D_{ijk}^{+e_1} = \frac{t_{i+1jk} - t_{ijk}}{\nabla e_1},$$

siendo similar para $D_{ijk}^{-e_2}$, $D_{ijk}^{+e_2}$, $D_{ijk}^{-e_3}$ y $D_{ijk}^{+e_3}$.

Para una mejor comprensión del algoritmo se muestra una aplicación en la Figura 3.8 usando un laberinto en el cual se busca el camino para salir. Para implementar el método de *Fast Marching* se debe definir el punto inicial con un valor mínimo como el punto que se indica en la imagen la Figura 3.8(a). Para la implementación de este método se requiere de una función de velocidad como se observa en la Figura 3.8(c). Según la ecuación 3.7 el tiempo de expansión es inversamente proporcional a la velocidad de desplazamiento, por lo tanto, se debe asignar una velocidad mayor en las zonas donde se busca un tiempo de expansión menor como se muestra en la imagen la Figura 3.8(c) donde la velocidad es mayor en el centro del laberinto.

Por cuestiones prácticas se asigna a las zonas consideradas como barreras o paredes con una velocidad nula para evitar la expansión en esas zonas como se muestra en la Figura 3.8(d) donde se implementa la propagación del frente de onda con la función de velocidad de la Figura 3.8(c). Una vez aplicado el método de *Fast Marching* se puede obtener la ruta desde cualquier punto hasta el inicio de la propagación por medio de la búsqueda de una ruta con tiempo mínimo como se muestra en la Figura 3.8(e).

Se puede cambiar el problema de un laberinto bidimensional a ramificaciones tridimensionales en donde se busca la mejor ruta entre cada centro obtenido en la etapa anterior considerandolos como la línea central de la ramificación.

No hay que olvidar el objetivo principal de este análisis de ramificaciones el cual es el seguimiento de partículas para el cálculo de su tamaño con base en su desplazamiento, por eso es importante que la línea central de la ramificación defina muy bien el centro de la partícula en cada cuadro del video. A pesar de obtener buenos resultados en el método de *Fast Marching*, este método no produce los resultados deseados para la asignación del centro, aunque sí los resultados se encuentran ubicados dentro de la partículas.

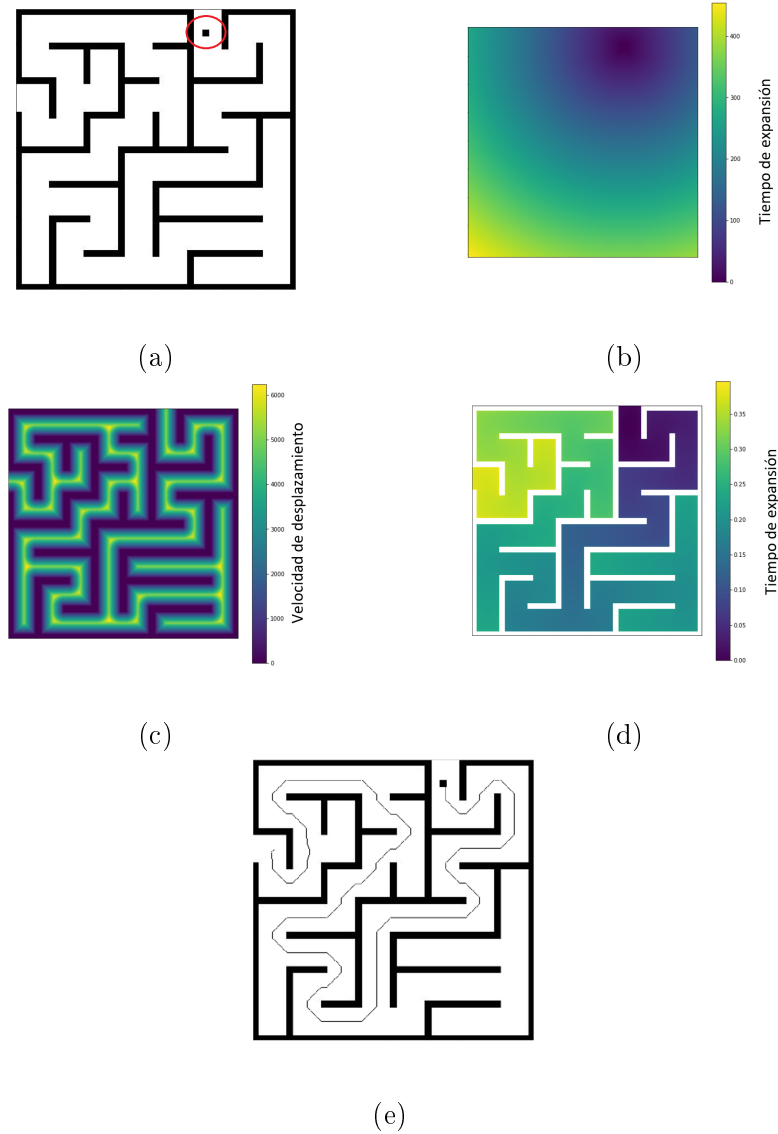


Figura 3.8: Implementación del algoritmo Fast Marching para obtener el camino hacia la salida en un laberinto.

En nuestro método hemos agregado una etapa para reubicar los centros obtenidos con el método de *Fast Marching* para mejorar el seguimiento de las partículas. En esta etapa el algoritmo “*Radial Symmetry Center*” se aplica a cada partícula, método que se mencionó en el Estado del Arte, el cual asigna el centro de la partícula al punto con mayor intensidad por medio de la obtención de los vectores gradientes de intensidad y posteriormente localizando la intersección de estos vectores ubicados dentro del área brillante de la partícula; este procedimiento busca el mismo resultado que un ajuste

Gaussiano pero con menor tiempo de procesamiento.

Para el cálculo de la intersección se realiza con la siguiente ecuación:

$$\begin{bmatrix} c_{e_1} \\ c_{e_2} \end{bmatrix} = \frac{1}{UV - WQ} \begin{bmatrix} O \\ J \end{bmatrix}, \quad (3.8)$$

donde U , V , W , Q , O y J se obtienen de la siguiente forma:

$$U = \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)v(i,j)^2}{v(i,j)^2+1}, \quad V = \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)}{v(i,j)^2+1},$$

$$W = - \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)v(i,j)}{v(i,j)^2+1}, \quad Q = - \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)v(i,j)}{v(i,j)^2+1},$$

$$O = \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)v(i,j)(v(i,j)j-i)}{v(i,j)^2+1},$$

y

$$J = \sum_{i,j}^{N_f, M_f} \frac{w(i,j)(v(i,j)j-i)}{v(i,j)^2+1},$$

donde c_{e_1} y c_{e_2} indican la coordenada de intersección de los vectores obtenidos de los operadores gradientes g_{e_2} y g_{e_1} . Para nuestro método se utilizaron los siguientes operadores:

$$g_{e_1} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I_P(e_2, e_1),$$

$$g_{e_2} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} * I_P(e_2, e_1),$$

donde I_P es la imagen de tamaño $N_f \times M_f$ que contiene a la partícula.

Tanto $v(i, j)$ como $w(i, j)$ son variables dependientes de los operadores gradientes, siendo $v(i, j) = \frac{g_{e_2}(i, j)}{g_{e_1}(i, j)}$ la pendiente de los vectores gradientes y $w(i, j) = \frac{L_k(i, j)}{\sqrt{g_{e_1}(i, j)^2 + g_{e_2}(i, j)^2}}$ la función de pesos donde $L_k(i, j)$ indica el área brillante de la partícula. En [32] se puede encontrar el desarrollo de la ecuación 3.8.

Para concluir este capítulo se presenta un resumen del método a implementar en el proyecto:

1. Se aplica un preprocesamiento a la imagen tridimensional donde se realiza un ventaneo en toda la imagen y a cada parche se le aplica un filtro Gaussiano y una estandarización de los datos.
2. Para cada parche se obtiene su vector característico por medio del método *Steerable Filters*.
3. Cada vector característico es evaluado en el algoritmo de *Random Forest*, primero realizando una clasificación para definir si el parche contiene ramificación.
4. En el caso de contener ramificación se calcula el centro de esta con una regresión tomando todas las propuestas de centros de cada árbol para generar un mapa de centros y determinar el centro ideal.
5. Una vez teniendo los centros de todos los parches clasificados como ramificación se obtiene la línea central aplicando el método de *Fast Marching*.
6. Por último, para mejorar la precisión de la línea central se implementa el algoritmo *Radial Symmetry Center*.

En el siguiente capítulo se explicará la implementación en el proyecto de estos métodos con sus respectivos resultados.

Capítulo 4

Metodología y Resultados

4.1. Preprocesamiento y Filtros orientables.

Para los experimentos, los videos que se usaron poseen dimensiones de 480×640 píxeles por cuadro y duración de 62 s con tasa de muestreo de 24 cuadros/s, lo que resulta en imágenes 3D de dimensiones $480 \times 640 \times 1498$ vóxeles. Después de la adquisición, las imágenes 3D son sub-divididas en sub-imágenes 3D (*parches*) $\mathcal{P}_c = \{p | p \in \mathbb{R}^3 \text{ y } (c_x - A_p) \leq p_x \leq (c_x + A_p) \text{ y } (c_y - A_p) \leq p_y \leq (c_y + A_p) \text{ y } (c_z - A_p) \leq p_z \leq (c_z + A_p)\}$ de dimensiones $(2A_p)^3$, donde c representa el centro del parche; por lo que la selección apropiada de c permite trasladar el parche a la región deseada de la imagen 3D. Para este análisis se utilizó un parche de tamaño $30 \times 30 \times 30$ vóxeles ($A_p = 15$), este parche se puede interpretar como una ventana que se desplaza 10, 10 y 15 vóxeles en los ejes x, y y z respectivamente por toda la imagen, dividiendo la imagen 3D en parches traslapados.

Antes de obtener los parches de cada imagen 3D, se les aplica un filtro Gaussiano 2D a cada uno de los planos de toda la imagen, es decir, se aplican 1498 filtros para suavizar cada cuadro y reducir el ruido del fondo; para nuestros experimentos cada filtro Gaussiano está definido en un plano de dimensiones 25×25 con media cero y desviación estandar igual a 4. Debido a que la ganancia de la cámara puede cambiar durante la adquisición de una secuencia, las partículas en la secuencia pueden poseer diferentes intensidades. Por lo tanto, se hace una normalización de cada parche usando la media y la variancia de intensidades en él. Posteriormente, se obtiene su matriz

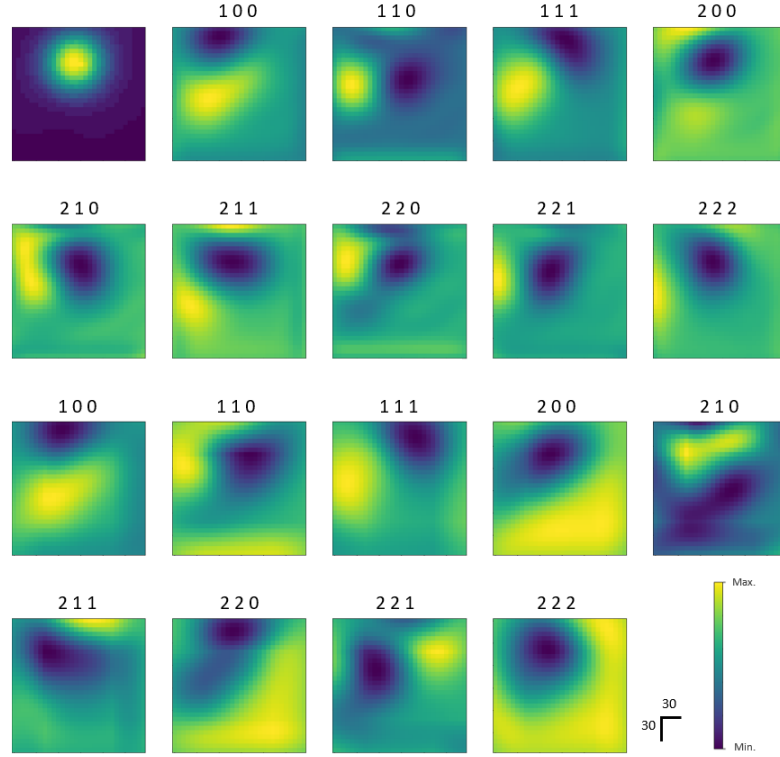


Figura 4.1: Filtrado del parche con ramificación, mostrando un cuadro del parche donde se visualiza la partícula y la respuesta del filtrado en el mismo cuadro. El primer cuadro se muestra la partícula detectada, los siguientes nueve cuadros con secuencia $(1, 0, 0)$, $(1, 1, 0)$, \dots , $(2, 2, 2)$ son el resultado de el primer cuadro filtrado con el filtro Gaussiano cuyo orden de derivada m, a, b corresponde a los dígitos superiores y varianza de 1.7. Los siguientes nueve cuadros son el resultado del primer cuadro filtrado utilizando una varianza de 4.2.

característica \mathbf{F} de dimensiones $Q \times M_P$ siendo Q el número de varianzas utilizadas y M_P el número de filtros implementados con la misma varianza. Cada elemento de esta matriz es igual a la convolución del parche \mathcal{P}_c con las derivadas parciales de una función Gaussiana con media cero, la desviación estándar de todas las funciones Gaussianas en una hilera q son iguales a σ_q . En cada columna j , el elemento de la matriz es igual a la siguiente convolución $\mathcal{P}_c * G_{m,a,b}^{\sigma_q}$ donde m, a y b representan el orden de la derivada parcial en los ejes x, y y z , respectivamente; la forma en que estas derivadas parciales se distribuyen a lo largo de una hilera es como sigue $(1, 0, 0)$, $(1, 1, 0)$, \dots , (M, M, M) . Para los experimentos usamos $M = 2$ generando 9 filtros con la misma varianza y se implementó dos varianzas iguales a 1.7 y 4.2 que dieron

como resultado el filtrado que se observa en la Figura 4.1 donde se muestra el cuadro número 14 de un parche donde se identificó la ramificación. En la primera imagen se muestra la partícula, en las siguientes nueve imágenes se observan los resultados del filtrado con una varianza de 1.7 y cada filtrado se realiza con una combinación lineal de la ecuación (3.3) hasta un filtro de orden m, a, b indicado en la parte superior de cada imagen. De la misma forma se muestran las siguientes nueve imágenes con una varianza de 4.2. Cabe mencionar que cada imagen de la Figura 4.1 tiene intensidades máximas y mínimas diferentes debido al cambio en el orden del filtro y las varianzas.

En la Figura 4.2 se muestran los filtros derivada de Gaussiana con varianza igual a 1.7, en los tres planos XY , YZ y XZ , la derivada parcial m, a, b de cada filtro corresponde a los valores mostrados en la parte superior de cada columna de la tabla.

La matriz característica \mathbf{F} del parche \mathcal{P}_c se representa como un vector de tamaño igual a 486000 (\mathbb{R}^{486000}) que es el argumento de entrada para el método de *Random Forest*.

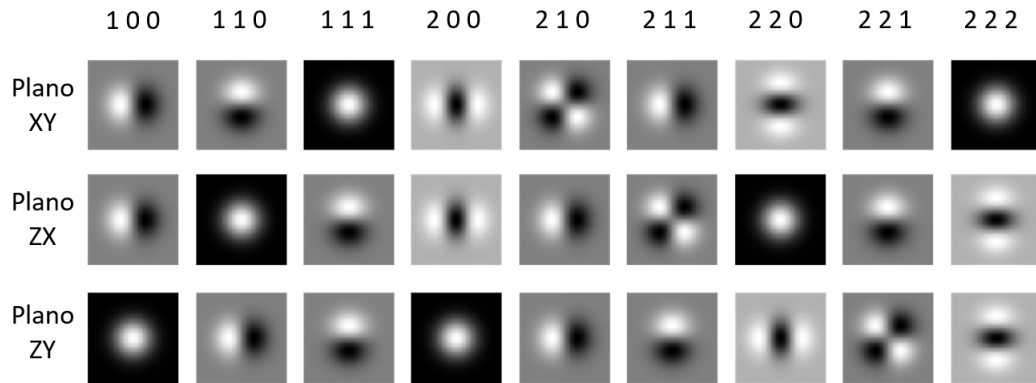


Figura 4.2: Muestra de los nueve filtros con varianza de 1.7 para el método de *Steerable Filters*.

Para obtener los ángulos θ y ϕ necesarios para la ecuación (3.2) se utilizan las siguientes fórmulas

$$\theta = \arctan \left(\frac{D_z}{\sqrt{D_x^2 + D_y^2}} \right)$$

y

$$\phi = \arctan\left(\frac{D_y}{D_x}\right),$$

en donde Dx , Dy y Dz son los desplazamientos de una partícula, o ramificación, en las direcciones x, y y z . Sin embargo, cuando se analiza un parche durante la etapa de clasificación no se tienen disponibles los ángulos θ y ϕ , para obtener sus valores se genera un arreglo de vectores característicos del parche bajo análisis usando diferentes valores para los ángulos θ y ϕ [11, 26]; el esquema de este proceso se puede ver en la Figura 4.3.

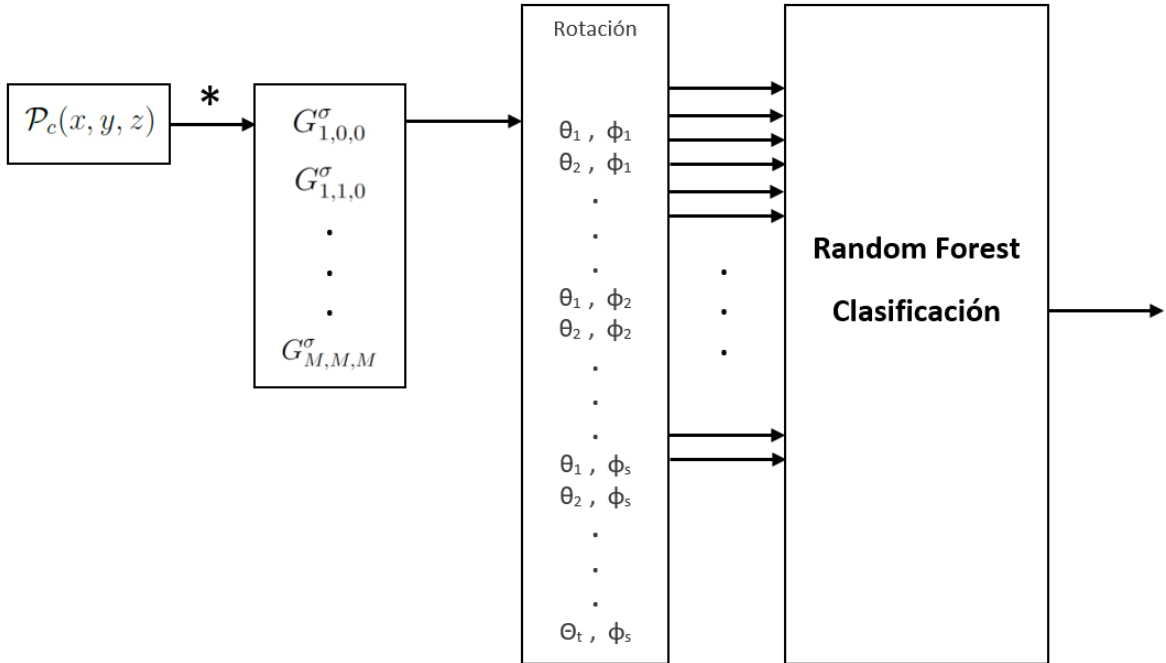


Figura 4.3: Diagrama para el cálculo de los vectores característicos con diferentes rotaciones. Ya que se desconoce la dirección de desplazamiento de la ramificación, para el parche $\mathcal{P}_c(x, y, z)$ se obtiene multiples vectores característicos realizando la convolución $\mathcal{P}_c * G_{m,a,b}$ con diferentes ángulos. El ángulo con mayor probabilidad designará el valor categórico del parche.

4.2. Etapa de aprendizaje de máquina.

En la etapa de clasificación para cada categoría se selecciona la rotación con mayor probabilidad $Y = 1 \vee Y = 0$, donde \vee es el operador “or” lógico y de entre todas las

categorías se asigna aquella con la mayor probabilidad,

$$\tilde{Y}(\mathcal{P}_c) = \arg \max_{j \in \{0,1\}} \left\{ \arg \max_{\theta, \phi} P(Y = j | \mathcal{R}) \right\},$$

tal que $(\theta, \phi) = \mathcal{R}(G(\mathcal{P}_c))$, donde G es el conjunto de filtros aplicados al parche \mathcal{P}_c y \mathcal{R} la función de rotación que produce los vectores θ y ϕ . En la Figura 4.4 se puede observar el resultado de la clasificación mostrando un cuadro del video. En esta etapa se agregó un segundo filtro de intensidad para mejorar la clasificación, se dará una explicación mas detallada sobre este filtro en el siguiente capítulo cuando se discutan las perspectivas.

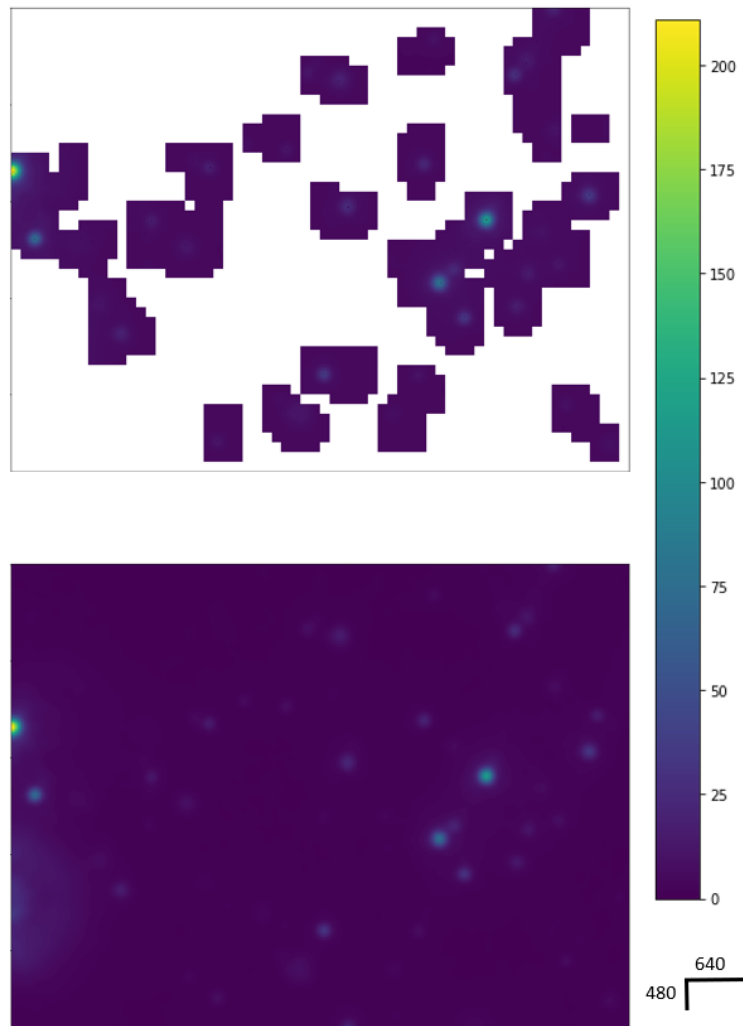


Figura 4.4: Resultado de la etapa de clasificación mostrando un cuadro del video.

Después de la etapa de clasificación, todos los parches con la etiqueta de “ramificación” son utilizados como argumentos de entrada a la etapa que calcula los centros. Esta etapa utiliza un método de regresión que se basa en el procedimiento *Random Forest* presentado en el artículo [26]. La Figura 4.5 ilustra el método, el cual calcula $r = \min(c - o)$, donde c es el centro del parche y o es el centro de la ramificación mas cercana a c , es decir, buscar el valor mínimo de r .

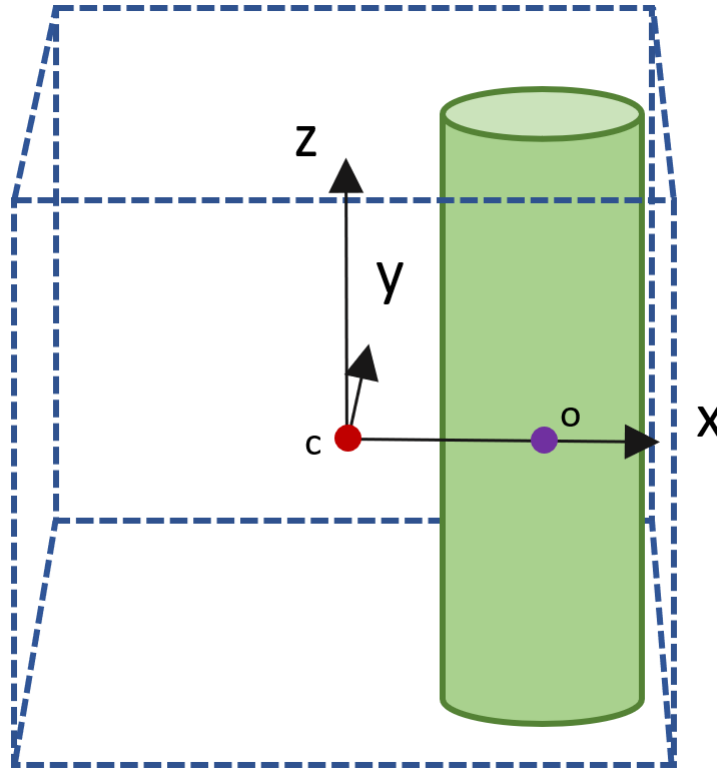


Figura 4.5: Etapa de Random Forest para el cálculo del centro de la ramificación por medio de la distancia mínima entre el centro c del parche y el centro o de la ramificación.

Desafortunadamente, la implementación del método de *Random Forest* que se encarga de calcular los centros de las ramificaciones no produce los resultados esperados, por lo menos no como lo hace el método Hough Forest del artículo [26]. Por lo tanto, para obtener mejores resultados en el cálculo del centro de la ramificación se contempló la utilización de todos los centros calculados por cada árbol del método de *Random Forest* como se observa en la Figura 4.6; se puede ver en la imagen (a) donde

se muestra los cuadros del parche que contienen propuestas de centros, en la imagen (b) se eliminan todos los centros ubicados fuera del área brillante de la partícula o de la ramificación, esto se logra implementando una umbralización por el método de Otsu en cada cuadro del parche [19], en la imagen (c) se muestra el promedio de todos los centros ubicados dentro del área de forma equiprobable, este promediado se realiza en cada cuadro para asegurar que el centro se encuentre dentro del área del parche, pero con el inconveniente de obtener mas de un centro por parche (uno por cada cuadro), por lo tanto se elige el centro perteneciente al cuadro con mayor número de propuestas como se muestra en la imagen (d).

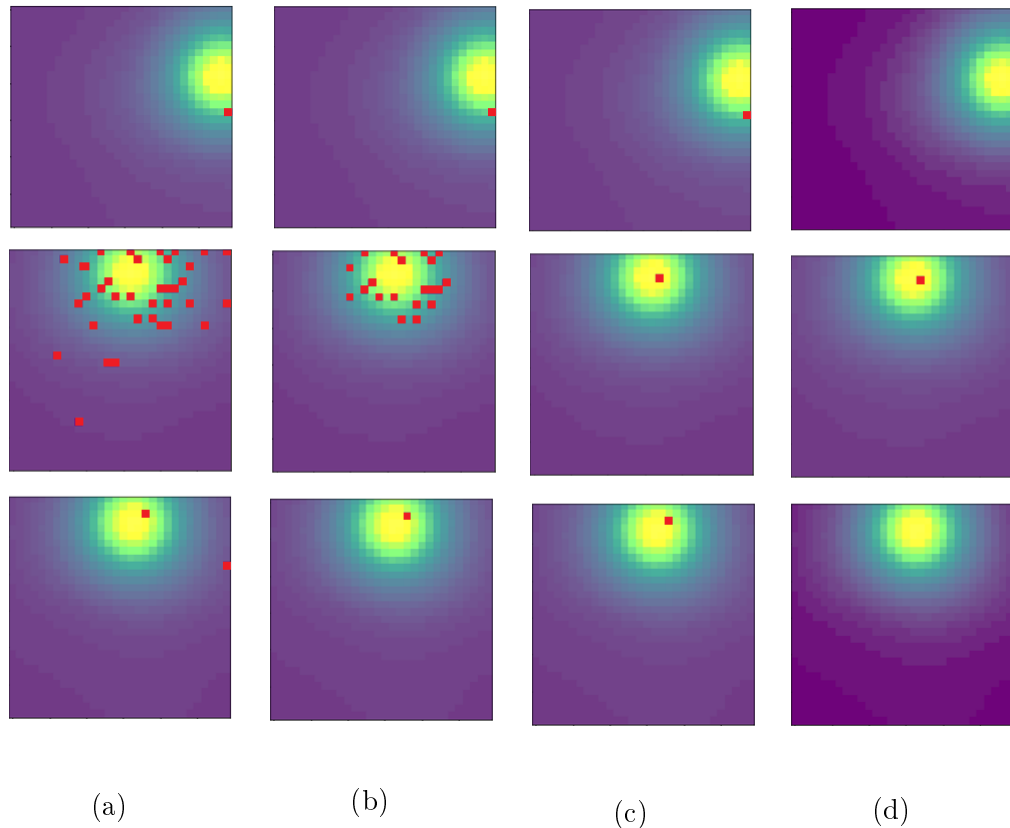


Figura 4.6: Etapa de Mapa de centros mostrando los cuadros con propuestas de centros de un parche identificado como ramificación. (a) Se muestran todos los centros propuestos, con puntos rojos, dentro de un parche obtenidos por el método de *Random Forest*, (b) en cada cuadro del parche donde hubo asignación de centros se eliminan todas las propuestas de centros ubicados fuera del área de la partícula que posee mayor intensidad. (c) En cada parche se realiza un promedio de todos los centros ubicados dentro del área obteniendo un centro por cada cuadro, (d) seleccionando el cuadro con mayor número de propuestas de centros.

Para ambas etapas de *Random Forest* se implementó la biblioteca de Sklearn para Python [21]. En la etapa de clasificación se entrenó el bosque aleatorio con 200 árboles y un criterio de Gini (mencionado en el capítulo anterior) para la función de costo, en cuanto a la etapa de regresión se entrenó con 70 árboles y un criterio de error cuadrático medio.

4.3. *Fast Marching y Radial Symmetry center.*

Como ya se mencionó, después de obtener todos los centros de todos los parches \mathcal{P}_c clasificados como ramificación se obtiene la línea central por medio de la trayectoria mínima aplicando el método de Fast Marching, la implementación consiste en dividir la imagen en niveles $J(\mathcal{P}_c, \tilde{Y} = 1) = \{c | c \in \mathcal{P}_c \text{ y } \mathcal{P}_c \in \tilde{Y} \text{ y } k_1 \leq c_z < k_2 \text{ y } (k_2 - k_1) = N\}$ a lo largo del eje z , donde k_1 y k_2 representan el primero y el último cuadro del parche respectivamente; por ejemplo, tomando en cuenta el tamaño de los parches y su traslape, se define al nivel J_1 como el conjunto de todos los parches que contienen ramificación y que se encuentran ubicados entre los cuadros 1 y 30 del video, mientras el nivel J_2 contiene todos los parches ubicados entre los cuadros 15 y 45 del video, así sucesivamente. Por lo tanto, en el nivel J_n se asignan a todos los centros como fuentes de la expansión de la superficie como un frente de onda y a todos los centros del nivel J_{n+1} como inicio de la trayectoria para obtener la línea central. Teniendo las trayectorias entre los dos niveles se reemplaza el nivel J_{n+1} por J_n y se repite el proceso.

La primera imagen de la Figura 4.4 que muestra el resultado de la clasificación, comparando con la segunda imagen la cual es la imagen original, se puede notar que cada partícula es detectada por más de un parche con su respectivo centro calculado, esto implica que cada ramificación tendrá más de un centro. Debido a que el método de *Fast Marching* requiere de asignar un centro para cada ramificación en cada nivel se escoge el centro ubicado en el área más brillante de la ramificación.

En la Figura 4.7 se observa el resultado del método mostrando la línea central de una ramificación a partir de la unión de dos puntos pertenecientes a los niveles J_n y

J_{n+1} dando como resultado la unión de 15 cuadros.

Para cada cuadro se muestran tres imágenes:

- La imagen de la izquierda indica el centro obtenido por el método, representado con un punto oscuro sobre la imagen original de la partícula.
- En la imagen central se muestra la función de velocidad para la propagación del frente de onda. Para esta función se utilizó el brillo de la partícula de la imagen de la izquierda para cada cuadro pero elevando su intensidad al cubo, provocando que el centro de la partícula tenga la velocidad máxima de propagación para el frente de onda y generando una caída rápida en la velocidad conforme se aleja del centro.
- La imagen de la derecha muestra la expansión de la onda en términos del tiempo. En el cuadro número uno se observa el origen de la expansión de onda mostrando los valores mínimos de tiempo y mientras van avanzando los cuadros, el tiempo de expansión va aumentando.

Cabe recalcar que en la Figura 4.7 el resultado de la línea central no es el deseado ya que no se ubica en la zona con mayor intensidad de la partícula, aunque sí se encuentra dentro del área brillante, gracias a esto se puede agregar el método de *Radial Symmetry Center* para reajustar el centro ya obtenido como se muestra en la Figura 4.8 donde se compara, en nueve cuadros de una ramificación o partícula en movimiento, el resultado del método *Fast Marching* con la reubicación del centro.

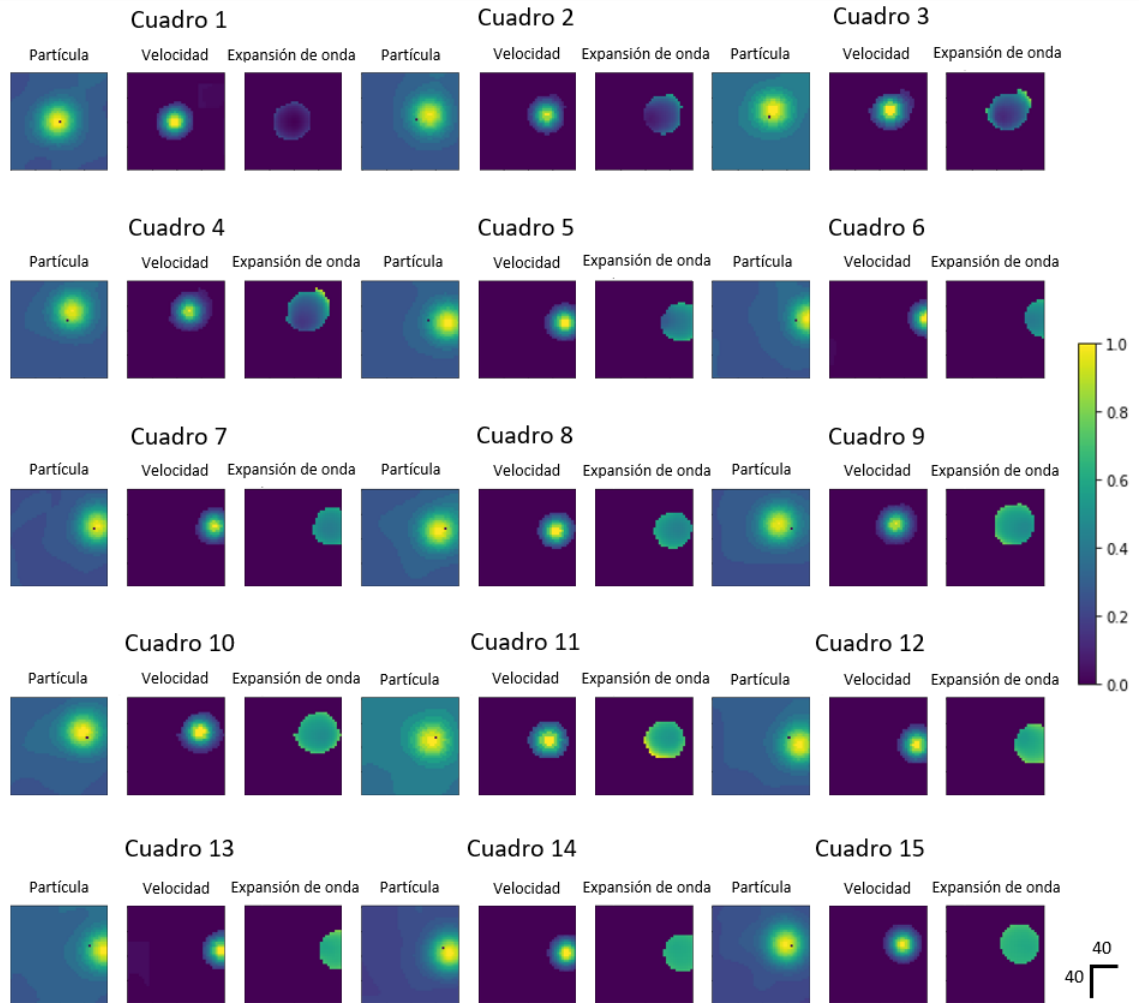


Figura 4.7: Resultado del método de *Fast Marching* mostrando la línea central uniendo dos centros pertenecientes a la misma ramificación. Conforme aumenta la expansión del frente de onda, asignando el origen en el cuadro 1, el tiempo de expansión va aumentando y su distribución depende de la función de velocidad asignada en cada cuadro. La línea central es adquirida buscando el camino con el menor tiempo a partir del centro ubicado en el cuadro 15 representado con un punto oscuro en la imagen donde se muestra la partícula.

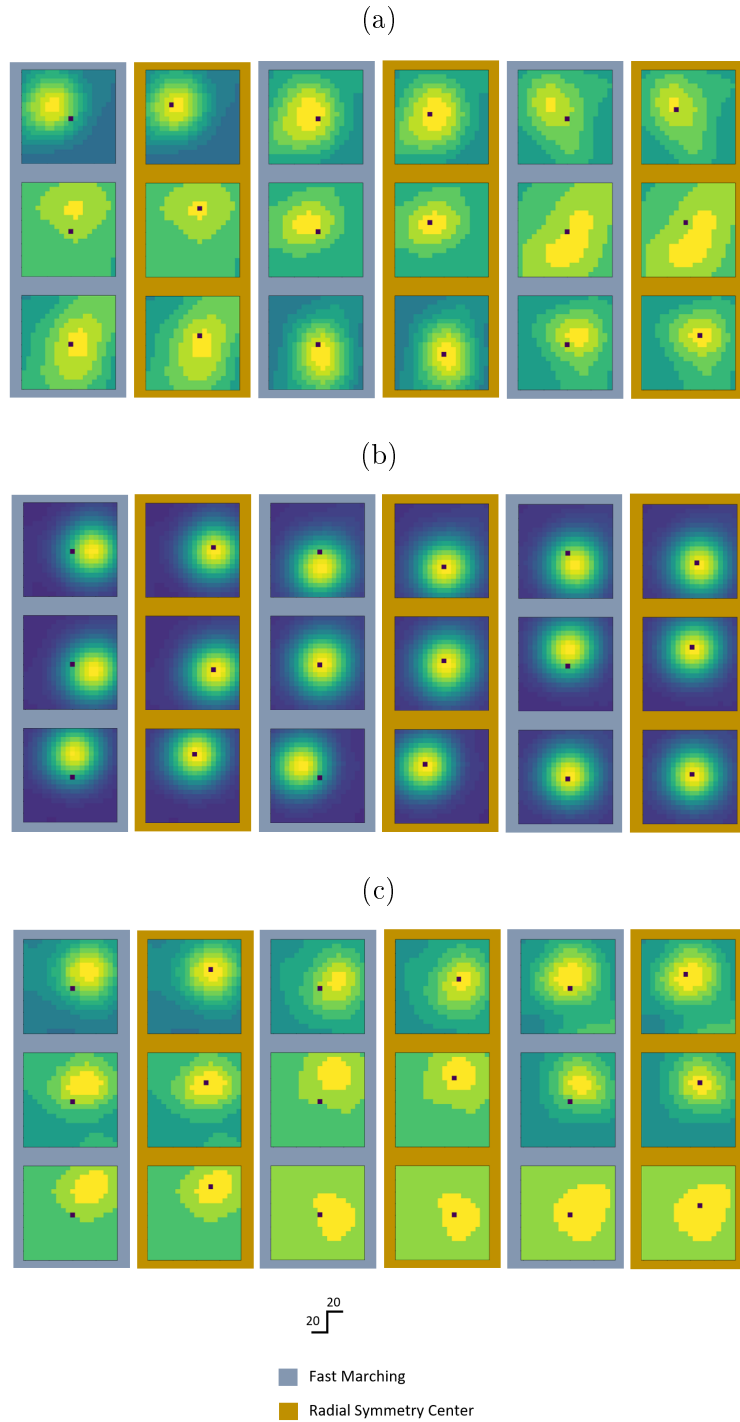


Figura 4.8: Comparación de los resultados obtenidos con el método de *Fast Marching* y *Radial Symmetry Center* mostrando tres partículas con diferentes desplazamientos hacia el fondo de la muestra cada uno. (a) La primera partícula tiene un desplazamiento momentaneo durante unos cuadros del video, (b) la segunda partícula no presenta desplazamientos significativo hacia el fondo y (c) la tercera partícula tiene un desplazamiento paulatino hasta desaparecer.

En la misma figura se muestran tres casos de partículas, en la imagen (b) es el caso de una partícula que no tiene gran desplazamiento hacia el fondo manteniendo un brillo fácil de detectar, en cambio en la imagen (a) se observa el caso de una partícula que va trasladándose hacia el fondo y vuelve a subir en la imagen, similar a la imagen (c) con la diferencia de que la partícula no vuelve a subir, mostrando un desvanecimiento progresivo del brillo.

En los tres casos se muestra como el método de *Radial Symmetry Center* desplaza el centro ya obtenido a la zona con mayor intensidad de la partícula.

4.4. Evaluación del algoritmo.

El mayor inconveniente de este algoritmo se encuentra en su tiempo de procesamiento; con el solapamiento indicado y el tamaño de los videos se requiere de 2,745 parches para cubrir un nivel conformado por 30 cuadros del video. Como se observa en la Figura 4.9, cada parche tiene un tiempo de procesamiento promedio de 0.556 segundos (medido desde la generación del arreglo compuesto por vectores característicos hasta el cálculo de los centros propuestos por cada arbol), provocando un cuello de botella al ser programado de forma secuencial; esto se explicará con mayor detalle en el siguiente capítulo cuando se discutan las perspectivas.

Por otra parte, como ya se hizo mención, en la Figura 4.4 se observa que cada partícula, o ramificación, es detectada por más de un parche, dificultando la evaluación de la detección de las partículas ya que no importa si en algunos parches no se detecta la ramificación, mientras la ramificación sea detectada al menos en un parche es suficiente para poder obtener la línea central. Por esta razón la manera en que se evalúa la detección de las partículas como se muestra en la Figura 4.10 es obteniendo el resultado final del algoritmo y realizar un conteo de las partículas detectadas analizando cada resultado.

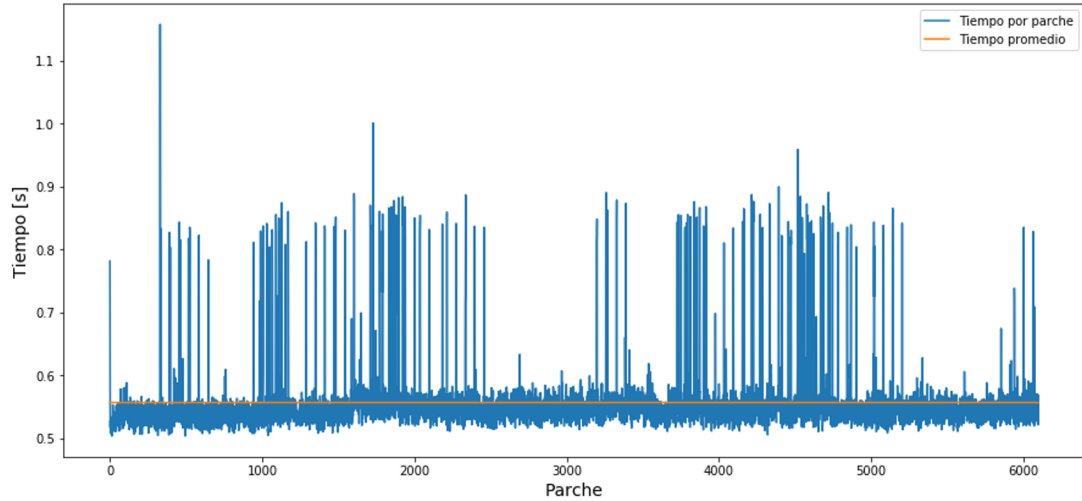
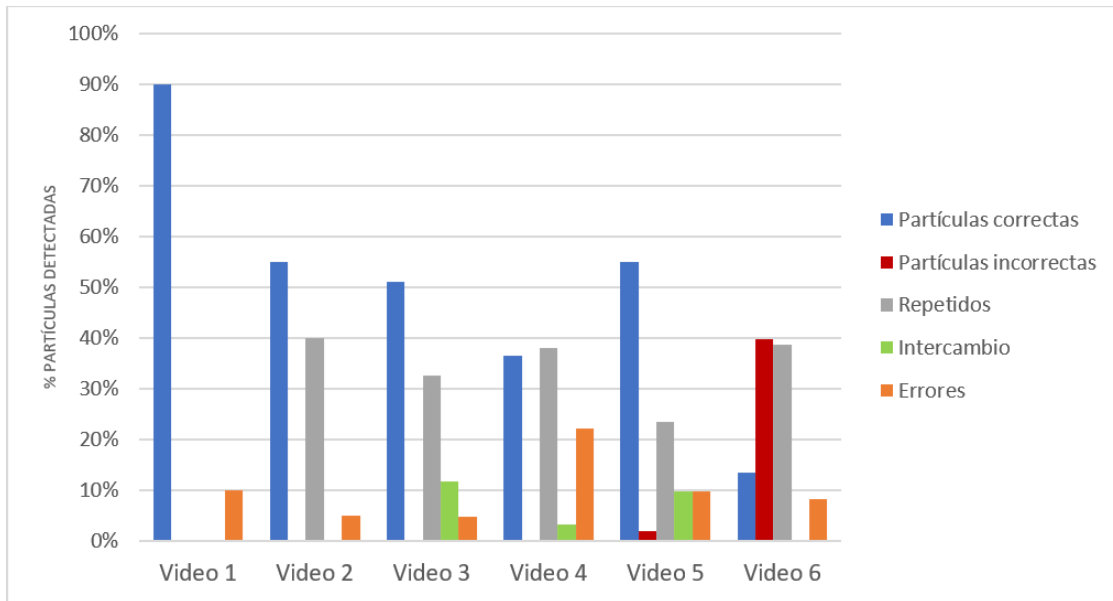
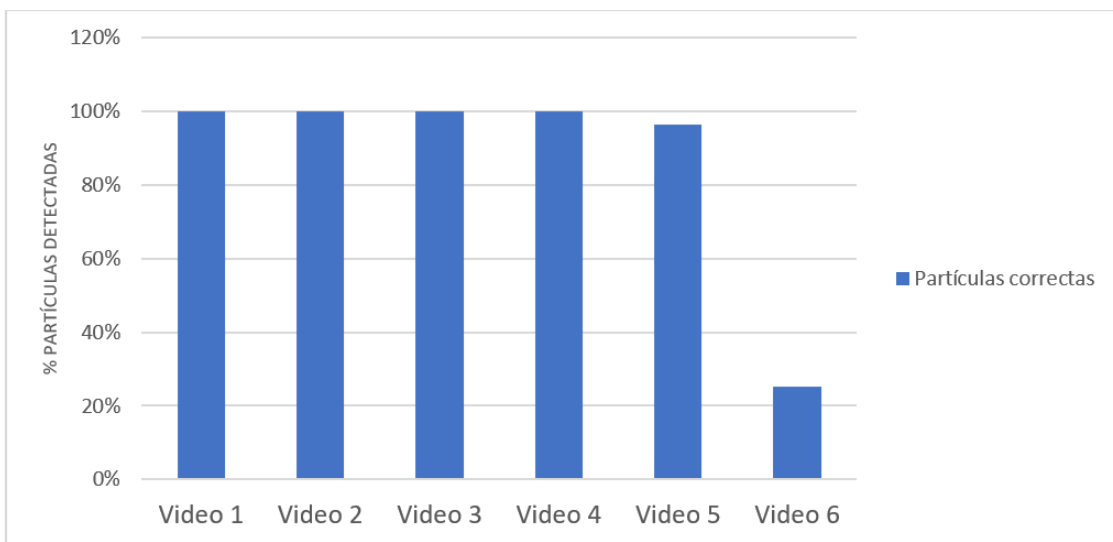


Figura 4.9: Tiempo de procesamiento para cada parche desde la obtención de los vectores característicos hasta el cálculo de los centros en la etapa de *Random Forest*.

En ambas gráficas se muestra la evaluación de seis videos obtenidos del laboratorio que fueron seleccionados con base en el nivel de saturación de partículas y de ruido luminoso como se muestra en la Figura 4.11, las imágenes corresponden a los videos ordenados desde el mas limpio al mas saturado. En la grafica (a) se muestran cinco medidas, la primera equivale al porcentaje de partículas detectadas que resultan correctas, bajo el criterio de visualizar el centro calculado en toda la trayectoria dentro del área de una partícula, mientras que la segunda medida es el resultado de las partículas incorrectas equivalentes a los centros ubicados fuera del área de la partícula y por lo tanto no hay un seguimiento. La tercer medida nombrada “Repetidos” refleja el rendimiento de la etapa de clasificación ya que el algoritmo puede repetir la misma trayectoria con mínimas diferencias como sería el origen de la linea central, causado por una mala detección de ramificación, asignando un centro en una zona donde no existe partícula pero cercano a una; como resultado, en la etapa de *Fast Marching* el centro de estas partículas pueden desplazarse hasta alcanzar la trayectoria de alguna partícula cercana, provocando como resultado que la partícula sea detectada más de dos veces.



(a)



(b)

Figura 4.10: Evaluación del algoritmo para la detección de partículas. (a) Evaluación de todos los resultados obtenidos por cada video, (b) visualización del porcentaje de partículas detectadas correctamente contemplando únicamente los resultados de partículas correctas e incorrectas mostrados en la gráfica (a).

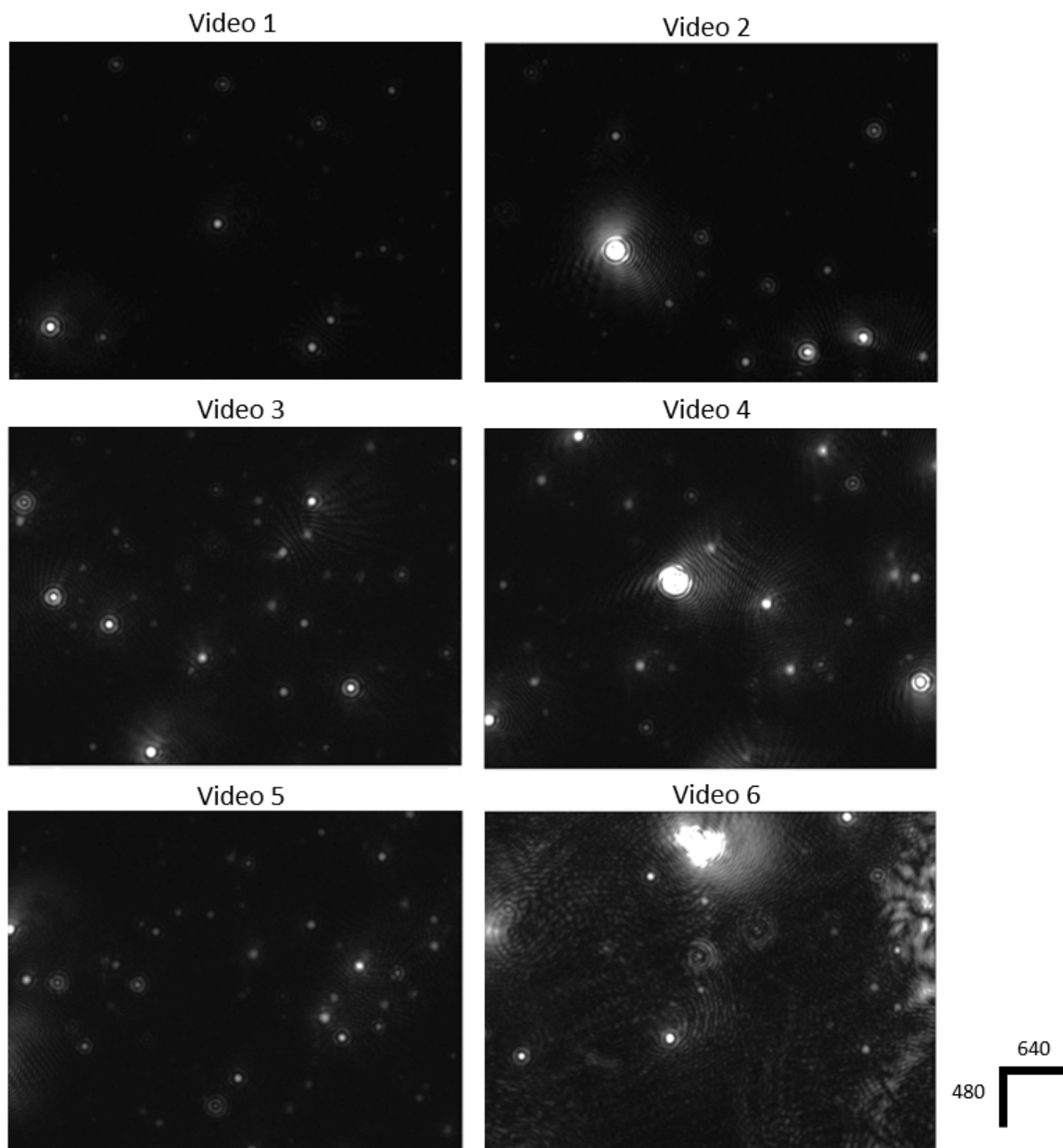


Figura 4.11: Videos utilizados para la evaluación de la detección de partículas con diferente saturación de partículas y brillo.

La cuarta medida nombrada “Intercambio” también se refiere a las partículas repetidas con la diferencia de que su origen proviene de otra partícula bien clasificada pero su centro se logra desplazar a otra partícula muy cercana a causa del método *Fast Marching*. Se explicarán con mayor detalle las medidas tres y cuatro en la Sección Perspectivas de la tesis. La quinta medida nombrada “Errores” indica el número

de partículas incorrectas de las cuales no se pudieron obtener trayectorias con el método de *Fast Marching* lo que ocasiona que se obtenga como resultado únicamente la ubicación del centro calculado en un solo cuadro del video.

Se puede observar que mientras va aumentando la saturación del brillo en la muestra el número de partículas incorrectas va creciendo, mientras que las últimas tres medidas no muestran una relación con la saturación de partículas ni de brillo. Por esta razón y porque pueden ser detectadas todas las partículas pertenecientes a estos tres casos, buscando las trayectorias repetidas y/o las trayectorias conformadas por un solo cuadro, se pueden descartar, dando como resultado la gráfica (b) donde solo se muestra el porcentaje de partículas detectadas correctamente una vez eliminando los casos repetidos, intercambiados y los errores.

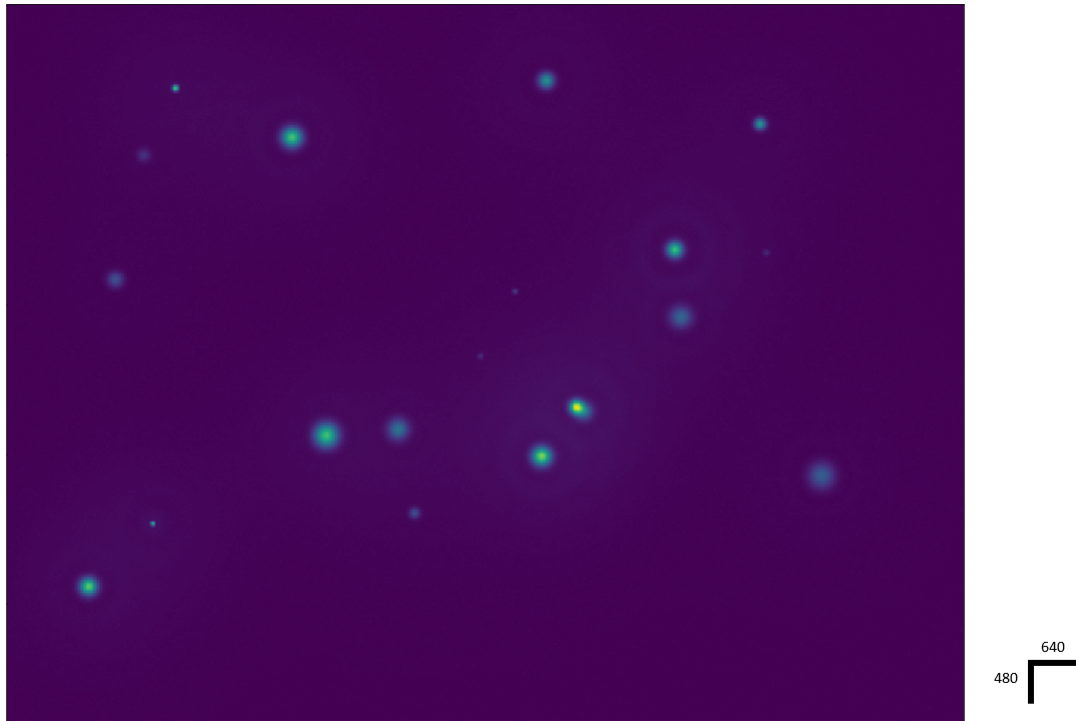


Figura 4.12: Simulación de video de partículas en movimiento para la evaluación de la estimación de los centros de cada partícula a través del tiempo.

Por otra parte, la evaluación del seguimiento de las partículas utilizando las mismas muestras para la evaluación de la detección resulta complicado e impreciso debido a que se requiere de asignar un centro previamente y del cual no se tiene conocimien-

to. Por esta razón se propuso crear una simulación de un video de partículas (ver Figura 4.12) generando varios centros que se distribuyen en el primer cuadro de la secuencia y a partir de los cuales se generan los centros en los siguientes cuadros; en cada cuadro los centros se desplazan dentro de un radio con dirección aleatoria. Para esta simulación el tamaño del radio se asigna a todos los centros de cada cuadro. Una vez que se determinan los centros de partículas en cada cuadro, se asigna una distribución Gaussiana a cada centro, la varianza es asignada de manera aleatoria usando una distribución uniforme. Además, se añade un aro brillante alrededor de cada partícula utilizando una función sinc y agregando a toda la imagen ruido con distribución de Poisson con $\lambda = 1$ (los videos obtenidos en el laboratorio poseen esta distribución). Esta simulación se utilizó como entrada al algoritmo para evaluar su rendimiento siguiendo partículas.

En la Figura 4.13 se observa una comparación de los resultados de los métodos *Fast Marching* y *Radial Symmetry Center* en donde se muestra la distancia entre el centro asignado por cada método y el centro real, utilizando una distancia Manhattan para poder visualizar mejor el rendimiento de cada método. Cada gráfica representa una partícula conformada por 39 cuadros donde las cuatro partículas muestran una reducción significativa en la distancia implementando el método de *Radial Symmetry Center*.

En el siguiente capítulo explicaremos con más detalle los resultados referentes al cálculo del tamaño de las partículas.

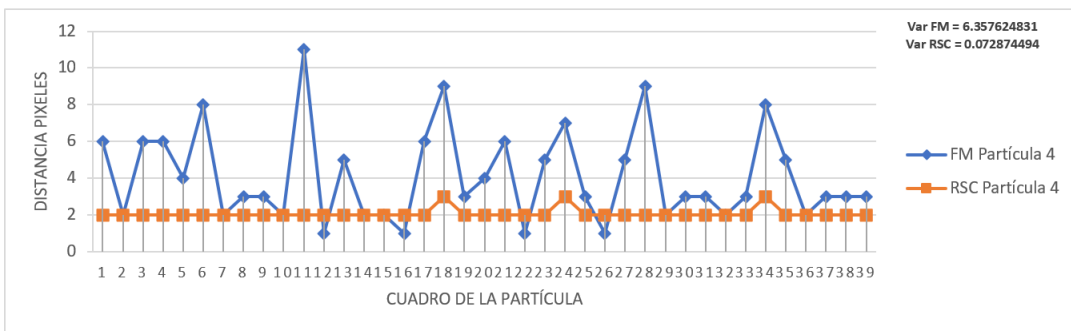
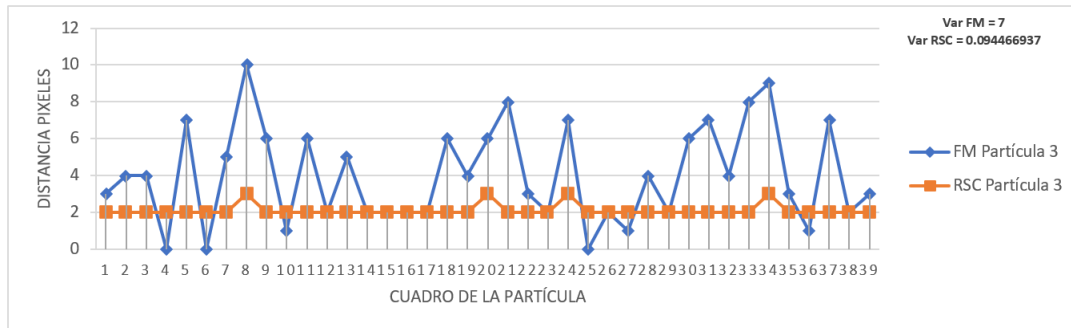
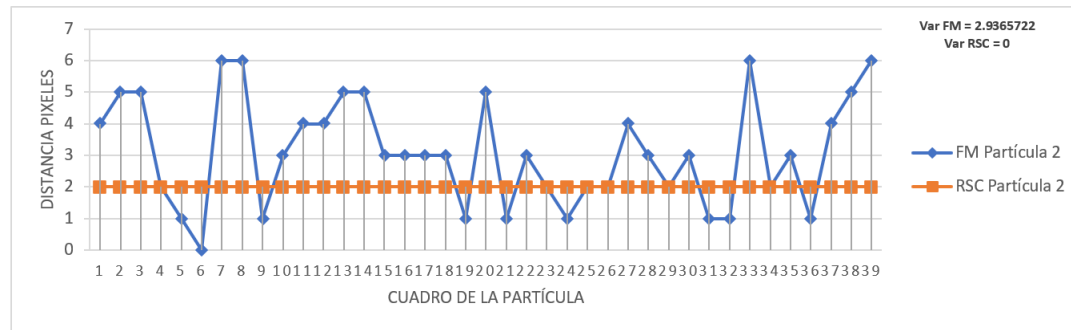
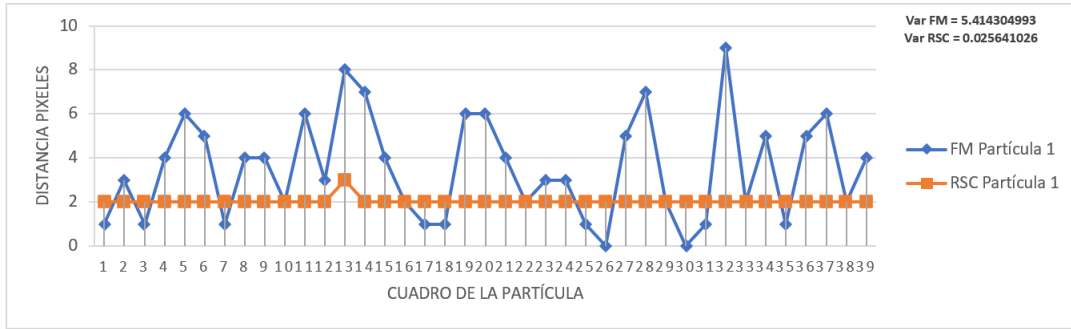


Figura 4.13: Evaluación del seguimiento de partículas comparando la distancia Manhattan entre el centro obtenido y el centro real, utilizando los métodos Fast Marching (FM) y Radial Symmetry Center (RSC) con cuatro partículas.

Capítulo 5

Conclusiones y Trabajo Futuro

El análisis de partículas como ramificaciones ha mostrado buenos resultados para la detección y seguimiento de estas. A pesar de los resultados mostrados en las figuras anteriores donde indican una mala clasificación en algunos casos, no implica que el análisis sea ineficiente debido a que se puede solucionar ya sea mejorando los métodos aplicados en este algoritmo o cambiando los métodos involucrados en la etapa de clasificación.

También hay que recordar que el método implementado esta basado en un artículo para seguimiento de vasos sanguíneos, aunque también son ramificaciones, el comportamiento y características de sus muestras son muy diferentes a las que se analizan en este proyecto. Otra cosa que se debe tener en cuenta es uno de los objetivos del proyecto el cual es comprobar que se puede obtener buenos resultados cambiando el análisis de partículas a ramificaciones tridimensionales y no es comprobar que el método propuesto por el artículo antes mencionado puede dar buenos resultados, por esta misma razón el algoritmo puede ser adaptado a las muestras que se estan analizando sin perder el tipo de análisis.

En este caso, la idea de utilizar un método de *Path planning algorithms* como es el caso de *Fast Marching* para obtener la línea central de la ramificación resulta muy util para resolver el problema de la pérdida de una partícula debido a su movimiento en profundidad, aunque puede tener inconvenientes para el seguimiento de partículas con una elevada velocidad de movimiento en donde, entre cada cuadro no se visualice una conexión, imposibilitando la formación de una ramificación aunque

esto se podría solucionar aumentando la frecuencia de muestreo para la adquisición del video considerando que se está trabajando con muestras cuyo tamaño no implica un desplazamiento tan grande.

Otro de los problemas ya mencionados que se puede encontrar cuando se trata de seguimiento de partículas es el ruido que genera el aro de luz de cada partícula generando zonas con mucho brillo provocando que se confunda con las partículas por su similitud en intensidad, por esta parte resulta conveniente la implementación de un método de aprendizaje de máquina para lograr diferenciar entre ambos. Por otra parte en los resultados se muestra que, aunque no se detecta gran parte de este ruido, existen casos donde sí se logra detectar, siendo estos casos los más cercanos a las partículas provocando resultados repetidos al final del algoritmo lo que puede indicar que se requiere de mayor entrenamiento.

No se muestra ningún resultado sobre el cálculo de los tamaños para cada partícula ya que esta etapa requiere de un estudio por separado, debido a que existen diversos factores que interfieren en la implementación de la ecuación de Stoke-Einstein, por ejemplo, la resolución de la cámara digital y la amplificación del microscopio afecta el tamaño que representa cada píxel en el momento de definir el desplazamiento de la partícula entre cada cuadro del video. Otro factor importante es el tiempo de muestreo de la cámara digital, ya que dependerá del comportamiento de las muestras que se desean analizar; una frecuencia de muestreo muy alta genera una disminución en la sensibilidad al desplazamiento de las partículas de gran tamaño con baja velocidad de movimiento, por el contrario, una frecuencia de muestreo muy baja dificulta el seguimiento de partículas muy pequeñas cuya velocidad de movimiento es elevada. A estos factores se le puede agregar el error de cuantificación y el error del cálculo de los centros, por lo tanto no se consideró adecuado anexar resultados de la estimación de los tamaños de cada partícula.

El algoritmo cumple con su principal objetivo el cual es realizar un buen seguimiento de las partículas pero a costo de un gran tiempo de procesamiento, pudiendo tardar hasta dos días para completar un video con el tiempo ya mencionado, aunque esto no es inconveniente ya que es posible solucionar este problema, por lo tanto

considero que vale la pena seguir mejorando este algoritmo ya que no solo cumple con un buen seguimiento, también soluciona algunos problemas comunes en el rastreo de partículas y puede llegar a solucionar otros si se tratan los problemas que se mencionan en las perspectivas.

5.1. Aportaciones.

- Implementar un método diseñado para seguimiento de vasos sanguíneos, en imágenes tri-dimensionales, en un seguimiento de partículas.
- Cambiar el método *Hough Forest* sugerido por el artículo por una etapa nombrada como “mapa de centros”.
- Complementar el método de *Fast Marching* para reajustar el centro adquirido utilizando el método de *Radial Symmetry Center*.

5.2. Perspectivas.

- Como ya se había mencionado, uno de los principales problemas del algoritmo se encuentra en su tiempo de procesamiento debido a que se debe analizar de forma secuencial cada parche hasta abarcar todo el video, pero se tiene la ventaja de que todos los parches son independientes hasta la etapa del cálculo de los centros (siendo este el cuello de botella), dando oportunidad de poder paralelizar el procesamiento de cada parche y así reducir el tiempo de procesamiento de dos días a unas horas o incluso minutos.
- Por otra parte, el cálculo de los vectores característicos es otro factor que repercute mucho en el tiempo de procesamiento y en espacio de memoria, por lo tanto existe la posibilidad de encontrar otro tipo de vectores característicos que no impliquen un alto costo en el tiempo de procesamiento ni en consumo de la memoria.

- También se hizo mención de un filtro agregado en la etapa de clasificación en donde se implementa un umbral para cada frame del parche detectado como ramificación. Este filtro se agregó debido a que existe ruido en el fondo con muy baja intensidad pero con una forma geométrica muy similar a las partículas provocando que el vector característico sea parecido al de la ramificación. Este es otro punto a favor para buscar otros vectores característicos y evitar el uso de este filtro innecesario ya que se está tratando con métodos de aprendizaje de máquina donde se debería poder diferenciar esto. Además de que este filtro depende de un umbral el cual se determinó con las muestras que se obtuvieron, pero existe la posibilidad de obtener muestras donde este umbral pueda cambiar mucho.
- Otro problema que se detectó y se mostró en las gráficas de la Figura 4.10, son los casos “intercambiados” ocasionados por el mismo método de *Fast Marching*, esto es debido a dos factores los cuales se deben mejorar:
 - Una buena función de velocidad es indispensable para lograr no solo que la línea central se obtenga lo mejor posible sino que también beneficia en que la búsqueda no se salga de la ramificación e incluso esto podría asegurar un buen seguimiento sin importar lo cerca que estén las partículas entre estas sin llegar a un punto de cruce durante su desplazamiento, lo que podría dificultar su seguimiento.
 - En este proyecto, el método de *Fast Marching* fue implementado a través de una biblioteca de Python dando buenos resultados pero no se observó el comportamiento esperado en las imágenes tridimensionales a lo cual se le puede atribuir el error de una mala expansión del frente de onda y por lo tanto un mal seguimiento de la partícula en el momento que se tiene más de una partícula a una distancia muy corta, por lo tanto resulta conveniente programar el método para asegurar que la expansión del frente de onda es el adecuado para las muestras.

Bibliografía

- [1] T. Alkhalifah and S. Fomel, “Implementing the fast marching eikonal solver: spherical versus Cartesian coordinates,” *Geophysical Prospecting*, vol. 49, no. 2, pp. 165–178, 2001.
- [2] R. Boltvanskiy, J. W. Merrill, and E. R. Dufresne, “Tracking particles with large displacements using energy minimization,” *The Royal Society of Chemistry*, 2017.
- [3] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, and J. Kreuter, “Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles,” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 57, no. 2, pp. 369–375, 2004.
- [4] A. Criminisi and J. Shotton, *Decision forests for computer vision and medical image analysis*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [5] R. Eisberg and R. Resnick, *Física Cuántica - Átomos, Moléculas, Sólidos, Nucl.* Turtleback Books, 1992.
- [6] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, “Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates,” *Pharmaceutical research*, vol. 27, pp. 796–810, 03 2010.
- [7] G. Fowles, *Introduction to Modern Optics*, ser. Dover Books on Physics. Dover Publications, 2012.
- [8] W. Fraunhofer, G. Winter, and C. Coester, “Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems,” *Analytical chemistry*, vol. 76, no. 7, pp. 1909–1920, 2004.

- [9] W. T. Freeman and E. H. Adelson, “The design and use of steerable filters,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 13, no. 9, pp. 891–906, Sep. 1991.
- [10] W. J. Godinez and K. Rohr, “Tracking Multiple Particles in Fluorescence Time-Lapse Microscopy Images via Probabilistic Data Association,” *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 34, no. 2, pp. 415–432, Feb 2015.
- [11] G. González, F. Fleurety, and P. Fua, “Learning rotational features for filament detection,” in *2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. IEEE, 2009, pp. 1582–1589.
- [12] D. Halliday, R. Resnick, and J. Walker, *Fundamentals of Physics*. John Wiley & Sons, 2010.
- [13] M. Jacob and M. Unser, “Design of steerable filters for feature detection using canny-like criteria,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 26, no. 8, pp. 1007–1019, Aug 2004.
- [14] K. Jaqaman, D. Loerke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S. L. Schmid1, and G. Danuser, “Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences,” *Nature Publishing Group*, 2008.
- [15] F. Jenkins and H. White, *Fundamentals of Optics*. Tata McGraw-Hill Education, 1937.
- [16] D. Murphy and M. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley, 2012.
- [17] K. P. Murphy, “Machine learning: A probabilistic perspective,” 2012, pp. 543 – 551.
- [18] J. M. Newby, A. M. Schaefer, P. T. Lee, M. G. Forest, and S. K. Lai, “Convolutional neural networks automate detection for tracking of submicron-scale

- particles in 2D and 3D,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 36, pp. 9026–9031, aug 2018.
- [19] N. Otsu, “A threshold selection method from gray-level histograms,” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, Jan 1979.
- [20] M. Patel, S. E. Leggett, A. K. Landauer, I. Y. Wong, and C. Franck, “Rapid, topology-based particle tracking for high-resolution measurements of large complex 3D motion fields,” *Scientific Reports*, 2018.
- [21] F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and Édouard Duchesnay, “Scikit-learn: Machine learning in python,” *Journal of Machine Learning Research*, vol. 12, no. 85, pp. 2825–2830, 2011. [Online]. Available: <http://jmlr.org/papers/v12/pedregosa11a.html>
- [22] S. Raschka, *Python Machine Learning*. Packt Publishing Ltd, 2016.
- [23] A. L. Rocca, G. D. Liberto, P. Shayler, C. Parmenter, and M. Fay, “Application of nanoparticle tracking analysis platform for the measurement of soot-in-oil agglomerates from automotive engines,” *Tribology International*, vol. 70, pp. 142–147, feb 2014.
- [24] J. Roller, P. Pfeiderer, J.-M. Meijer, and A. Zumbusch, “Detection and tracking of anisotropic core-shell colloids,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2018.
- [25] C. K. Rosenthal, A. Heinrichs, N. Gray, N. Rusk, N. Blow, and K. Baumann, “Milestones in light microscopy,” *Nature Cell Biol*, vol. 11, pp. S6–S7, 2009.
- [26] M. Schneider, S. Hirsch, B. Weber, G. Székely, and B. H. Menze, “Joint 3-D vessel segmentation and centerline extraction using oblique Hough forests with steerable filters,” *Medical Image Analysis*, vol. 19, no. 1, pp. 220–249, jan 2015.

- [27] F. Sears, M. Zemansky, and H. García, *Física Universitaria Con Física Moderna Vol 2*. Pearson Educación de México, SA de CV, 2005.
- [28] J. F. D. Sepúlveda and J. C. Correa, “Comparación entre árboles de regresión cart y regresión lineal,” *Comunicaciones en estadística*, vol. 6, no. 2, pp. 175–195, 2013.
- [29] J. A. Sethian, *Level set methods and fast marching methods: evolving interfaces in computational geometry, fluid mechanics, computer vision, and materials science*. Cambridge university press, 1999, vol. 3.
- [30] D. J. Smith, “Ultimate resolution in the electron microscope?” *Materials Today*, vol. 11, pp. 30–38, 2008.
- [31] J. Strong, *Concepts of Classical Optics*, ser. Dover Books on Physics. Dover Publications, 2012.
- [32] H. Yücel and N. T. Okumuşoğlu, “A new tracking algorithm for multiple colloidal particles close to contact,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2017.
- [33] J. Zepeda Cervantes, “Evaluación de cristales de poliedrina como vehículo para la expresión de antígenos recombinantes en un modelo murino,” mathesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.