

Imágenes de microscopía

Detección de filamentos

Autores:

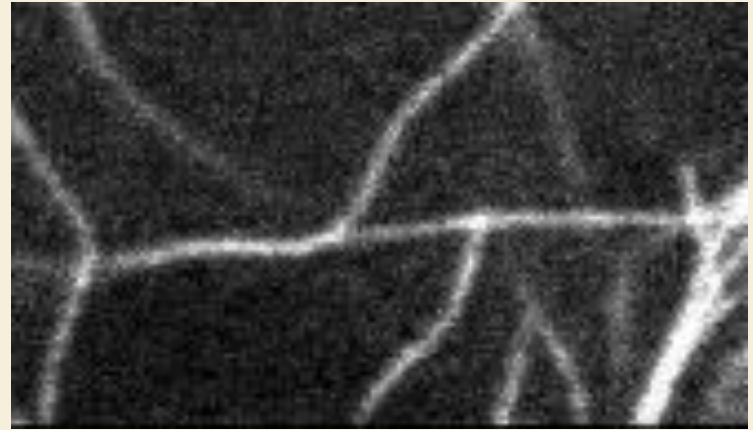
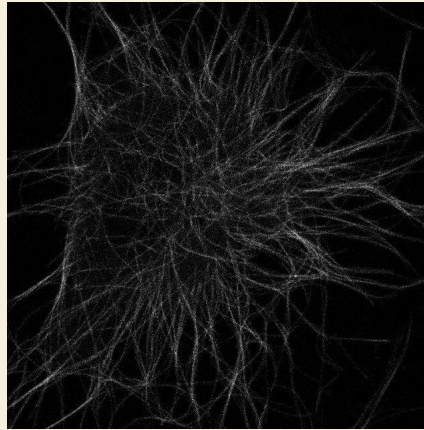
- Ignacio Sagues - ITBA - isagues@itba.edu.ar
- Tobias Brandy - ITBA - tbrandy@itba.edu.ar
- Faustino Pannunzio - ITBA - fpannunzio@itba.edu.ar

Tutora:

- Luciana Bruno - IC/FCEN - lucianabrun@gmail.com

Descripción del Problema

Las siguientes imágenes son ejemplos de filamentos de microscopía de fluorescencia a los que se debería poder realizar un seguimiento.



Descripción del Problema

Existen numerosos algoritmos para el seguimiento (tracking) con precisión nanométrica de partículas individuales de geometría tipo-esférica. Sin embargo, hacer el seguimiento de filamentos que se desplazan y transforman a lo largo del tiempo es un trabajo para el cual existen menos estrategias.

Para realizar el proceso de seguimiento de una forma más automatizada y con mayor precisión, existen tres enfoques diferentes.

Descripción del Problema

- **Umbralización:** El objetivo es convertir una imagen en escala de grises a una nueva con sólo dos niveles, de manera que los objetos queden separados del fondo para de esta manera intentar delimitar el contorno del filamento a trackear.
- **Contornos activos:** El método de contornos activos es un algoritmo utilizado para poder seguir de manera rápida y precisa una figura a lo largo de una secuencia de imágenes. En este algoritmo se debe considerar al filamento a seguir como una unidad cuyos contornos van a expandirse y contraerse.
- **Análisis de perfiles de intensidad:** Esta técnica consiste en trazar perfiles de intensidad en la dirección transversal al filamento a lo largo del mismo. Considerando que la intensidad será máxima en las zonas centrales del filamento.

Descripción del Problema

Actualmente el Grupo de Dinámica Intracelular utiliza el algoritmo AFTER (Automated Filament Tracking and Evaluation Routine), desarrollado durante la Tesis Doctoral de la Dra. Pallavicini (FCEN-UBA).

Esta es una herramienta que permite interactuar con un rutina desarrollado en Matlab mediante una interfaz gráfica.

Los principales problemas de esta solución es la necesidad de una licencia para utilizarla, la velocidad de respuesta del algoritmo y la usabilidad de la interfaz.

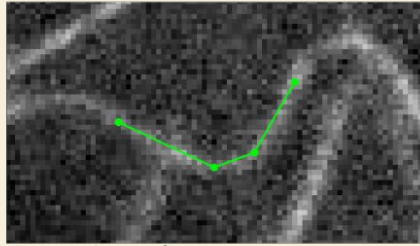
Objetivo

Construir una aplicación web de **código abierto** para el seguimiento de filamentos del citoesqueleto observados por microscopía de fluorescencia, enfocada en ser **precisa, rápida y simple**.

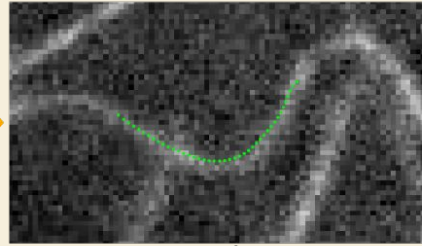
Debe permitir obtener:

- Coordinadas de los filamentos con resolución sub-pixel en los distintos cuadros en formato texto.
- Imágenes de los filamentos con el resultado del tracking para fines de visualización.

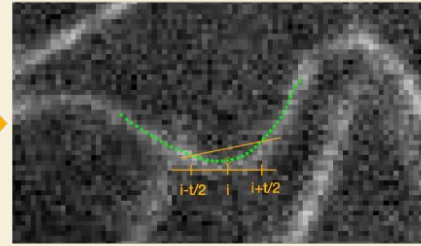
Algoritmo - Introducción



Selección inicial de puntos
(solo 1er paso)

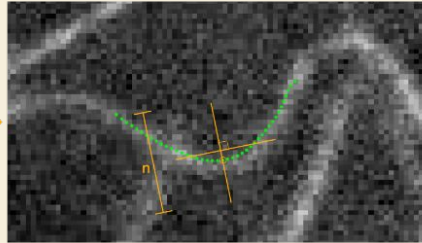
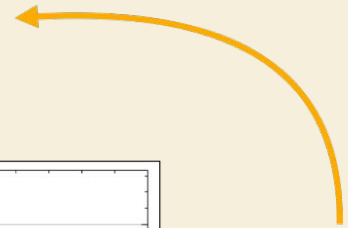


Interpolación lineal
(solo 1er paso)

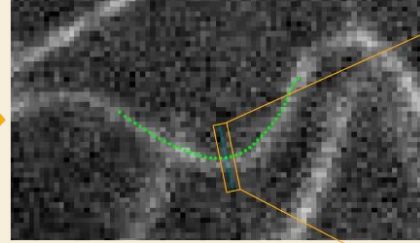


Aproximación de la recta tangente

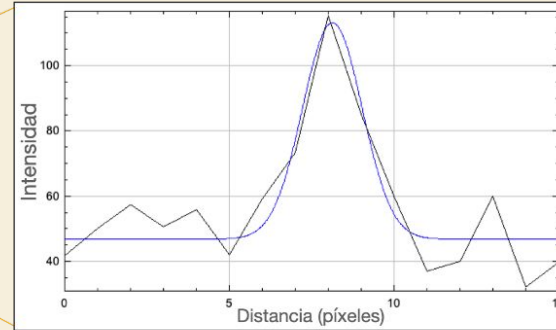
El resultado es utilizado
como valor inicial para la
siguiente iteración



Calculo de la recta normal



Obtención del perfil de intensidad



Ajuste a una función gaussiana



Parámetro μ
(aproximación del centro
del filamento)

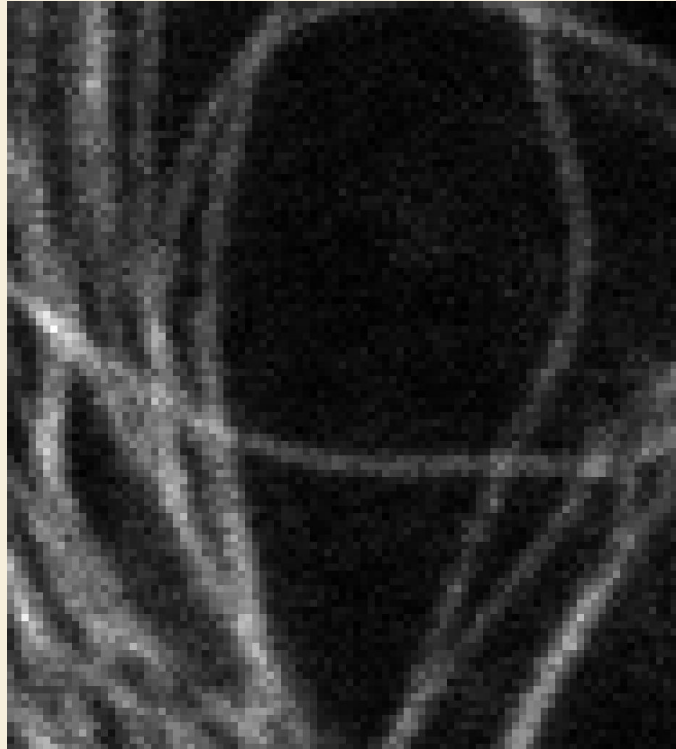


Almacenado de
resultados de la
iteración actual

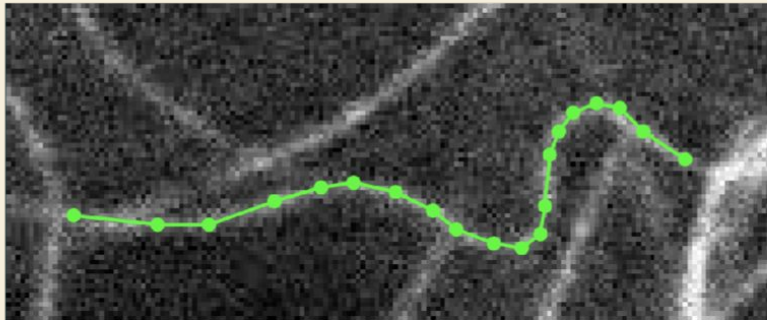
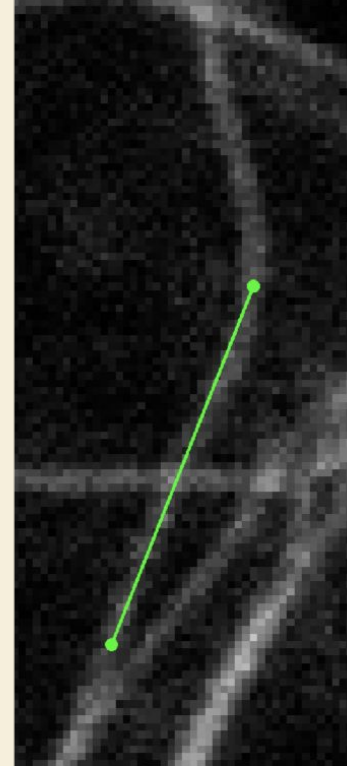
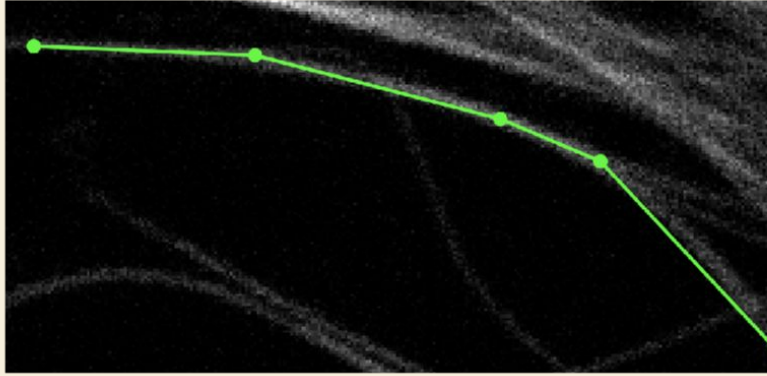
Esquema general de la rutina de seguimiento

Algoritmo

¿Cómo seleccionamos el filamento?

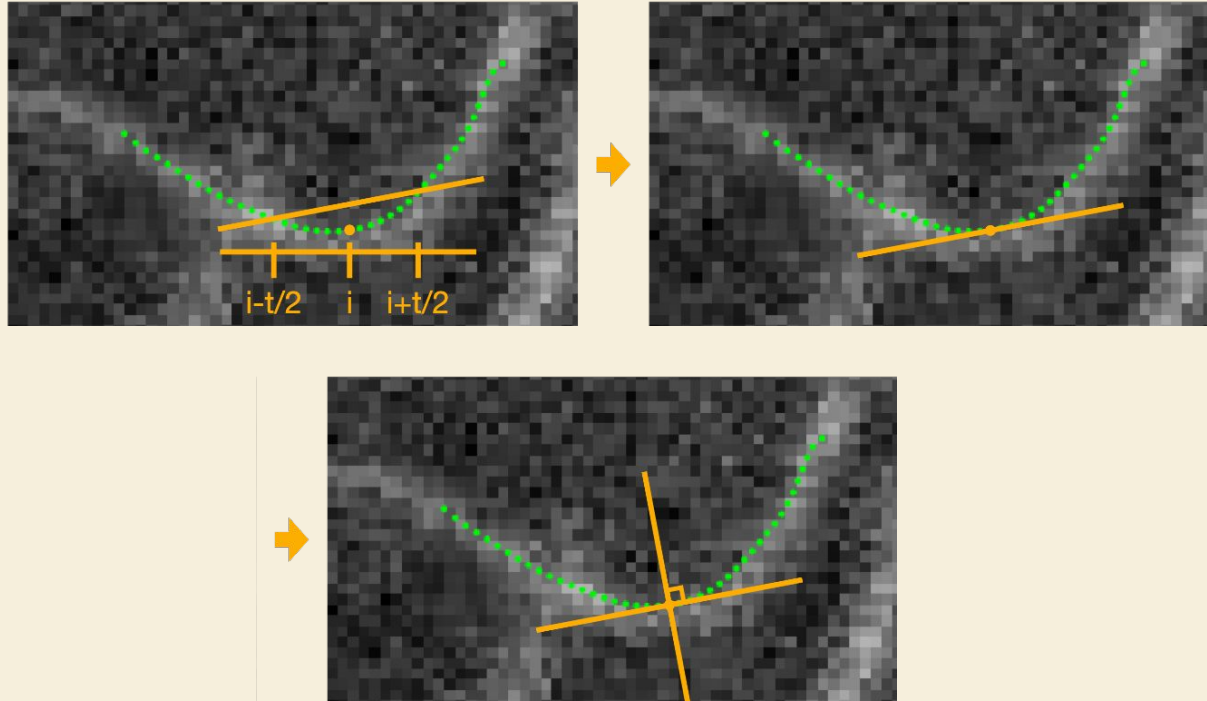


Algoritmo - Primera Iteración



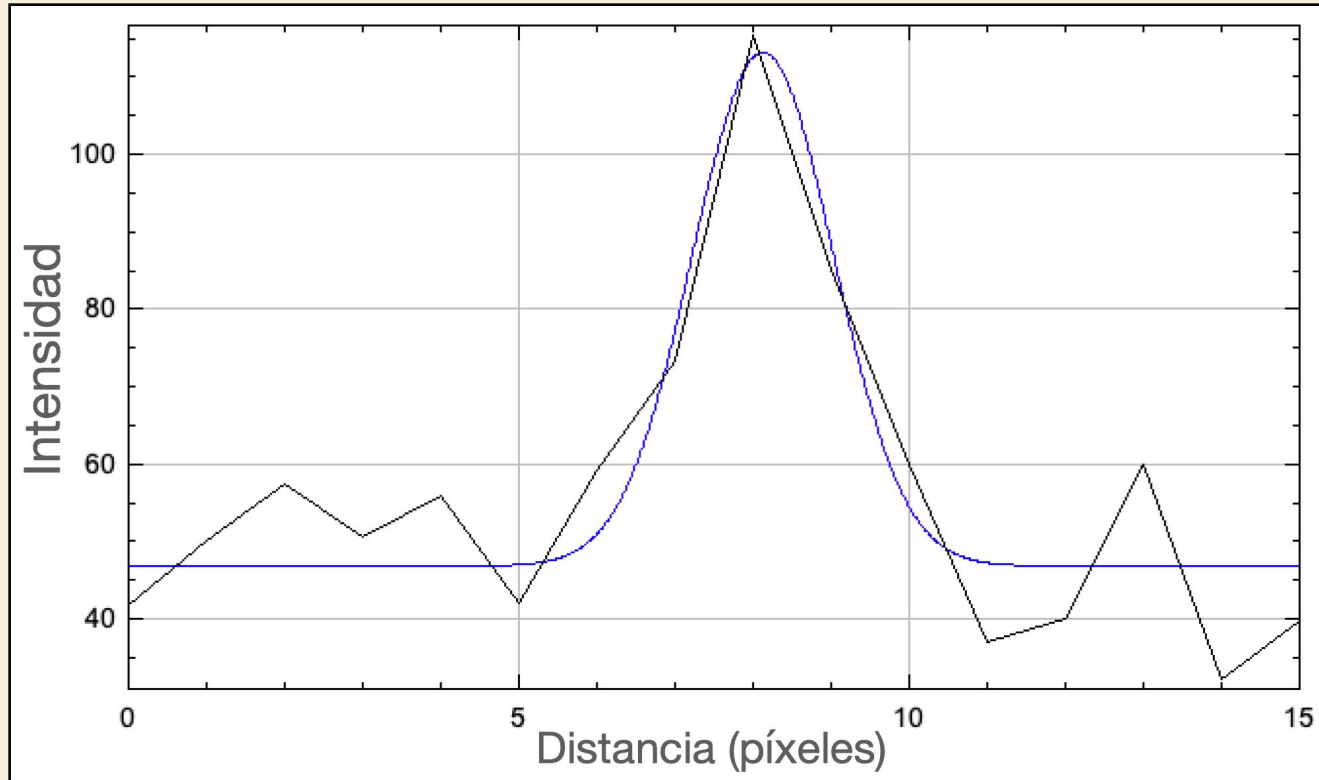
Selección de distintos tipos de filamentos

Algoritmo - Perfiles de Intensidad



Procedimiento para el cálculo de la recta normal

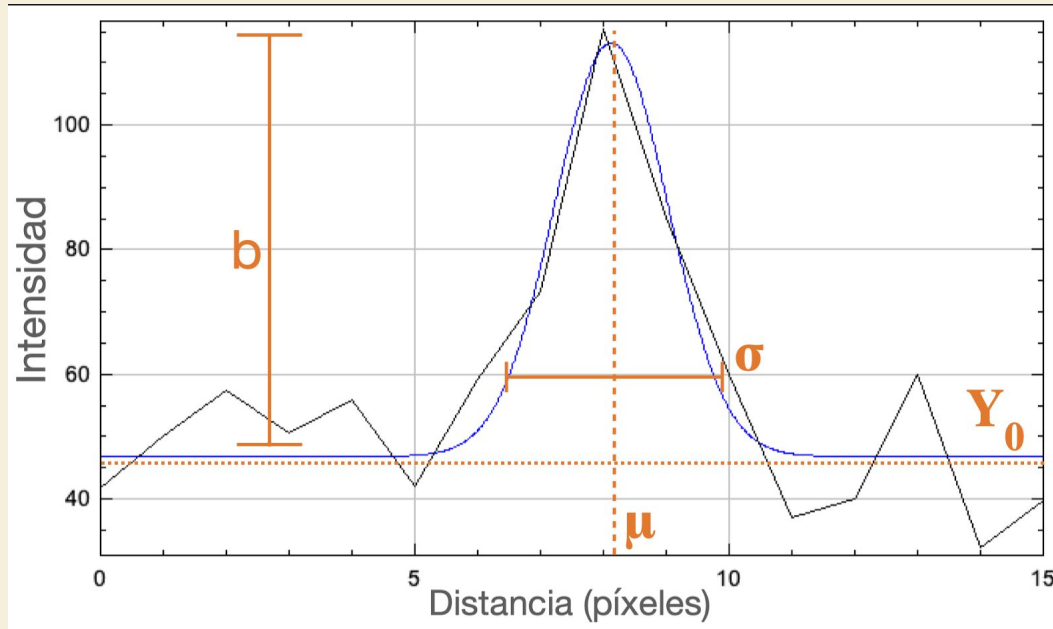
Algoritmo - Ajuste Gaussiano



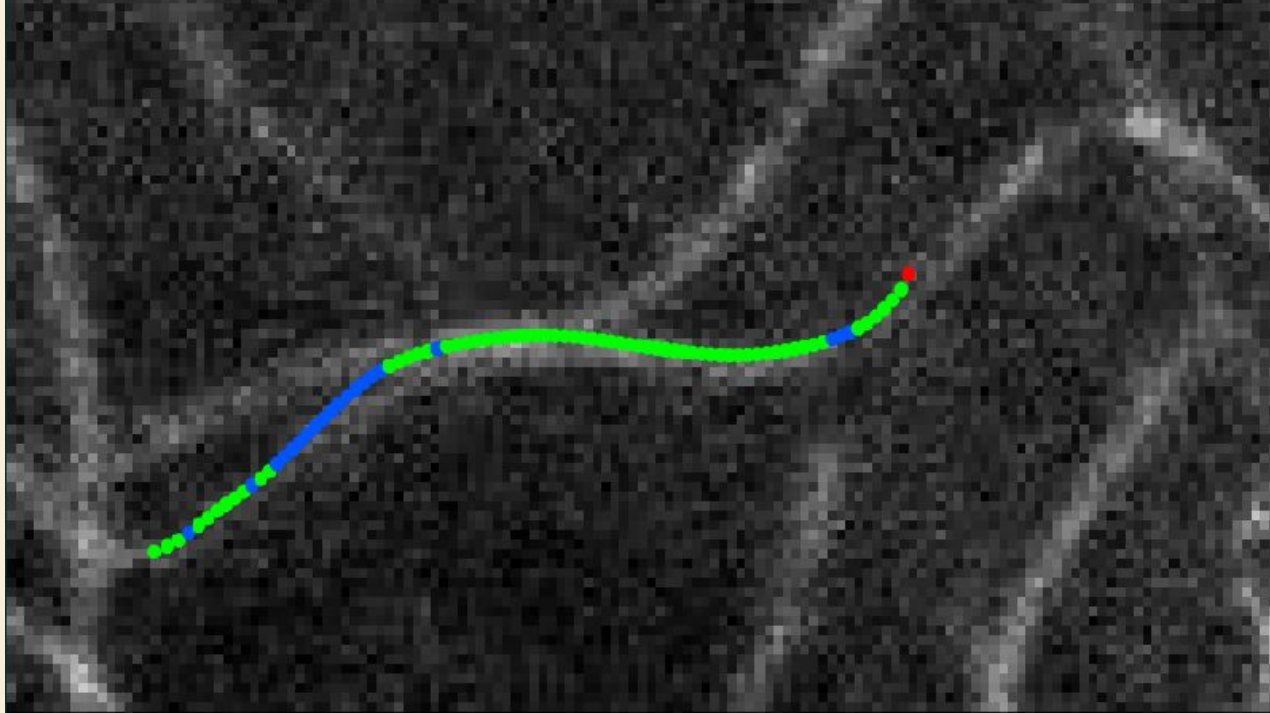
Perfil de intensidad y función gaussiana ajustada

Algoritmo - Ajuste Gaussiano

$$g(x) = y_0 + b * e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$



Algoritmo - Reposición de coordenadas



Verde ■

Ajustados de forma exitosa.

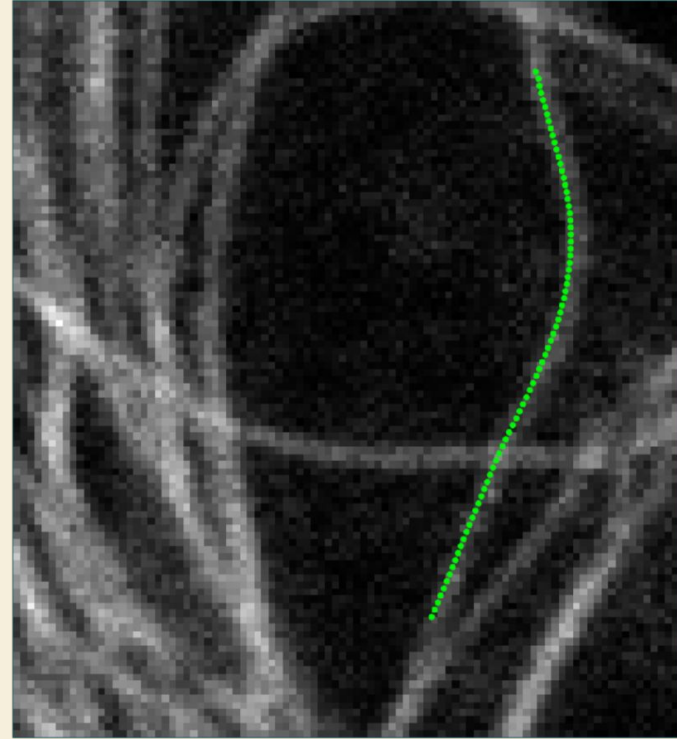
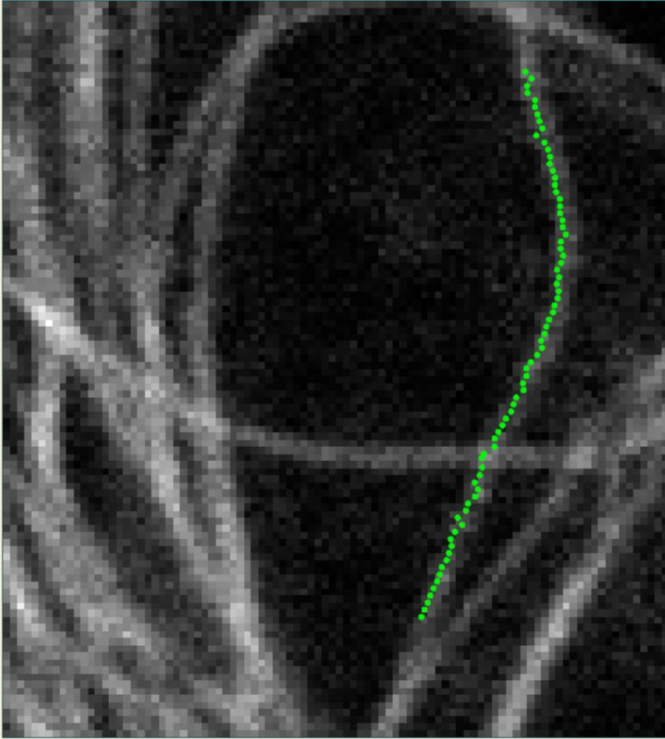
Azul ■

No Ajustado: Generados por interpolación lineal.

Rojo ■

No Ajustado: Coordenadas conservadas de la iteración anterior. Sólo en bordes.

Algoritmo - Suavizado



Resultado del ajuste sin y con suavizado usando curvas de Bezier

Interfaz - Inicial

El trabajo se enfocó en el desarrollo de una interfaz simple para el usuario.

The screenshot displays the initial interface of an application. It features a dark teal background. At the top left, there are two buttons: 'MANUAL DE USO' and 'SELECCIONE LAS IMÁGENES QUE DESEA TRACKEAR'. On the right side, there is a panel titled 'Parámetros de tracking' which contains several settings:

- Tolerancia de error: 0.6
- Ancho del perfil de intensidad: 10
- Densidad de puntos: 1
- Cantidad de puntos para interpolar: 3
- Puntos para calcular tangente: 15
- Longitud del segmento de suavizado: 100
- Suavizado final: ☒
- Imágenes invertidas: ☐

Estado inicial de la aplicación.

Interfaz - Selección

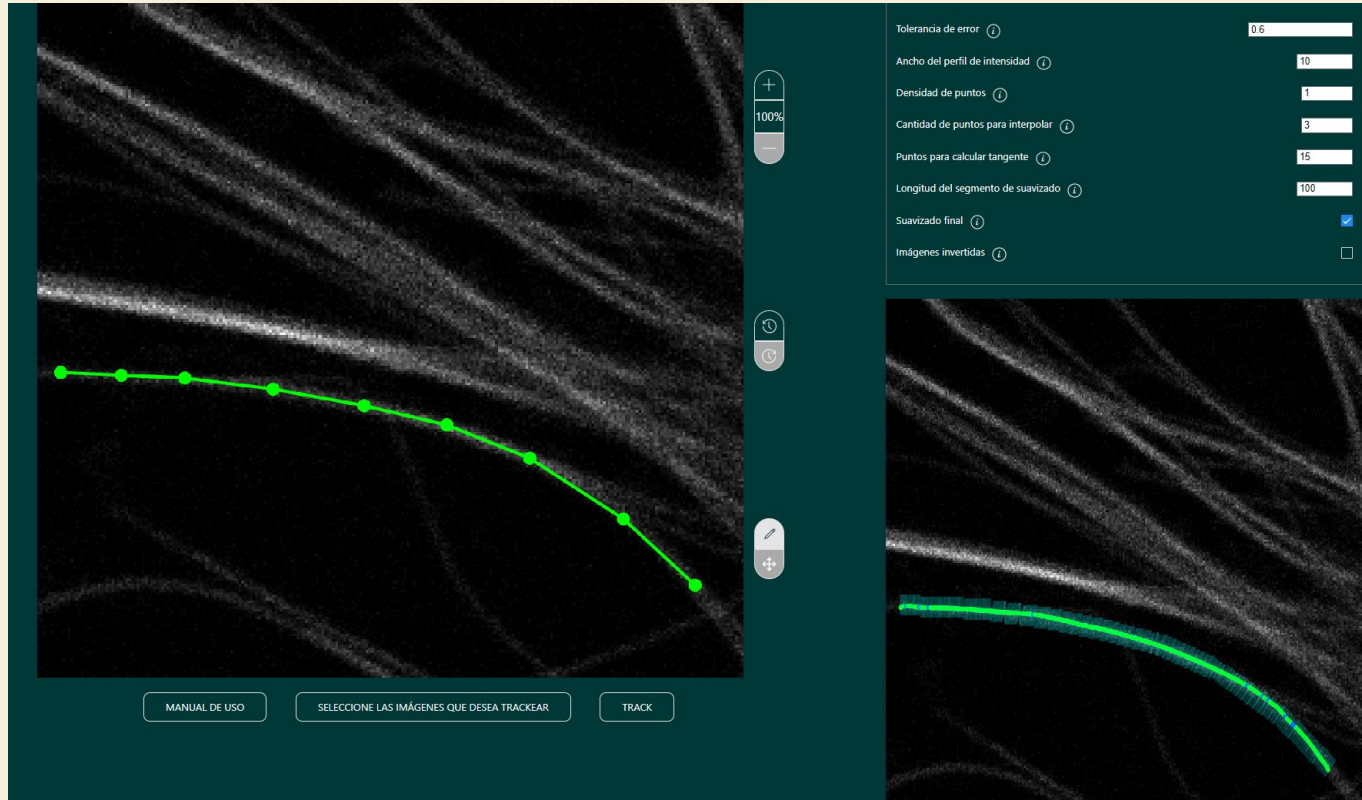
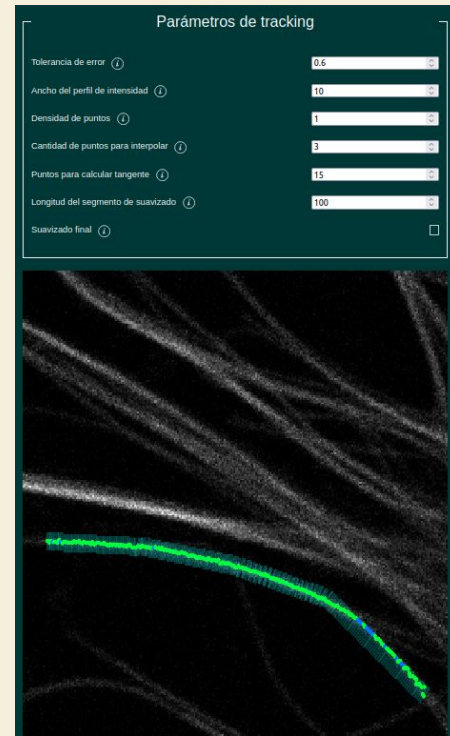
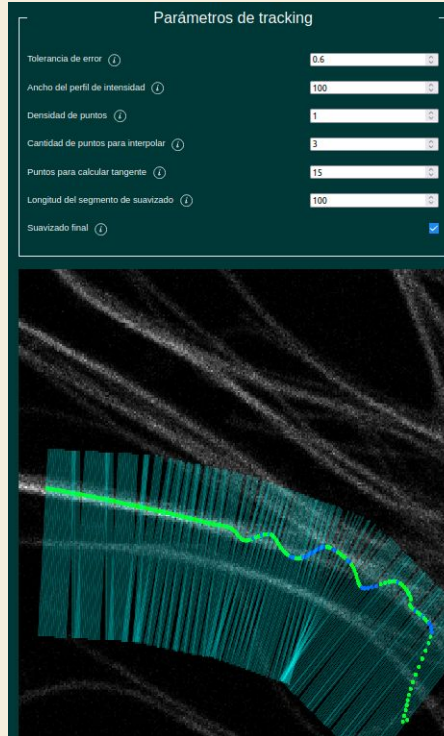
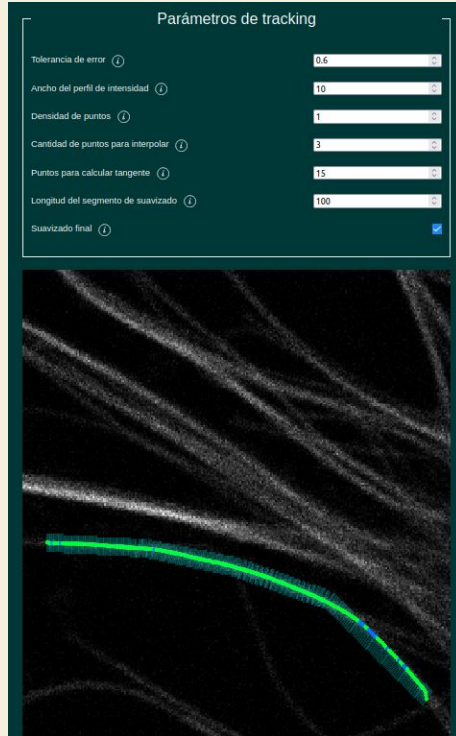


Imagen principal para la selección del filamento junto a la previsualización.

Interfaz - Parámetros

- Tolerancia de error
- Largo del perfil de intensidad
- Densidad de puntos
- Cantidad de puntos para interpolar
- Puntos para calcular tangente
- Longitud del segmento de suavizado
- Suavizado final
- Imágen invertida

Interfaz - Previsualización



Misma selección, distintas configuraciones de parámetros.

Interfaz - Resultados

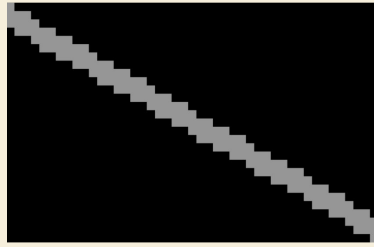


Exportar Resultados

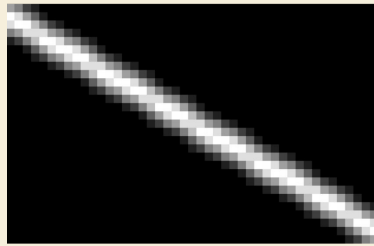
Descargar los resultados de las posiciones en formato [JSON](#) o [TSV](#)

Descargar las imágenes en [Zip](#)

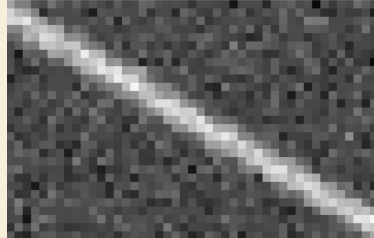
Validación - Imágenes Sintéticas



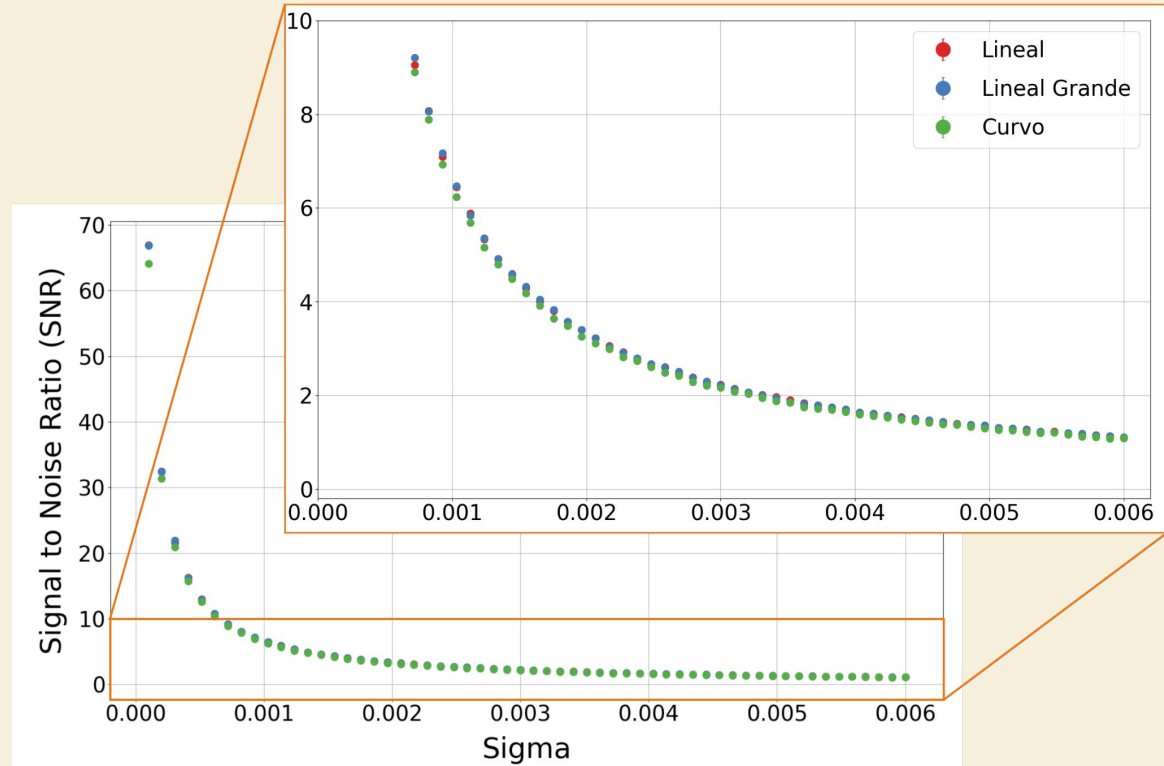
Filamento inicial



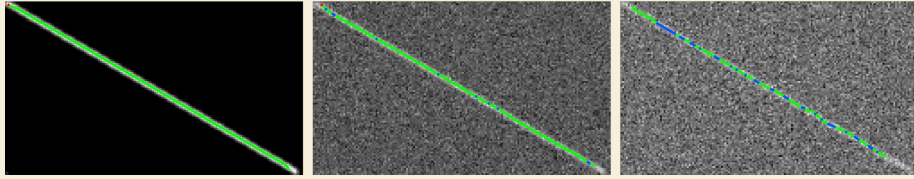
Convolución Gaussiana



Ruido Gaussiano

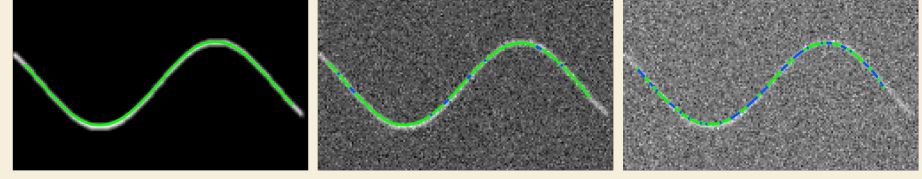


Validación - Precisión y Tiempo



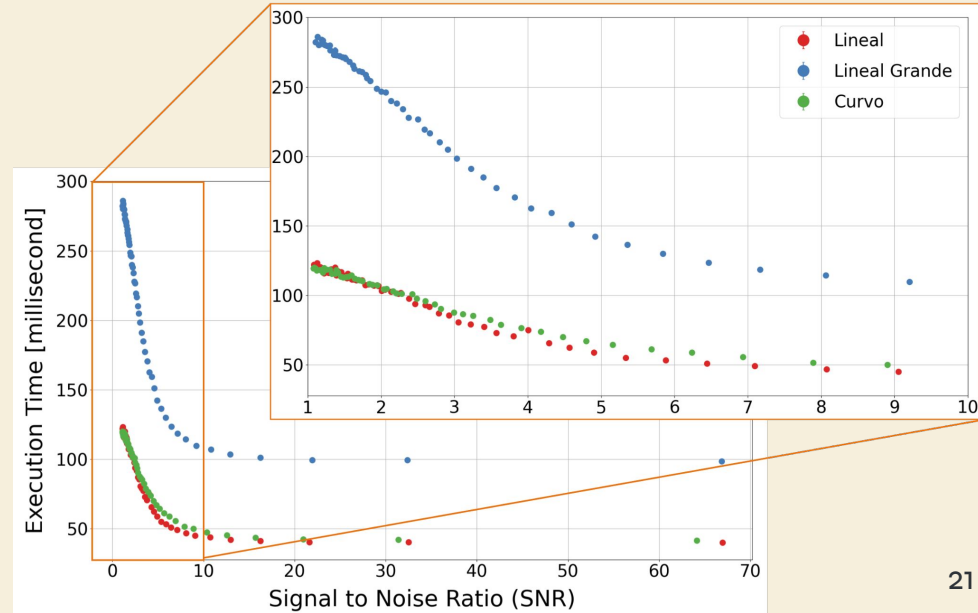
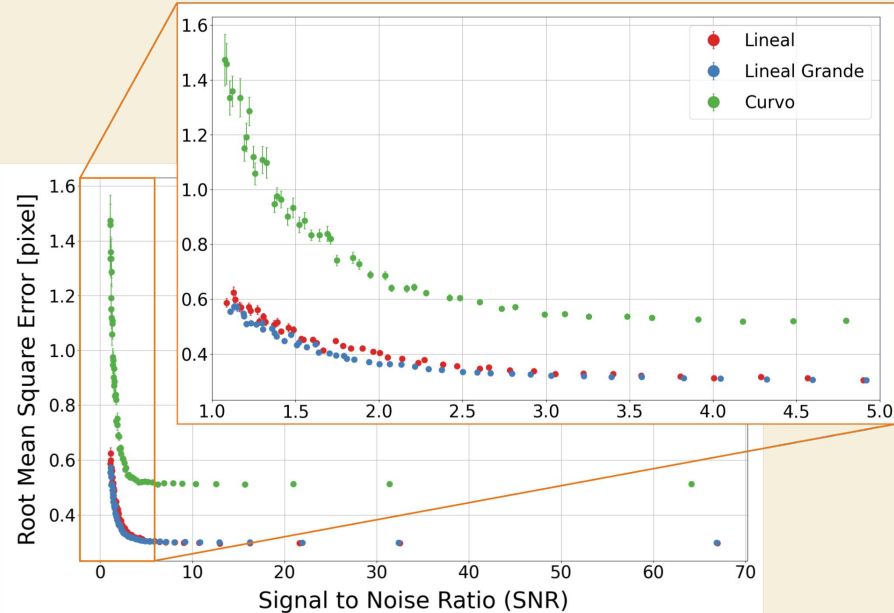
SNR

Precisión

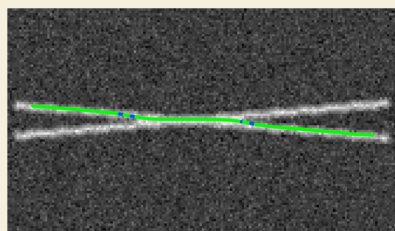


SNR

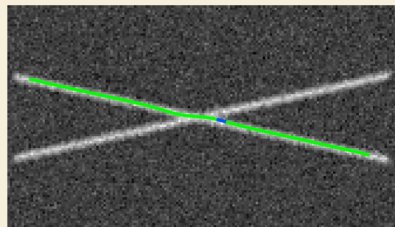
Tiempo



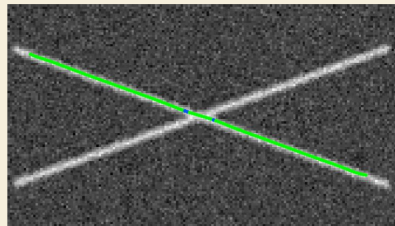
Validación - Intersección



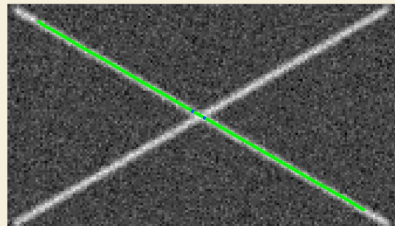
$\theta = 10^\circ$



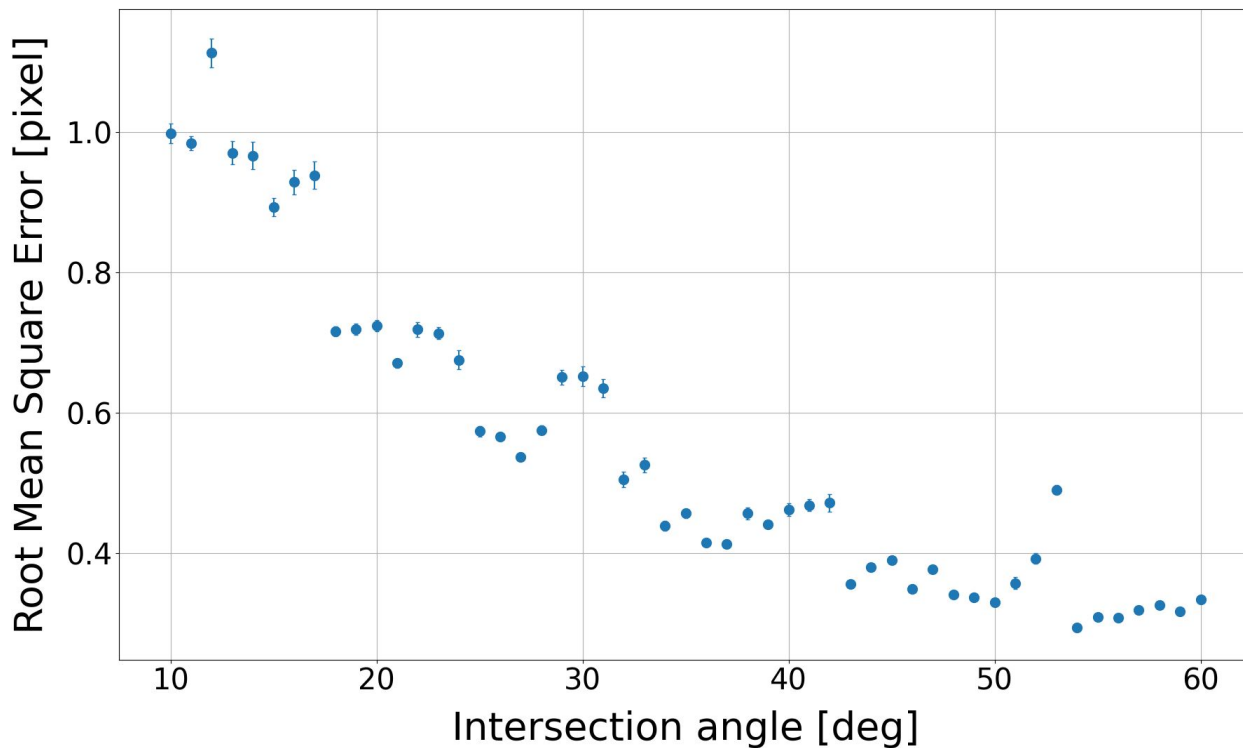
$\theta = 25^\circ$



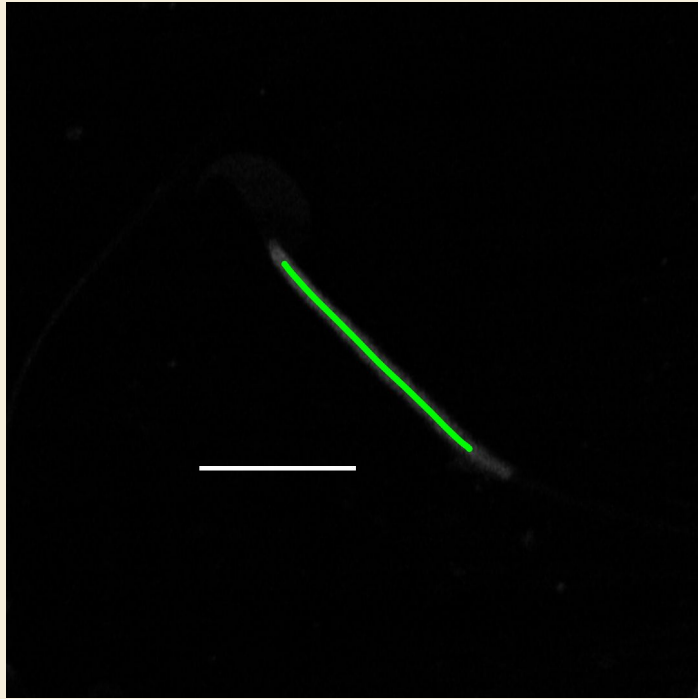
$\theta = 40^\circ$



$\theta = 60^\circ$



Caso Real - Microscopía Airyscan



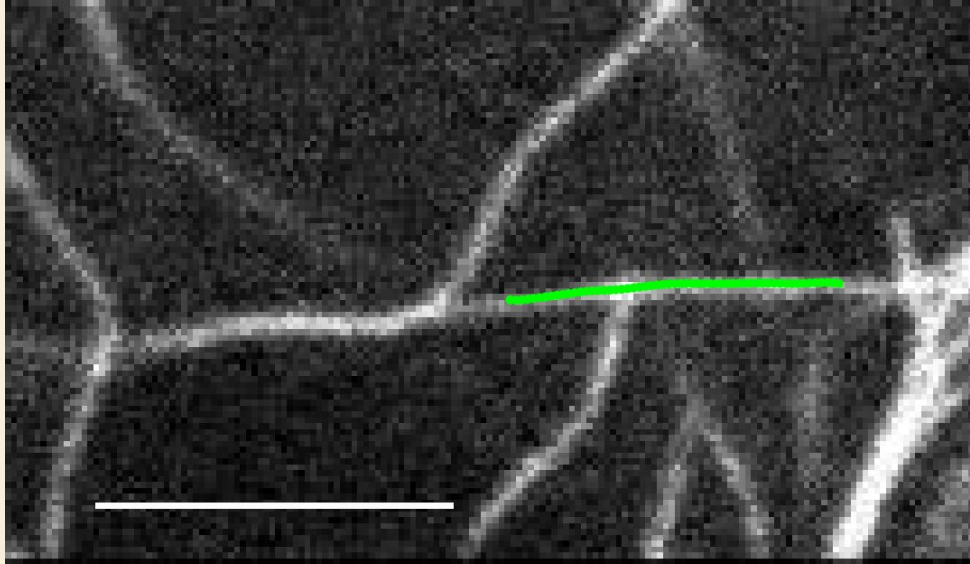
Flagelo de un espermatozoide de ratón marcado con una proteína fluorescente obtenido mediante microscopía de Airyscan.

Imágenes: Dra. Vanina Da Ros (IByME-CONICET).

La escala representa 10 μm .

El tamaño de la imagen es de 1044x1044 píxeles.

Caso Real - Microscopía Confocal



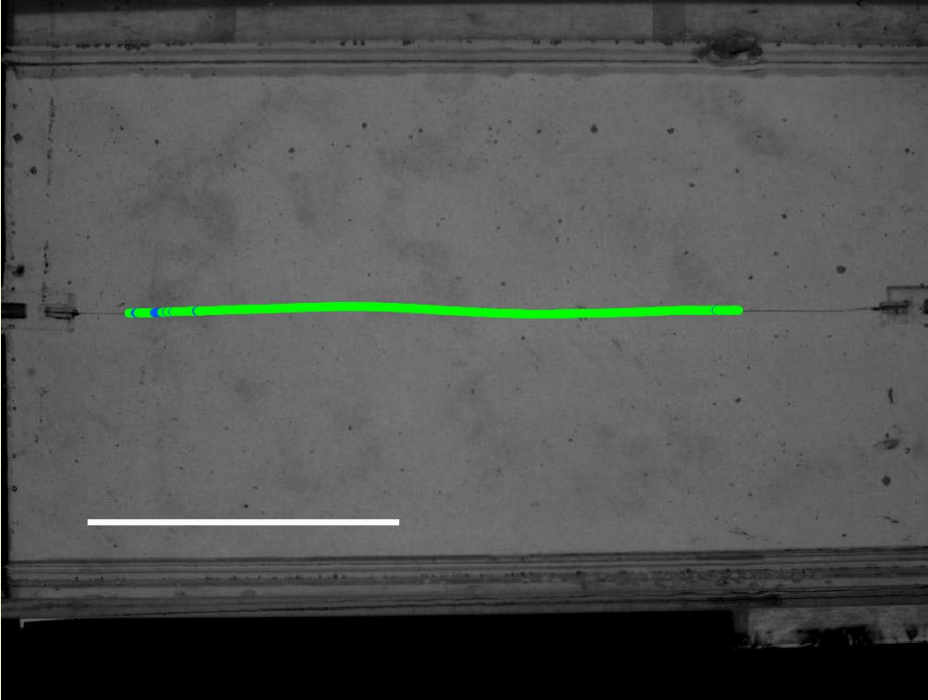
Microtúbulos fluorescentes en célula melanófora de rana (microscopía confocal).

Imágenes: Diana Wetzler, FCEN-UBA

La escala representa 5 μm .

El tamaño de la imagen es de 166x96 píxeles.

Caso Real - Cámara CCD



Filamento macroscópico tomado con cámara CCD.

Imágenes: Veronica D'Angelo, FIUBA.

La escala representa 5 cm.

El tamaño de la imagen es de 1024x768 píxeles.

DEMOSTRACIÓN

Logros

- Algoritmo de trackeo de filamentos:
 - Tecnologías de código abierto
 - Preciso
 - Rápido
 - Configurable
 - Resistente a ruido e intersecciones
- Aplicación web pública y sencilla para uso general:
 - ITBA: <https://pf-pipo.it.itba.edu.ar>
 - FCEN-UBA: <http://fernet.exp.dc.uba.ar>

Futuras Extensiones

- Análisis de los resultados obtenidos
- Mejor resolución de problemas en los bordes
- Mejoras en la rutina de suavizado
- Resultados parciales y progreso del seguimiento

¡Muchas gracias!