



Facultad
de
Ciencias

**Simulación y herramientas de
análisis de imagen. Aplicación en
Biología celular**

(Simulation and image processing tools. Application in cellular
Biology)

Trabajo de fin de Grado
para acceder al

GRADO EN MATEMÁTICAS

Autor: Juan Carlos Fenández Troyano

Directores: Juan F. López Giménez y Marcos Cruz Rodríguez

Junio-2014

Índice general

1.	Agradecimientos	4
2.	Resumen. Inglés	5
3.	Resumen	5
4.	Introducción	6
4.1.	Introducción Biología y Procedimientos	6
5.	Materiales y Métodos	10
5.1.	Análisis de Imagen	10
5.2.	Wavelets	12
5.3.	Técnicas Espectrales	16
5.4.	Modificación del algoritmo	20
6.	Resultados	23
6.1.	Simulador	23
6.2.	Comparación de Filtros	26
7.	Discusión	27
8.	Conclusiones	28

1. Agradecimientos

Hay una larga lista de personas a las que agradecer su apoyo para hacer posible este trabajo. En primer lugar agradecer a mis padres ya que desde pequeño me educaron, y me enseñaron lo bonito de las matemáticas; también por su paciencia en estos últimos años de estudio no siempre fácil.

Ya con respecto al trabajo, agradecer al Dr. Juan Francisco López Giménez, por su paciencia, por apostar por unas prácticas externas de un matemático en un mundo de biólogos. Gracias también por la libertad a la hora de realizar las prácticas, y de desarrollar el trabajo.

En segundo lugar agradecer al Dr. Marcos Cruz por centrar y acotar mis ideas convirtiéndolas en algo concreto y manejable además de descubrirme una parte de las matemáticas que desconocía.

Agradecer también al Dr. Victor Campa, técnico de microscopía del IBBTEC. Por su paciencia, y por hacerme hueco en su mundo de microscopios, que seguramente volveré a utilizar en el futuro. Por otro lado también agradecerle las conversaciones técnicas acerca del algoritmo.

Por último agradecer a la gente del IBBTEC, por la atmósfera en la que he podido trabajar.

2. Resumen. Inglés

Endocytosis is a process used by cells to introduce molecules. The cells include the molecules in an invagination of the plasma membrane, forming a vesicle that eventually detaches from the membrane to enter the cytoplasm. Receptor endocytosis as a consequence of the action of chemical compounds can be studied as a biological response to pharmacological implications. For this type of study it is essential to develop a tool to assess quantitatively the formation of vesicles or endosomes. In this paper we present a virtual tool or simulator, which simulates images of endocytosis in living cells. We will use the simulator to compare different methods of image analysis in order to select the best one and apply it to the quantification algorithm of endosomes implemented in [1].

Key Words: Endocytosis, Image Processing, Filters, Simulation, Algorithm.

3. Resumen

La endocitosis es un proceso por el cual la célula introduce moléculas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. La endocitosis de receptores como consecuencia de la acción de compuestos químicos puede ser estudiada, como una respuesta biológica con implicaciones farmacológicas. Para este tipo de estudio se hace imprescindible el desarrollo de una herramienta que permita evaluar de forma cuantitativa la formación de vesículas o endosomas. Durante este trabajo presentaremos una herramienta virtual o simulador, que simula imágenes del proceso de endocitosis en célula viva y además dicho simulador nos servirá para comparar distintos métodos de análisis de imagen con el objetivo de seleccionar el mejor de todos ellos y aplicarlo a un algoritmo de cuantificación de endosomas ya implementado en [1].

Palabras Clave: Endocitosis, Análisis de Imagen, Filtros, Simulación, Algoritmo.

4. Introducción

4.1. Introducción Biología y Procedimientos

La membrana plasmática es una estructura celular cuya función principal es aislar el interior de la célula o citoplasma del medio extracelular. Existen numerosos procesos biológicos que implican el tráfico de moléculas tanto del citoplasma al exterior, proceso denominado exocitosis, como del exterior al interior celular que es el proceso conocido como endocitosis [2] [3]. Mediante el proceso de endocitosis las células introducen al citoplasma moléculas de diversos tamaños, y el mecanismo más generalizado es por la formación de una invaginación de la membrana que termina desprendiéndose dando lugar a una vesícula cerrada, ver figura 1.

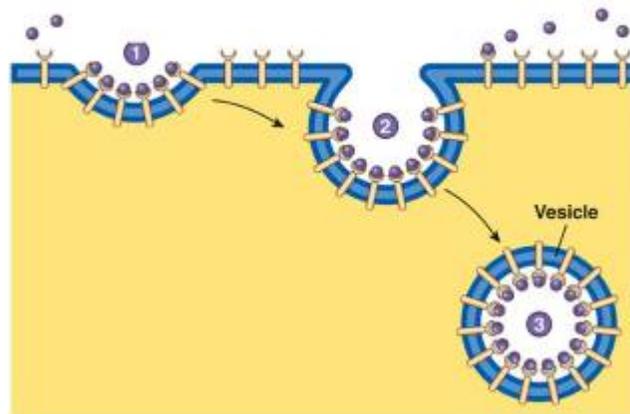


Figura 1: Esquema del proceso de endocitosis

Estas vesículas, denominadas endosomas, podrán fusionarse con lisosomas donde se producirá la digestión celular de su contenido, o bien según el caso, pueden volver a la membrana plasmática para fusionarse y volver a formar parte de ella, fenómeno conocido como reciclado. Por ejemplo, la endocitosis es el método que utilizan las neuronas para recuperar un neurotransmisor liberado en el espacio sináptico y poder ser posteriormente reutilizado. Sin este proceso, se produciría un fracaso en la transmisión del impulso nervioso entre neuronas [2] .

Los receptores celulares son proteínas que se encuentran en la membrana plasmática. Su función principal es servir como elementos comunicadores entre el exterior y el interior celular. Así y a nivel molecular, cuando una molécula agonista se une a un receptor de forma específica produce una serie de cambios conformacionales en éste que a su vez inician toda una serie de eventos intracelulares de forma consecutiva, fenómeno conocido en biología como señalización intracelular [3]. Estos eventos celulares de señalización tendrán distintas consecuencias fisiológicas en el organismo completo; por este motivo los receptores celulares se contemplan como dianas terapéuticas en el desarrollo de nuevos fármacos.

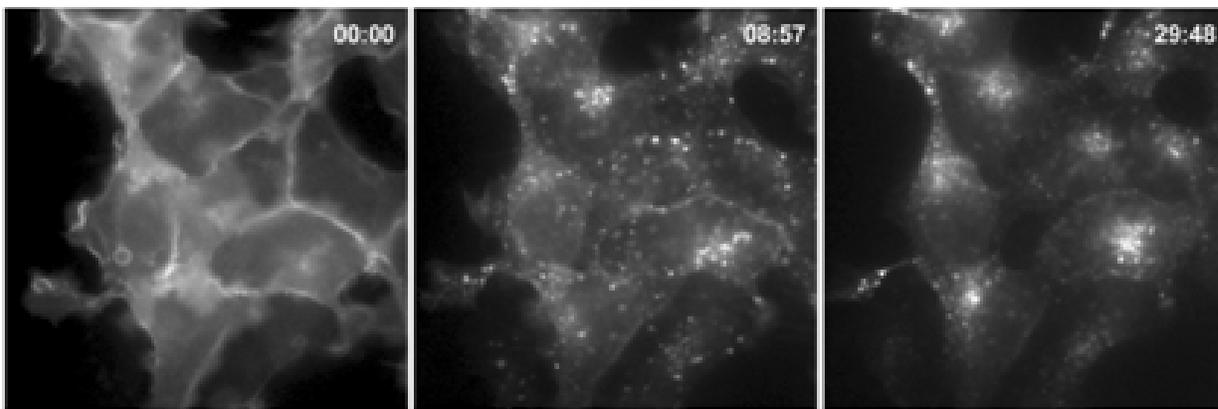


Figura 2: Ejemplo de endocitosis en imagenes reales

La endocitosis de receptores como consecuencia de la acción de compuestos químicos puede ser considerada, y por lo tanto estudiada, como una respuesta biológica con implicaciones farmacológicas. Para este tipo de estudio se hace imprescindible el desarrollo de una herramienta experimental que permita evaluar de forma cuantitativa la formación de vesículas o endosomas en respuesta a la activación de receptores por fármacos agonistas específicos. Un modelo experimental para llevar a cabo este tipo de trabajos consiste en realizar modificaciones genéticas del receptor para incluir en su estructura proteica la molécula fluorescente YFP (yellow fluorescent protein) , de forma que una vez expresado de forma heteróloga en líneas celulares permanentes pueda ser visible por medio de microscopía de fluorescencia. Aunque esta tecnología permite visualizar con alta resolución

tanto temporal (experimentos en tiempo real con células vivas) como espacial (localización de los endosomas en distintos compartimentos intracelulares), no disponíamos de una herramienta de análisis de imágenes para cuantificar los endosomas a medida que se van formando tras la activación de los receptores. Para solventar esta limitación metodológica diseñamos un algoritmo aplicable al análisis de las imágenes obtenidas en los experimentos de microscopía de fluorescencia de forma que los endosomas fueran identificados de forma específica en la imagen resultante de la emisión fluorescente de la proteína YFP [4] unida al receptor de interés. En un trabajo anterior [1], se implementó un algoritmo de cuantificación de endosomas, a continuación puede verse el diagrama de flujo de dicho algoritmo, figura 3.

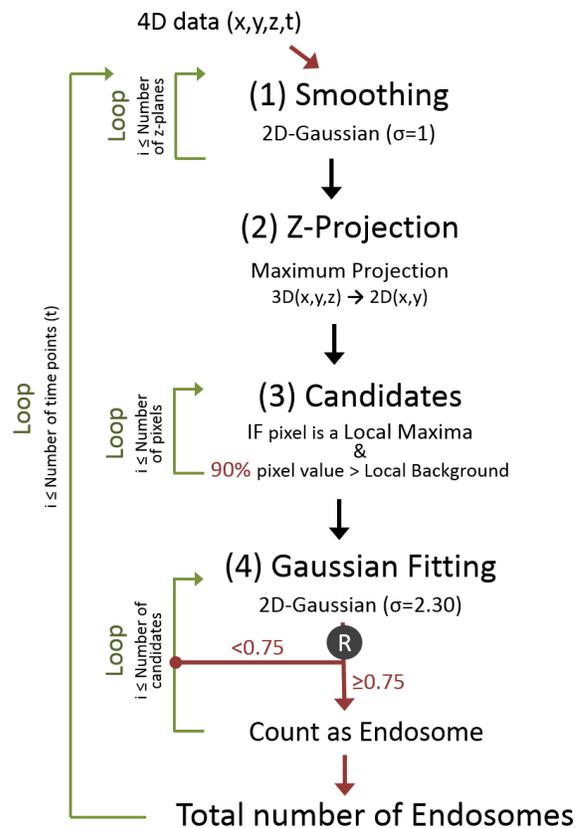


Figura 3: Diagrama de Flujo del Algoritmo, detallado en [1]

A la hora de realizar el algoritmo usamos una función gaussiana para describir matemáticamente un endosoma.

$$S(x_1, x_2) = a \cdot e^{-\left(\frac{(x_1 - x'_1)^2}{2r^2} + \frac{(x_2 - x'_2)^2}{2r^2}\right)} \quad (1)$$

Las funciones gaussianas quedan determinadas por tres parámetros, su centro (x'_1, x'_2) , su amplitud a y su tamaño r . Ver figura 4

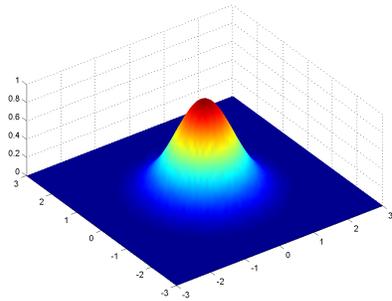


Figura 4: Ejemplo de función gaussiana en dos dimensiones

Para verificar la validez del algoritmo, era necesario tener imágenes con un número N_e de endosomas conocido. Debido a que no es posible tenerlas ya que no sabemos a priori cuantas hay en una imagen real, la mejor solución era simularlas siguiendo el modelo matemático. El objetivo de este trabajo es realizar una herramienta virtual de simulación de imágenes biológicas con N_e endosomas e implementar y comprar distintos tipos de filtros, en concreto el filtro gaussiano, el filtro Mexican Hat y un filtro paso banda en el espacio de Fourier.

5. Materiales y Métodos

Durante todo el trabajo, utilizaremos imágenes digitales; es decir una representación bidimensional de una imagen a partir de una matriz numérica, para más detalle puede consultar [5]

La mayor parte del trabajo se a realizado con el programa de análisis matematico MATLAB, tanto el algoritmo como el simulador fueron implementados en MATLAB. Por otro lado se han utilizado el programa de análisis de imagen FIJI y el el programa matemático de software libre R. En concreto FIJI se utilizó para realizar pruebas con los distintos filtros y visualizar de una manera más cómoda los resultados obtenidos, ya que es un programa específicamente preparado para ello. Por otro lado R se utilizó para analizar el muestreo de endosomas, con el objetivo de averiguar la distribución de los parámetros amplitud y tamaño.

5.1. Análisis de Imagen

En esta sección vamos a presentar los distintos filtros y herramientas que se compararán gracias al simulador. [6]

Definición 1. *Filtro*

Un filtro es una operación que modifica el valor de un pixel sin cambiar la geometría de la imagen. Los filtros modifican el valor de cada pixel en función de los pixeles que lo rodean.

Filtro Gaussiano

Un filtro gaussiano es una herramienta de procesamiento de imágenes, cuya finalidad es difuminar la imagen, suavizando el ruido [7]; para ello se modifica cada pixel en función de los píxeles que le rodean, convolucionando [5] la imagen con la función G :

$$G(x_1, x_2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{x_1^2+x_2^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

Como la imagen es discreta, discretizamos G y realizamos una convolución discreta [6]. En nuestro caso utilizamos una función gaussiana simétrica con $\sigma = 1$, es posible que en la figura 5 no se aprecie a simple vista el efecto del filtro, pero si nos fijamos en el interior

de una célula puede verse que el ruido es suavizado y la perfil de los endosomas también, como puede apreciarse con mas detalle en 6.

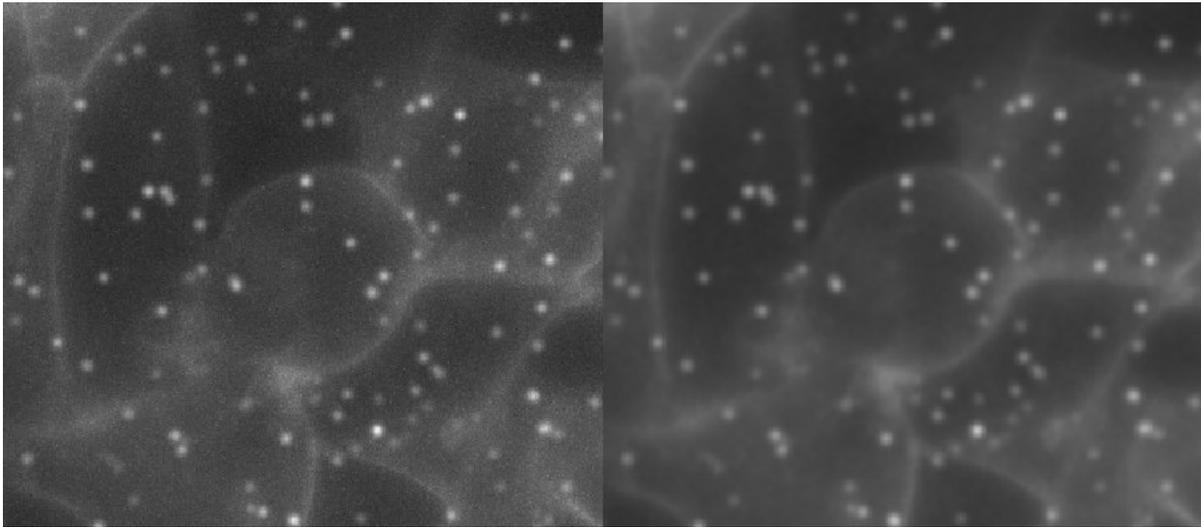


Figura 5: Ejemplo. Imagen antes (izquierda) y después (derecha) de filtrado gaussiano

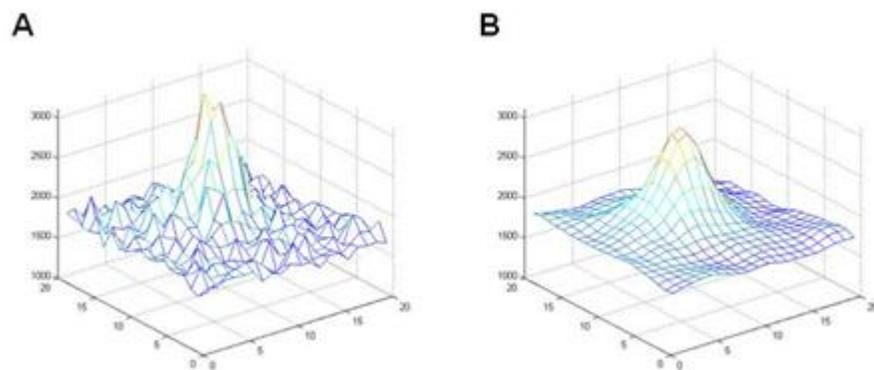


Figura 6: Detalle del perfil de un endosoma antes (A) y después (B) del filtrado gaussiano

Pueden utilizarse distintas transformaciones para descomponer y procesar las imágenes: Las técnicas espectrales, por ejemplo, son los procedimientos que estudian la representación y el análisis de imágenes en el dominio de frecuencia, basado en la descomposición

de las imágenes en suma de funciones armónicas, senos y cosenos. Utilizando para ello la transformada de Fourier. [6]

La transformada de Fourier es básicamente el espectro de frecuencias de una función. Un buen ejemplo de eso es lo que hace el oído humano, ya que recibe una onda auditiva y la transforma en una descomposición en distintas frecuencias (que es lo que finalmente se escucha).

Análogamente la transformación wavelet es la representación de las imágenes mediante funciones wavelets, que son funciones matemáticas diferentes de las armónicas. La diferencia más importante entre las wavelets y las transformadas de Fourier es que las wavelets están localizadas en espacio y frecuencia mientras que las de Fourier solo están localizadas en frecuencia.

5.2. Wavelets

La transformada de wavelet nos permite separar una función dada en sus diferentes componentes, y cada una de ellas tiene la misma escala que la wavelet hija que es una copia escalada y trasladada de la llamada función madre:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \Psi(x) dx = 0, \quad (3)$$

Hay una gran variedad de transformadas wavelet que pueden ser clasificadas en transformadas discretas de wavelet, como la Haar wavelet y transformadas continuas de wavelet como la Mexican Hat.

Nos centraremos más adelante en el segundo caso. En las transformadas continuas de wavelet, la función madre, $\Psi(x)$, satisface las propiedades de compensación, normalización y admisibilidad,

$$\int_{-\infty}^{\infty} \Psi(x) dx = 0, \quad (4)$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} |\Psi(x)|^2 dx = 1, \quad (5)$$

$$C_{\Psi} \equiv (2\pi^2) \int_0^{\infty} k^{-1} \Psi^2(k) dk < \infty, \quad (6)$$

donde $\Psi(k)$ es la transformada de Fourier de $\Psi(x)$.

La función wavelet (o *wavelet hija*), ψ , se define a partir de la función madre, de los parámetros de escala R y de posición b , de la siguiente manera:

$$\psi_{R,b}(x) = \frac{1}{R} \Psi \left(\frac{x-b}{R} \right). \quad (7)$$

Los coeficientes de la wavelet $w_{R,b}$, dada una función $f(x)$, quedan definidos por la convolución con la función wavelet:

$$w_{R,b} \equiv \int f(x) \psi_{R,b}(x) dx. \quad (8)$$

Las fórmulas mencionadas para una dimensión, pueden ser generalizadas a mayores dimensiones. Las transformadas wavelet son habituales en compresión de datos, procesamiento de imágenes, óptica, sísmica, geofísica, astrofísica...

Mexican Hat

Un caso particular de wavelet muy utilizado en el procesamiento de imágenes es el Mexican Hat. El Mexican Hat pertenece una familia de filtros ampliamente utilizados, han sido muchas las publicaciones relacionadas; se pueden utilizar en separación de componentes [8] [9] [10], para eliminar el ruido instrumental [11] [12], en análisis de correlación [13] ...

Su función en dos dimensiones es la siguiente:

$$M(x_1, x_2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \left(2 - \frac{x_1^2 + x_2^2}{\sigma^2} \right) e^{-\frac{(x_1^2 + x_2^2)}{2\sigma^2}} \quad (9)$$

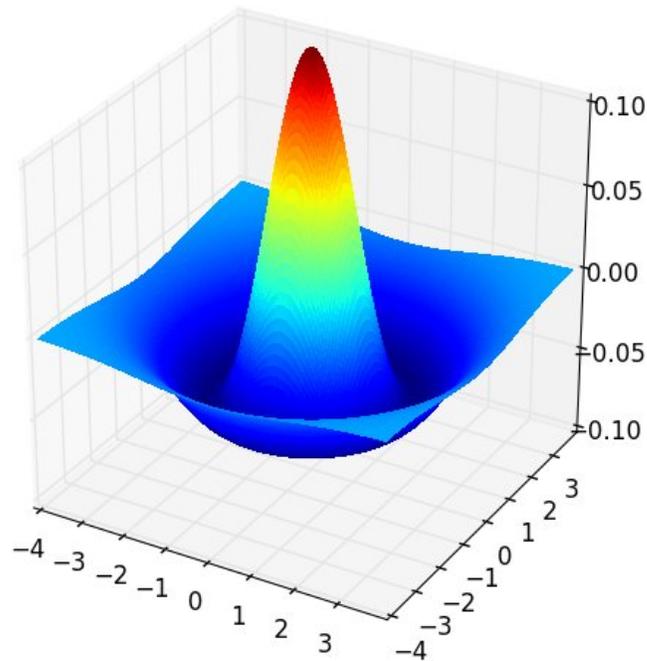


Figura 7: Filtro con Mexican Hat de dos dimensiones

Esta función es la derivada segunda de la función Gaussiana. Esta función, como toda wavelet, esta compensada, es decir el área positiva es el mismo que el área negativa. Esto supone que al aplicarlo a una otra función, toda constante desaparezca. Además destaca todo aquello que tenga forma gaussiana de sigma determinado, como en nuestro caso los endosomas. [14]

Al igual que en el caso del filtro gaussiano, no es posible realizar la convolución continua, es por ello que utilizamos la aproximación discreta de la función Mexican Hat. En la figura 8 puede apreciarse que al filtrar con una Mexican Hat los endosomas se destacan, además la membrana y el ruido de fondo tienden a desaparecer. En el ejemplo 8 se ha filtrado con una Mexican Hat de amplitud 2.07

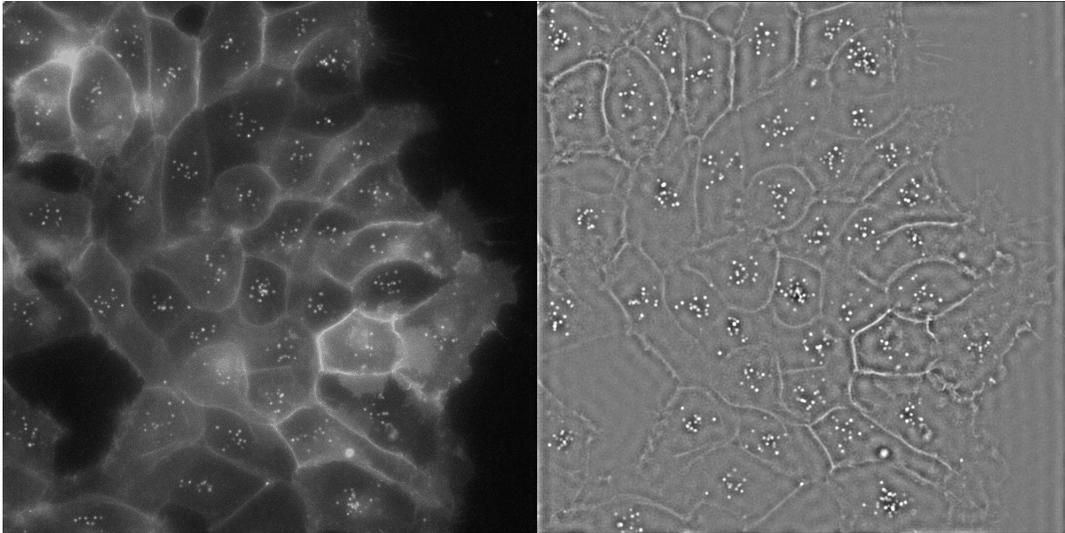


Figura 8: Ejemplo. Imagen antes (izquierda) y despues (derecha) de un filtrado con Mexican Hat de amplitud 2.07

5.3. Técnicas Espectrales

Serie de Fourier

Una serie de Fourier es una serie infinita que converge puntualmente a una función periódica y continua a trozos (o por partes). Las series de Fourier constituyen la herramienta matemática básica del análisis de Fourier empleado para analizar funciones periódicas a través de la descomposición de dicha función en una suma infinita de funciones sinusoidales mucho más simples.

Para una función f definida en un intervalo real $(-p, p)$, su descomposición en series de Fourier es la siguiente:

$$f(t) = \frac{A_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} \left[A_n \cos\left(\frac{2n\pi}{P}t\right) + B_n \sin\left(\frac{2n\pi}{P}t\right) \right] \quad (10)$$

Donde A_n y B_n se denominan coeficientes de Fourier de la serie de Fourier de la función $f(x)$ y P es el periodo.

Cuando expandimos el intervalo en el que la función está definida la estructura básica de la serie de Fourier, llamada ahora integral de Fourier está dada por, [6]:

$$\begin{aligned} f(x) &= \int_0^{\infty} (A_{\alpha} \cos(\alpha x) + B_{\alpha} \sin(\alpha x)) d\alpha \\ A_{\alpha} &= \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \cos(\alpha x) dx \\ B_{\alpha} &= \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \sin(\alpha x) dx \end{aligned}$$

La transformada de Fourier

Definimos el espacio $L^1(\mathbb{R})$ como el conjunto de las funciones $f : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{C}$ tales que f es absolutamente integrable, es decir:

$$\int_{-\infty}^{\infty} |f(x)| dx < \infty \quad (11)$$

Si $f \in L^1(\mathbb{R})$ definimos la transformada de Fourier (para $\omega \in \mathbb{R}$ mediante la fórmula:

$$\hat{f}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-ix\omega} dx = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) (\cos(\omega x) + i \cdot \sin(\omega x)) dx \quad (12)$$

La propiedad más importante de la transformada de Fourier es que es posible reconstruir f a partir de su transformada, mediante la llamada fórmula de inversión:

$$f(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \hat{f}(\omega) e^{-ix\omega} d\omega = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \hat{f}(\omega) (\cos(\omega x) + i \cdot \sin(\omega x)) d\omega \quad (13)$$

De esta forma obtenemos la transformada de Fourier de una función $f(x)$ y podemos trabajar en el espacio espectral, pudiendo trabajar en él, para luego volver al espacio original. La relación entre una función $f(x)$ y su transformada $\hat{f}(\omega)$ es única en ambas direcciones: el espectro de Fourier está inequívocamente definido para una función dada y para cualquier función en el espectro de Fourier solo hay una posible señal de la que provenga.

Como puede observarse, $\hat{f}(\omega)$ tiene dos componentes una real y una imaginaria. Es decir: $\hat{f}(\omega) = R(\omega) + i \cdot I(\omega)$ donde $R(\omega)$ e $I(\omega)$ son la parte real y la parte imaginaria respectivamente.

Llamamos espectro de Fourier al modulo de $\hat{f}(\omega)$

$$|\hat{f}(\omega)| = \sqrt{R(\omega)^2 + I(\omega)^2} \quad (14)$$

Y su ángulo recibe el nombre de fase

$$P(\omega) = \arctan \frac{I(\omega)}{R(\omega)} \quad (15)$$

Ejemplo en una dimensión, [15]:

Sea m una señal que depende de la variable x de la siguiente manera, ver figura 9:

$$m(x) = \sin(2\pi 50x) + \cos(2\pi 120x) + \sin(2\pi 300x) \quad (16)$$

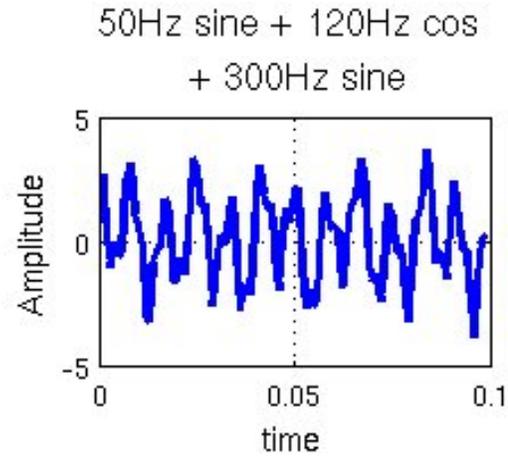


Figura 9: Señal inicial

Aplicando la transformada de Fourier y calculando las frecuencias obtenemos, ver figura 10:

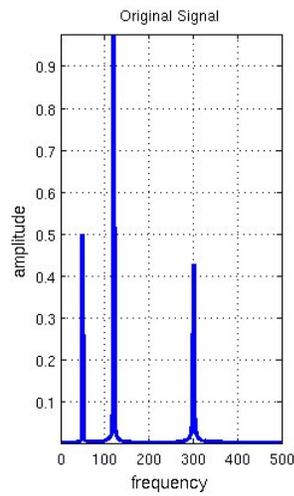


Figura 10: Espectro de potencias, en el se aprecian las frecuencias, 50 Hz, 120 Hz y 300 Hz de la señal inicial

Puede apreciarse que las frecuencias obtenidas, 50, 120 y 300 Hz corresponden con las introducidas en la señal inicial, es decir se han recuperado y discretizado por frecuencias.

La Transformada Discreta de Fourier en 2D

Para una señal de dos dimensiones discreta como es nuestra imagen, la transformada de Fourier ha de definirse de la siguiente manera, [6]:

Definición 2. Sea $g(u, v)$ una función periódica de dimensiones $M \times N$, la transformada discreta de Fourier se define de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} G(m, n) &= \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} g(u, v) \cdot e^{-i2\pi \frac{mu}{M}} \cdot e^{-i2\pi \frac{nv}{N}} \\ &= \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} g(u, v) \cdot e^{-i2\pi \left(\frac{mu}{M} + \frac{nv}{N} \right)} \end{aligned} \quad (17)$$

Con $m=0\dots M-1$ y $n=0\dots N-1$,

obteniendo así una imagen $M \times N$ transformada

Definición 3. De forma similar podemos definir la transformada inversa discreta en 2D

$$\begin{aligned} g(u, v) &= \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} G(m, n) \cdot e^{i2\pi \frac{mu}{M}} \cdot e^{i2\pi \frac{nv}{N}} \\ &= \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} G(m, n) \cdot e^{i2\pi \left(\frac{mu}{M} + \frac{nv}{N} \right)} \end{aligned} \quad (18)$$

Con $u=0\dots M-1$ y $v=0\dots N-1$.

Cuando queremos visualizar la transformada de Fourier como imagen, habitualmente se usa el valor absoluto de su función compleja, el espectro de potencias: $|G(m, n)|$, para mayor comodidad a la hora de visualizar la imagen suele utilizarse el logaritmo del espectro de potencias, $\log(|G(m, n)|)$, en la imagen central de la figura 11 puede verse la representación centrada del espectro de potencias.

Filtro de paso banda o FPB

A continuación puede verse el resultado de filtrar una imagen con endosomas entre unas frecuencias de 33 y 100 Hz. Es decir se elimina todo aquello que no se encuentra entre esas frecuencias y luego se reconstruye la imagen inicial sin esas frecuencias.

Las frecuencias se escogieron en función de los cambios que se aprecian en el espectro de potencias entre la imagen con endosomas y la imagen sin endosomas. Es decir, se realizó la transformada de Fourier de la imagen, se pasó un filtro top-hat en el espacio de frecuencias para luego invertir la transformada de Fourier, se puede apreciar en la figura 11.

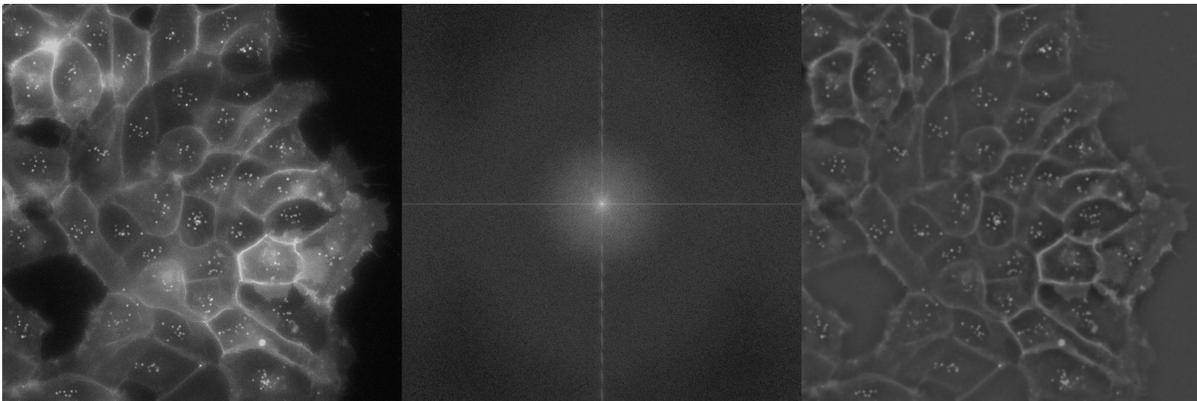


Figura 11: Imagen a filtrar, Trasformada de Fourier e imagen filtrada entre unas frecuencias de 33 y 100 Hz

5.4. Modificación del algoritmo

Es necesario modificar el algoritmo utilizado en [1], ya que para cada filtro los parámetros varían. Por tanto hemos adaptado el algoritmo inicial de la siguiente manera, ver figura 12.

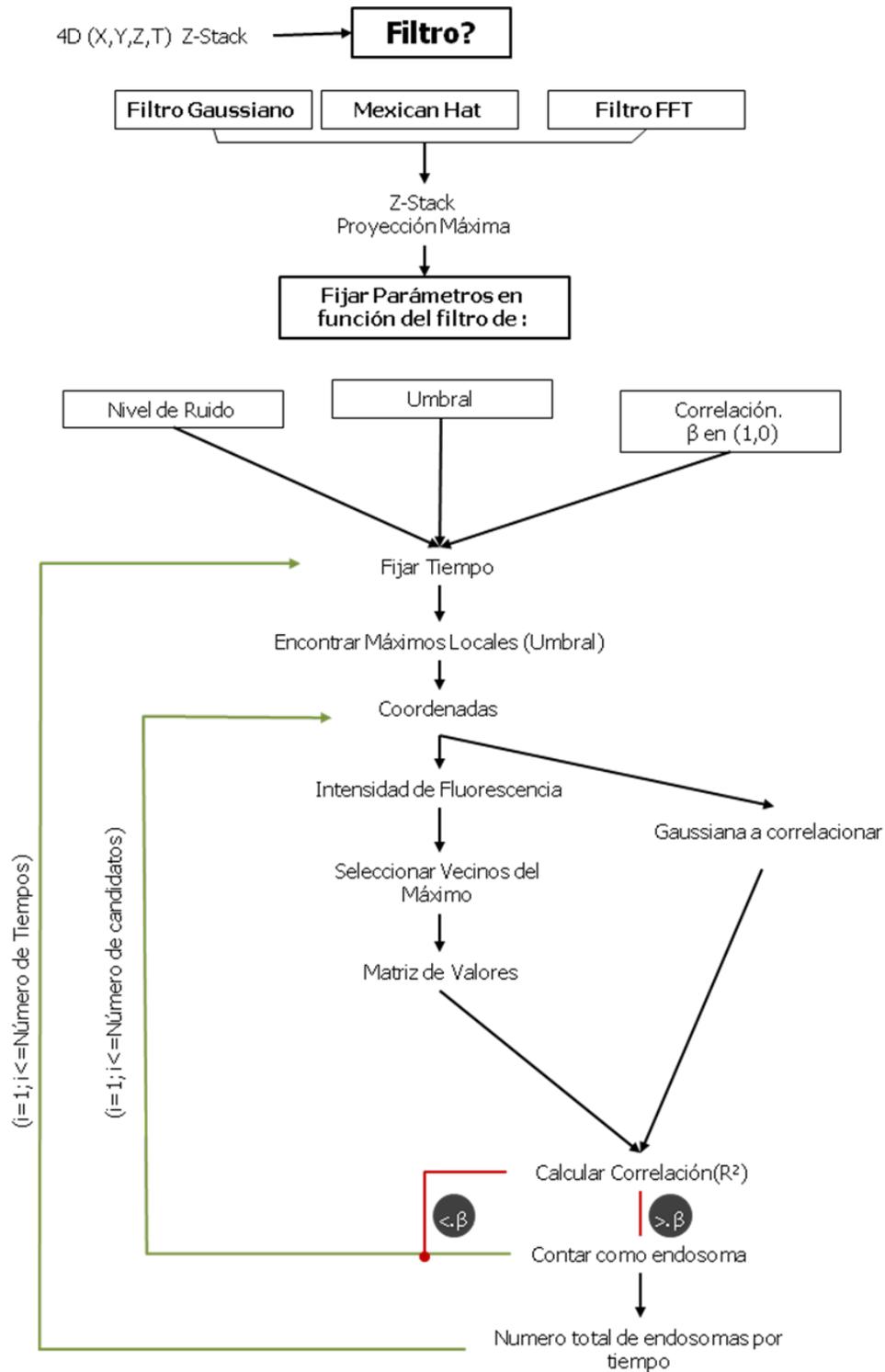


Figura 12: Diagrama de flujo del algoritmo adaptado para el estudio de los tres filtros diferentes; para cada filtro se adaptaron los parámetros

Los parámetros a considerar eran, umbral, nivel de ruido y β (correlación). Los dos primeros parámetros, tanto umbral como nivel de ruido son muy robustos y no es necesario modificarlos para los diferentes tipos de filtro. Por otro lado hay que prestar especial atención al parámetro β con el que se correlacionan los candidatos. Para el filtro Gaussiano dicho parámetro había sido estudiado ya en [1], para los otros dos filtros se estudió de forma análoga, es decir estudiando como se comporta la correlación después del filtrado.

6. Resultados

6.1. Simulador

En primer lugar para generar las imágenes es necesario saber la forma y la altura que tienen los endosomas reales. Para ello se seleccionaron 150 endosomas reales de los que se midió su amplitud a y su tamaño r . Los resultados fueron que el tamaño de los endosomas estudiados sigue una distribución normal $N(\mu_t, \sigma_t^2)$, con $\mu_t = 2,07$ píxeles y $\sigma_t = 0,53$ píxeles. Mientras que la altura o amplitud de los endosomas sigue una distribución normal $N(\mu_a, \sigma_a^2)$ de con $\mu_a = 1652,22$ unidades de amplitud y $\sigma_a = 178,24$ unidades de amplitud. El algoritmo implementado en [1] localiza los candidatos a endosomas y luego decide si son endosomas o no, en función del tamaño del endosoma al que se asemejan. Verificamos que los endosomas y los candidatos no endosomas (espurias) se diferencian en su tamaño, como puede verse en la figura 13, y como cabía esperar a la vista del estudio estadístico anterior.

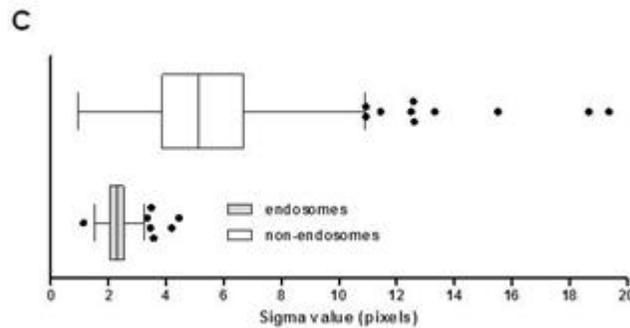


Figura 13: Diferencia de la amplitud entre endosomas y espurias

Una vez conocidos estos datos, se decidió que lo mejor para modelizar las imágenes, es coger como base una imagen de células sin endosomas como puede verse en la figura 14 A, y añadir endosomas artificiales a esta imagen. Esto permite, además de no tener que generar gráficamente las membranas, que el ruido sea exactamente igual al ruido real del aparato.

Queremos generar un número N_e de endosomas, un endosoma queda determinado por su centro (x_1, x_2) , su amplitud a y su tamaño r . Siguiendo los resultados experimentales

generamos los parámetros necesarios para cada uno de los endosomas :

$$x_1 \sim U(1, M)$$

$$x_2 \sim U(1, N)$$

$$a \sim N(\mu_t, \sigma_t^2)$$

$$r \sim N(\mu_a, \sigma_a^2)$$

El algoritmo que genera números pseudo-aleatorios puede verse más detallada en [16].

Sabiendo que en nuestra imagen base, figura 14 A, hay espacios en los que no hay células, evitamos que los endosomas caigan en esa zona utilizando un umbral para crear una imagen binaria véase figura 14 B: si la posición cae en una zona negra, esa posición vuelve a generarse hasta que caiga en una zona blanca.

Una vez determinados todos los parámetros, se genera una imagen $M \times N$ con los endosomas ($i = 1 \dots N_e$), es decir tomando cada posición $(x_1, x_2)_i$ como centro utilizamos la función gaussiana definida en la ecuación 1 y para cada endosoma su correspondiente amplitud a_i y su tamaño r_i

Una vez generada esta imagen, hay que sumar la imagen de los endosomas, figura 14 C con la imagen base figura 14 A. Como la fluorescencia viene dada por el número de proteínas YFP que hay en la imagen y teóricamente este número es constante, la media de fluorescencia antes y después debía ser la misma; la combinación lineal de la suma de las imágenes debe tener por tanto la misma intensidad media de fluorescencia que la imagen base. Reajustando dicha intensidad y teniendo en consideración todo lo comentado el resultado para $N=1000$ endosomas se muestra en Figura 14 D.

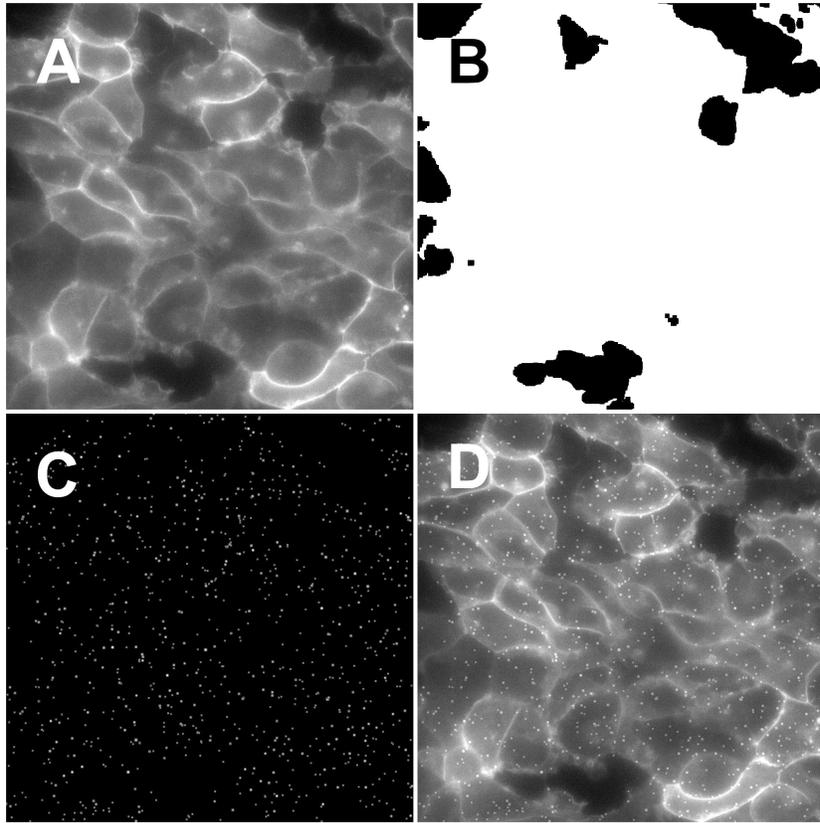


Figura 14: Imágenes utilizadas en el simulador

Uno de los mayores problemas que presenta la cuantificación de endosomas en célula viva es la aglomeración a la que tienden los endosomas a medida que su número aumenta; es decir tienden a agruparse, perdiéndose así la forma gaussiana característica. A fin de hacer el simulador lo más realista posible, se da la opción al usuario de recrear la aglomeración en el grado que desee, ya que el nivel de aglomeración depende del tipo de célula y el tipo de endocitosis. Para ello sobre la imagen base se selecciona un pixel centrado en cada célula y a partir de él se generan la posición de los endosomas siguiendo una distribución gaussiana con centro el pixel seleccionado y desviación típica la deseada por el usuario

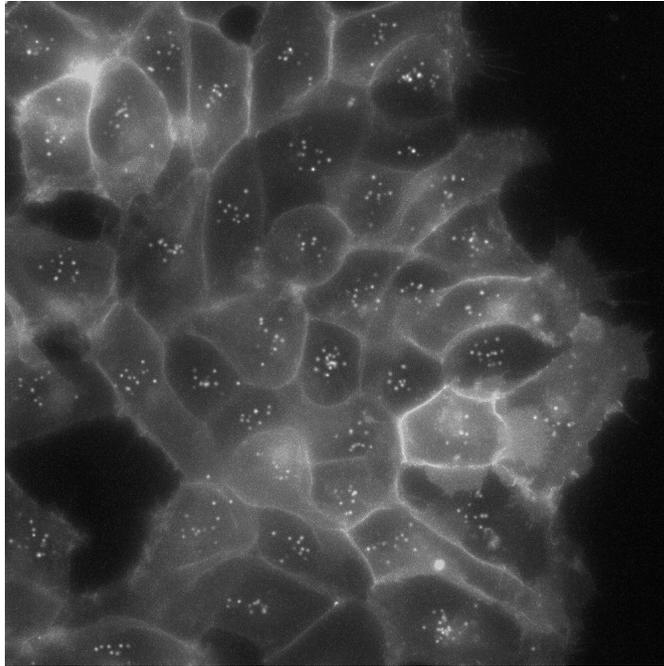


Figura 15: Simulación con aglomeración

Además el simulador guarda la posición la amplitud y el tamaño de cada endosoma generado, de esta forma una vez implementado el algoritmo de detección podemos cotejar si los endosomas encontrados coinciden con los simulados. En la figura 15 podemos ver una simulación con aglomeración.

6.2. Comparación de Filtros

Durante un experimento real con célula viva, se aprecia que la endocitosis es un proceso en el cual a medida que el tiempo avanza el número de endosomas crece, a fin de simular este crecimiento se generaron 4 tiempos para cada simulación, es decir para cada simulación se generaron 4 imágenes digitales con 0,100,200,300 endosomas respectivamente.

Se decidió aprovechar que la posición de los endosomas era conocida. Cuando el algoritmo principal localizaba un endosoma, el algoritmo comprueba si es una espuria, o un endosoma simulado (cotejado). Los resultados por tiempo son los siguientes para 25 simulaciones diferentes con una ligera aglomeración.

CUANTIFICACIÓN COTEJADA + ESPURIAS

Tiempo	0	1	2	3
Endosomas simulados	0	100	200	300
Gaussiana cotejada	0	$78, 2 \pm 3, 18$	$156, 12 \pm 4, 51$	$230, 24 \pm 6, 33$
Gaussiana espurias	25	24	24	24
Mexican Hat cotejada	0	$80, 48 \pm 3, 74$	$159, 72 \pm 5, 07$	$234, 96 \pm 6, 98$
Mexican Hat espurias	22	21	21	21
FPB cotejada	0	$76, 76 \pm 3, 64$	$152, 68 \pm 5, 57$	$223, 96 \pm 7, 17$
FPB espurias	8	8	8	8

7. Discusión

Puede verse en la tabla, que a tiempo 0 se simularon 0 endosomas, pero todos los filtros encuentran endosomas (espurias), esto se debe a que las células pueden tener distintos tipos de formaciones con forma gaussiana, es un número basal que tendremos para todo filtro. Cabe destacar que en el filtro FPB el número basal es significativamente menor que en los otros dos filtros.

También en la tabla podemos observar que a mayor número de endosomas mayor es el error en todos los filtros, esto se debe a que al simular un gran número de endosomas la probabilidad de que dos endosomas se generen muy cerca uno de otro es muy alta. Puede apreciarse el problema que supone para todos los algoritmos ya que la forma gaussiana puede verse afectada al unir dos endosomas y contar sólo uno o no contar ninguno de los dos.

Por otro lado, si nos fijamos, puede asegurarse que las diferencias entre los filtros no vienen dadas por espurias u otros factores, las espurias se mantienen constantes. Es decir, puede apreciarse que las espurias para todos los tiempos quedan determinadas por el número de espurias a tiempo 0, es decir el número de endosomas (falsos) que encuentra a en la imagen base lo arrastra para el resto de tiempos, pero no introduce otro tipo de espurias.

8. Conclusiones

La endocitosis de receptores como consecuencia de la acción de compuestos químicos puede ser estudiada, como una respuesta biológica con implicaciones farmacológicas. Para este tipo de estudio se hace imprescindible el desarrollo de una herramienta que permita evaluar de forma cuantitativa la formación de vesículas o endosomas y comparar algoritmos de cuantificación entre sí.

El simulador, es una herramienta válida a la hora ajustar y testar algoritmos para la cuantificación de endocitosis, además la gran variedad de posibilidades que se le ofrecen al usuario hace posible simular distintos tipos de endocitosis e incluso sin mucha variación podrían simularse cualquier otro proceso biológica en la que los objetos a estudiar puedan modelizarse como una gaussiana.

Por otro lado al guardar no sólo la posición de los endosomas sino también la amplitud y el tamaño, podría también servir como herramienta de validación para futuros algoritmos en los que se estudiasen estas características de los endosomas en función de la droga. Es evidente que herramientas virtuales como los simuladores abren una vía de comparación de algoritmos a fin de testar y probar distintos tipos de ellos, y compararlos de forma cuantitativa.

A la vista de la tabla del punto anterior puede asegurarse que para la cuantificación de endocitosis el filtro Mexican Hat es el mejor de entre los tres estudiados aunque la diferencia no es excesivamente grande, esto concuerda con lo esperado teóricamente ya que es una herramienta ampliamente utilizada en la detección de gaussianas [14].

Queda abierta la posibilidad de trabajar con el Mexican Hat con varias escalas, en este estudio se ha realizado solo con una escala (2.07) para seguir el procedimiento y estudio realizado en [1]. Es posible que trabajando con varias escalas pueda obtenerse un mejor resultado ya que los endosomas presentan distintos tamaños.

Queda también abierta la aplicación del método a imágenes reales, esto se lleva a cabo en [1] con el filtrado gaussiano, pero no con el resto. Además es posible realizar una estimación de las espurias reales para cada muestra utilizando las imágenes con células sin endosomas, aunque no sería exacto debido a que las células están vivas durante el experimento y por tanto se mueven.

Queda probado teóricamente que el algoritmo implementado en [1] se puede mejorar utilizando un filtro Mexican Hat, por otro lado cabe destacar que la mejora no es sólo para este algoritmo, sino para todo algoritmo o análisis de imagen en el que se quieran destacar o se busquen señales con forma gaussiana.

Bibliografía

- [1] Víctor M. Campa, Almudena Capilla, María J. Varela, Arlet M. Acanda de la Rocha, Juan C. Fernandez-Troyano, R. Belén Barreiro and Juan F. Lopez-Gimenez. *Endocytosis as a Biological Response in Receptor Pharmacology: Evaluation by Fluorescence Microscopy*. En vías de publicación , 2014.
- [2] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell* New York, Garland Science , 2002.
- [3] Ricardo Paniagua Gomez-Alvarez *Biología Celular* Mcgraw-Hill/ Interamericana de España, S.A. , 2007.
- [4] Tsien RY. *The green fluorescent protein*. *Annu Rev Biochem* 1998;67:509-544.
- [5] Wilhelm Burger, Mark J. Bruge, *Principles of Digital Image Processing, Fundamental techniques*, Springer, 2009.
- [6] Wilhelm Burger, Mark J. Bruge, *Principles of Digital Image Processing, Core Algorithms*, Springer, 2009.
- [7] Wikipedia *www.Wikipedia.org*.
- [8] Tenorio L., Jaffe A.H., Hanany S. Lineweaver C.H., 1999 , MNRAS , 310 , 823
- [9] Tenorio L., Jaffe A.H., Hanany S. Lineweaver C.H., 1999 , MNRAS , 310
- [10] Vielva P., Barreiro R. B., Hobson M. P., Martinez González E., Lasenby A. N., Sanz J. L. Toffolatti L. 2001b, MNRAS , 328 , 1.

- [11] Vielva P., MartínezGonzález E., Gallegos J. E., Toffolatti L. Sanz J. L. 1999a, MNRAS, 309 , 672.
- [12] Vielva P., MartínezGonzález E., Gallegos J. E., Toffolatti L. Sanz J. L. 1999b, A&AS , 140 , 99
- [13] Vielva P., MartínezGonzález E. & Tucci M. 2006, MNRAS, 365, 891
- [14] Marcos Cruz Rodríguez,2009 tesis doctoral *Statistical evidence of a local non-Gaussianity in the WMAP Data.*
- [15] Dr Cyril Pernet *Fourier Analysis for neuroscientists, A practical guide using Matlab.* February , 2012
- [16] Eric A. Suess , Bruce E. Trumbo *Introduction to Probability Simulation and Gibbs Sampling with R*, Editorial Springer, 2010.
- [17] Dr. J. M. Brayer, <http://www.cs.unm.edu/brayer/vision/Fourier.html>, Department of Computer Science, University of New Mexico, Albuquerque, NM, USA., Consultado 26-3-2014.
- [18] Nick Efford., *Digital Image Processing: A Practical Introduction Using Java™* , Pearson Education, 2000.
- [19] Julio Medina, *XII Encuentro de Matemática y sus Aplicaciones* <http://www.slideshare.net/docdigitus/analisis-de-Fourier-para-seales>, EPN-Quito,Ecuador-28 junio a 2 julio 2010.
- [20] Gonzalez, Woods, Addison Wesley, *Digital Image Processing, ch 3*, Addison-Wesley, 1993.