

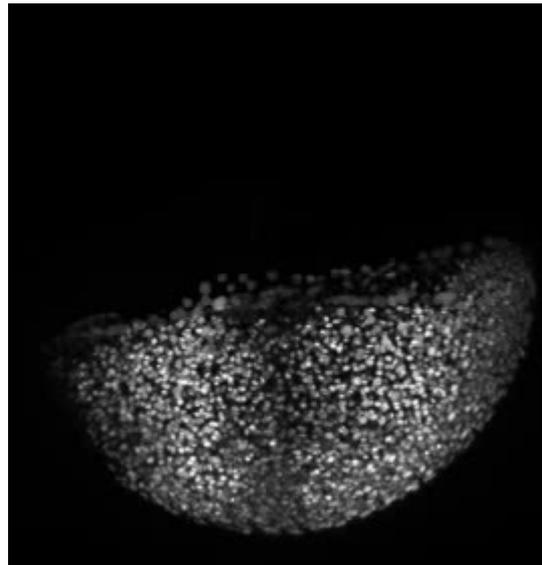
Image Analysis 4:

Dynamics quantification

Dr. Mauricio Cerda
SCIAN-Lab, Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Al adquirir series temporales de datos:

- ¿Cómo caracterizar fenómenos de desplazamiento, crecimiento y transporte ?
- ¿Cómo cuantificar en imágenes discretas?
- ¿Qué error tendrá esta medición?

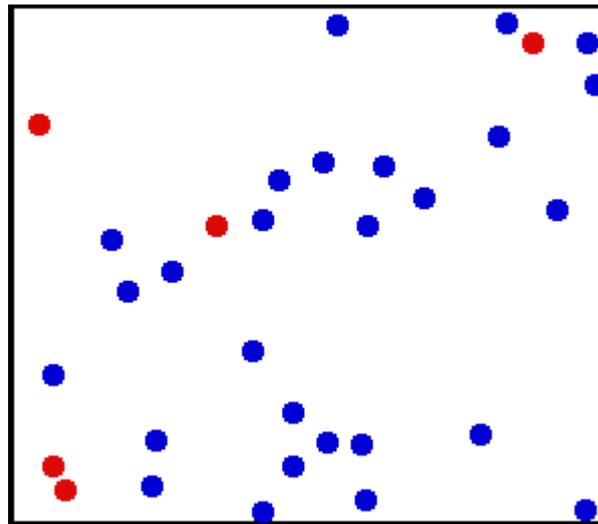


1. Tracking.
2. Difusión (FRAP).
3. Flujo óptico

1. Tracking.
2. Difusión.
3. Flujo óptico

Luego de realizada la segmentación, una primera pregunta es:

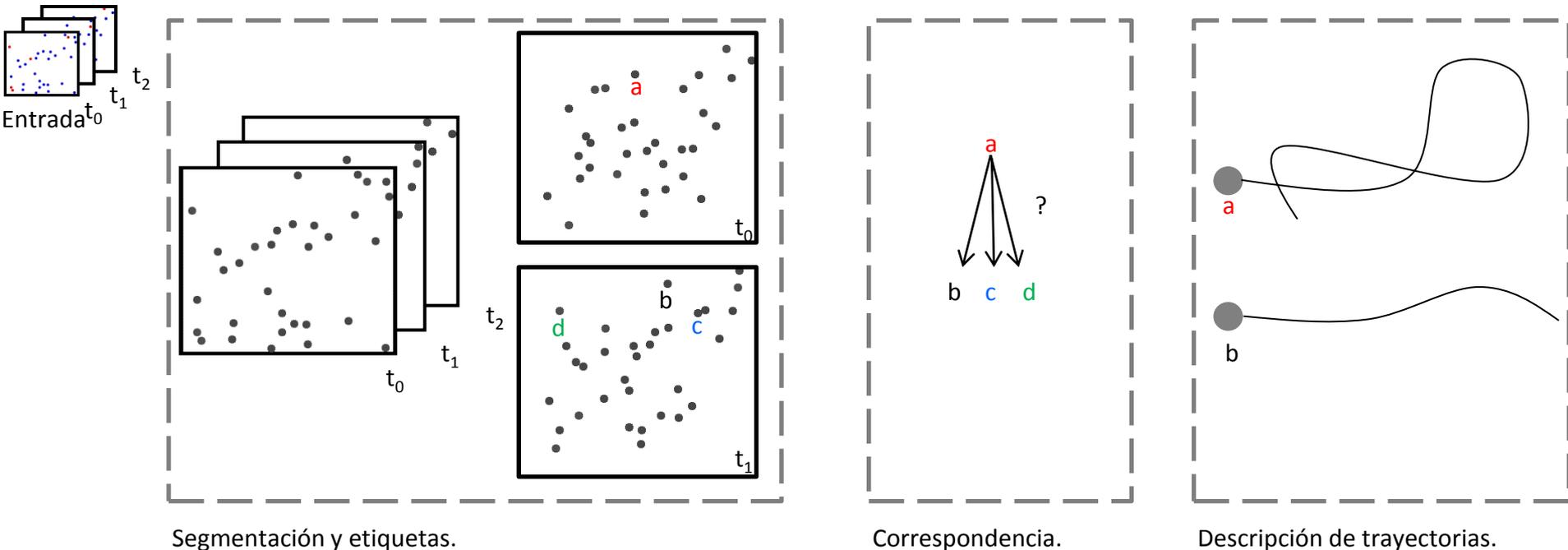
- ¿cómo caracterizar el desplazamiento (traslación) de un objeto en particular?



¿Los objetos rojos se mueven diferente a los azules?

Dada una serie de imagenes o stacks buscamos:

- Segmentar y etiquetar cada objeto en cada imagen.
- Hacer la correspondencia entre cada tiempo ■.
- Describir cada trayectoria.

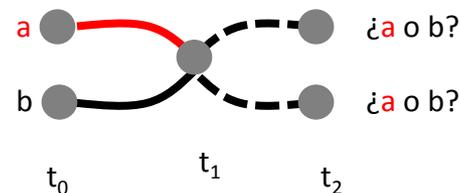


- La segmentación identificará entre fondo y objetos.
- Etiquetar es dar un nombre/numero arbitrario a cada objeto.
- La correspondencia busca identificar el mismo objeto en n frames.
- ¡Hacer la correspondencia es un paso crítico!

- Criterio basado en distancias:

Supongamos que sólo se usa un criterio de distancia,
¿qué puede suceder?

- Confundir dos objetos cercanos
- Intersección de objetos

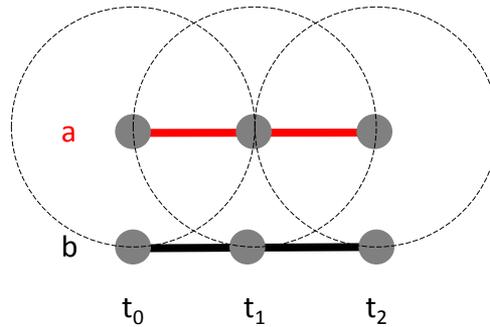


Los criterios basados en distancia y características se pueden mejorar:

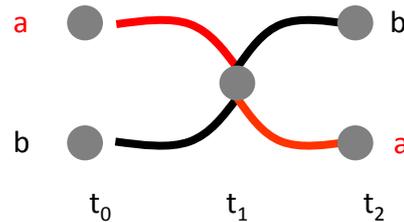
- Con alguna restricción del movimiento del objeto.
- Otros criterios de similaridad.

- Ejemplos típicos de restricciones:

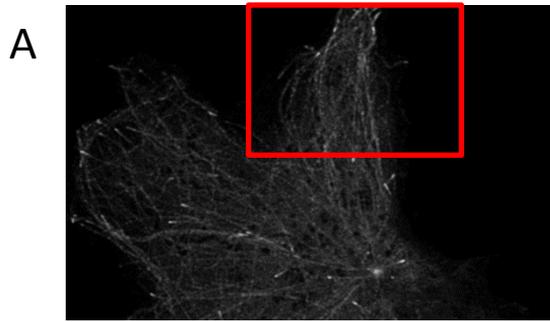
- Mov. menores a Δ pixeles por frame (imageJ).



- Mov. sin cambios de dirección abruptos.



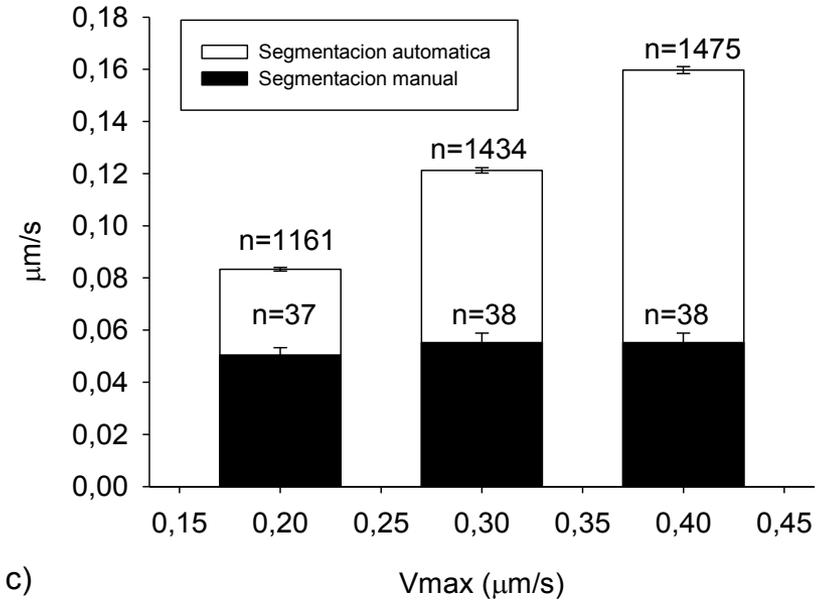
Ej. Tracking de microtúbulos en eb3.



Segmentación manual



Segmentación automática.

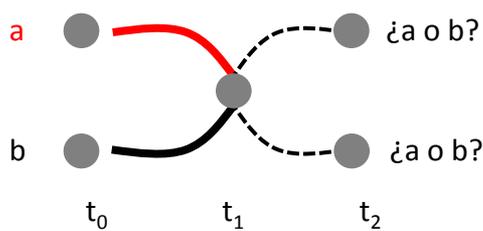


- Estimación imageJ de distancia max (Vmax)
- Si las trayectorias están bien separadas, el tracking es independiente de Vmax (negro)
- De lo contrario Vmax se vuelve crítico (blanco).

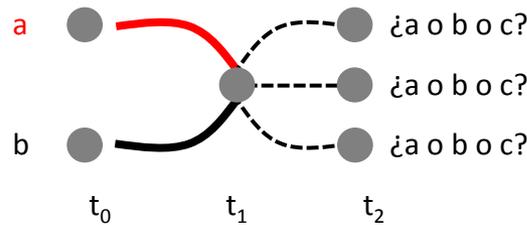
El criterio de distancia se puede mejorar incluyendo una descripción por objeto de:

- Forma (momentos de morfología) ● ★
- Color ● ●
- Restricciones globales de posición/deformación
- Textura
- Dirección movimiento,
- Eventos Fusión/Fisión.

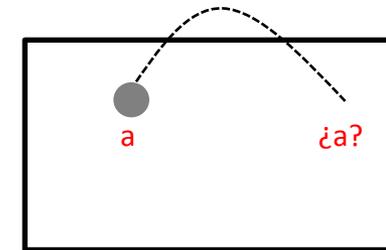
- Estos criterios aún podrían fallar en casos como:
 - Oclusiones
 - División/fusión celular
 - Objetos que salen/ingresan del/al campo visual (2D) o plano (3D).



Oclusión.



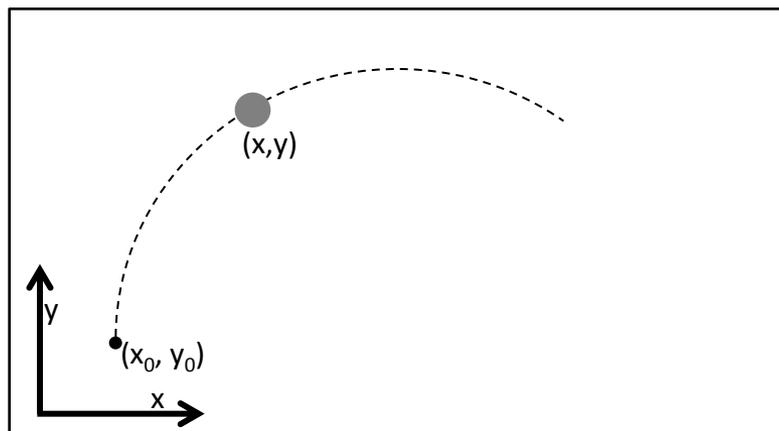
División.



Salidas del campo visual.

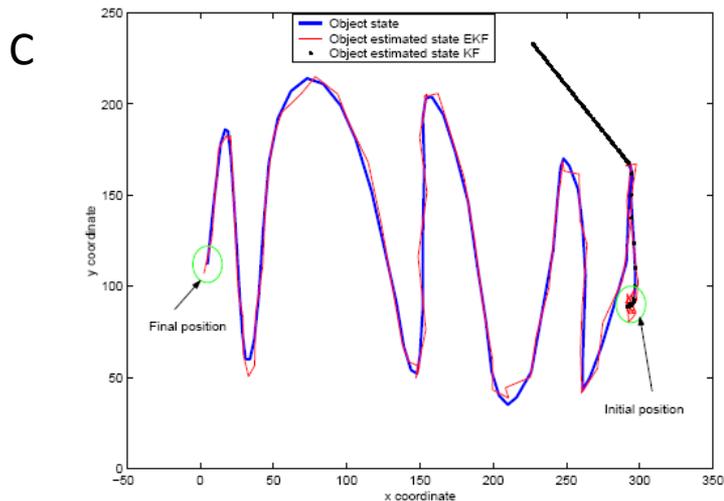
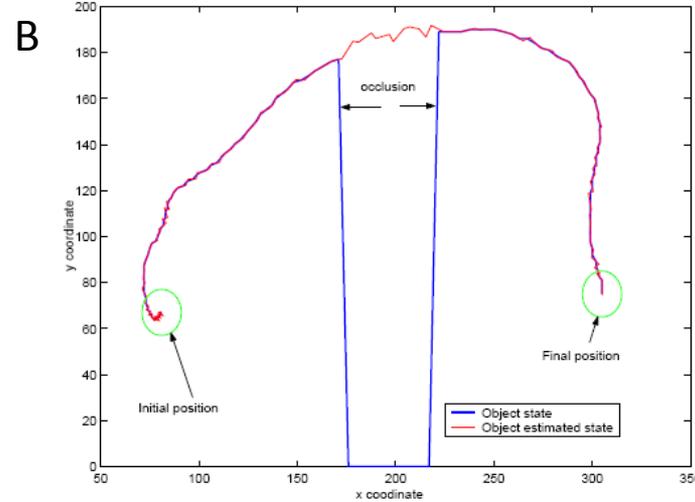
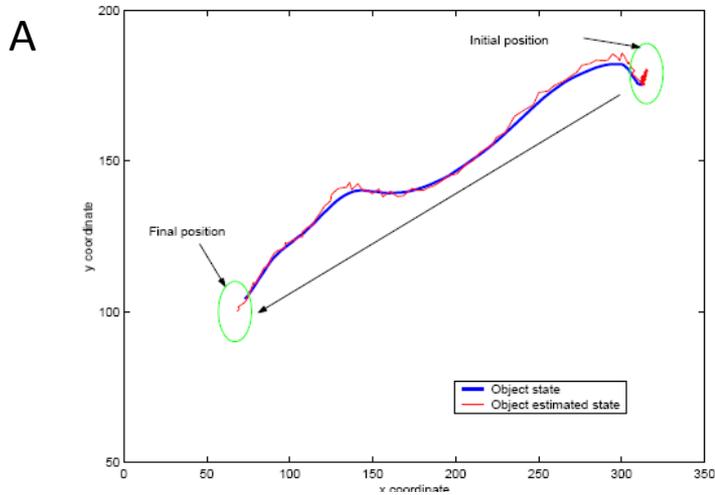
- Los criterios de forma o velocidad constante asumen una cantidad conservada.
- Una idea más elaborada es describir el proceso de movimiento.
- Ej. suponer caída libre e inferir la posición más probable en cada frame.

$$\begin{aligned}
 x(t) &= x_0 + v_x t \\
 y(t) &= y_0 + v_y t - \frac{gt^2}{2}
 \end{aligned}$$



- Algunos formalismos para realizar tracking con información adicional del proceso son el filtro de Kalman, modelos de Markov o probabilísticos [see Refs].
- Estos métodos deducen la dinámica más probable, analizando no sólo pares de frames sino **muchos** (o todos) los frames anteriores.

- Ej. Filtro de Kalman para tracking.



En azul la posición observada, en rojo la posición estima por el filtro de Kalman, y en negro por el filtro de Kalman extendido. **(A)** objeto que desplaza a velocidad constante, **(B)** objeto que se desplaza a velocidad constante y desaparece un intervalo de tiempo, **(C)** objeto que se desplaza con diferentes aceleraciones. [Cuevas et al. 2005].

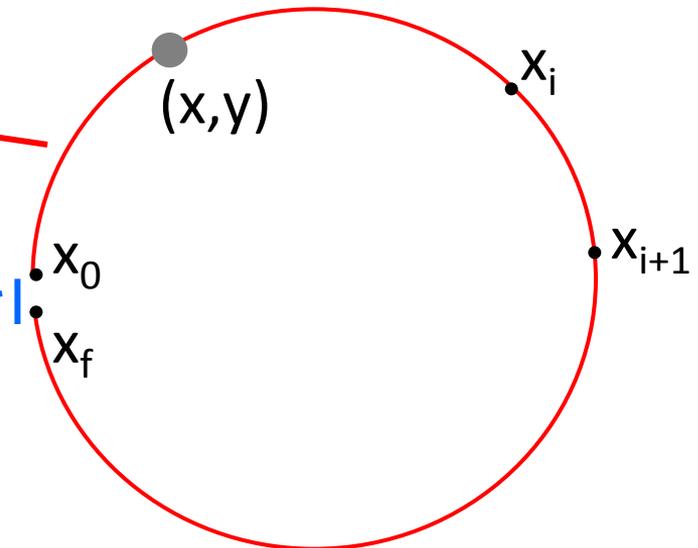
Una vez la trayectoria determinada, algunos parámetros son:

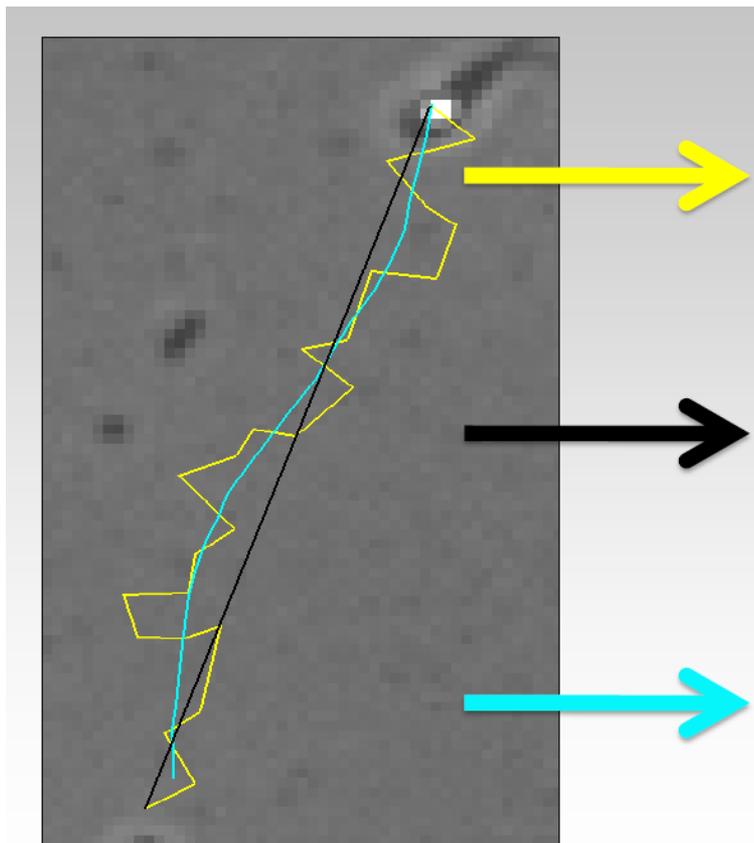
- Distancia recorrida

$$\sum_{i=1}^f |x_i - x_{i-1}|$$

- Desplazamiento

$$x_f - x_0$$





- Velocidad curvilinea.

$$VCL = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^f \frac{\sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}}{t_i - t_{i-1}}$$

- Velocidad lineal.

$$VSL = \frac{\sqrt{(x_f - x_0)^2 + (y_f - y_0)^2}}{t_f - t_0}$$

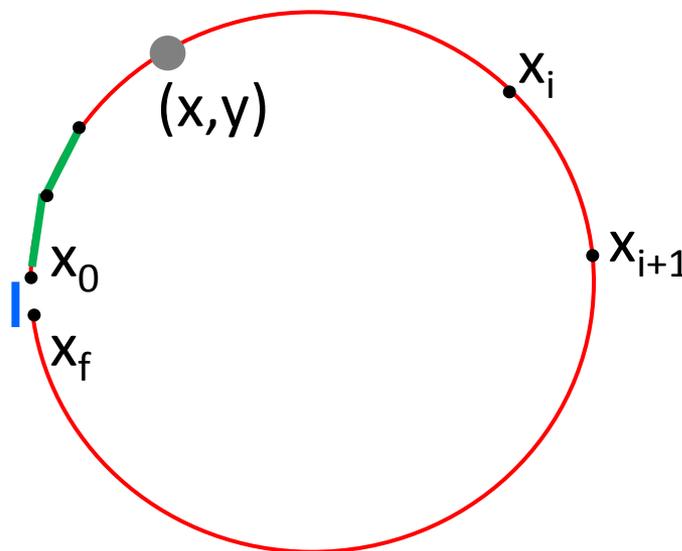
- Velocidad promedio.

$$VAP = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^f \frac{\sqrt{(X_{s_i} - X_{s_{i-1}})^2 + (Y_{s_i} - Y_{s_{i-1}})^2}}{t_i - t_{i-1}}$$

- Direccionalidad

distancia
desplazamiento

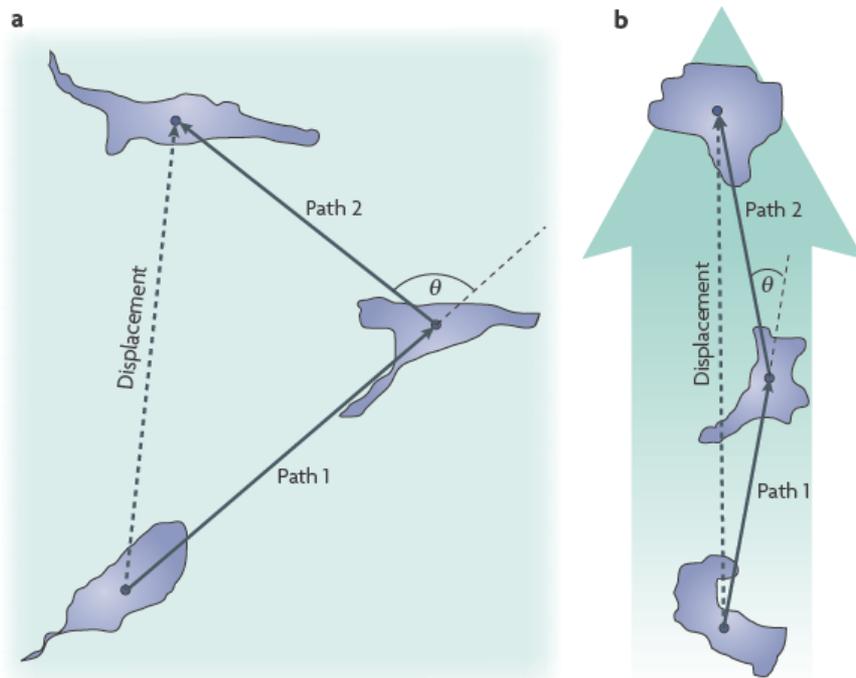
- Mean Square Displacement (MSD)



$$MSD(n\delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} [x(i\delta t + n\delta t) - x(i\delta t)]^2$$

- Ej. Persistencia de migración de células.

Box 1 | Chemokinesis, chemotaxis and directional migration



Migración celular con factores aplicados simétricamente (a) o asimétricamente (b). (a) Células en 3 tiempos en una concentración uniforme. (b) Célula migrando en al dirección del gradiente.

Direccionalidad se define como desplazamiento dividido por distancia recorrida or por MSD.

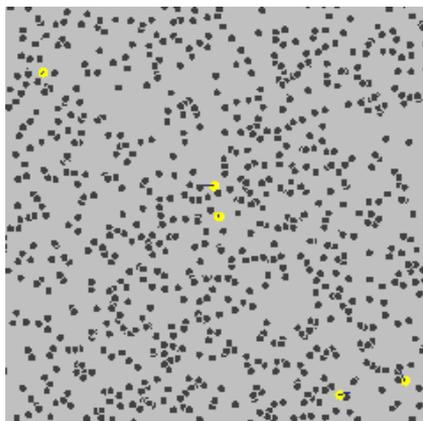
La direccionalidad en migración celular esta controlada por multiples factores: matriz extracelular, mecanimos de polaridad de cada célula, señales a receptores, y otros [Ryan et al. 2009]

Chemokinesis occurs when a factor, applied to the cell either symmetrically or

- El tracking tiene al menos 3 etapas: segmentación, análisis de correspondencia y descripción de trayectorias.
- La etapa de correspondencia es crítica, y los supuestos pueden cambiar drásticamente los resultados.
- El tracking es una herramienta que requiere generalmente intervención manual para verificar criterios, detectar oclusiones y trayectorias anómalas.
- En la literatura de migración celular ya existen parámetros establecidos una vez realizado el tracking.

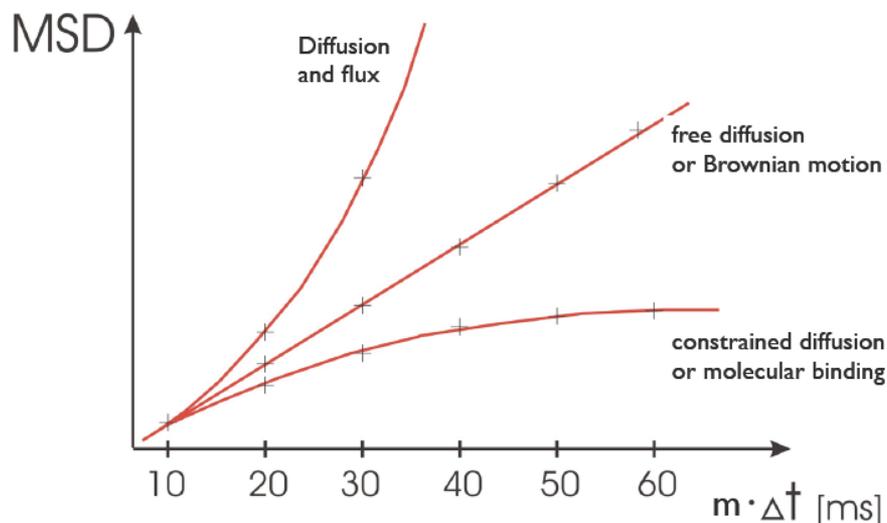
1. Tracking.
2. Difusión (FRAP).
3. Flujo óptico

En un medio como el agua, pequeños objetos como el polen se desplazan de manera aleatoria (descrito por Brown 1827),



Este fenómeno permite caracterizar cantidades microscópicas, como el radio de las moléculas, con cantidades macroscópicas como la densidad (Einstein, 1906).

- Si una partícula (2D) se mueve en de manera aleatoria, el MSD (r^2) es proporcional a D .
- D se define como la constante de difusión (pendiente de la curva).
- Ej. Clasificar mov. de una partícula única.



• Suponiendo una solución en equilibrio, ie $\frac{\partial c}{\partial t} = 0$, dos fuerzas se anulan:

- las colisiones (difusión)
- el propio peso de las partículas (potencial).

• En equilibrio los dos flujos se deben anular,

$$0 = J_{\text{drift}} + J_{\text{diffusion}}$$

• Usando la relación de Boltzmann (estados de alta energía son menos probables).

k_b : constante de Boltzmann

T : Temperatura absoluta

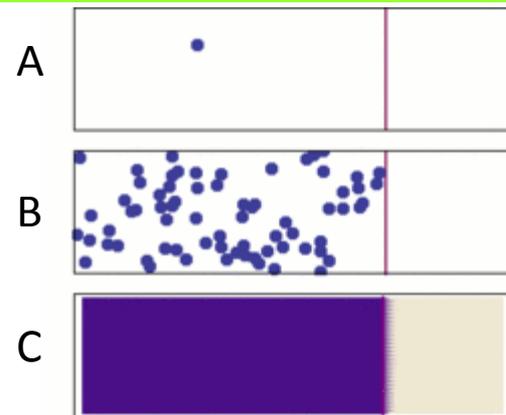
η : viscosidad

r : radio de la partícula

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r}$$

• A esta se le llama Eq. de Stokes-Einstein (en su PhD!).

- Leyes de Fick (1855).
- El flujo de partículas va desde zonas de mayor a menor concentración (ley Fick 1).



Difusión en 3 escalas diferentes: (a) molécula única, (b) múltiples moléculas, y (c) gran número de moléculas. Tomado de Wikipedia.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

- La masa se conserva en ausencia de reacciones químicas.

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial J}{\partial x} = 0$$

- Usando la conservación de masa y la primera ley de Fick se puede derivar la segunda ley de Fick que caracteriza la dinámica.

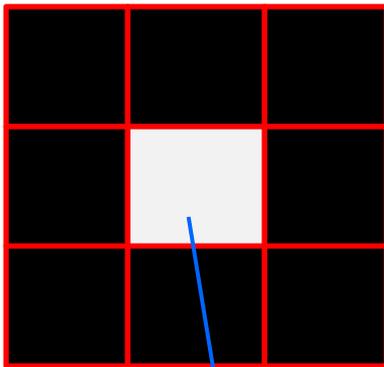
$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

- La ecuación de difusión caracteriza la dinámica.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

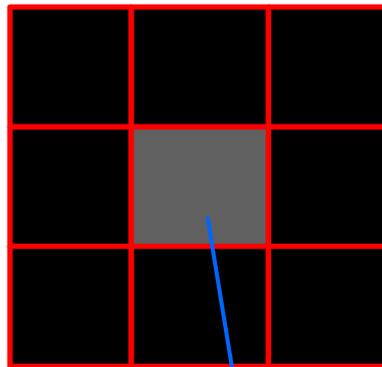
-1	-1	-1
-1	8	-1
-1	-1	-1

The laplacian operator
(include diagonals)



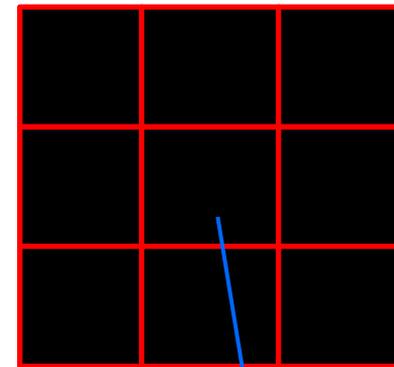
t=0

$c(x=1,y=1,t=0)$



t=1

$c(x=1,y=1,t=0)$

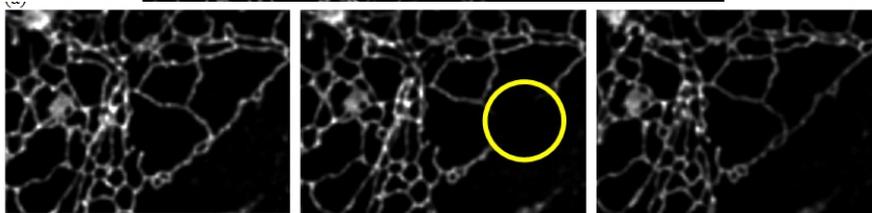
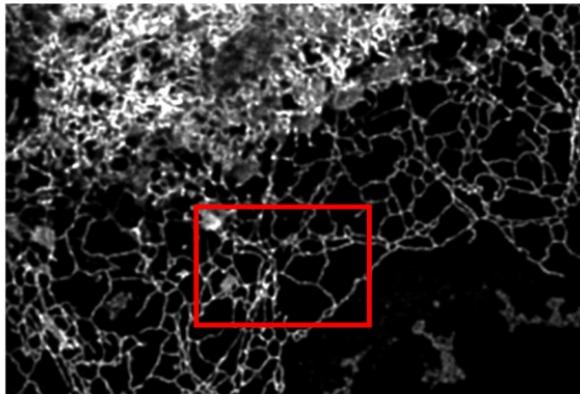


t=2

$c(x=1,y=1,t=0)$

- A escala microscópica el transporte se considera difusivo.
- Si pudiéramos seguir cada partícula, podríamos calcular MSD y determinar $D!!!$
- En imágenes de fluorescencia, no es posible resolver cada molécula.
- Se necesita una aproximación macroscópica para estimar D .

- La densidad es proporcional a la intensidad de fluorescencia.
- Al “quemar” un area las moléculas fluorecentes “llenar” el area sin fluoroforos mediante difusión.



t_0

t_{frap}

$t_{>\text{frap}}$

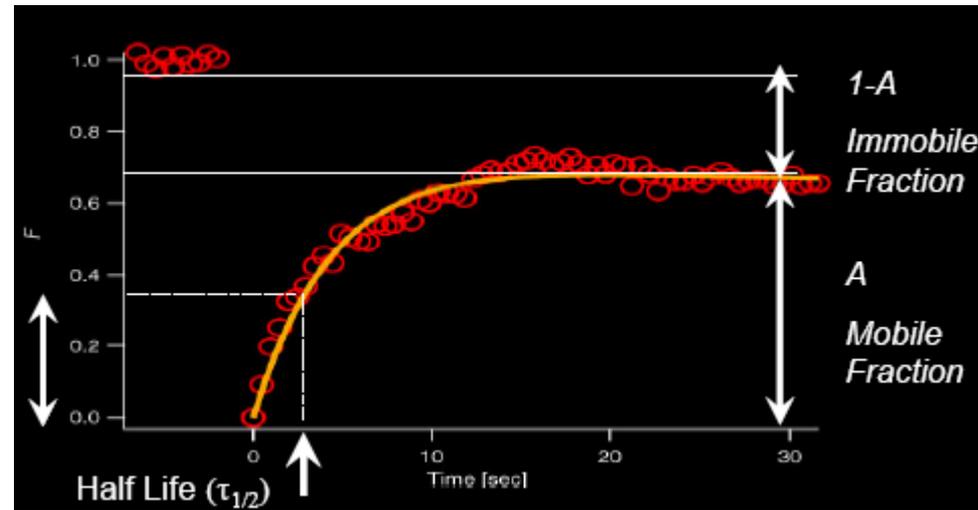
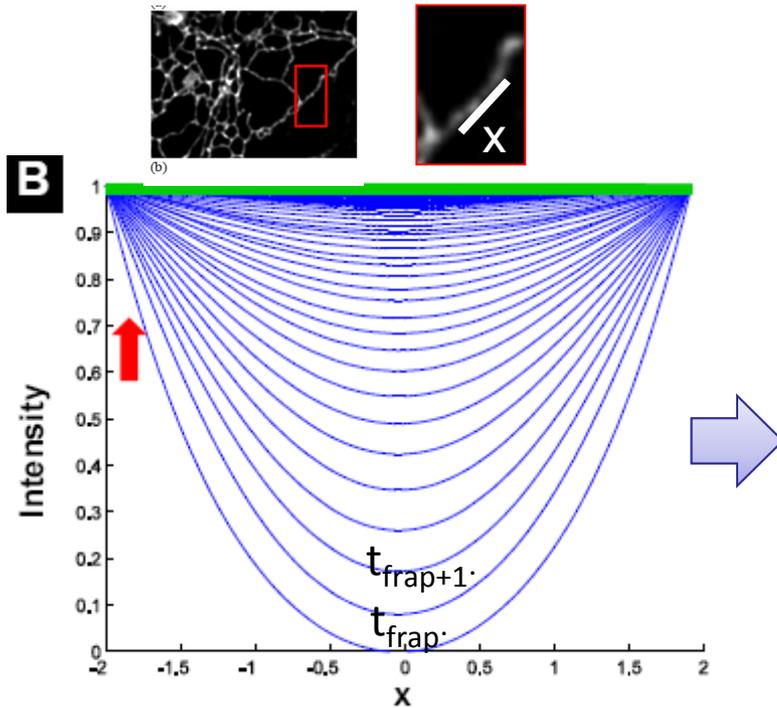
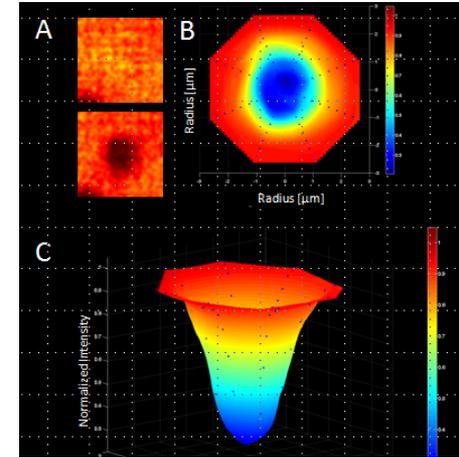
$$\frac{\partial I(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 I(x,t)}{\partial x^2}$$

D : coeficiente de difusión

I : Intensidad de imagen

Datos gentileza del Dr. Omar Ramírez y Jorge Toledo, material sin publicar (2012).

- La ecuación de difusión es posible solucionarla (c) para diferentes geometrías y condiciones de borde.
- Caso 1D, bordes fijos, frap suave (Gaussiano).



$$\frac{\partial I(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 I(x,t)}{\partial x^2}$$

$$F = \int_{-L}^L I(x,t) dx$$

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) es una técnica que permite estimar el coeficiente de difusión, bajo algunos supuestos:

- Los bordes son conocidos (geometría)
- La condición inicial es conocida (forma del laser)

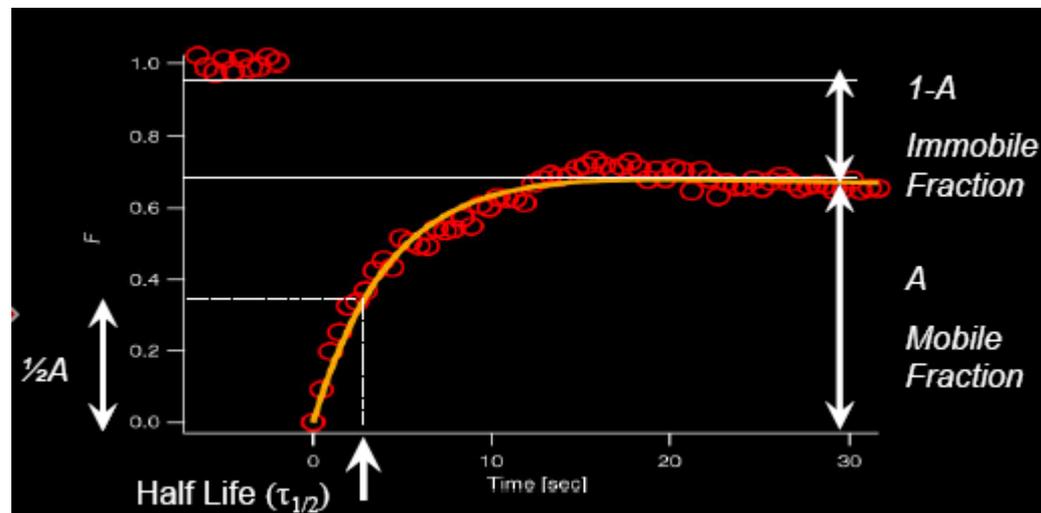
La solución de esta ecuación para el caso antes descrito es:

$$F(t) \approx R \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \exp \left(-\frac{D\pi^2 t}{4L^2} \right) \right)$$

1er componente Fourier.

R : fracción recuperada (móvil)

L : tamaño del trap

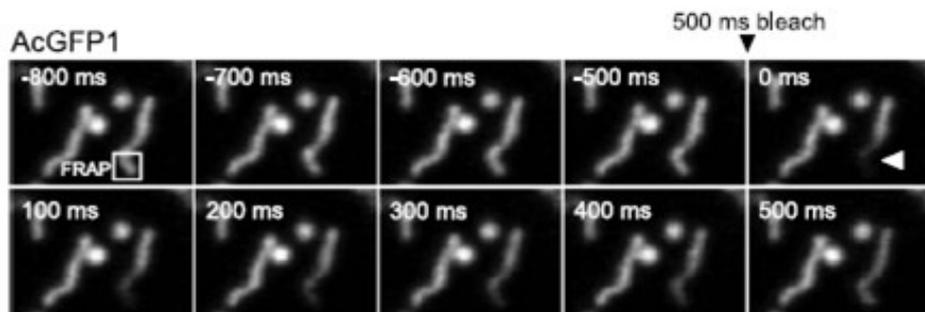


- Conociendo la solución teórica para $F(t)$
- Midiendo la intensidad en un área determinada (ROI)
- Es posible construir una curva de intensidad total y hacer un ajuste de curva para determinar D .

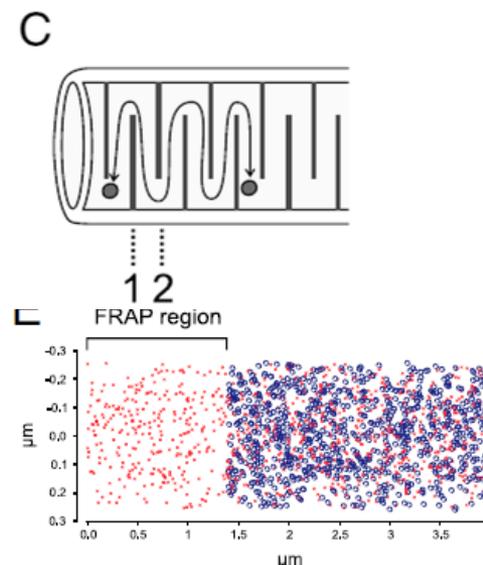
- El error en la estimación de D estará determinado por:
 - La correctitud de asumir sólo difusión (experimental).
 - La condición de borde (experimental).
 - La condición inicial (forma del laser).

- Para geometrías “simples” es posible encontrar una solución analítica para poder fitear una curva (tubos, esferas, triángulos).
- En problemas más complicados se puede simular la difusión vía random walk y estudiar el efecto de la geometría.

Ei. “simular” un FRAP para entender transporte en mitocondrias.



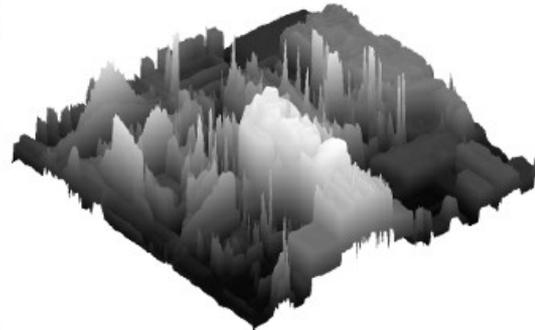
FRAP en mitocondrias (izquierda) usando ACGFP1 en células HEK293. (c) Modelo geométrico de una mitocondria. (e) Simulación de las moléculas fluorescentes, en azul al momento del FRAP, y en rojo 15s después.



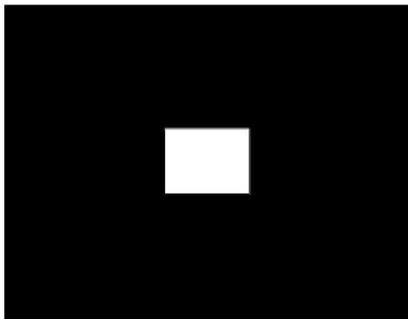
- En proc. de imágenes se puede utilizar la difusión como un filtro para eliminar gradientes locales (Difusión isotrópica).



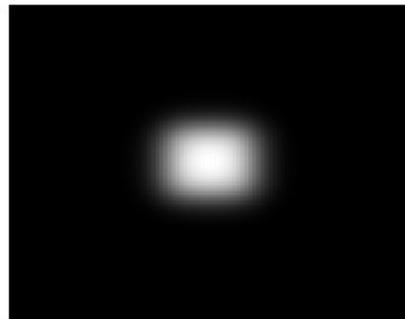
(a) Tsukuba.



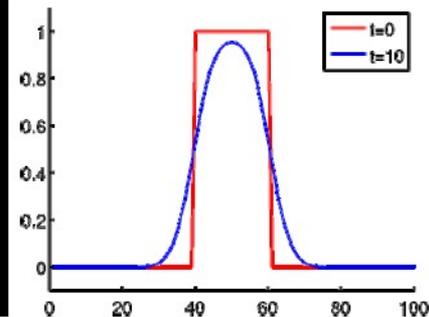
(b) Tsukuba.



(a) Time $t = 0$



(b) Time $t = 1$



(c) Graphs

- La difusión isotrópica puede permitir segmentar un gran objeto, pero no objetos finos.

Ej. Medición de ancho de fibras de actina.

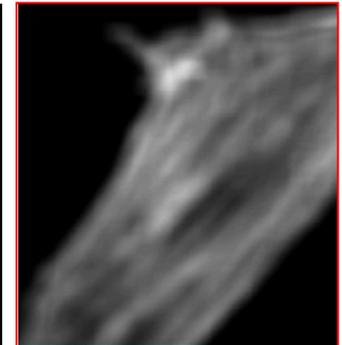
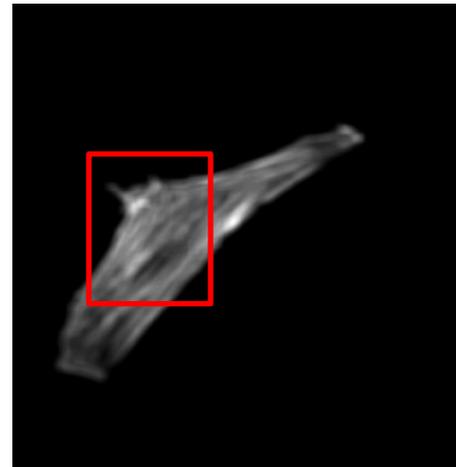
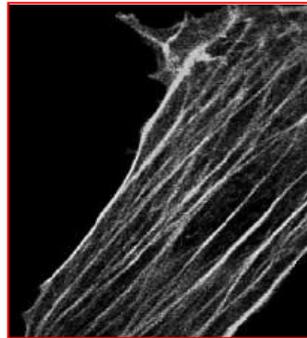
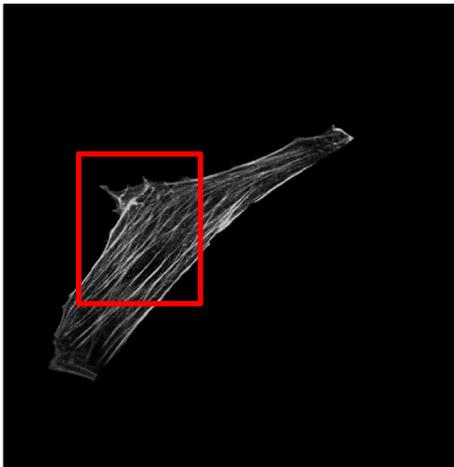


Imagen original (deconvolucionada).

Fibras de actina en astrocitos. Material no publicado
gentileza de AQLL-Lab, 2013.

Difusión isotrópica (Filtro Gaussiano)

- Otros métodos han propuestos la difusión confinada (anisotrópica) para eliminar pequeños gradientes y preservar mayores.

Ej. Eliminar los detalles un objeto, preservando los bordes más grandes.

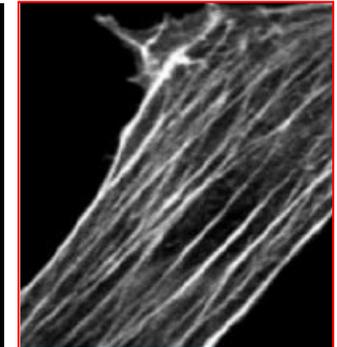
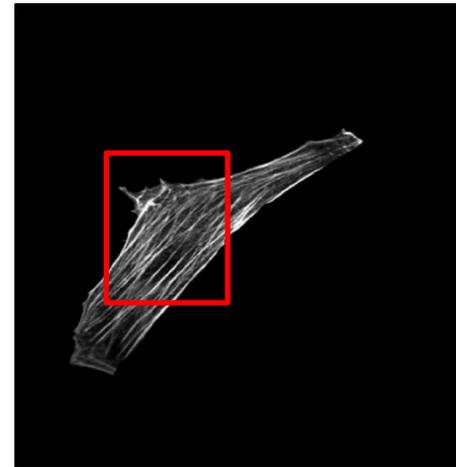
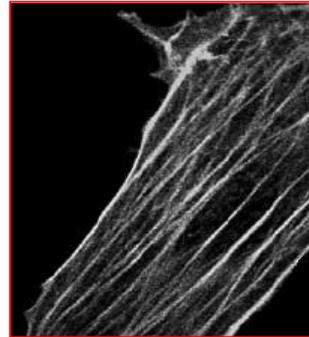
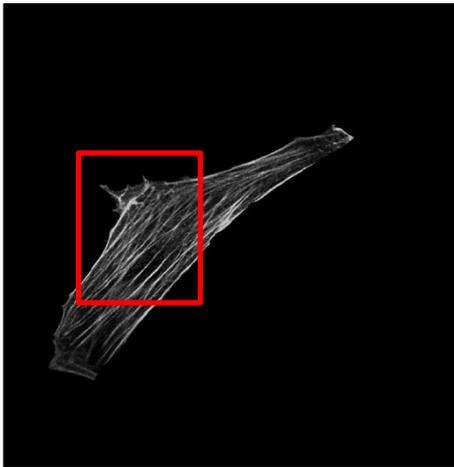


Imagen original (deconvolucionada).

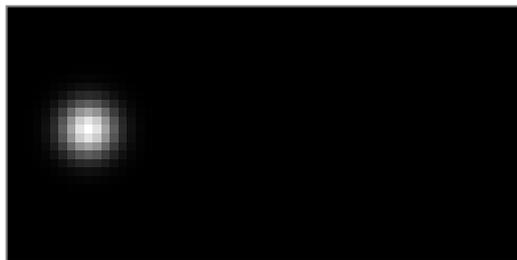
Fibras de actina en astrocitos. Material no publicado
gentileza de AQLL-Lab, 2013.

Difusión anisotrópica (utilizando gradiente)

- La microscopía de fluorescencia permite acceder a información respecto a fenómenos de transporte.
- La estimación del coeficiente de difusión D caracteriza el proceso de difusión, bajo varios supuestos.
- Métodos computacionales permiten simular difusión en geometrías más complejas.
- La difusión, como mecanismo de propagación de información, se aplica también en informática.

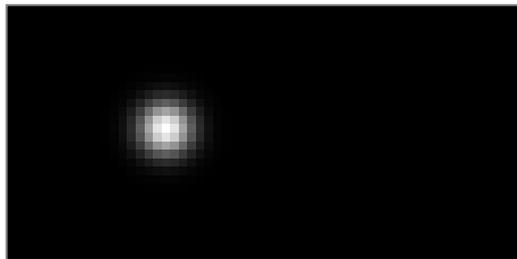
1. Tracking.
2. Difusión.
3. Flujo óptico

Otra aproximación para cuantificar la dinámica de la intensidad de luz (translación y deformaciones) es hacer un cálculo del movimiento aparente de cada pixel.



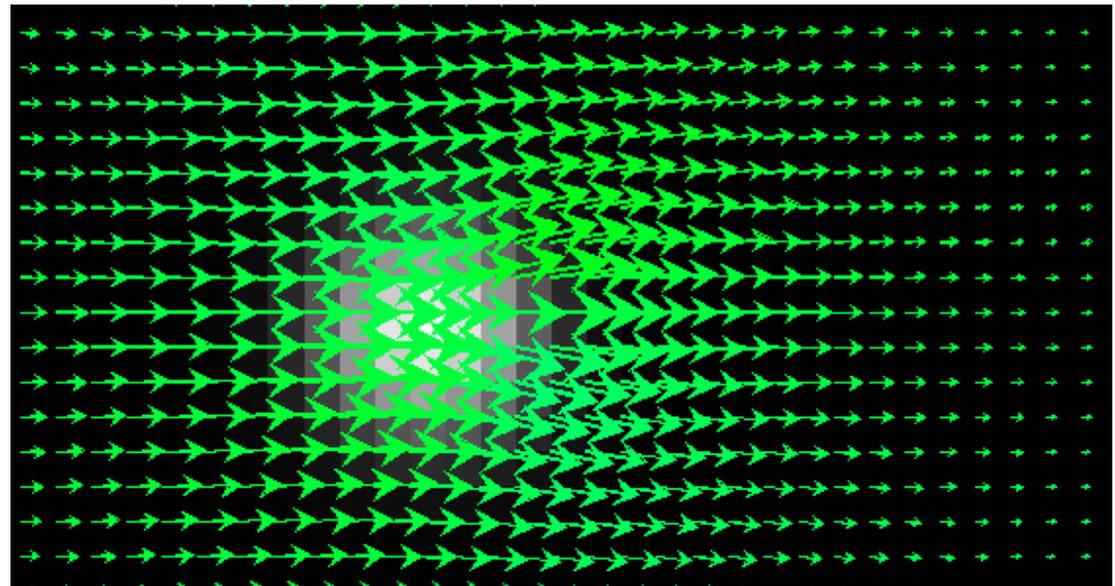
Time 1

$$I(x, y, t)$$



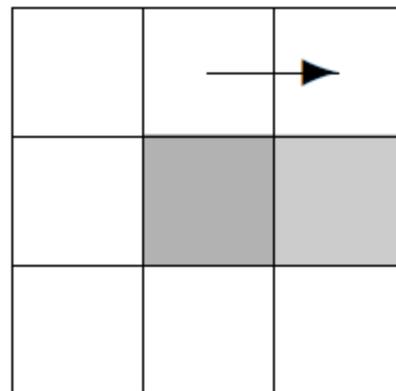
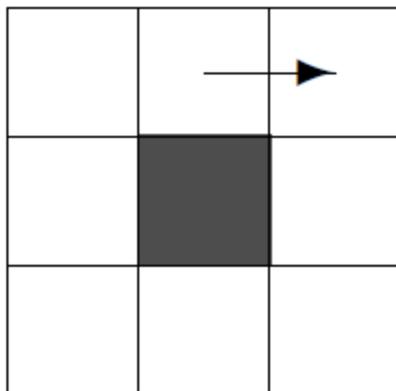
Time 2

$$I(x, y, t + \Delta t)$$



Si asumimos que el cambio de intensidad en un pixel es resultado de una traslación podemos describir:

- Traslaciones.
- Deformaciones.



No necesitamos etiquetar objetos , sólo asumimos que se conserva la cantidad de luz.

Matemáticamente este supuesto se puede formular como:

$$I(x, y, t) = I(x - u, y - v, t + 1)$$

Usando una aproximación de Taylor,

$$f(x) = f(a) + f'(a)(x - a) + f''(a)(x - a)^2$$

Aplicado a la constancia de brillo:

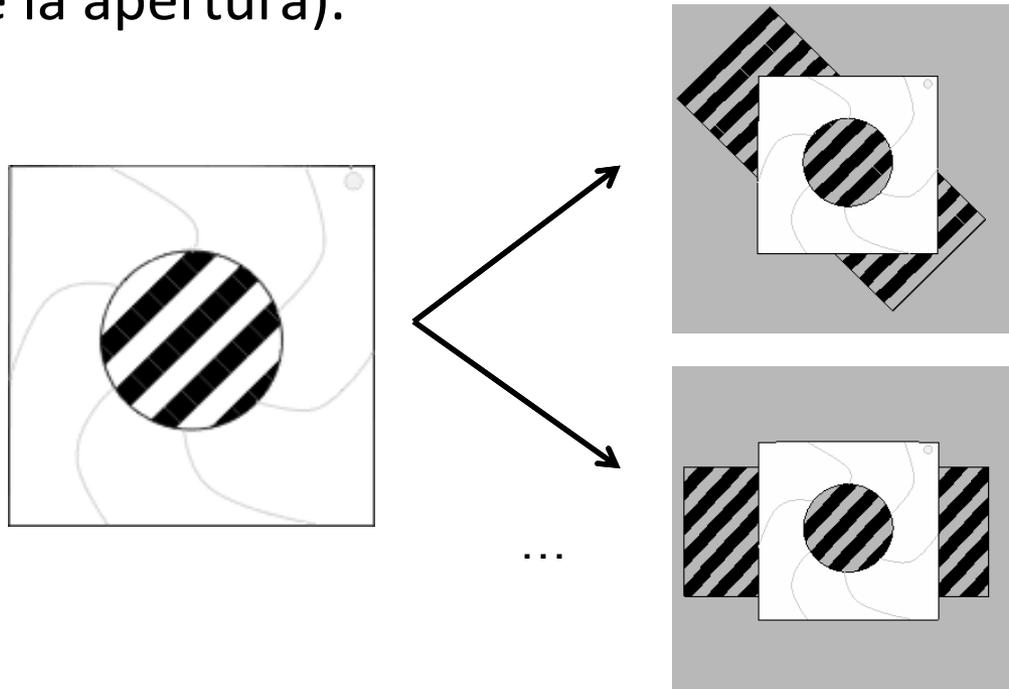
$$I(x, y, t) = I(x + u, y + v, t + 1)$$

$$I(x + u, y + v, t + 1) = I(x, y, t) + I_x u + I_y v + I_t$$

$$I_x u + I_y v + I_t = 0$$

Ecuación OFC

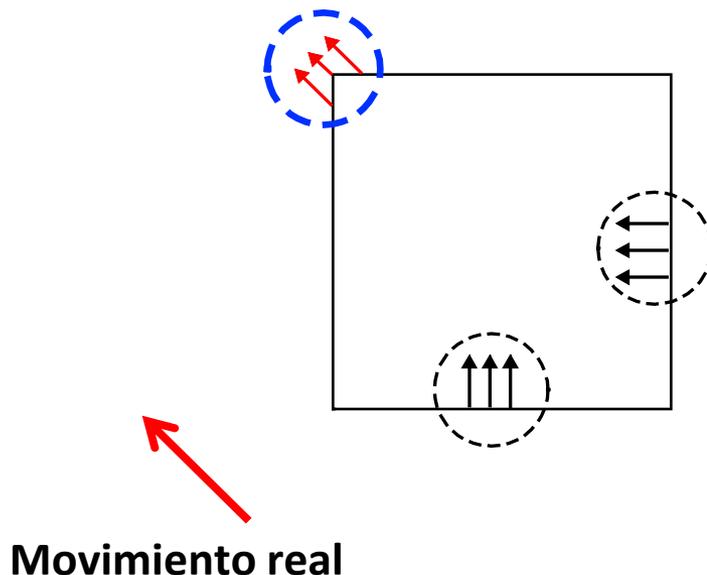
- La idea es que usando la ecuación OFC podemos buscar en cada pixel el vector (u,v) : el movimiento aparente de ese pixel.
- Pero, sólo es posible estimar el mov. perpendicular a los bordes (problema de la apertura).



- Algunas soluciones posibles:

- Calcular sólo en píxeles donde no se produce el problema (zona en rojo)

- “Difundir” la solución desde donde es posible calcular hacia otras regiones que se desplazan (rojo hacia negro).



- Lucas-Kanade (1981) propuso asumir que en una pequeña región (Ω) el mov. es constante.
- Esto permite calcular OF, en cada pixel, minimizando la siguiente función:

$$E(u, v) = K_{\rho} * ((I_x u + I_y v + I_t)^2).$$

- Un mínimo (u^*, v^*) de E satisface $\partial_u E = 0$ y $\partial_v E = 0$, por lo tanto:

- Para resolver la ecuación anterior, el determinante de la matriz A debe ser diferente de cero:

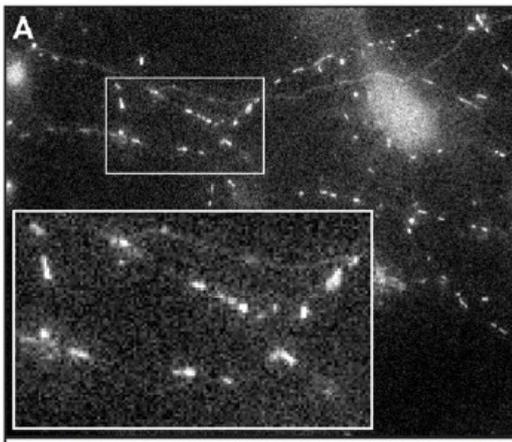
$$\det(A) = (K_\rho * I_x^2)(K_\rho * I_y^2) - (K_\rho * I_x I_y)(K_\rho * I_x I_y)$$

- Esto ocurre solamente si $K_\rho * I_x$ y $K_\rho * I_y$ son diferentes de cero.
- Es decir, el sistema tiene solución única solamente en esquinas (puntas)!

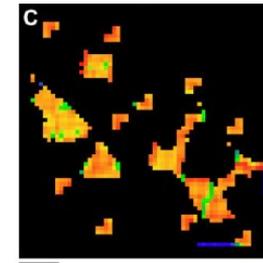
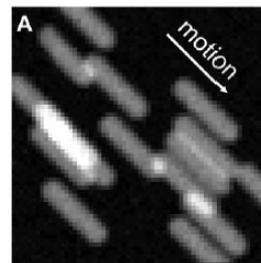
Pasos para utilizar este método:

- Medir el gradiente de la imagen.
- Ubicar las esquinas de los ROI.
- Calcular OF usando Lukas-Kanade en dichas zonas.

Ej. Medición de movimiento de mitocondrias [Gerencser et al. 2008].



Raw fluorescent image of axons of hippocampal neurons expressing mito-mPlum



Modelo geométrico de mitocondria (izq) y zonas donde la estimación es más precisa (der).

- La segunda idea es “Difundir” la solución desde donde es posible calcular hacia otras regiones que se desplazan
- Horn-Schunck (1981) propusieron asumir que el campo vectorial sea suave:

$$E(u, v) = \int_{\Omega} \left(\underbrace{(I_t - I_x u - I_y v)^2}_{\text{datos}} + \alpha \underbrace{(|\nabla u|^2 + |\nabla v|^2)}_{\text{suavidad}} \right) dx$$

- donde I es la imagen, i.e. este modelo es global al buscar (u^*, v^*) minimicen E para toda la imagen.

- El sistema anterior se puede resolver minimizando el funcional (Euler-Lagrange) mediante,

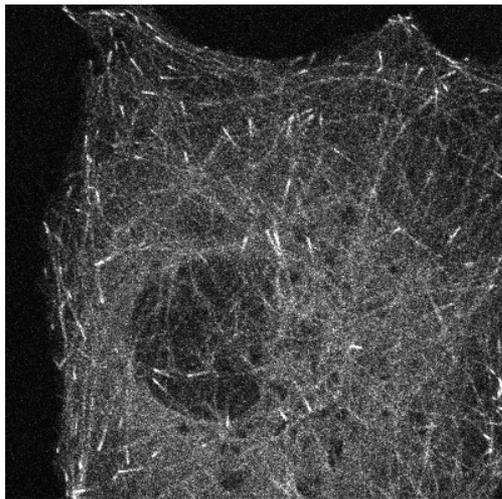
$$u_i^{k+1} = \bar{u}_i - \frac{I_x \left[I_x \bar{u}_i^{-k} + I_y \bar{v}_i^{-k} + I_t \right]}{\alpha^2 + I_x^2 + I_y^2} \quad \bar{u}_i^{-k} = \frac{1}{3} \Delta u_i + u_i$$

- En este caso (mét. Jacobi), en cada iteración se estima (u,v).
- Es posible calcular una solución en donde hay al menos un borde.

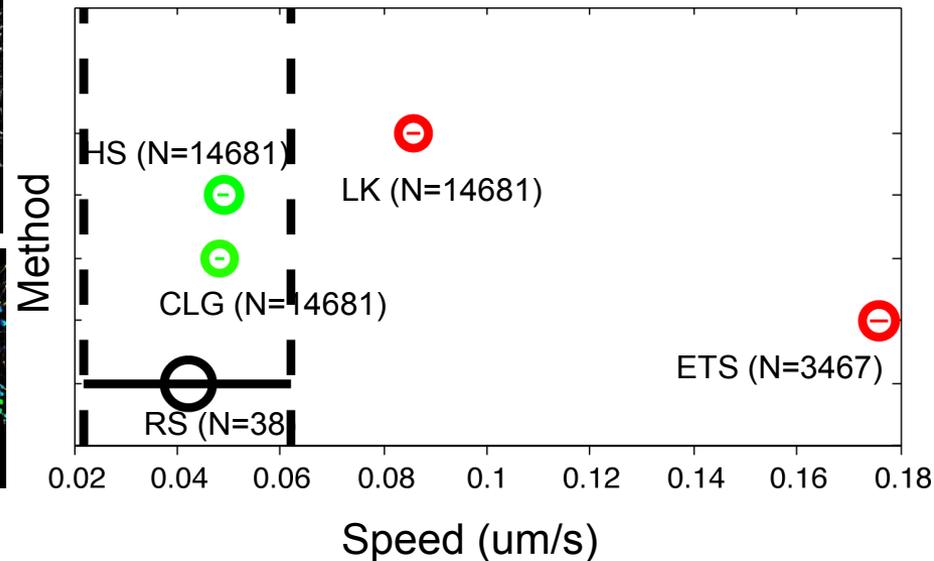
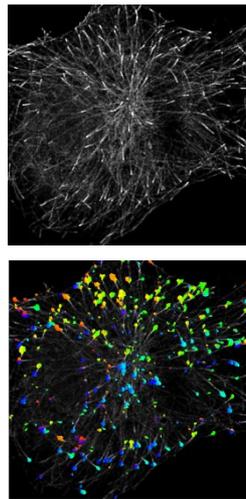
Para utilizar este método:

- Medir el gradiente de la imagen.
- Ubicar los ROI.
- Calcular OF usando HS y medir en el ROI.

Ej. Medición de vel. de microtubulos en COS-7 [Cerde et al. 2012].



COS-7 cells expressing EB3-GFP.



- El flujo óptico es una herramienta que permite estimar desplazamiento aparente por pixel.
- Es sensible a la geometría de los objetos (apertura), y dependiendo del método se deben seleccionar algunos puntos.
- Entrega mayor “flexibilidad” a los métodos de tracking ya que funciona a nivel de píxeles.
- Técnicamente es más complejo de usar que tracking manual, pero en los últimos años se ve una tendencia a usar este tipo de métodos en problemas de biología.

- [Cuevas et al. 2005], Kalman filter for vision tracking, Technical Report B 05-12, Freie Universität Berlin, Institut für Informatik.
- [Ryan et al. 2009] Random versus directionally persistent cell migration, Nature Reviews, Molecular Cell Biology.
- [Shonkwiler et al. 2000] Mathematical biology: an introduction with maple and matlab, Springer.
- [Del piano, 2012], Performance of optical flow techniques for motion analysis of fluorescent point signals in confocal microscopy, MVA.
- [Cerda, 2012], Optical flow for temporal events quantification in cellular events, IEEE Transaction on biomedical engineering (*in preparation*).
- [Dieteren et al. 2011], Solute diffusion is hindered in the mitochondrial matrix, PNAS.