

# Algoritmo de seguimiento automático de trayectorias de axones a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia

## Objetivo

El trazado de trayectorias axonales a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia es crucial para entender la funcionalidad de las neuronas y revelar la conectividad de las redes cerebrales. Esta necesidad ha impulsado el desarrollo de métodos avanzados para el trazado automático de axones, conocido como trazado neuronal o *neuro tracing*.

A pesar de la disponibilidad de numerosos métodos de trazado, la reconstrucción precisa de neuronas a partir de imágenes con alto nivel de ruido sigue siendo un desafío significativo, particularmente para axones con intensidades de fluorescencia bajas. Como resultado, los algoritmos de reconstrucción automática o semiautomática a menudo fallan en el seguimiento de axones con baja intensidad debido al poco contraste que hay entre el axón y el fondo de la imagen. En este estudio, proponemos un algoritmo innovador diseñado específicamente para abordar esta limitación.

## Métodos

La mayoría de los algoritmos de trazado de axones pueden clasificarse en dos categorías principales: *esqueletización global* y *rastreo local*. En este estudio, adoptamos la metodología de rastreo local, que se descompone esencialmente en tres fases: la detección de puntos semilla, la asignación de direcciones a estos puntos y la búsqueda de caminos óptimos entre puntos semilla adyacentes. Todo el procesamiento de imágenes y el código de rastreo de axones se realizó en código Python.

Previo a la detección de los puntos semilla, se aplica corrección gamma a la imagen para realzar el contraste entre el cuerpo neuronal y el fondo, seguido de filtros gaussiano y mediano para reducción de ruido. Para terminar, se utiliza un segmentador basado en la matriz Hessina de la imagen para segmentar estructuras tipo *vessels*, que es característica de los axones.

Una característica distintiva de los axones con baja fluorescencia es su aparición como una sucesión de puntos brillantes, denominados puntos axonales. Los puntos semilla son precisamente estos puntos axonales, los cuales se identifican utilizando el paquete *Trackpy* de Python, que localiza puntos brillantes con un diámetro y brillo específicos.

Posteriormente, se asigna una dirección a cada punto semilla mediante el siguiente procedimiento: se construye un rectángulo de 5 por 20 píxeles centrado en el punto semilla. Este rectángulo se rota y, en cada rotación, se calcula la suma de la intensidad de los píxeles contenidos dentro del rectángulo. Finalmente, se selecciona la dirección correspondiente a la rotación que produce la mayor suma de intensidades. De esta manera, se obtiene una imagen de direcciones.

El paso siguiente consiste en determinar qué puntos semilla se conectarán entre sí. Para ello, se considera el vector de dirección del punto semilla inicial, y el vector de desplazamiento que conecta este punto con su vecino más cercano. La literatura sugiere que los axones no realizan cambios bruscos de dirección, lo que implica que el ángulo entre los

vectores de dirección o entre los vectores de dirección y desplazamiento no debe exceder los 15 grados. Además, solo se consideran puntos semilla que se encuentren a una distancia máxima de 20 píxeles. Los puntos que satisfacen esas condiciones son llamados *candidatos*. Finalmente, el mejor candidato es elegido por medio de una función de costo que depende del ángulo del vector de desplazamiento y de la distancia entre el punto semilla inicial y el punto candidato. El algoritmo se detiene una vez que no hay más puntos candidatos.

## **Resultados**

El verdadero desafío y objetivo principal del algoritmo radica en la detección y reconstrucción de trayectorias de axones con baja fluorescencia. En este caso, el algoritmo ha mostrado una capacidad prometedora para recuperar múltiples trayectorias que previamente se perdían en el fondo de la imagen debido a la baja intensidad de señal.

A pesar de estos avances, aún persisten ciertos aspectos que requieren refinamiento. Uno de los principales desafíos es la eliminación de trayectorias falsos positivos, que pueden surgir debido a artefactos en la imagen o ruido residual. Además, es crucial abordar la completitud de las trayectorias, ya que algunas pueden aparecer discontinuas debido a variaciones en la intensidad de fluorescencia o a la presencia de obstáculos en el campo de visión.

## **Conclusiones**

El algoritmo propuesto ha demostrado ser eficaz en la delineación de trayectorias de axones con alta intensidad de fluorescencia. De manera más significativa, ha mostrado la capacidad de trazar secciones de axones con bajo contraste respecto al fondo o incompletas. Para mejorar su desempeño, es fundamental implementar un método eficiente para completar trayectorias interrumpidas. Además, la calidad de las estructuras obtenidas debe ser evaluada utilizando métricas reconocidas. Finalmente, se observó que el costo computacional del algoritmo es bajo, lo que lo convierte en una opción viable para su implementación en estudios futuros.