



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE INGENIERÍA



Cryo-EM Volume Denoising

Análisis de Algoritmos de Disminución de Ruido sobre Datos
Volumétricos Obtenidos con Criomicroscopía Electrónica.

MEMORIA DE PROYECTO PRESENTADA A LA FACULTAD DE INGENIERÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA POR

Alicia Schandy, Alejandro Silva, Nicolás Violante

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUERIMIENTOS
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO ELECTRICISTA.

TUTOR

Federico Lecumberry..... Universidad de la República
Alberto Bartesaghi..... Duke University

TRIBUNAL

Alicia Fernández..... Universidad de la República
José Lezama..... Universidad de la República
Ignacio Ramírez..... Universidad de la República

Montevideo
martes 10 noviembre, 2020

Cryo-EM Volume Denoising, Alicia Schandy, Alejandro Silva, Nicolás Violante.

Esta tesis fue preparada en \LaTeX usando la clase iietesis (v1.1).

Contiene un total de 94 páginas.

Compilada el martes 10 noviembre, 2020.

<http://iie.fing.edu.uy/>

Agradecimientos

Agradecemos a todas las personas que colaboraron con el desarrollo de este proyecto, particularmente:

A nuestra familia y amigos, por su cariño y apoyo incondicional durante el transcurso de toda la carrera.

A Federico Lecumberry y Alberto Bartesaghi, por su labor como tutores del proyecto. Apreciamos profundamente su paciencia, su orientación y sus valiosas recomendaciones.

A la Universidad de la República por ofrecernos la oportunidad de desarrollarnos personal y académicamente.

A *Duke University* por brindarnos acceso a los recursos informáticos necesarios para realizar los experimentos en este proyecto.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

Resumen

La criomicroscopía electrónica es una técnica de imagenología que permite obtener modelos tridimensionales de la estructura atómica de macromoléculas, a partir de cientos de miles de imágenes extremadamente ruidosas capturadas con un microscopio electrónico de transmisión. Conocer la estructura de las macromoléculas con mayor precisión es fundamental para comprender mejor distintos procesos biológicos y contribuir al desarrollo de fármacos y vacunas para atacar diferentes enfermedades. Avances técnicos en el proceso de adquisición de las imágenes y progresos en la capacidad de procesamiento de grandes volúmenes de datos han mejorado considerablemente la máxima resolución alcanzable por esta técnica. No obstante, un área poco explorada dentro de la criomicroscopía electrónica es la posibilidad de procesar y refinar la reconstrucción tridimensional para mejorar aún más su resolución.

En este proyecto se evalúa el desempeño de tres algoritmos de disminución de ruido en volúmenes sobre el mapa de densidad de la enzima beta-galactosidasa con distintos niveles de ruido (gaussiano y de media nula) agregado: *Non-Local Means* (NLM), *Block-Matching and 4D filtering* (BM4D) y *Noise2Void* (N2V). Estos algoritmos buscan aprovechar la auto-similitud en la señal para disminuir el ruido que la degrada.

La beta-galactosidasa es una macromolécula con mucha redundancia. Está formada por cuatro cadenas idénticas de 1,023 aminoácidos cada una. En la naturaleza existen solamente veinte tipos de aminoácidos distintos, lo cual significa que esta macromolécula contiene múltiples ejemplares de los mismos aminoácidos ubicados en distintas orientaciones a lo largo de toda su estructura. Luego de realizar experimentos para determinar la elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño de cada uno de los algoritmos, se comprueba que los tres logran un incremento porcentual significativo en la resolución de la reconstrucción tridimensional. Más específicamente, tomando como insumo el mapa de densidad de la beta-galactosidasa degradado con distintos niveles de ruido, la mejora de resolución promedio alcanzada por NLM es de 12.9%, la de BM4D es de 28.4% y la de N2V es de 27.7%.

No obstante, ninguno de estos algoritmos es invariante a rotaciones, lo cual impide que puedan aprovechar gran parte de la redundancia presente en la señal y constituye una limitante para la máxima mejora de resolución alcanzable por estos métodos. En este contexto, se diseña una medida de similitud invariante a rotaciones para incorporar en el algoritmo NLM. Se propone una extensión de este algoritmo que integra recursos propios y existentes capaz de identificar como similares, estructuras que contienen prácticamente la misma señal pero que se encuentran en distintas orientaciones, logrando así recoger más información para realizar la restauración. La idea central es similar a la de NLM tradicional, excepto que la nueva medida de similitud compara el vecindario de referencia con otros vecindarios de la ventana de búsqueda previamente alineados al de referencia. El método de alineación consiste en proyectar la transformada de Fourier de los volúmenes sobre esferas y utilizar herramientas matemáticas de los armónicos esféricos para hallar la rotación que mejor alinea dichas proyecciones. La eficacia del método de alineación y de la nueva medida de similitud se valida con una serie de experimentos. En primer lugar, se comprueba que el método de alineación logra alinear correctamente dos aminoácidos

del mismo tipo en orientaciones aleatorias para los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza. Además, la medida de similitud propuesta asigna pesos cercanos a uno a aminoácidos del mismo tipo en orientaciones diferentes. Se verifica también que la nueva medida de similitud es más robusta al ruido que la de NLM tradicional. Finalmente, se constata que al simular una corrida del nuevo NLM y del tradicional sobre la beta-galactosidasa en exactamente las mismas condiciones, el nuevo NLM encuentra mucho más vecindarios similares al de referencia en la ventana de búsqueda que el tradicional. Luego de validar la herramienta y realizar experimentos para determinar la mejor elección de parámetros del algoritmo propuesto, se comprueba que éste supera en desempeño a NLM tradicional para niveles de ruido en la estructura de entrada de desviación estándar $0.5 \leq \sigma \leq 1.5$.

Los resultados del trabajo demuestran que la aplicación de algoritmos de disminución de ruido tiene el potencial de incrementar significativamente la resolución de los modelos tridimensionales de macromoléculas obtenidos con criomicroscopía electrónica. Asimismo, se desarrolla una extensión de NLM invariante a rotaciones que supera en desempeño al NLM tradicional para esta aplicación en particular, pero que a su vez podría constituir una valiosa herramienta para mejorar la calidad de modelos tridimensionales en otras aplicaciones del procesamiento de señales.

Prefacio

La elaboración del presente trabajo surgió del profundo interés por investigar en un área en pleno desarrollo en la frontera entre la ingeniería y las ciencias de la salud. Nos entusiasmó mucho trabajar en criomicroscopía electrónica ya que esta técnica es el estado del arte en biología estructural y sus aplicaciones tienen gran trascendencia. En particular, uno de los aspectos que nos resultó más deslumbrante es que los modelos atómicos obtenidos a través de criomicroscopía electrónica permiten analizar en detalle los distintos procesos biológicos de las enfermedades. En consecuencia, la información que ofrece esta técnica es fundamental en el diseño de vacunas y fármacos.

Haber elegido un proyecto de fin de carrera puramente de investigación resultó sin dudas desafiante, más aún porque al ser un campo en transformación y relativamente nuevo, hay pocos antecedentes en los que apoyarse. Además, gran parte del proyecto se desarrolló en un contexto muy peculiar afectado por la pandemia del virus SARS-COV-2. Si bien nos adaptamos rápidamente a la virtualidad, las medidas de distanciamiento social atentaron contra la riqueza que hubiera aportado el contacto presencial entre nosotros y con los tutores.

Finalmente, otro inconveniente que tuvimos que afrontar fue los largos tiempos de ejecución de los algoritmos. Incluso disponiendo de 300 GB de RAM y paralelizando el código en 21 procesos independientes con 70 CPUs cada uno, hubo experimentos que tardaron más de cien horas en correr. Estas demoras significaron que no pudimos realizar todos los experimentos que hubiéramos querido. Para poder entregar el proyecto en la fecha estipulada priorizamos aquellos que nos parecían más importantes de acuerdo a los objetivos planteados.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	I
Resumen	III
Prefacio	V
Tabla de Contenidos	VI
1. Introducción	1
1.1. Definición del Problema y Descripción del Proyecto	1
1.2. Trabajos Relacionados	5
1.3. Descripción del Documento	6
2. Criomicroscopía Electrónica	7
2.1. Principios Fundamentales de la Criomicroscopía Electrónica	7
2.2. Medidas de Resolución en Criomicroscopía Electrónica	11
2.3. Formatos de Archivos para Almacenar Información Estructural de Macromoléculas	13
3. Breve Revisión de Algoritmos de Eliminación de Ruido	15
3.1. Non-Local Means	17
3.2. Block-Matching and 4D Filtering	18
3.3. Noise2Void	20
4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)	23
4.1. Motivación	23
4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones	25
4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones	30
5. Evaluación del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM	36
5.1. Introducción	37
5.1.1. Insumo para los Experimentos: Beta-galactosidasa	37
5.1.2. Justificación y Descripción General de los Experimentos	37
5.2. Non-Local Means	39
5.3. Block-Matching and 4D Filtering	45
5.4. Noise2Void	49
5.5. Nuevo Non-Local Means	53
5.6. Comparación entre los Algoritmos	58

Tabla de contenidos

6. Resultados Preliminares del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre Datos Reales	64
7. Observaciones Finales y Trabajo a Futuro	68
7.1. Conclusiones Generales	68
7.2. Evaluación de los Resultados Respecto a los Criterios de Éxito del Proyecto . . .	69
7.3. Dificultades y Aprendizajes	70
7.4. Trabajo a Futuro	71
Referencias	73
Índice de tablas	77
Índice de figuras	78

Capítulo 1

Introducción

Resumen

Este capítulo contiene la introducción al trabajo realizado en el proyecto. Inicia con la definición del problema donde se especifica el contexto y la motivación del mismo. Luego, se describen objetivos generales, alcance, y criterios de éxito para delimitar claramente el rumbo que se le da a la investigación. Se introducen los experimentos diseñados para abordar el problema de investigación y se mencionan algunos antecedentes en la literatura vinculados a este problema. Finalmente, se resume el contenido de los capítulos que componen la documentación.

Contenido

1.1. Definición del Problema y Descripción del Proyecto	1
1.2. Trabajos Relacionados	5
1.3. Descripción del Documento	6

1.1. Definición del Problema y Descripción del Proyecto

Las proteínas son macromoléculas biológicas presentes en todas las células del cuerpo humano. Existe una inmensa variedad de proteínas que difieren en estructura y en las distintas funciones que desempeñan en el organismo, pero todas ellas están construidas a partir del mismo conjunto de veinte subunidades estructurales básicas llamadas aminoácidos. Todos los aminoácidos comparten una estructura general similar, contienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono. Se diferencian unos de otros únicamente en sus cadenas laterales o grupos R que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica. La Figura 1.1 muestra la estructura general de un aminoácido y los veinte tipos que existen en la naturaleza.

Cada proteína se caracteriza por la forma en la que se combinan y organizan en el espacio los diferentes aminoácidos que la componen. En la mayoría de los casos las proteínas están compuestas por cientos o miles de aminoácidos, por lo que normalmente dentro de una misma proteína suelen haber múltiples copias del mismo aminoácido en distintas orientaciones. A modo de ejemplo, en la Figura 1.2a se muestra un fragmento de la secuencia de aminoácidos de una de las cadenas de la enzima beta-galactosidasa donde se destacan en verde las ocurrencias del aminoácido alanina. En la Figura 1.2b se resaltan las distintas copias de este aminoácido que aparecen en la estructura tridimensional del recorte considerado.

Capítulo 1. Introducción

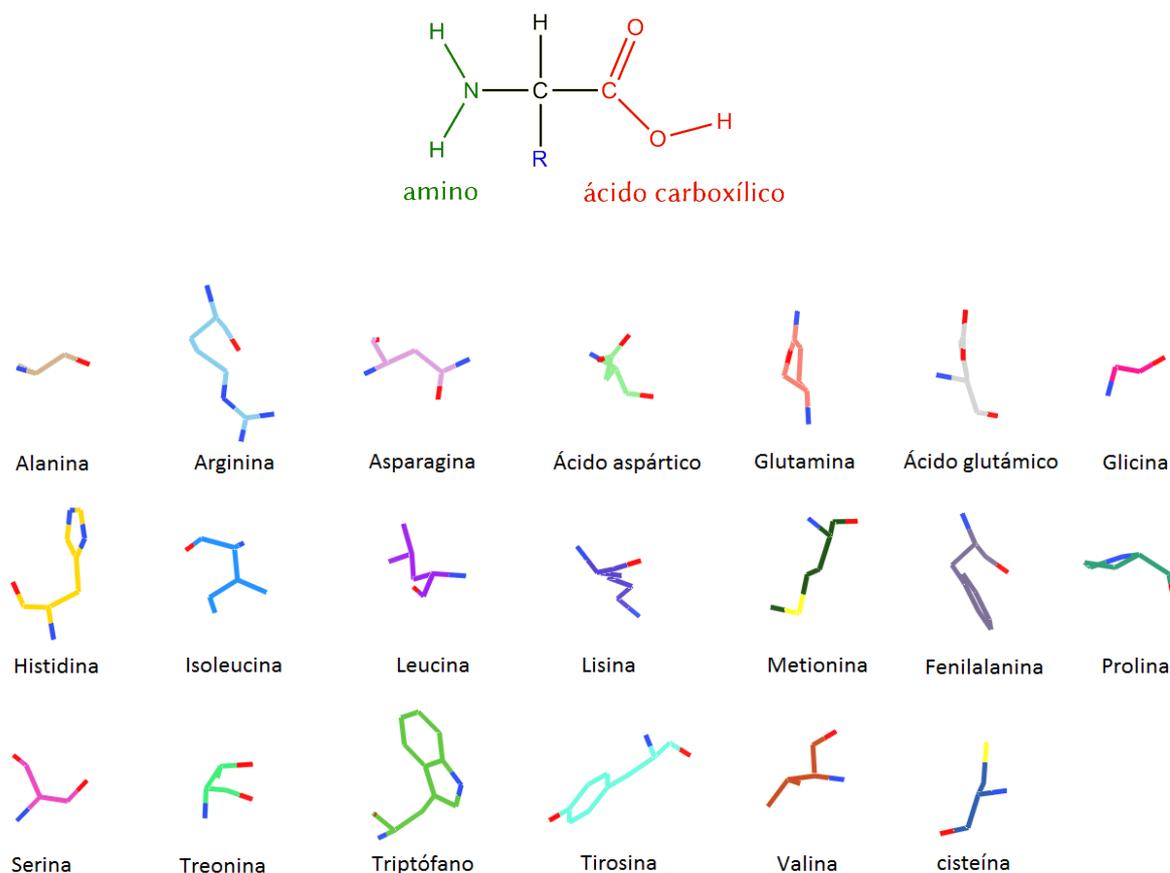


Figura 1.1: Arriba: Estructura general de un aminoácido. Abajo: Modelo atómico de los veinte tipos de aminoácidos que existen en la naturaleza.

Usualmente se definen cuatro niveles de estructura de las proteínas. La estructura primaria es la secuencia de aminoácidos. La estructura secundaria refiere a los patrones de plegamiento de los aminoácidos que se distinguen comúnmente en todas las proteínas: las alfa-hélices y las beta-láminas. La estructura terciaria describe la disposición tridimensional de la cadena completa de aminoácidos. Si la proteína está formada por más de una estructura terciaria, la estructura completa se denomina cuaternaria. Conocer la estructura de las proteínas con mayor precisión es fundamental para comprender mejor distintos procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos y mejorar el proceso de diseño de fármacos para atacar diferentes enfermedades [1].

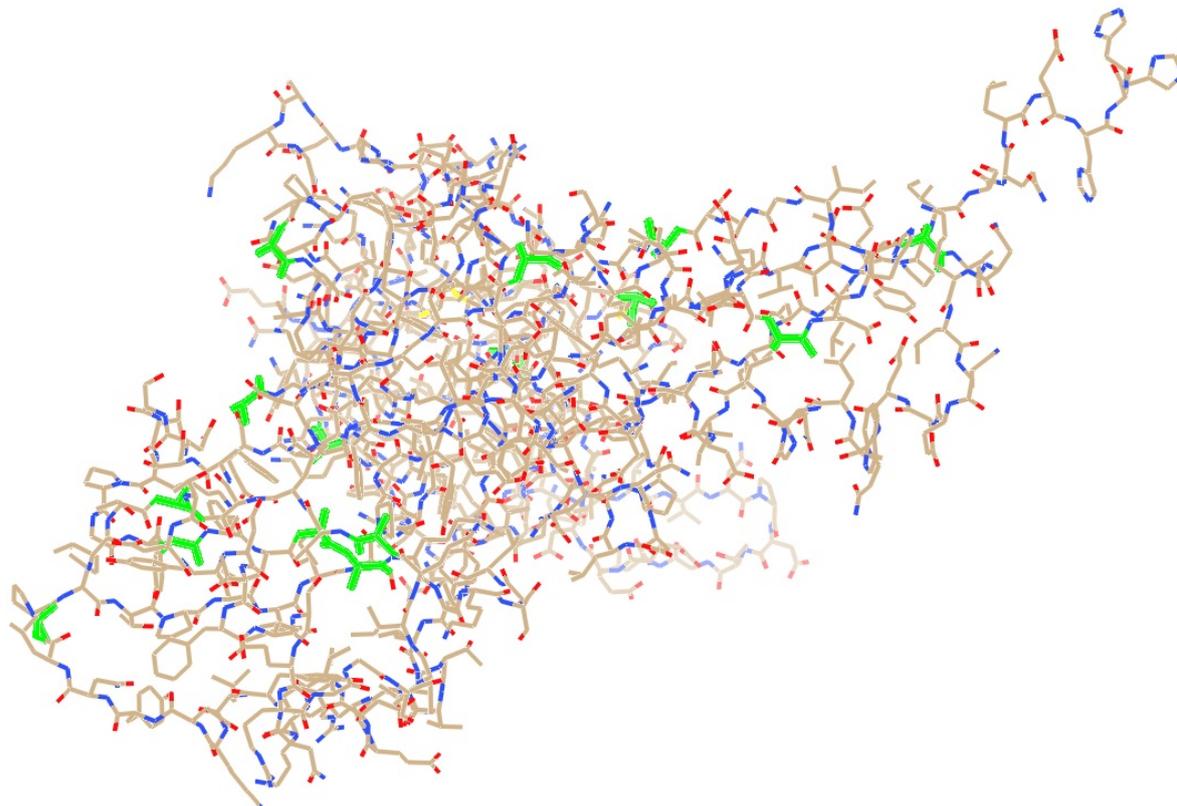
La criomicroscopía electrónica es una técnica de imagenología que permite obtener una reconstrucción tridimensional de la estructura atómica de macromoléculas a partir de cientos de miles de imágenes extremadamente ruidosas capturadas con un microscopio electrónico de transmisión. Avances técnicos en el proceso de adquisición de las imágenes y progresos en la capacidad de procesamiento de grandes volúmenes de datos han mejorado considerablemente la máxima resolución alcanzable por esta técnica, que hoy en día domina el campo de la biología estructural [2].

La mayoría de los esfuerzos por mejorar la resolución alcanzada por esta técnica se han focalizado en mejorar los métodos de clasificación y alineación de las proyecciones para optimizar el proceso de reconstrucción tridimensional. Un área poco explorada dentro de la criomicroscopía electrónica es la posibilidad de procesar y refinar la reconstrucción tridimensional para mejorar su resolución.

1.1. Definición del Problema y Descripción del Proyecto

```
chain A 334 ETQQRCVTATDYDTFVSEFRGSI IQAVQTFTDSTKPGYAFIAAKPKSGLY
chain A 384 LTTVQREDIKNYLKDYNLAPITPSIISPNYLFIKTNLKVTYALNKLQESE
chain A 434 QWLEGQIIDKIDRYTDEVEIFNSSFAKSKMLTYVDDADHSVIGSSATI Q
chain A 484 MVREVNQNFYKTPEAGIKYNNQIKDRSMESNTFSFNNGRKKVNPDTGLEED
chain A 534 VLYDVRIVSTDRDSKGIGKVIIGPFAAGDV TENENIQPYTGNDFNKLAN S
chain A 584 DGRDKYYVIGEINYPADV IYWNIAKINLTSEKFEVQTI ELYSDPTDDVIF
chain A 634 TRDGSLIVFENDLRPQYL TIDLEPISQLEHHHHHHH
```

(a) Secuencia de aminoácidos.



(b) Estructura tridimensional.

Figura 1.2: Ejemplo de redundancia en la enzima beta-galactosidasa. En verde se resaltan las múltiples ocurrencias del aminoácido alanina.

Una de las áreas fundamentales de aplicación del procesamiento de señales es la disminución de ruido en imágenes. Los algoritmos de disminución de ruido reciben como entrada una imagen degradada con ruido y la procesan con el objetivo de eliminar este ruido y restaurar la imagen real. Muchos de estos métodos se basan en aprovechar la auto-similitud de las imágenes para realizar la restauración. Asimismo, la mayoría se pueden extender a tres dimensiones para aplicarlos en problemas de disminución de ruido en volúmenes. El algoritmo *Non-Local-Means* (NLM) [3] y su sucesor *Block-Matching and 4D filtering* (BM4D) [4] se destacan entre los métodos que aprovechan la redundancia dentro de la señal para hacer disminución de ruido por promediado. Por otra parte, *Noise2Void* (N2V) [5] se distingue entre los métodos modernos que utilizan redes neuronales para aprender el modelo del ruido que afecta la señal.

En el marco descripto, el proyecto pretende evaluar el desempeño de BM4D y de N2V sobre el mapa de densidad de una macromolécula obtenido con criomicroscopía electrónica y compararlo con el desempeño de un algoritmo más tradicional como es NLM. Se espera

Capítulo 1. Introducción

que estos algoritmos aprovechen la auto-similitud presente en los modelos tridimensionales de macromoléculas y permitan una mejora significativa en su resolución.

Por otra parte, si bien existen varios algoritmos de disminución de ruido en imágenes invariantes a rotaciones [6] [7] [8], no se han encontrado en la literatura propuestas que puedan aplicarse sobre datos tridimensionales. La característica de invarianza a rotaciones resulta fundamental para el problema que se plantea en este proyecto. Como muestra la Figura 1.2b, para aprovechar completamente la redundancia en la señal es necesario contemplar que los aminoácidos que conforman las proteínas se encuentran típicamente en distintas orientaciones.

En este contexto y utilizando propiedades de las funciones esféricas, se diseña una medida de similitud invariante a rotaciones para incorporar en el algoritmo NLM. De esta forma, se propone una extensión del algoritmo que integra recursos propios y existentes capaz de identificar como similares estructuras que contienen prácticamente la misma señal pero que se encuentran en distintas orientaciones, logrando así recoger más información para realizar la restauración. Esto es importante dado que, como establece la ley de varianza, si el ruido es independiente y se promedian N volúmenes con el mismo contenido de señal, la varianza del ruido se reduce en \sqrt{N} . Esto implica que cuanto más estructuras similares se promedian, más se reduce el ruido que degrada la señal. De igual forma, el número N de estructuras similares que contiene el volumen, impone un límite teórico en la cantidad de ruido que se puede eliminar. El algoritmo propuesto supera en desempeño al NLM tradicional para niveles de ruido en la estructura de entrada de desviación estándar $0.5 \leq \sigma \leq 1.5$, donde el rango de la señal es aproximadamente $[0, 3.3]$.

Este trabajo apunta a desarrollar una herramienta innovadora que constituya un aporte en pos del avance y perfeccionamiento de una técnica con inmensurable potencial.

Objetivos

El objetivo general del proyecto consiste en estudiar, analizar y aplicar algoritmos de disminución de ruido que aprovechen la redundancia presente en los modelos tridimensionales de macromoléculas obtenidos con criomicroscopía electrónica para mejorar su resolución.

Alcance

1. Se estudian los fundamentos de la criomicroscopía electrónica, desde la técnica de adquisición de las imágenes hasta la reconstrucción tridimensional de la estructura molecular, analizando las diferentes etapas de procesamiento que involucra. Se selecciona un modelo tridimensional de una macromolécula y una medida de resolución para realizar los experimentos.
2. Se evalúa y compara el desempeño de los algoritmos NLM, BM4D y N2V sobre el mapa de densidad ruidoso de la macromolécula seleccionada.
3. Se estudia la teoría de armónicos esféricos y su aplicación al problema de alineación de volúmenes. Se explora la posibilidad de utilizar estas ideas para proponer una extensión de NLM invariante a rotaciones.

Criterios de Éxito

Relacionado con los **Alcances** – ítem 1:

1. Haber incursionado en un tema actual, de alta relevancia y con inmenso potencial de desarrollo abordando un problema abierto.

Relacionado con los **Alcances** – ítem 2:

2. Haber determinado una elección de parámetros óptima para los algoritmos que resulte en una mejora de la resolución de la estructura de entrada de al menos 10 %.

Relacionado con los **Alcances** – ítem 3:

3. Haber diseñado una medida de similitud entre vecindarios del volumen que sea invariante a rotaciones.
4. Haber incorporado esta medida en el algoritmo NLM y haber logrado una mejora de la resolución de la estructura de entrada de al menos 10 %.

1.2. Trabajos Relacionados

Existen fundamentalmente dos enfoques para mejorar la resolución del modelo tridimensional de una macromolécula obtenido con criomicroscopía electrónica: trabajar a nivel de las proyecciones 2D capturadas con el microscopio electrónico de transmisión, o trabajar a nivel del modelo 3D generado a partir del proceso de reconstrucción.

A continuación se describen brevemente algunos antecedentes en la literatura que buscan mejorar la resolución del modelo tridimensional de una macromolécula, tomando como insumo el propio modelo 3D.

Por un lado, existe una familia de métodos basados en realizar un filtrado local a los modelos 3D con el fin de mejorar sus zonas más ruidosas. Los modelos 3D de macromoléculas obtenidos con criomicroscopía electrónica en general no tienen una resolución homogénea, sino que existen zonas que se reconstruyen con menor resolución que otras. *SIDESPLITTER* [9], *LocalDeblur* [10] y *LocScale* [11] son algunos ejemplos de herramientas para perfeccionar el modelo tridimensional de la estructura que se enfocan en la estimación de la resolución local del modelo y la aplicación de un filtrado local sobre las regiones de menor resolución. Estos trabajos sugieren que se puede mejorar la interpretación de la estructura y en algunos casos aumentar su resolución global, si se logra disminuir el ruido que afecta localmente las distintas zonas de la reconstrucción.

Por otro lado, el paquete de software M [12] implementa un método de filtrado del modelo 3D usando aprendizaje profundo con la red de convolución *Noise2Noise*. Esta es capaz de eliminar ruido al intentar aprender el mapeo entre dos o más observaciones ruidosas independientes con el mismo contenido de señal. Al enfrentarse a esta tarea imposible, la red aprende la observación “promedio”, eliminando así el ruido. En criomicroscopía electrónica, es usual dividir el total de proyecciones adquiridas en dos subconjuntos que permiten generar dos medios mapas 3D independientes de la macromolécula. Luego, una forma de estimar la resolución del modelo es evaluando qué tan parecidas son las transformadas de Fourier 3D de ambos mapas a distintas frecuencias espaciales. En M, se aplica *Noise2Noise* sobre estos dos medios mapas, que, en definitiva, son dos observaciones ruidosas independientes que contienen la misma señal. Mediante la aplicación de este método se logra un filtrado local suave y libre de artefactos, que permite disminuir el ruido que afecta localmente las distintas regiones del modelo, mejorando su resolución.

Los referidos trabajos son antecedentes que inspiraron la idea de aplicar algoritmos de disminución de ruido sobre el modelo 3D de la macromolécula con el objetivo de mejorar su resolución. En este proyecto, en lugar de refinar los dos medios mapas construidos a partir de la mitad del conjunto de proyecciones como en el software M (que no siempre están disponibles), se busca disminuir el ruido directamente sobre la reconstrucción tridimensional completa.

Capítulo 1. Introducción

En [13] se aborda el problema de clasificación y alineación de volúmenes obtenidos con tomografía de electrones (tomogramas). La tomografía de electrones es uno de los métodos para adquirir modelos 3D de distintos especímenes, usualmente *in vivo*, en criomicroscopía electrónica. Para resolver la alineación de los tomogramas, se basa en el trabajo de Kovacs y Wriggers [14], donde se propone un método abismalmente más eficiente que la búsqueda exhaustiva para hallar la rotación en ángulos de Euler que, aplicada a uno de los volúmenes, resulta en la máxima correlación entre ellos. Esto se logra proyectando la transformada de Fourier de los volúmenes a alinear sobre esferas y utilizando el teorema de convolución de armónicos esféricos. La medida de similitud invariante a rotaciones desarrollada en este proyecto e incorporada en NLM, se basa fuertemente en las ideas planteadas en estos trabajos. No obstante, en este proyecto el contexto es mucho más desafiante ya que se busca alinear aminoácidos, cuyo tamaño es varios órdenes de magnitud menor que el de los tomogramas obtenidos con tomografía de electrones.

1.3. Descripción del Documento

La presente documentación está organizada de la siguiente forma:

El **capítulo 1** corresponde a la introducción. En este capítulo se presenta la definición del problema y se explica el contexto y la motivación del proyecto. Asimismo, se mencionan antecedentes en la literatura del trabajo propuesto y se describen los objetivos generales, alcance y criterios de éxito del proyecto.

Los **capítulos 2 y 3** constituyen el marco teórico. Allí se definen los conceptos esenciales para comprender el problema de investigación y los experimentos desarrollados. Se presentan los principios fundamentales de la criomicroscopía electrónica, la medida de resolución para determinar la calidad de los modelos tridimensionales obtenidos con esta técnica y los tipos de archivos frecuentemente empleados para almacenar información estructural de macromoléculas. Asimismo, se introducen algunas de las familias de técnicas de eliminación de ruido más representativas del campo de procesamiento de señales, haciendo énfasis en los tres algoritmos que se evalúan en el proyecto: *Non-Local Means* (NLM), *Block-Matching and 4D Filtering* (BM4D) y *Noise2Void* (N2V).

En el **capítulo 4** se propone y valida una medida de similitud invariante a rotaciones para incorporar en el algoritmo NLM de forma de aprovechar mejor la redundancia en la estructura de las macromoléculas.

En el **capítulo 5** se evalúa y compara el desempeño de NLM, BM4D, N2V y NLM invariante a rotaciones sobre el mapa de densidad ruidoso de una macromolécula obtenida con criomicroscopía electrónica, en un caso controlado donde se conoce la estadística del ruido que degrada la señal.

En el **capítulo 6** se presentan resultados preliminares del desempeño de NLM, BM4D, N2V y NLM invariante a rotaciones sobre el mapa de densidad real de una macromolécula descargado del *Electron Microscopy Data Bank*.

Finalmente, en el **capítulo 7** se exponen las conclusiones y reflexiones finales respecto al desarrollo del proyecto. Se realiza un análisis de los resultados obtenidos en relación a los criterios de éxito y se presentan líneas de investigación a futuro.

Capítulo 2

Criomicroscopía Electrónica

Resumen

Este capítulo inicia describiendo los principios fundamentales de la criomicroscopía electrónica. Se realiza una comparación con otras técnicas de imagenología, resaltando las principales ventajas que ofrece la criomicroscopía electrónica. Se describen las distintas etapas de procesamiento en el análisis de partículas individuales. Se realiza una breve reseña histórica de la evolución de esta técnica y de los distintos avances que han impulsado su crecimiento exponencial en los últimos años.

Luego, se introducen las medidas de resolución utilizadas en criomicroscopía electrónica, profundizando sobre la *Fourier Shell Correlation*, que es la medida empleada en este proyecto para estimar la calidad de la reconstrucción tridimensional de macromoléculas. Se presenta su formulación matemática y se explica cómo interpretar las curvas típicas.

Finalmente, se describen los tipos de archivos MRC y PDB que se utilizan como insumo para el proyecto. Se detalla la información que contiene cada uno de estos formatos y se explica cómo se generan a partir de ellos los datos artificiales con los que se validan los algoritmos de eliminación de ruido en el capítulo 5.

Contenido

2.1. Principios Fundamentales de la Criomicroscopía Electrónica	7
2.2. Medidas de Resolución en Criomicroscopía Electrónica . .	11
2.3. Formatos de Archivos para Almacenar Información Estructural de Macromoléculas	13

2.1. Principios Fundamentales de la Criomicroscopía Electrónica

La biología estructural se centra en el estudio de la estructura y dinámica de las macromoléculas con el objetivo de comprender mejor los procesos biológicos inherentes a la vida, los mecanismos básicos de las enfermedades y contribuir al desarrollo de fármacos. Dado que la función que cumplen las macromoléculas en el organismo y su interacción con otros componentes biológicos están íntimamente vinculadas con su conformación tridimensional, resulta de alta relevancia científica conocer con gran precisión dicha estructura [15].

En el campo de la biología estructural, existen esencialmente tres técnicas de imagenología que permiten analizar estructuras biológicas: la cristalografía de rayos X, la resonancia magnéti-

Capítulo 2. Criomicroscopía Electrónica

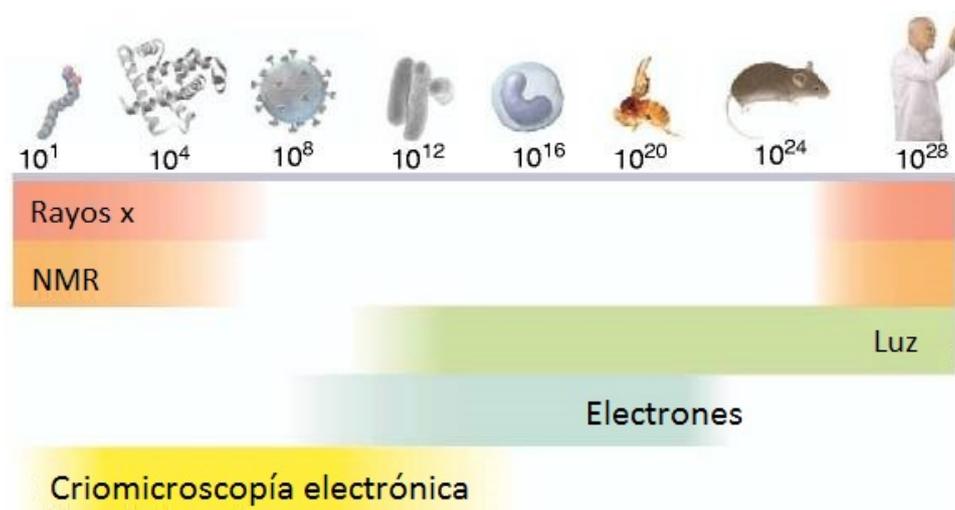


Figura 2.1: Espectro de aplicación de distintas técnicas de imagenología según el tamaño en Daltons del espécimen a analizar. La microscopía de electrones de alta resolución cubre una brecha existente entre la resolución alcanzada por la cristalografía de rayos X y la microscopía de luz. Imagen adaptada de [17].

ca nuclear y la microscopía (de luz o de electrones). La elección de la técnica a utilizar depende en gran medida del tamaño en Daltons (Da) del espécimen que se quiere estudiar. El Dalton es la unidad estándar para expresar masas atómicas y moleculares ($1 \text{ Da} \approx 1.66 \times 10^{-27} \text{ kg}$ [16]). Como muestra la Figura 2.1, estas técnicas cubren casi todo el espectro de masas atómicas. Las estructuras menores a 10^5 Da o mayores a 10^{25} Da se estudian típicamente con rayos X o resonancia magnética, las estructuras mayores a 10^{12} Da con microscopía de luz y las estructuras entre 10^8 Da y 10^{22} Da con microscopía de electrones. No obstante, para adquirir información estructural de macromoléculas cuya masa atómica ronda los 10^8 Da (caso de una gran variedad de complejos moleculares y virus), existe una zona gris donde ninguna de las técnicas se desempeña bien. Es en este nicho donde surge la criomicroscopía electrónica [17].

La criomicroscopía electrónica permite obtener reconstrucciones tridimensionales de macromoléculas con alta resolución. Presenta varias ventajas en comparación con las demás técnicas. En primer lugar, permite conocer la estructura tridimensional de macromoléculas en un rango de masas atómicas que anteriormente no se conocía. A diferencia de la microscopía de luz, cuya resolución ha estado tradicionalmente limitada por la longitud de onda de la luz, la microscopía electrónica puede alcanzar resoluciones atómicas debido a que la longitud de onda de los electrones, al ser varios órdenes de magnitud menor, no impone en este caso una restricción significativa. En comparación con la cristalografía de rayos X, técnica prevalente en la biología estructural durante los últimos 50 años, la criomicroscopía electrónica no requiere tener la muestra cristalizada, proceso muy engorroso e incluso imposible de realizar en algunos casos. Finalmente, en criomicroscopía electrónica no se necesita disponer de una gran cantidad de muestra ni hacer un enriquecimiento isotrópico como en la técnica de resonancia magnética nuclear [2].

Como contrapartida, la criomicroscopía electrónica es una técnica invasiva que degrada la muestra. Para no deformar la estructura a analizar, la dosis de electrones de alta energía con la que se irradia la muestra debe ser limitada, lo que se traduce en que las imágenes obtenidas tienen un contraste y una relación señal a ruido (SNR, por sus siglas en inglés) muy baja. Partiendo de la base de que la deformación en la muestra es proporcional a la temperatura, en criomicroscopía electrónica se congela la muestra a temperaturas criogénicas ($-150 \text{ }^\circ\text{C}$ a $-273 \text{ }^\circ\text{C}$) para mitigar los daños al espécimen.

2.1. Principios Fundamentales de la Criomicroscopía Electrónica

Existen tres enfoques dentro de esta técnica: el análisis de partículas individuales, la tomografía de electrones y la cristalografía de electrones. Si bien las tres variantes comparten los mismos principios básicos, se diferencian en la forma de adquirir y procesar las imágenes y en las aplicaciones en las que se emplean. Este proyecto hace hincapié en el análisis de partículas individuales (SPA, por sus siglas en inglés), que es el enfoque más ampliamente utilizado dentro de la criomicroscopía electrónica.

El SPA, como su nombre lo indica, se utiliza principalmente para estudiar macromoléculas y complejos moleculares cuyas estructuras e interacciones dinámicas pueden analizarse de forma aislada *in vitro*. Este método presenta múltiples ventajas. Por un lado, no requiere cristalización ni grandes cantidades de la muestra, lo cual permite aislar la partícula de interés en estado fisiológico. Además, las muestras pueden ser parcialmente heterogéneas, es decir, contener ejemplares de la misma partícula en distintos estados de conformación. Si esto ocurre, durante el proceso de reconstrucción se pueden generar distintos modelos de la partícula en cada uno de estos estados de conformación. Asimismo, el SPA es relativamente rápido ya que muchos pasos dentro del proceso se pueden automatizar [18].

La Figura 2.2 muestra un diagrama del proceso de SPA. Comienza con la preparación de la muestra, que consiste en aislar varios ejemplares de la partícula de interés y realizar una congelación rápida a temperaturas criogénicas de forma que el espécimen hidratado quede embebido en un hielo amorfo preservando sus características nativas. La ubicación y orientación de las partículas dentro del hielo son aleatorias y desconocidas. Luego, se introduce el espécimen en el microscopio electrónico donde se irradia con un haz de electrones y se capturan imágenes de la muestra. La señal obtenida en el detector consiste en múltiples proyecciones en 2D (micrógrafos) extremadamente ruidosas de la muestra. A continuación, se identifican y seccionan las partículas de interés en los micrógrafos, de forma de obtener un numeroso conjunto de imágenes de proyecciones de partículas individuales en distintas orientaciones. Posteriormente, se clasifican dichas imágenes en distintos grupos según el estado de conformación de la partícula y la vista desde la cual fue tomada la proyección, y se descartan las imágenes de partículas muy degradadas por la radiación. El siguiente paso consiste en alinear todas las imágenes pertenecientes a una misma clase y promediarlas para obtener una imagen promedio que represente cada clase. Dicho promedio tiene una SNR mucho mayor que las proyecciones individuales. Una vez que se tienen los promedios de clase, comienza la etapa de reconstrucción tridimensional de la estructura. Se identifican los parámetros de orientación y traslación de cada proyección a través de un algoritmo iterativo de maximización de la esperanza alternando etapas de reconstrucción y refinamiento. En la primera iteración se utiliza un modelo inicial para calcular la orientación y traslación de cada proyección. Luego, a partir de las proyecciones y los parámetros de alineación recién calculados se realiza una reconstrucción tridimensional de la estructura. Esta estructura tridimensional se utiliza como modelo de referencia para refinar los parámetros de alineación asignados a cada proyección en la siguiente iteración. Los nuevos parámetros son los que minimizan una función de costo que compara la proyección del modelo de referencia en esos ángulos con la imagen obtenida en el microscopio. Este bucle reconstrucción-refinamiento, que constituye un esquema de Expectation-Maximization, se repite hasta obtener un modelo tridimensional certero, a partir del cual se pueda derivar un modelo atómico de la macromolécula [19].

Los modelos tridimensionales que se obtienen mediante SPA tienen ruido, que proviene principalmente de los siguientes factores: 1) dispersión de los electrones al impactar contra el hielo en el que está embebida la muestra, 2) movimiento de la muestra ocasionado por el haz de electrones durante el proceso de adquisición, 3) errores en la alineación de las proyecciones y 4) errores introducidos por la discretización de las orientaciones de las proyecciones. [22]. No es sencillo derivar un modelo estadístico de este ruido, por lo que en el presente trabajo se simula el ruido asumiendo un modelo gaussiano de media nula.

Capítulo 2. Criomicroscopía Electrónica

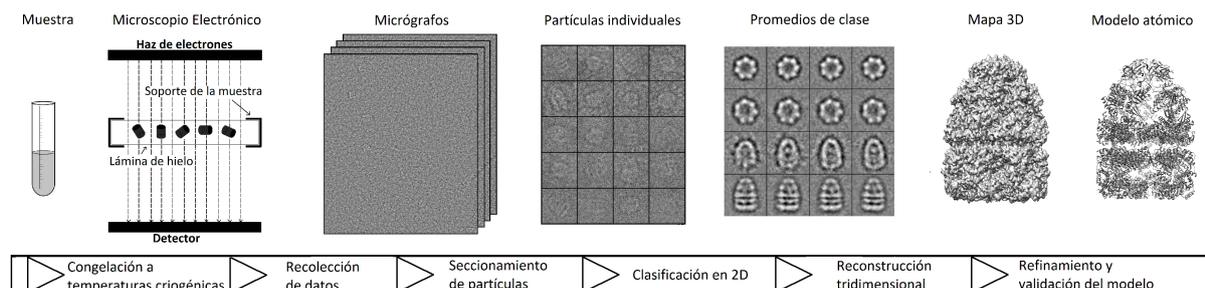


Figura 2.2: Diagrama del proceso de SPA. Se coloca la muestra congelada a temperaturas criogénicas en un microscopio electrónico y se capturan múltiples proyecciones en 2D (micrógrafos). Se identifican, clasifican y alinean las proyecciones de las partículas para obtener promedios de clases con mayor SNR. Se realiza la reconstrucción tridimensional a través de un algoritmo de maximización de la esperanza y con esa información se estima un modelo atómico de la macromolécula. Imagen creada a partir de [20] y [21].

Asimismo, la técnica de SPA tiene algunas limitaciones. Por un lado, la degradación de la muestra por la radiación impone un límite en la resolución del modelo tridimensional. Para compensar la baja dosis de radiación, es necesario tomar muchas imágenes con bajo SNR y promediarlas. No obstante, los resultados del promediado dependen directamente de la calidad de la alineación. Si hay errores en la alineación, el promediado resultará en imágenes borrosas y por lo tanto en una baja resolución de la reconstrucción. Otro factor determinante es la cantidad de proyecciones a partir de las cuales se realiza la reconstrucción. Si no hay proyecciones de la partícula en la suficiente cantidad de ángulos, la resolución final será anisotrópica [18].

Finalmente, SPA presenta grandes desafíos computacionales. Por un lado, se tiene como insumo imágenes extremadamente ruidosas, siendo en general el ruido significativamente más grande que la señal. Además, se necesita un espacio muy amplio de almacenamiento para poder guardar la inmensa cantidad de imágenes que se requieren para obtener la reconstrucción tridimensional (aproximadamente 12 TB de almacenamiento para una sola proteína [23]). Finalmente, es indispensable contar con gran capacidad de procesamiento para realizar la segmentación, clasificación y alineación de cientos de miles o incluso millones de proyecciones de partículas. Todo el proceso de obtención de la estructura tridimensional a partir de las proyecciones se puede pensar intuitivamente como un proceso de compresión de datos. Se parte, por ejemplo, de 12 TB de datos que contienen una gran cantidad de información irrelevante, y a través de distintas etapas de procesamiento se logra reducir 100.000 veces el tamaño de los datos para obtener una única estructura tridimensional de apenas 100 MB que contiene el mapa de densidad electrónica de la molécula.

En este proyecto, se propone aplicar algoritmos de disminución de ruido por promediado sobre el modelo tridimensional de una macromolécula. La idea central es análoga al promediado de clases que se realiza en el proceso de SPA pero llevada al caso tridimensional, donde promediar subestructuras similares resulta en una mejora del SNR del modelo. También en forma análoga al proceso de SPA, se pueden obtener resultados significativamente superiores en la restauración si las subestructuras promediadas están correctamente alineadas.

Si bien la criomicroscopía electrónica surgió en 1974 a partir de los trabajos de Taylor y Glaeser, es apenas hace unos 10 años que la técnica ha cobrado relevancia gracias a los avances técnicos en el proceso de captación de las imágenes y a los progresos en la capacidad de adquisición, almacenamiento y procesamiento de inmensas cantidades de datos [2]. Más específicamente, uno de los elementos determinantes en el crecimiento vertiginoso de la criomicroscopía electrónica fue la introducción en 2013 de los detectores directos de electrones (DEDs, por sus siglas en inglés), que aumentaron abismalmente la calidad y el SNR de las imágenes obtenidas

2.2. Medidas de Resolución en Criomicroscopía Electrónica

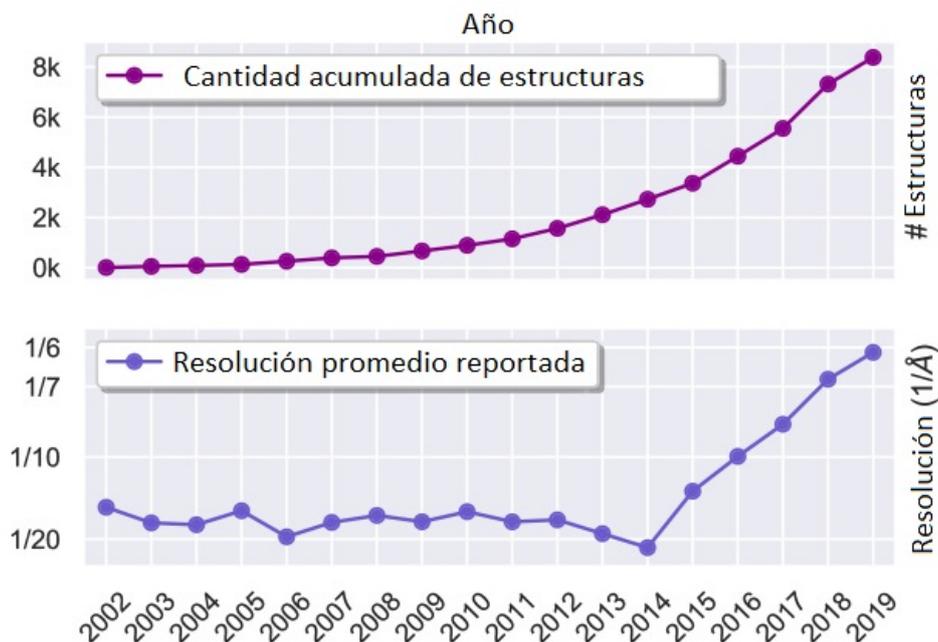


Figura 2.3: Cantidad y resolución promedio de estructuras que se determinaron por año con la técnica de criomicroscopía electrónica en el período 2002-2019. Imagen adaptada de [15].

y consecuentemente mejoraron la máxima resolución alcanzable por esta técnica. Generaciones anteriores de detectores transformaban los electrones en fotones para poder registrar las imágenes introduciendo en este proceso una gran cantidad de ruido, mientras que los DEDs se destacan por detectar directamente los electrones. Adicionalmente, permiten registrar múltiples cuadros por micrografía y obtener una película sin necesidad de aumentar la cantidad de radiación de la muestra. En forma coordinada con la aparición de los DEDs, avances en el procesamiento de imágenes han permitido contemplar la diversidad de conformaciones que puede presentar una misma macromolécula y corregir el movimiento de la muestra ocasionado por el haz de electrones durante el proceso de adquisición, reduciendo así el ruido asociado a estos dos factores. Gracias a estos avances, en los últimos años la criomicroscopía electrónica ha tenido un desarrollo exponencial que la ha posicionado hoy en día como una de las técnicas más prometedoras para el estudio de la estructura tridimensional de macromoléculas [15]. La Figura 2.3 muestra la cantidad y la resolución promedio de estructuras que se determinaron por año con esta técnica en el período 2002-2019 [15]. Cabe resaltar que un valor más pequeño de resolución indica una mejor resolución. Actualmente, la criomicroscopía electrónica se utiliza frecuentemente para abordar problemas novedosos y desafiantes, como la caracterización de la proteína S presente en la envoltura del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 y del receptor ACE2 presente en la membrana de las células humanas al que se une la proteína S durante el proceso de infección del virus. Conocer la estructura de estos dos compuestos y su interacción es clave para el desarrollo de fármacos para combatir el COVID-19 [24] [25].

2.2. Medidas de Resolución en Criomicroscopía Electrónica

La determinación de la resolución de las reconstrucciones tridimensionales de macromoléculas obtenidas con criomicroscopía electrónica es fundamental para la correcta interpretación del modelo y para tener una noción de la calidad de los resultados alcanzados.

Capítulo 2. Criomicroscopía Electrónica

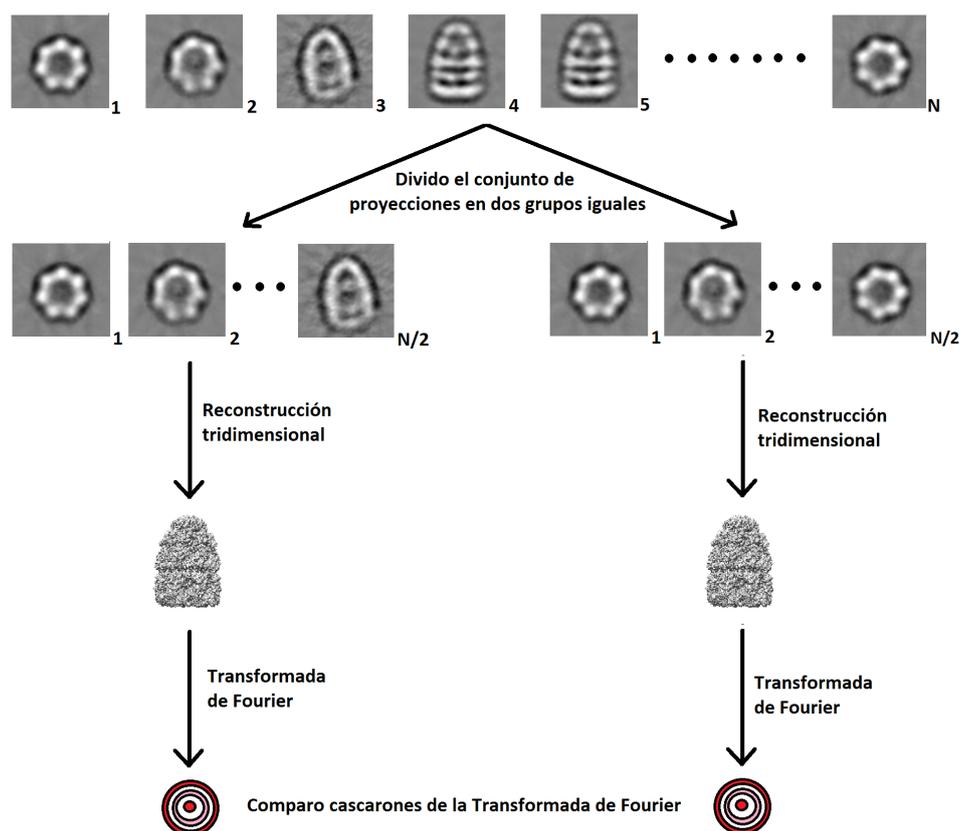


Figura 2.4: Diagrama del procedimiento para calcular la FSC de un modelo. Se separa el conjunto de proyecciones en dos grupos iguales, se generan dos reconstrucciones independientes a partir de cada uno de los subconjuntos y se calcula la correlación entre las transformadas de Fourier de las dos reconstrucciones sobre cascarones de igual frecuencia espacial.

A grandes rasgos, la resolución indica qué grado de detalle presenta la estructura tridimensional. En algunos casos en los que el modelo tiene una resolución casi atómica, una forma de validar los resultados obtenidos y estimar cualitativamente la resolución alcanzada es observar si se pueden identificar ciertos elementos en la estructura secundaria de la proteína. Por ejemplo, a resolución 9 Å se pueden distinguir las alfa-hélices, a resolución 4.8 Å las beta-láminas y a resolución 3.5 Å algunas cadenas laterales de aminoácidos [26]. No obstante, esta estimación es imprecisa y por lo tanto es necesario utilizar otras métricas para evaluar la calidad de los resultados. Entre las medidas estadísticas más representativas para determinar la resolución de los modelos se encuentran el Q-Factor, la relación señal a ruido espectral (SSNR, por sus siglas en inglés), la *Differential Phase Residual* (DPR) y la *Fourier Shell Correlation* (FSC). En este capítulo se hace hincapié en esta última, que es la más frecuentemente utilizada en el campo de la criomicroscopía electrónica [27].

La FSC evalúa la auto-consistencia de los resultados en el espacio de Fourier. Para ello se separa el conjunto de las proyecciones en dos grupos iguales y se generan dos reconstrucciones tridimensionales independientes a partir de cada uno de los subconjuntos. Intuitivamente, la resolución del modelo se estima evaluando qué tan parecidas son las transformadas de Fourier tridimensionales de ambos mapas a distintas frecuencias espaciales. La Figura 2.4 muestra un diagrama del procedimiento para calcular la FSC de un modelo.

Sean \mathcal{F}_1 y \mathcal{F}_2 las transformadas de Fourier de las reconstrucciones tridimensionales independientes obtenidas a partir de cada subconjunto de proyecciones, la FSC se define para un

2.3. Formatos de Archivos para Almacenar Información Estructural de Macromoléculas

cascarón de frecuencias $S_{f,\delta} = \{p : p \in \mathbb{R}^3, f - \delta < |p| < f + \delta\}$ como:

$$FSC(f, \delta) = \frac{\text{Re}(\sum_{|k| \in S_{f,\delta}} \mathcal{F}_1(k) \mathcal{F}_2^*(k))}{\sqrt{\sum_{|k| \in S_{f,\delta}} |\mathcal{F}_1(k)|^2 \sum_{|k| \in S_{f,\delta}} |\mathcal{F}_2(k)|^2}}$$

En la práctica se fija el valor de δ y se trabaja con la FSC como una función solamente de la frecuencia asociada al cascarón. La curva de FSC es una función $f(x)$ donde la variable independiente x corresponde al módulo de la frecuencia espacial y la variable dependiente $f(x)$ a la correlación entre las transformadas de Fourier de las dos reconstrucciones tridimensionales sobre cascarones de igual frecuencia espacial. Esta curva típicamente comienza en uno para frecuencias espaciales bajas y luego decrece gradualmente a cero para frecuencias espaciales más altas. Una medida de FSC cercana a uno para una determinada frecuencia espacial indica que los detalles del modelo tridimensional a esa resolución son confiables [27].

La medida de FSC también puede usarse para comparar dos volúmenes distintos. Una curva de FSC cercana a uno para todas las frecuencias espaciales implica una gran similitud entre los volúmenes comparados, mientras que una curva de FSC cercana a cero indica que los volúmenes presentan grandes diferencias.

En la practica muchas veces resulta conveniente tener un único valor de resolución que corresponda a la máxima frecuencia espacial para la cual la información del modelo se pueda considerar confiable. En la literatura se presentan varios criterios diferentes para determinar este umbral. El más simple de todos es estimar la resolución del modelo como el inverso de la frecuencia espacial para la cual $FSC = 0$, es decir, cuando ya no hay señal en los resultados. Otros criterios empíricos frecuentemente utilizados consideran como valor de corte $FSC = 0.143$ o $FSC = 0.5$, siendo este último con el que se alcanzan resultados más consistentes en la práctica [28]. La Figura 2.5 muestra un ejemplo de una curva de FSC típica, donde se muestran los umbrales de corte $FSC = 0.143$ y $FSC = 0.5$ para estimar de la resolución. La integral bajo la curva de FSC también puede emplearse como indicador de la resolución de la estructura. Un valor de integral bajo la curva de FSC más alto significa que la resolución del volumen es mayor, puesto que implica que la curva de FSC toma valores más grandes para un mayor rango de frecuencias. En el presente trabajo se utiliza la implementación de *EMAN2* [29] para calcular todas las FSC.

2.3. Formatos de Archivos para Almacenar Información Estructural de Macromoléculas

En este proyecto se trabaja con estructuras tridimensionales de macromoléculas a distintas resoluciones seleccionadas de la base de datos *Protein Data Bank* [31]. Esta base de datos reúne información estructural de proteínas, ácidos nucleicos y complejos moleculares obtenida a través de distintas técnicas de imagenología y aportada por científicos de todo el mundo. En particular en este proyecto se trabaja con dos formatos de archivos: MRC y PDB.

El formato MRC desarrollado por el *Medical Research Council* (MRC) *Laboratory of Molecular Biology* [32] es el estándar para representar los resultados de la técnica de criomicroscopía electrónica y tomografía electrónica. Los archivos MRC contienen un mapa aproximado de la distribución de densidad electrónica de la macromolécula. Más concretamente, consisten en un arreglo tridimensional de vóxeles donde cada vóxel almacena el correspondiente valor de densidad electrónica. Además, en el encabezado de cada archivo MRC se especifica qué tamaño tiene cada vóxel en la realidad (v_s) y en qué lugar del espacio se ubica el origen de coordenadas del arreglo (*origin*). El tamaño del arreglo que almacena el mapa de densidad depende directamente

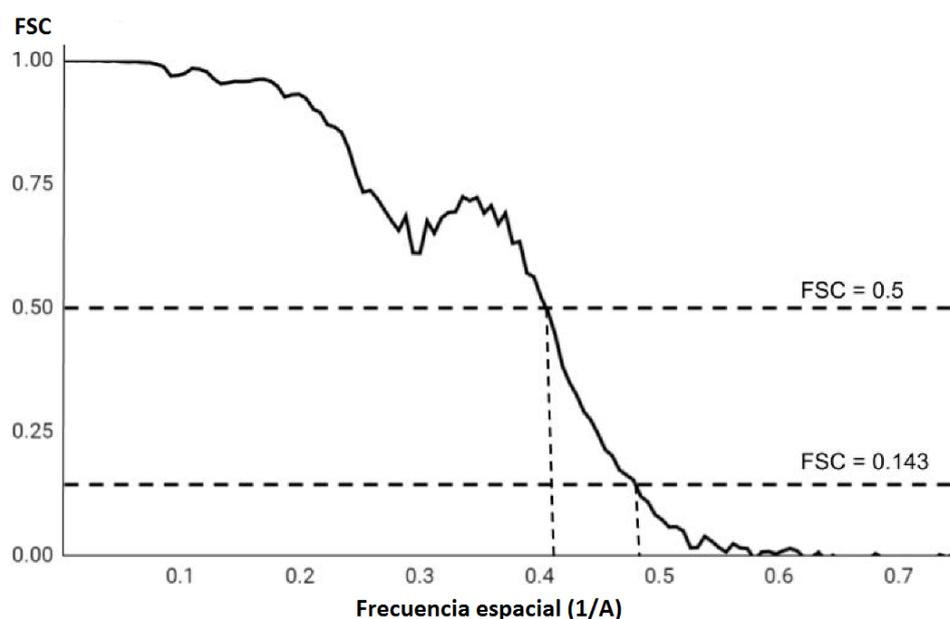


Figura 2.5: Ejemplo de una curva de FSC típica. Comienza en uno para frecuencias espaciales bajas y luego decrece gradualmente a cero para frecuencias espaciales más altas. Se indican los umbrales de corte $FSC = 0.143$ y $FSC = 0.5$ para estimar de la resolución. Imagen adaptada de [30].

de v_s . Por ejemplo, si se disminuye v_s a la mitad, se necesita un arreglo del doble de tamaño para representar la partícula. Además, como el mapa de densidad es una función continua que se representa en el MRC de forma discreta, debe cumplirse el Teorema de Nyquist-Shannon y por lo tanto la frecuencia de muestreo debe ser al menos el doble de la frecuencia máxima de la señal. Dicho de otra forma, v_s debe ser menor a un medio de la resolución de la partícula. Para visualizar los MRC, en este proyecto se utiliza el software *Chimera* [33]. Este software permite regular el umbral de visualización. Si se fija el umbral en un valor u , el programa muestra todos los vóxeles cuya densidad electrónica es mayor a u . En las siguientes secciones se incluyen figuras que muestran isosuperficies de distintos MRC, donde el umbral de visualización se elige en cada caso de forma cualitativa, cuidando que se logre apreciar tanto la señal como el nivel de ruido que la degrada. Cuando se hacen comparaciones entre varios volúmenes, todos se muestran con el mismo umbral. Además, para que los resultados sean reproducibles, se aclara siempre el umbral seleccionado.

El formato *Protein Data Bank* (PDB) [34] permite representar de forma estandarizada el modelo químico de la estructura de macromoléculas obtenido a través de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica. Los archivos PDB almacenan las coordenadas de cada átomo de la macromolécula. A partir de esa información, se puede obtener la ubicación y orientación de cada aminoácido que la compone. Además de coordenadas, cada archivo también contiene información adicional como la estructura primaria, secundaria y terciaria de la macromolécula, los ligandos, datos sobre el proceso de recolección de datos y referencias bibliográficas.

En este proyecto en lugar de trabajar con los MRC resultantes de la técnica de criomicroscopía electrónica, se generan archivos MRC artificiales a distintas resoluciones a partir del modelo químico conocido. Luego, se les añade ruido gaussiano con distintos valores de desviación estándar para simular el mapa de densidad real que se obtiene típicamente con criomicroscopía electrónica. De esta forma se trabaja en condiciones controladas donde se conoce el nivel de ruido que afecta la señal y se pueden explorar distintas técnicas para eliminarlo.

Capítulo 3

Breve Revisión de Algoritmos de Eliminación de Ruido

Resumen

Este capítulo inicia con una introducción general a diferentes técnicas de eliminación de ruido. En particular se presentan métodos aplicables a imágenes y volúmenes que aprovechan la auto-similitud de la señal, describiendo los tres algoritmos de eliminación de ruido con los que se trabaja en este proyecto: *Non-Local Means*, *Block-Matching and 4D Filtering* y *Noise2Void*. También se mencionan las implementaciones con las que se realizan los experimentos en los capítulos 4 y 5 y los principales parámetros que se pueden ajustar en cada una de ellas. Para facilitar la comprensión, la descripción de los algoritmos se realiza para imágenes, pero en todos los casos la extensión a volúmenes es inmediata.

Contenido

3.1. Non-Local Means	17
3.2. Block-Matching and 4D Filtering	18
3.3. Noise2Void	20

Introducción

Una aplicación central y extensa área de investigación del procesamiento de señales es la disminución de ruido. Dada una observación $x = s + n$, el objetivo es recuperar la señal de interés s que se encuentra degradada con ruido n aditivo, de media nula e independiente de la señal. Para el caso de imágenes, sea I una grilla de coordenadas de tamaño $N \times N$, se define la imagen $x \in \mathbb{R}^{N \times N}$ como $x = \{x_i / i \in I\}$. Los principales desafíos de la eliminación de ruido son conservar bordes sin producir *blur*, preservar texturas y zonas suaves y no introducir artefactos [35] [36].

La ley de varianza [37] establece que si el ruido es independiente y se promedian M píxeles x_i con el mismo contenido de señal, la varianza del ruido se reduce en \sqrt{M} . A partir de este resultado se han propuesto diferentes métodos en el dominio espacial para obtener una estimación \hat{s}_i del contenido de señal en x_i . Por ejemplo, el filtro de media consiste en estimar \hat{s}_i como

Capítulo 3. Breve Revisión de Algoritmos de Eliminación de Ruido

el promedio de todos los píxeles en un vecindario P de tamaño (p_s, p_s) centrado en i , esto es,

$$\hat{s}_i = \frac{1}{p_s^2} \sum_{j \in P} x_j. \quad (3.1)$$

Una extensión inmediata es el filtro de media gaussiano, que enmascara P con un *kernel* gaussiano $g(i, j) = e^{-\frac{d(i,j)}{2\sigma_a^2}}$ que pondera píxeles cercanos al centro i de P . En este caso, la estimación es dada por

$$\hat{s}_i = \frac{1}{C_g} \frac{1}{p_s^2} \sum_{j \in P} g(i, j) x_j. \quad (3.2)$$

Donde C_g es una constante de normalización asociada al filtro g . En ambos casos se asume que los píxeles cercanos a i tienen un contenido de señal similar y realizaciones independientes de ruido. Una desventaja de estos métodos es que introducen *blur* y degradan bordes, especialmente para p_s grande.

Existen métodos no lineales como el filtro de mediana y el filtro bilateral que abordan el problema de degradación de bordes. En particular, el filtro bilateral [38] extiende al filtro gaussiano incorporando un término extra $k(x_i, x_j) = e^{-\frac{d(x_i, x_j)}{2\sigma_b^2}}$, obteniendo la estimación

$$\hat{s}_i = \frac{1}{C_g} \frac{1}{C_k} \frac{1}{p_s^2} \sum_{j \in P} g(i, j) k(x_i, x_j) x_j. \quad (3.3)$$

Donde C_k es una constante de normalización asociada al filtro k . De esta forma, en el promediado no se tienen en cuenta píxeles con intensidades muy diferentes, ayudando a evitar la degradación de bordes.

Otra familia de métodos de disminución de ruido son aquellos que se aplican en un dominio transformado, típicamente usando Transformada de Fourier o Wavelets [39]. Los métodos de Fourier son principalmente técnicas de filtrado pasabajos que eliminan componentes de alta frecuencia atribuidos al ruido, en este aspecto vale la pena resaltar el filtrado de Wiener [40], en el cual se elige la respuesta al impulso de manera que minimice el error cuadrático medio entre la entrada y una respuesta esperada. Dicho método de filtrado se emplea en el BM4D.

Los métodos de Wavelets se basan en que en el dominio transformado los coeficientes correspondientes al ruido tienen magnitud mucho menor que los correspondientes a la señal. De esta forma, por ejemplo, puede aplicarse un umbral sobre estos coeficientes y antitransformar para obtener \hat{s} . Un ejemplo de esto es tomar la base de la transformada del coseno (DCT) [41], para justamente umbralizar y quedarse con los primeros términos.

También se han desarrollado métodos con enfoques propios de la Teoría de la Información, como el algoritmo DUDE [42]. En este caso se asume conocido un modelo completo de la estadística del ruido, pero no se requiere conocer ninguna información de la señal. Este método garantiza asintóticamente el mismo desempeño que el mejor método con acceso a información de la señal, por lo que se lo denomina un *universal denoiser*.

Por otro lado, con la creciente popularidad de los métodos de aprendizaje profundo se han propuesto una gran variedad de nuevos algoritmos de eliminación de ruido. En el caso supervisado, estos consisten en entrenar redes neuronales convolucionales (CNN, por sus siglas en inglés) con parejas de imágenes ruidosas y sin ruido (x^j, s^j) para aprender un mapeo f_θ entre ellas. Los parámetros θ de la red se ajustan de forma que minimicen una función de costo \mathcal{L} entre la predicción $\hat{s}^j = f_\theta(x^j)$ y la referencia s^j :

$$\arg\min_{\theta} \sum_j \mathcal{L}(f_\theta(x^j), s^j). \quad (3.4)$$

3.1. Non-Local Means

Elecciones típicas de \mathcal{L} son la *Binary Cross-Entropy* (BCE), el *Mean Squared Error* (MSE) y el *Mean Absolute Error* (MAE), aunque el desarrollo de funciones de costo apropiadas para diferentes aplicaciones es un área activa de investigación. Otra vertiente del aprendizaje profundo consiste en los métodos no supervisados. Por ejemplo, los *autoencoders* [43] buscan aprender una representación de baja dimensión (*encoding*) de los datos, mapeando la entrada x a un vector latente $z \in \mathbb{R}^D$ con $D \ll N^2$ mediante una red encoder e_ϕ y generando la reconstrucción con otra red decoder d_θ . La reducción de dimensión asegura que los detalles más finos, en particular el ruido de x , no puedan ser reconstruidos por d_θ . Ambas redes son entrenadas conjuntamente buscando minimizar un costo \mathcal{L} entre x y su reconstrucción $\hat{x} = d_\theta(e_\phi(x))$.

$$\operatorname{argmín}_{\theta \phi} \sum_j \mathcal{L}(d_\theta(e_\phi(x^j)), x^j). \quad (3.5)$$

Otro método reciente no supervisado de eliminación de ruido es *Deep Image Prior* [44], que está basado en la observación de que la estructura de una CNN define implícitamente un *prior* sobre el espacio de imágenes. En este caso se entrena una U-Net [45] con una única imagen x buscando aprender su reconstrucción sin ruido. Deteniendo el proceso de entrenamiento antes de que la red pueda sobre-ajustarse completamente al ruido presente en x , se logra obtener la restauración \hat{s} .

Finalmente, dentro de las técnicas clásicas de eliminación de ruido, un camino que ha resultado particularmente exitoso consiste en explotar el hecho de que generalmente las imágenes naturales presentan zonas similares repetidas, también llamadas auto-similitudes. En estas zonas, el contenido de señal es muy similar pero el ruido es independiente. Si el ruido es además de media nula, la ley de varianza establece que éste se puede disminuir promediando las zonas similares de la imagen. Resulta fundamental resaltar que estas zonas deben estar alineadas para no degradar la señal al promediar. Existen en la literatura múltiples métodos de eliminación de ruido basados en este principio [46]. La redundancia presente en las macromoléculas hace que dichos métodos sean particularmente atractivos para abordar el problema de disminución de ruido en modelos tridimensionales obtenidos con criomicroscopía electrónica. A continuación, se analizan en particular los tres algoritmos con los que se trabaja en este proyecto.

3.1. Non-Local Means

La publicación del algoritmo de *Non Local Means* (NLM) [3] hace casi 15 años revolucionó el campo de las técnicas de disminución de ruido. NLM introdujo la idea de explotar la auto-similitud y no localidad de las imágenes naturales, impulsando grandes avances en el área de restauración de imágenes. Este algoritmo se caracteriza por su simplicidad y elegancia matemática. Destaca también por su capacidad de preservar bordes y detalles finos de la estructura de la imagen.

La idea básica detrás de NLM consiste en elegir un vecindario de referencia R y recorrer la imagen buscando vecindarios similares. Luego, el píxel central del vecindario de referencia se sustituye por un promedio ponderado de los centros de los vecindarios similares. La estimación \hat{s}_i del valor de señal en el píxel i está dada por,

$$\hat{s}_i = \sum_{j \in I} \omega(i, j) x_j, \quad (3.6)$$

siendo $\omega(i, j)$ el peso asignado al píxel j . Este peso se calcula en base a una medida de similitud entre los distintos vecindarios Q y el de referencia R centrados en j e i respectivamente,

$$d(i, j) = \|K_a \cdot [R - Q]^2\|_F, \quad (3.7)$$

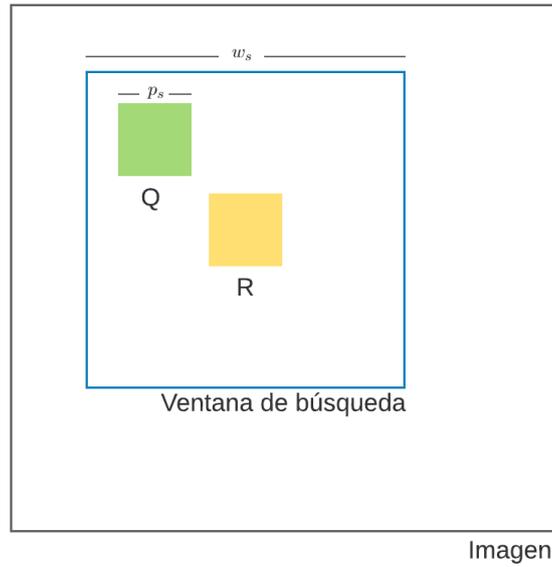


Figura 3.1: Diagrama de NLM. Búsqueda de vecindarios Q similares al de referencia R restringida a una ventana de búsqueda W .

donde K_a es una máscara gaussiana de desviación estándar a que da mayor relevancia a los píxeles cercanos al centro de los vecindarios. Los pesos $\omega(i, j)$ entonces se calculan como,

$$\omega(i, j) = \frac{1}{C(i)} e^{-\frac{d(i, j)}{h^2}} \quad (3.8)$$

donde

$$C(i) = \sum_j e^{-\frac{d(i, j)}{h^2}} \quad (3.9)$$

es un factor de normalización para que se verifique $0 < \omega(i, j) < 1$ y $\sum_j \omega(i, j) = 1$. El parámetro h controla el decaimiento exponencial de los pesos como función de la distancia $d(i, j)$.

Por motivos de eficiencia, como muestra la Figura 3.1, se restringe la búsqueda de vecindarios similares a una ventana de búsqueda centrada en el vecindario de referencia. Para los experimentos se utiliza una implementación propia basada en la de Scikit-Image¹. Entre otros parámetros de interés, es posible elegir el tamaño de la ventana de búsqueda ($w_s \times w_s \times w_s$), el tamaño de los vecindarios ($p_s \times p_s \times p_s$) y el factor de decaimiento exponencial de los pesos (h). Opcionalmente puede entregarse al algoritmo la varianza del ruido σ^2 .

3.2. Block-Matching and 4D Filtering

El algoritmo *Block-Matching and 3D Filtering* (BM3D) [47] está basado en la idea de promediar zonas similares dentro de la misma imagen para eliminar el ruido, pero busca explotar simultáneamente tanto la correlación intra-vecindario como la inter-vecindario mediante un filtrado más avanzado que el promediado llamado filtrado colaborativo. BM3D se mantiene desde su fecha de publicación como un método de disminución de ruido de referencia, con un

¹https://github.com/scikit-image/scikit-image/blob/master/skimage/restoration/non_local_means.py

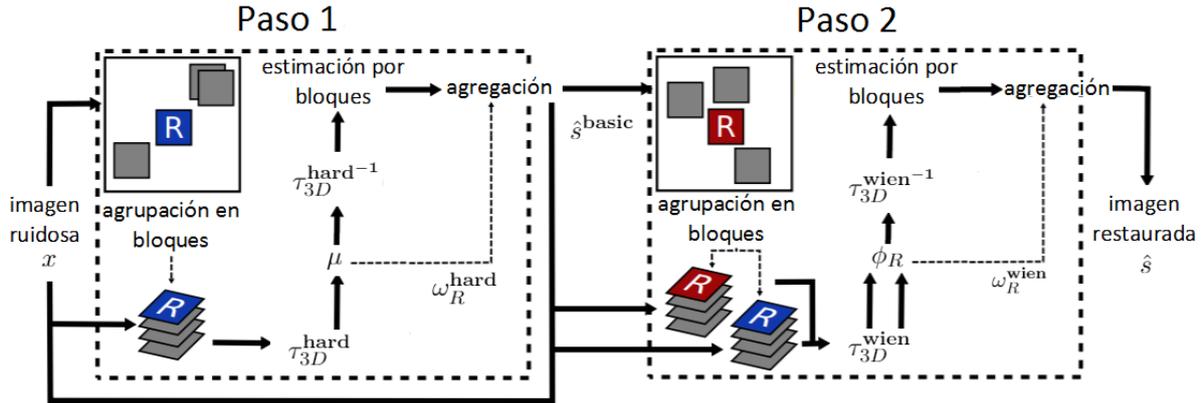


Figura 3.2: Diagrama de bloques de BM3D. Consta de dos pasos, en el primero se obtiene una versión preliminar de la imagen sin ruido que luego es utilizada en el segundo para aplicar un mejor filtrado a la imagen ruidosa, obteniendo así la restauración final. Cada paso consiste en una etapa de agrupación en bloques de vecindarios similares, una etapa de filtrado colaborativo (umbralización o Wiener) y una etapa de agregación de resultados. Imagen adaptada de [49].

desempeño que incluso llega a los límites teóricos de disminución de ruido [48]. La posterior extensión al caso de datos tridimensionales recibe el nombre de *Block-Matching and 4D Filtering* (BM4D) [4].

Como muestra la Figura 3.2, el algoritmo consta de dos pasos de filtrado y agregación de resultados. En el primero se obtiene una versión preliminar de la imagen sin ruido que luego es utilizada para aplicar un mejor filtrado a la imagen ruidosa, obteniendo así la restauración final.

Primer Paso: Filtrado Colaborativo y Agregación

Se considera un vecindario de referencia R en x y se recorre la imagen buscando los N^{hard} vecindarios más similares. Estos vecindarios se apilan en un bloque $\mathcal{B}(R)$ de tamaño $p_s \times p_s \times N^{\text{hard}}$. A este bloque se le aplica una técnica llamada filtrado colaborativo, que consiste en una transformación lineal isométrica τ_{3D}^{hard} al bloque, un operador de umbralización μ en el espacio transformado para atenuar el ruido y la transformación inversa para volver al dominio espacial.

$$\mathcal{B}^{\text{hard}}(R) = \tau_{3D}^{\text{hard}^{-1}}(\mu(\tau_{3D}^{\text{hard}}(\mathcal{B}(R)))) \quad (3.10)$$

donde $\mathcal{B}^{\text{hard}}(R)$ es una versión de $\mathcal{B}(R)$ con ruido atenuado. De esta forma, aplicar filtrado colaborativo a $\mathcal{B}(R)$ permite hallar un estimado básico para cada píxel i perteneciente a cada vecindario $Q \subset \mathcal{B}(R)$, dado por el valor del correspondiente píxel i en $Q^{\text{hard}} \subset \mathcal{B}^{\text{hard}}(R)$, denominado $\hat{s}_{i,Q,R}^{\text{hard}}$.

En la mayoría de los casos, para cada píxel de la imagen x hay más de una estimación debido al solapamiento de los vecindarios. En la etapa de agregación se busca conciliar los distintos estimados haciendo un promedio ponderado de todos ellos. Esta ponderación da prioridad a vecindarios homogéneos, buscando evitar aquellos que contengan bordes que puedan causar artefactos indeseados [49].

$$\hat{s}_i^{\text{basic}} = \frac{\sum_R \omega_R^{\text{hard}} \sum_{Q \in \mathcal{B}(R)} \mathbb{1}_{i \in Q} \hat{s}_{i,Q,R}^{\text{hard}}}{\sum_R \omega_R^{\text{hard}} \sum_{Q \in \mathcal{B}(R)} \mathbb{1}_{i \in Q}} \quad (3.11)$$

Capítulo 3. Breve Revisión de Algoritmos de Eliminación de Ruido

donde los pesos se definen como $\omega_R^{\text{hard}} = \frac{1}{N_R^{\text{hard}}}$ siendo N_R^{hard} la cantidad de coeficientes no nulos luego de aplicar la umbralización μ , y la función $\mathbb{1}_{i \in Q}$ vale 1 cuando $i \in Q$ y 0 cuando $i \notin Q$.

Segundo Paso: Filtrado Colaborativo de Wiener y Agregación

En un segundo paso se aplica un esquema similar de filtrado colaborativo pero utilizando la estimación \hat{s}^{basic} del paso anterior para buscar N^{wien} vecindarios similares. Para esto se selecciona un vecindario de referencia R en \hat{s}^{basic} y se construye un bloque $\mathcal{B}^{\text{basic}}(R)$ de tamaño $p_s \times p_s \times N^{\text{wien}}$ y otro bloque $\mathcal{B}(R)$ apilando los mismos vecindarios que pertenecen a $\mathcal{B}^{\text{basic}}(R)$ pero correspondientes a x . Otra diferencia con el primer paso del algoritmo es que en lugar de umbralizar con el operador μ en el espacio transformado, se aplica un filtro de Wiener ϕ_R cuyos coeficientes se obtienen a partir de $\mathcal{B}^{\text{basic}}(R)$.

$$\mathcal{B}^{\text{wien}}(R) = \tau_{3D}^{\text{wien}^{-1}}(\phi_R \cdot \tau_{3D}^{\text{wien}}(\mathcal{B}(R))) \quad (3.12)$$

siendo los coeficientes del filtro:

$$\phi_R(\eta) = \frac{|\tau_{3D}^{\text{wien}}(\mathcal{B}^{\text{basic}}(R))(\eta)|^2}{|\tau_{3D}^{\text{wien}}(\mathcal{B}^{\text{basic}}(R))(\eta)|^2 + \sigma^2} \quad (3.13)$$

donde σ^2 es la varianza del ruido y η la frecuencia a la que se aplica el filtro.

De forma análoga al primer paso, aplicar filtrado colaborativo de Wiener a $\mathcal{B}(R)$ permite hallar una estimación final para cada píxel i perteneciente a cada vecindario $Q \subset \mathcal{B}(R)$, dado por el valor del correspondiente píxel i en $Q^{\text{wien}} \subset \mathcal{B}^{\text{wien}}(R)$, denominado $\hat{s}_{i,Q,R}^{\text{wien}}$. Utilizando el mismo esquema de agregación anteriormente mencionado se obtiene la estimación final para cada píxel de la imagen.

$$\hat{s}_i = \frac{\sum_R \omega_R^{\text{wien}} \sum_{Q \in \mathcal{B}(R)} \mathbb{1}_{i \in Q} \hat{s}_{i,Q,R}^{\text{wien}}}{\sum_R \omega_R^{\text{wien}} \sum_{Q \in \mathcal{B}(R)} \mathbb{1}_{i \in Q}} \quad (3.14)$$

donde los pesos están definidos como $\omega_R^{\text{wien}} = \frac{1}{\|\phi_R\|_2^2}$.

Para una descripción más detallada de BM3D se recomienda referirse a la publicación original [47] y al posterior análisis exhaustivo del algoritmo y sus parámetros [49].

Para los experimentos del capítulo 5 se utiliza la implementación de BM4D de la *Temper University of Technology* [4]². Esta es una implementación patentada, por lo que el acceso a las diferentes funciones que componen el algoritmo es limitado. Al igual que en NLM, por motivos de eficiencia se puede restringir la búsqueda de vecindarios similares a una ventana de búsqueda. Los parámetros más relevantes que pueden ser controlados por el usuario son w_s y p_s . Además, la implementación incluye un estimación de la varianza del ruido σ^2 , aunque si el ruido es conocido (como en el caso de ruido sintético), su varianza puede ser entregada como parámetro.

3.3. Noise2Void

Como establece la ecuación (3.4), es posible entrenar una CNN de forma supervisada para aprender una mapeo f_θ entre imágenes ruidosas x y su contenido de señal s . Sin embargo, en

²<https://www.cs.tut.fi/~foi/GCF-BM3D>

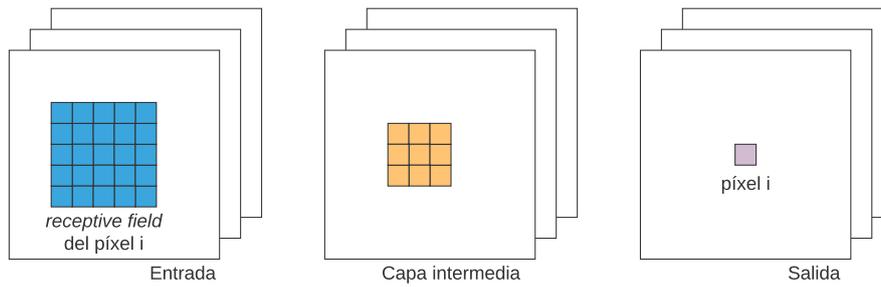


Figura 3.3: Ejemplo ilustrativo de la existencia del *receptive field* en una CNN. El valor del píxel i en la salida depende únicamente de un vecindario en la capa intermedia debido a que se calcula mediante una convolución. A su vez, cada píxel del vecindario en la capa intermedia depende de una porción de la capa anterior (en este caso la entrada).

general no es posible adquirir la imagen sin ruido. Para poder entrenar únicamente con imágenes ruidosas, recientemente se han propuesto diferentes alternativas, entre las que se destaca *Noise2Noise* (N2N) [50]. En este caso, la red es entrenada con parejas de imágenes (x^j, x'^j) con el mismo contenido de señal pero diferente realización de ruido, buscando minimizar una función de costo \mathcal{L} entre ellas:

$$\operatorname{argmín}_{\theta} \sum_j \mathcal{L}(f_{\theta}(x^j), x'^j). \quad (3.15)$$

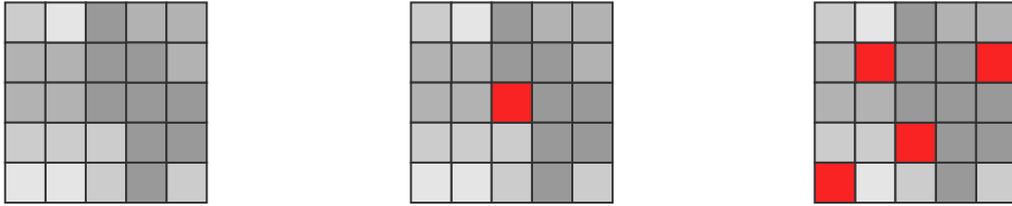
Al cumplirse ciertas hipótesis sobre la estadística del ruido (independiente píxel a píxel y de media nula) y con una elección adecuada de \mathcal{L} , cuando la red intenta aprender el mapeo entre imágenes ruidosas la salida converge a la imagen “promedio”, eliminando así parte del ruido.

Si bien N2N permite entrenar sin necesidad de imágenes limpias, todavía requiere de al menos dos imágenes con diferente realización de ruido, lo cual sigue siendo una limitante. En algunas aplicaciones, la naturaleza dinámica de la escena hace imposible capturar dos imágenes con el mismo contenido de señal. Por este motivo, en 2019 se introdujo *Noise2Void* (N2V) [5], un algoritmo que permite realizar la eliminación del ruido a partir de una única imagen, explotando la auto-similitud de la misma y la independencia del ruido. Esta red permite disminuir el ruido sobre la propia imagen de interés partiendo de dos hipótesis fundamentales que permiten inferir el valor de señal en un píxel a partir de sus alrededores: 1) señal correlacionada píxel a píxel y 2) ruido aditivo, de media nula, y condicionalmente independiente píxel a píxel dada la señal.

Para entrenar esta red, sus autores observan que la salida para el píxel i no depende de toda la imagen de entrada x , sino únicamente de un vecindario $x_{RF(i)}$ centrado en i llamado campo de visión o *receptive field* de la red [51], como se muestra en la Figura 3.3. Esto significa que, a nivel de píxel, puede considerarse el mapeo entre entrada y salida de la red $f_{\theta}(x) = \hat{s}$ como un mapeo entre $x_{RF(i)}$ y \hat{s}_i dado por

$$f_{\theta}(x_{RF(i)}) = \hat{s}_i. \quad (3.16)$$

En base a esta observación, N2V es entrenado procesando secuencialmente los $x_{RF(i)}$ de la red buscando predecir el valor en i . Se crea un punto ciego en el centro de los *receptive fields*, como se muestra en la Figura 3.3, para evitar aprender la función identidad como solución trivial. De esta forma, la predicción \hat{s}_i depende de todos los píxeles en $x_{RF(i)}$ excepto del i . Como se asume que la señal de cada píxel está correlacionada con la señal de los píxeles de su entorno, la red puede hacer una buena estimación para i solamente observando sus alrededores.



(a) Sin punto ciego. (b) Con un punto ciego en el píxel central i . (c) Con varios puntos ciegos.

Figura 3.4: Ejemplo de $x_{RF(i)}$ con y sin puntos ciegos. En la práctica, para generar un punto ciego se sustituye el valor de la imagen en i por el de un píxel cercano elegido al azar.

Los parámetros θ se aprenden minimizando el costo entre la predicción \hat{s}_i y el valor original en la imagen x_i :

$$\operatorname{argmín}_{\theta} \mathcal{L}(f_{\theta}(x_{RF(i)}), x_i). \quad (3.17)$$

Al igual que para N2N, con una elección de \mathcal{L} adecuada la predicción de la red converge a la imagen “promedio”, reduciendo así el ruido.

En la práctica, aplicar el esquema de entrenamiento descrito anteriormente resulta ineficiente porque requiere procesar secuencialmente cada vecindario entero para obtener la predicción de un único píxel. Por este motivo, se entrena con vecindarios con N puntos ciegos, como puede verse en la Figura 3.4c. Los valores de los píxeles en los puntos ciegos son sustituidos por los de algunos píxeles cercanos, asegurando así que la salida dependa de todos los píxeles del vecindario excepto de los que se quiere predecir [5].

Se utiliza la implementación oficial de código abierto de NVIDIA ³. Esta permite la elección de varios parámetros relevantes de forma directa. En lo que refiere al entrenamiento, puede variarse tanto el *learning rate* como la cantidad de épocas de entrenamiento. Hay dos opciones disponibles para la función de costo: MSE y MAE. También es posible controlar la cantidad de puntos ciegos y el tamaño de los vecindarios de entrada a la red $p_s \times p_s \times p_s$. Además, el código incluye rotaciones de 90° para incrementar la cantidad de datos de entrenamiento.

³<https://github.com/juglab/n2v>

Capítulo 4

Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

Resumen

En este capítulo se propone una extensión del algoritmo NLM invariante a rotaciones. Inicia con una introducción donde se plantea la necesidad de desarrollar una nueva medida de similitud que aproveche mejor la redundancia en la estructura de las macromoléculas. Se introducen algunos antecedentes en la literatura que presentan extensiones de NLM invariantes a rotaciones para el caso bidimensional. Luego, se definen las herramientas matemáticas de alineación de volúmenes que se emplean para diseñar una medida de similitud invariante a rotaciones aplicable sobre datos tridimensionales. Finalmente, se presentan algunos experimentos que validan la medida de similitud propuesta.

Contenido

4.1. Motivación	23
4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones	25
4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones	30

4.1. Motivación

NLM y BM4D son algoritmos de disminución de ruido que se basan en aprovechar la autosimilitud presente en el volumen. En particular, comparten la misma idea central de tomar un vecindario de referencia y recorrer una ventana de búsqueda identificando vecindarios similares al de referencia según una medida de similitud. Luego, el vóxel del centro del vecindario de referencia se sustituye por un promedio ponderado entre los centros de los vecindarios similares al de referencia, donde los pesos dependen de una medida de similitud entre cada vecindario y el de referencia.

Ninguno de estos algoritmos es invariante a rotaciones, debido a que la medida de similitud utilizada no contempla posibles rotaciones entre las subestructuras que compara, lo que implica que un vecindario exactamente igual al de referencia pero en otra orientación puede recibir un peso pequeño en la ponderación. Como se mencionó anteriormente, las macromoléculas presentan mucha redundancia, ya que contienen múltiples ejemplares de los mismos aminoácidos

Capítulo 4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

ubicados en distintas orientaciones a lo largo de toda su estructura. En un MRC, dos aminoácidos del mismo tipo contienen prácticamente la misma señal y realizaciones independientes de ruido. No obstante, si dichos aminoácidos no se encuentran alineados, los algoritmos no los reconocen como similares y por lo tanto no consideran esta valiosa información para realizar la restauración. No contar con una medida de similitud invariante a rotaciones impide que los algoritmos puedan aprovechar gran parte de la redundancia presente en la señal y constituye una limitante para la máxima mejora de resolución alcanzable por estos métodos.

Dado que la implementación de BM4D disponible es patentada, no se tiene acceso a las diferentes funciones que la componen, siendo imposible hacerle modificaciones. La opción de realizar una implementación propia se considera fuera del alcance de este proyecto, por lo que se decide trabajar con el algoritmo NLM.

Existen varias extensiones de NLM invariantes a rotaciones en la literatura, todas ellas para el caso bidimensional. Grewenig *et al.* [7] y Ji *et al.* [6] proponen sustituir la medida de similitud de NLM presentada en la ecuación (3.7) por una invariante a rotaciones. En lugar de comparar el valor de intensidad de los píxeles entre vecindarios de la imagen, se comparan un conjunto de descriptores (momentos) de estos vecindarios. Los momentos invariantes fueron introducidos por Hu en 1962 [52] y constituyen una herramienta fundamental en el campo de reconocimiento de patrones. Estos momentos son invariantes a traslaciones, rotaciones y cambios de escala. Posteriormente, Teague [53] presentó los momentos de Zernike, que también poseen estas características pero además no contienen redundancia, lo cual significa que momentos de distinto orden representan características independientes de la imagen. Ambos momentos son robustos al ruido, lo cual los vuelve particularmente útiles para aplicaciones de análisis de imágenes. En [6] y [7] se propone calcular momentos invariantes (ya sea de Hu o Zernike) de los vecindarios centrados en cada píxel de la imagen de forma de obtener descriptores de forma locales que sean invariantes a rotaciones. En particular, sea $\mathcal{M} = \{M_k/k = 1 \dots K\}$ un set de momentos invariantes a rotaciones, i y j dos píxeles de la imagen ruidosa y R y Q los vecindarios cuadrados centrados en los píxeles i y j , la medida de similitud propuesta es [7]:

$$d_{\mathcal{M}}(i, j) = \sum_{k=1}^K [M_k(R) - M_k(Q)]^2. \quad (4.1)$$

Esta medida de similitud elimina el Kernel gaussiano empleado en NLM tradicional (3.7), por lo que cada momento tiene igual probabilidad de influenciar la intensidad del píxel central. En [6] se muestra que el método propuesto, utilizando momentos de Zernike, es capaz de identificar más vecindarios similares al de referencia y que la calidad de la imagen restaurada es mejor que la de NLM tradicional.

Zimmer *et al.* [8] presentan un enfoque completamente distinto para incorporar invarianza a rotaciones en NLM. El algoritmo propuesto, llamado *Rotationally Invariant Block-Matching* (RIBM), consiste básicamente en estimar el ángulo de rotación de cada vecindario con respecto al de referencia y rotarlos utilizando interpolación bilineal. Luego de tener los vecindarios de la imagen alineados al de referencia, se emplea la medida de similitud de NLM tradicional de la ecuación (3.7) para compararlos. Sean Q y Q' dos vecindarios de la imagen, tales que Q' es una versión ruidosa y rotada respecto al centro del vecindario Q , el primer paso para alinearlos es hallar el centroide de cada vecindario de la siguiente forma:

$$C_Q := \begin{pmatrix} \frac{\int_Q xI(x,y)dxdy}{\int_Q I(x,y)dxdy} \\ \frac{\int_Q yI(x,y)dxdy}{\int_Q I(x,y)dxdy} \end{pmatrix} \quad (4.2)$$

donde se asume un sistema de coordenadas cuyo centro está en el centro del vecindario e $I(x, y)$ es el valor que toma la imagen ruidosa en el píxel de coordenadas (x, y) .

4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

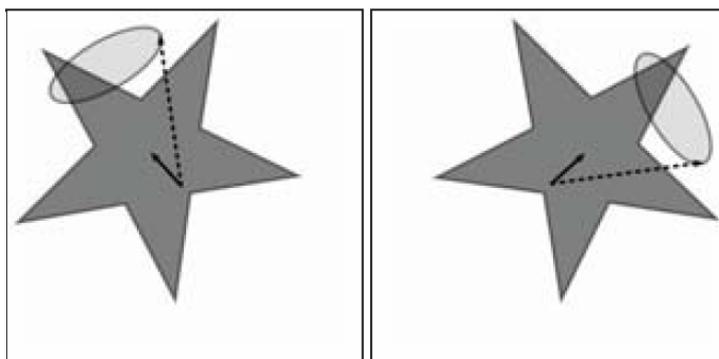


Figura 4.1: Ejemplo de dos vecindarios idénticos a menos de una rotación de 90° . La flecha continua va desde el centro hacia el centroide del vecindario (píxeles oscuros corresponden a valores altos de intensidad). La flecha punteada en el vecindario de la izquierda apunta a un píxel arbitrario, mientras que la flecha punteada en el vecindario de la derecha apunta al píxel correspondiente considerando la rotación [8].

Luego, como muestra la Figura 4.1 se estima la rotación entre los vecindarios Q y Q' como el ángulo entre los vectores que unen el centro del vecindario con el centroide del vecindario.

El desempeño de RIBM es significativamente superior al del método basado en momentos invariantes. Como contrapartida, su costo computacional es elevado, siendo su tiempo de ejecución alrededor del doble que el de NLM tradicional [7].

A continuación, se presenta una extensión de NLM invariante a rotaciones aplicable sobre datos volumétricos llamado nuevo NLM (NNLM). La idea central es similar a la del método planteado por Zimmer *et al.* [8], en tanto se utiliza la medida de similitud de NLM tradicional para comparar el vecindario de referencia con otros vecindarios dentro de la ventana de búsqueda previamente alineados al de referencia. De esta forma, el peso asignado a un vecindario similar al de referencia pero en otra orientación es cercano a uno. No obstante, al agregar una dimensión más al método de alineación de Zimmer *et al.*, la complejidad matemática del cálculo de la rotación aumenta considerablemente. Además, la forma en la que estiman la rotación entre vecindarios no funciona bien en casos en los que el centroide está muy cerca del centro del patch, a veces incluso provocando que los resultados sean peores que los de NLM tradicional [8]. Otra alternativa para la alineación de volúmenes es la computacionalmente costosa búsqueda exhaustiva, que consiste en discretizar el espacio de las posibles rotaciones, aplicarlas una por una a uno de los volúmenes y quedarse con la terna de ángulos que maximice la correlación entre los dos. En el caso de NNLM, se emplea un método de alineación mucho más eficiente, fuertemente basado en el trabajo de Sprechmann [13]. Este método consiste en proyectar la transformada de Fourier de los volúmenes sobre esferas y utilizar herramientas matemáticas de las funciones esféricas para hallar la rotación que mejor alinea dichas proyecciones. En las siguientes secciones se detalla el proceso de alineación y se valida la medida de similitud desarrollada.

4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

Una función esférica es un mapeo de la esfera unidad a un valor escalar ($f : S^2 \rightarrow \mathbb{R}$). Como muestra la Figura 4.2, todos los puntos en la superficie de la esfera pueden ser expresados de manera unívoca en coordenadas esféricas de la forma,

$$\eta(\theta, \varphi) = (\cos(\varphi) \sin(\theta), \sin(\varphi) \sin(\theta), \cos(\theta)) \quad (4.3)$$

donde $\theta \in [0, \pi]$ es el ángulo polar (ángulo de colatitud) y $\varphi \in [0, 2\pi]$ es el ángulo azimutal (ángulo de longitud) [13].

Capítulo 4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

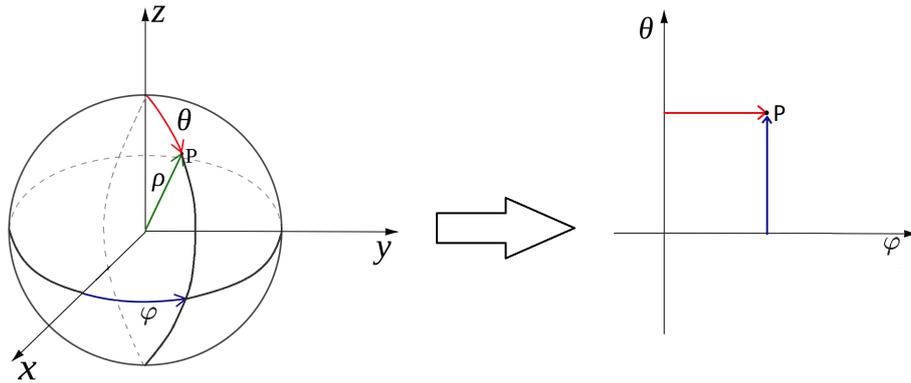


Figura 4.2: Sistema de coordenadas esféricas y su correspondiente representación en un plano. $\theta \in [0, \pi]$ es el ángulo polar (ángulo de colatitud) y $\varphi \in [0, 2\pi]$ es el ángulo azimutal (ángulo de longitud).

La teoría clásica del análisis de Fourier establece que toda función real, periódica y cuadrado integrable puede escribirse como combinación lineal de exponenciales complejas $\{e^{jk\theta}\}_{k \in \mathbb{Z}}$. Las funciones periódicas definidas en la recta real pueden pensarse como funciones complejas definidas en la circunferencia unidad (S^1). Esto significa que el conjunto de exponenciales complejas forman una base ortonormal del espacio de las funciones definidas en S^1 .

Análogamente, los armónicos esféricos forman una base ortonormal del espacio de las funciones definidas en S^2 . Son una herramienta matemática muy útil para abordar problemas variados como la representación de campos magnéticos y gravitacionales de cuerpos planetarios, la resolución de la ecuación de Schrödinger, o la optimización de gráficos en informática [54].

La expresión matemática de los armónicos esféricos de orden l y grado m , con $l \in \mathbb{N}$ y $-l \leq m \leq l$ tiene la forma,

$$Y_l^m(\theta, \varphi) = C e^{im\varphi} P_l^m(\cos \theta) \quad (4.4)$$

donde C es un factor de normalización y P_l^m es el polinomio asociado de Legendre de orden l y grado m . Los polinomios asociados de Legendre son aquellos que verifican la ecuación:

$$(1 - x^2)y'' - 2xy' + \left(l[l + 1] - \frac{m^2}{1 - x^2} \right) y = 0. \quad (4.5)$$

En el caso particular en que $m = 0$, los polinomios asociados de Legendre coinciden con los polinomios de Legendre. Para $m \neq 0$, los polinomios asociados de Legendre pueden calcularse a partir de los polinomios de Legendre de la forma,

$$P_l^m(x) = (1 - x^2)^{\frac{m}{2}} \left(\frac{d}{dx} \right)^m P_l(x). \quad (4.6)$$

La propiedad más importante de los polinomios asociados de Legendre es la ortogonalidad, que a su vez conduce a la ortogonalidad de los armónicos esféricos. Por más información sobre los polinomios asociados de Legendre se recomienda recurrir a [55].

Los armónicos esféricos también cumplen la propiedad de completitud, por lo que toda función esférica y cuadrático integrable puede expresarse como series de la forma,

$$f(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{m=l} \hat{f}_{lm} Y_l^m(\theta, \varphi) \quad (4.7)$$

4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

donde $Y_l^m(\theta, \varphi)$ son las funciones de armónicos esféricos y \hat{f}_{lm} son los coeficientes de la transformada de Fourier esférica de f . Estos coeficientes pueden obtenerse proyectando f sobre cada función de la base Y_l^m [13].

Una función esférica tiene ancho de banda B , si se cumple que $\hat{f}_{lm} \simeq 0 \forall l \geq B$ y por lo tanto su expansión verifica,

$$f(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{B-1} \sum_{m=-l}^{m=l} \hat{f}_{lm} Y_l^m(\theta, \varphi). \quad (4.8)$$

La función de correlación entre dos funciones esféricas f_1 y f_2 se puede definir como

$$(f_1 \otimes f_2) = \int_{\eta \in S^2} f_1(\eta) f_2(\eta) d\eta. \quad (4.9)$$

donde se usa η como coordenadas esféricas en el dominio frecuencial.

Sea $SO(3)$ el espacio de las rotaciones en tres dimensiones, también se puede definir una función $SCC : SO(3) \rightarrow \mathbb{R}$ que asocia a cada rotación $R \in SO(3)$ el valor de la correlación que resultaría de aplicar dicha rotación a una de las funciones esféricas,

$$SCC(R) = \int_{\eta \in S^2} f_1(\eta) f_2(R^T \eta) d\eta. \quad (4.10)$$

La transformada de Fourier de las funciones definidas en $SO(3)$ se conoce como $SO(3)$ *Fourier Transform* (SOFT). Dichas funciones también pueden expandirse como series de funciones pertenecientes a una base ortonormal, donde los coeficientes que multiplican a las funciones de la base se conocen como coeficientes de la SOFT.

El teorema de convolución del análisis clásico de Fourier para funciones reales [56] establece que se puede calcular la correlación entre dos funciones a través del producto de sus transformadas de Fourier en el espacio recíproco. Una generalización de este teorema permite obtener los coeficientes de la SOFT para la función SCC a partir del producto de los coeficientes de la transformada de Fourier esférica (TFE) de las funciones f_1 y f_2 . Este teorema establece que se puede conocer la correlación entre dos funciones esféricas para todas las rotaciones posibles en $SO(3)$ calculando la TFE de cada función esférica, multiplicando sus coeficientes y calculando una SOFT inversa [13]:

$$SCC(R) = SOFT^{-1}(TFE(f_1)TFE(f_2)). \quad (4.11)$$

Más aún, tomando el máximo de la SCC , se puede calcular qué rotación resulta en una mayor correlación entre f_1 y f_2 , es decir, cuál es la rotación que mejor alinea f_1 y f_2 :

$$R_{opt} = \arg \max_{\mathcal{R}} \{SCC(R)\}. \quad (4.12)$$

Se pretende aplicar estas ideas en NLM para alinear los vecindarios dentro de la ventana de búsqueda al vecindario de referencia y de esta forma derivar una medida de similitud invariante a rotaciones.

Una forma de asociar a un volumen una función esférica es integrar el módulo de la transformada de Fourier de dicho volumen a lo largo de radios trazados desde el origen de coordenadas [13]. Matemáticamente:

$$f(\eta(\theta, \varphi)) = \int_a^b |\mathcal{F}(\rho\eta(\theta, \varphi))| d\rho \quad (4.13)$$

donde $\eta(\theta, \varphi)$ (4.3) refiere a las coordenadas esféricas y a y b determinan el rango de frecuencias en el que se integra, actuando como un filtro pasabanda. En el algoritmo propuesto se toma $a = 0.05f_s$ y $b = 0.35f_s$, donde f_s corresponde a la frecuencia de muestreo, tal como sugiere en [13].

Capítulo 4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

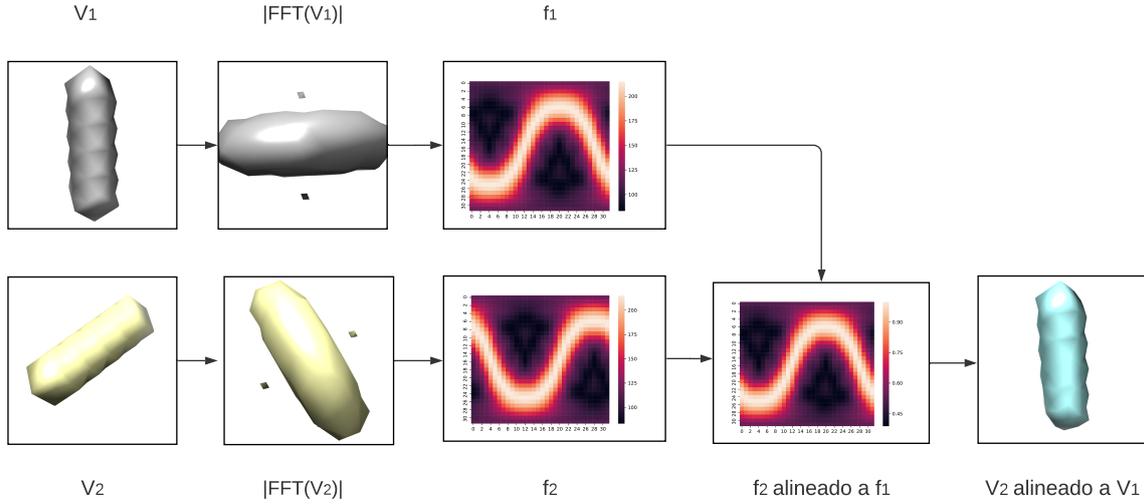


Figura 4.3: Ejemplo sintético del procedimiento de alineación. Se calcula el módulo de la transformada de Fourier de los volúmenes V_1 y V_2 y se proyectan dichas transformadas sobre la esfera unidad, obteniéndose las funciones esféricas f_1 y f_2 . Se calcula la función SCC y se obtiene la rotación \mathcal{R} que mejor alinea f_2 respecto a f_1 . Finalmente se aplica \mathcal{R} a V_2 , quedando éste alineado a V_1 .

De esta forma, el procedimiento que se plantea para alinear dos volúmenes V_1 y V_2 es [13]:

1. utilizar la ecuación (4.13) para asignar a cada uno de los volúmenes las funciones esféricas f_1 y f_2 ,
2. aplicar las ecuaciones (4.11) y (4.12) para hallar la terna de ángulos que mejor alinea f_2 con respecto a f_1 ,
3. aplicar dicha rotación al volumen V_2 .

Para facilitar la comprensión del procedimiento de alineación propuesto se presentan dos ejemplos. El primero se muestra en la Figura 4.3, y consiste en un volumen V_1 que es una barra, y otro volumen V_2 que es la misma barra rotada según la terna de ángulos $\alpha = 45^\circ, \beta = 0^\circ, \gamma = 0^\circ$. Siguiendo el procedimiento planteado anteriormente, el primer paso es calcular el módulo de la transformada de Fourier (FFT) de las barras. En este caso podemos pensar las barras como funciones delta discretas, de manera que sus transformadas de Fourier son planos ortonormales a las mismas. Además, al rotar un volumen en el espacio, su transformada de Fourier sufre la misma rotación en el espacio recíproco.

Luego, se obtienen las funciones esféricas mapeando el módulo de la FFT de las barras a la esfera unidad según la ecuación (4.13). Para facilitar la visualización, los mapas esféricos se muestran en un plano, como se propone en la Figura 4.2. De forma análoga a cuando se representa la Tierra sobre un planisferio, hay que tener en cuenta las deformaciones que esto conlleva. En el caso del ejemplo de la barra, en la Figura 4.3 se puede apreciar que al mapear un plano a la esfera unidad, se obtiene una senoide.

Siguiendo con el procedimiento de alineación, a partir de las dos funciones esféricas f_1 y f_2 se calcula la SCC utilizando la ecuación (4.11) y se obtiene la rotación que mejor alinea f_2 a f_1 utilizando la ecuación (4.12). Finalmente, se aplica dicha rotación a V_2 , que queda alineado a V_1 .

4.2. Desarrollo de una Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

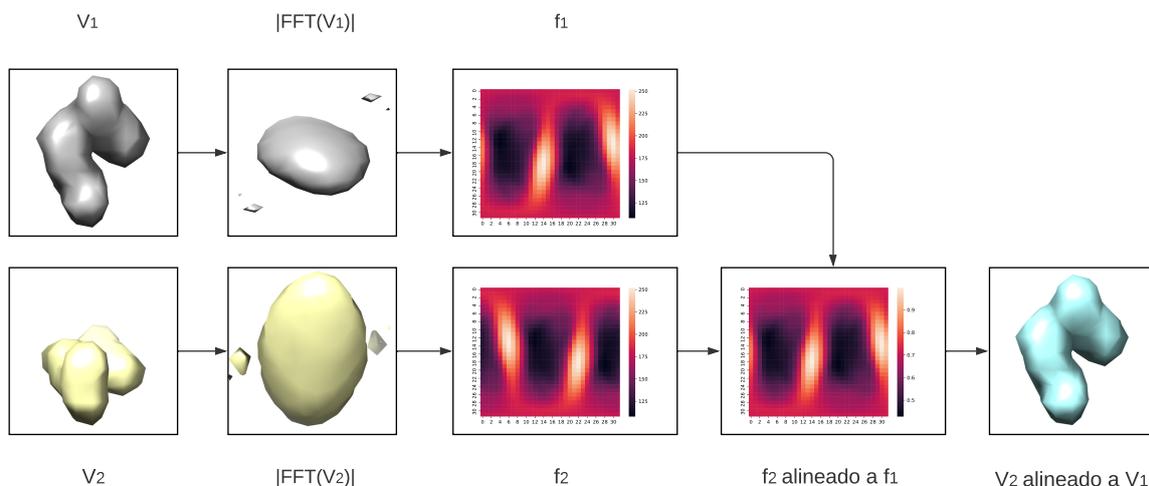


Figura 4.4: Ejemplo del procedimiento de alineación sobre un aminoácido tipo ARG. Se calcula el módulo de la transformada de Fourier de los volúmenes V_1 y V_2 y se proyectan dichas transformadas sobre la esfera unidad, obteniéndose las funciones esféricas f_1 y f_2 . Se calcula la función SCC y se obtiene la rotación \mathcal{R} que mejor alinea f_2 respecto a f_1 . Finalmente se aplica \mathcal{R} a V_2 , para alinearlo a V_1 .

La Figura 4.4 constituye otro ejemplo de aplicación del procedimiento de alineación propuesto. En este caso, en lugar de una barra, se considera un volumen V_1 que es un aminoácido tipo ARG, y otro volumen V_2 que es el mismo aminoácido rotado según la terna de ángulos $\alpha = 45^\circ, \beta = 0^\circ, \gamma = 0^\circ$. Siguiendo las mismas etapas que en el ejemplo anterior, se logra alinear V_2 con respecto a V_1 .

La idea central para incorporar invarianza a rotación en NLM es adaptar la medida de distancia de la ecuación (3.7) de forma que un vecindario muy similar al de referencia pero en distinta orientación reciba un peso alto en la ponderación. Esto se logra alineando los vecindarios con el procedimiento descrito anteriormente antes de compararlos.

Una observación importante es que la rotación que mejor alinea dos vecindarios se halla con una métrica (correlación entre las proyecciones esféricas) y luego la similitud entre ellos se evalúa con otra métrica diferente (distancia de NLM). Para evitar este problema así como para ganar robustez frente a una falla en la alineación, se propone la medida de distancia,

$$d_{ir}(i, j) = \min \{ \|K_a \cdot [R - Q]^2\|_F, \|K_a \cdot [R - R_{opt}(Q)]^2\|_F \} \quad (4.14)$$

donde el primer término corresponde a la distancia entre los vecindarios sin alinear y el segundo término a la distancia entre los vecindarios después de la alineación.

Respecto a los aspectos de implementación y análisis computacional, se hicieron pruebas para chequear qué es lo que se demoraba más en ejecutar. Los resultados dieron que lo que más demoraba era calcular los mapas esféricos de los vecindarios, y lo segundo que más demoraba era llamar el programa en C que recibe dos mapas esféricos y devuelve la rotación que mejor alinea los mapas. El tema es que para dos vecindarios de referencia contiguos muchos de los vecindarios en la ventana de búsqueda son los mismos y por lo tanto se estaba calculando el mismo mapa esférico varias veces de manera innecesaria. Esto se solucionó pre-calculando los mapas esféricos de todos los vecindarios del volumen de antemano. Este cambio en la implementación se tradujo en una gran mejora en los tiempos de ejecución, a pesar de que siguieron siendo elevados.

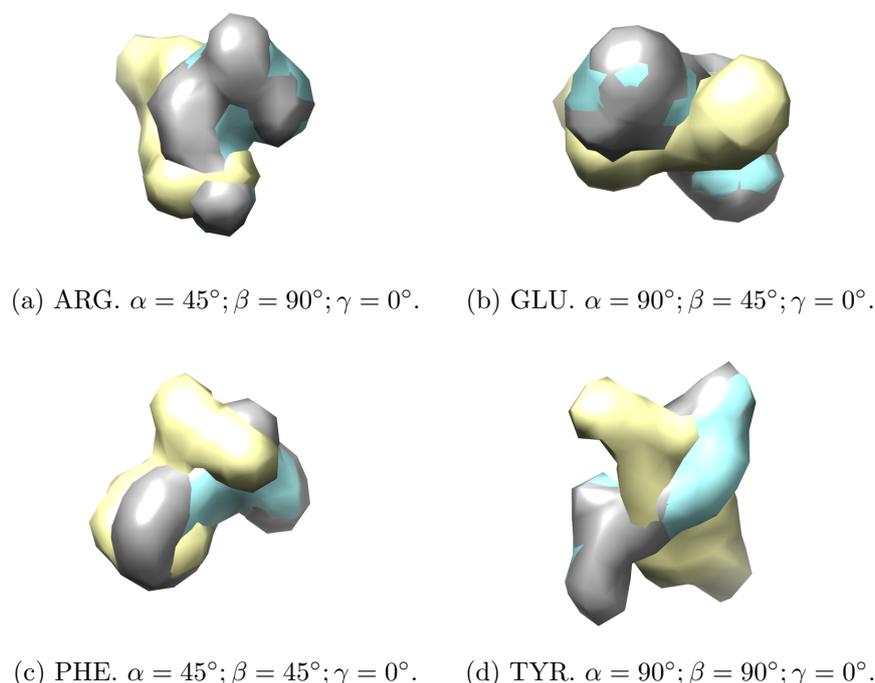


Figura 4.5: Ejemplo de los resultados del método de alineación para cuatro aminoácidos distintos: ARG, GLU, PHE y TYR. En gris se muestra el aminoácido original, en amarillo el mismo aminoácido rotado según la terna de ángulos indicada en cada subfigura y en celeste el resultado de alinear el aminoácido rotado con respecto al original. Umbral = 0.45.

4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

Como se mencionó anteriormente, NLM se basa en disminuir el ruido a través del promediado de zonas similares. En este proyecto en particular, se busca disminuir el ruido en la estructura tridimensional de una proteína, constituida por múltiples copias de los mismos aminoácidos. Sería deseable que la medida de similitud de NNLM identificara estas subestructuras como similares y les asignara pesos altos en la ponderación al momento de realizar la restauración.

En los siguientes experimentos se busca evaluar si la medida de similitud propuesta es invariante a rotaciones, es decir, si logra identificar que vecindarios que encierran aminoácidos del mismo tipo en distintas orientaciones son similares.

En primer lugar, se consideran volúmenes de aminoácidos a resolución 3 Å sin ruido agregado. Como establece la ecuación (4.14), la nueva medida de distancia compara un vecindario de referencia con otros vecindarios dentro de la ventana de búsqueda previamente alineados al de referencia. De esta forma, es fundamental corroborar que el método de alineación planteado funciona correctamente. Con este objetivo, se consideran pares de aminoácidos del mismo tipo en distintas orientaciones para cada uno de los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza y se evalúa si el método propuesto logra alinearlos correctamente. En todos los casos analizados se obtiene una excelente alineación. A modo de ejemplo, en la Figura 4.5 se muestra, para cuatro aminoácidos distintos (ARG, GLU, PHE y TYR), un aminoácido de referencia, el mismo aminoácido rotado según una determinada terna de ángulos y el resultado de alinear dicho aminoácido con respecto al de referencia. Se aprecia que el aminoácido de referencia y el alineado quedan completamente superpuestos, lo cual indica que la alineación es muy buena.

Habiendo corroborado que el método de alineación es eficaz, el siguiente paso es verificar que

4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

el peso asignado a dos aminoácidos del mismo tipo alineados entre sí es cercano a uno. Para ello se compara la nueva medida de similitud con la tradicional de NLM al cotejar un aminoácido de referencia con el mismo aminoácido en otras siete orientaciones, para cada uno de los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza. En todos los casos se observa un comportamiento similar al presentado en la Figura 4.6 para los aminoácidos ARG, GLU, PHE y TYR. En dichos experimentos, se toman vecindarios que encierran completamente a los aminoácidos. En particular, para el ARG se consideran vecindarios de tamaño $21 \times 21 \times 21$, para el GLU de $23 \times 23 \times 23$, para el PHE de $19 \times 19 \times 19$ y para el TYR de $13 \times 13 \times 13$. Las ocho orientaciones evaluadas son:

0. $\alpha = 0^\circ, \beta = 0^\circ, \gamma = 0^\circ$
1. $\alpha = 0^\circ, \beta = 45^\circ, \gamma = 45^\circ$
2. $\alpha = 45^\circ, \beta = 0^\circ, \gamma = 45^\circ$
3. $\alpha = 45^\circ, \beta = 45^\circ, \gamma = 45^\circ$
4. $\alpha = 90^\circ, \beta = 45^\circ, \gamma = 0^\circ$
5. $\alpha = 90^\circ, \beta = 45^\circ, \gamma = 45^\circ$
6. $\alpha = 90^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 45^\circ$
7. $\alpha = 90^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 90^\circ$

donde la numeración coincide con el eje horizontal de las gráficas de la Figura 4.6.

En todos los casos analizados, con la medida de similitud nueva a los aminoácidos del mismo tipo se les asigna un peso cercano a uno. Las pequeñas variaciones responden a que se está trabajando con vecindarios relativamente pequeños, por lo que los errores de interpolación son considerables.

Los experimentos presentados validan la medida de similitud propuesta para un caso ideal en el que no hay ruido. No obstante, NNLM se aplica en este proyecto para restaurar estructuras ruidosas, por lo que es importante evaluar cuánto se degrada la nueva medida de similitud al agregar ruido en las estructuras comparadas.

Con este objetivo, se compara la nueva medida de similitud con la tradicional de NLM al cotejar dos copias del mismo aminoácido ruidoso en dos orientaciones fijas diferentes para distintos niveles de ruido agregado. La orientación relativa entre los aminoácidos está definida por la terna de ángulos de Euler $\alpha = 45^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 0^\circ$ y se agrega ruido de desviación estándar $\sigma = \{0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\}$. La Figura 4.7 muestra los resultados de este experimento para los aminoácidos ARG, GLU, PHE y TYR.

Naturalmente, la nueva medida de similitud asigna un peso cercano a uno a los aminoácidos del mismo tipo en distintas orientaciones para el caso en que no hay ruido agregado ($\sigma = 0$). No obstante, al aumentar la desviación estándar del ruido, los pesos asignados disminuyen. Esto ocurre por una combinación de dos razones: 1) en algunos casos el ruido ocasiona que haya errores en el método de alineación y 2) aún si la alineación es perfecta, el ruido degrada la señal causando que la distancia euclídea entre los volúmenes comparados sea mayor. A modo de ejemplo, en la Figura 4.8 se muestran los resultados de alinear dos aminoácidos del mismo tipo (ARG, GLU, PHE y TYR) rotados entre sí $\alpha = 45^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 0^\circ$ y con ruido agregado de $\sigma = 0.2$. Se observa que los resultados de la alineación no son tan buenos como en el caso sin ruido y además el ruido ocasiona que aún estando alineados los volúmenes difieran. Sin perjuicio de esto, los gráficos de la Figura 4.7 muestran que la nueva medida de similitud es más robusta al ruido que la tradicional.

Capítulo 4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

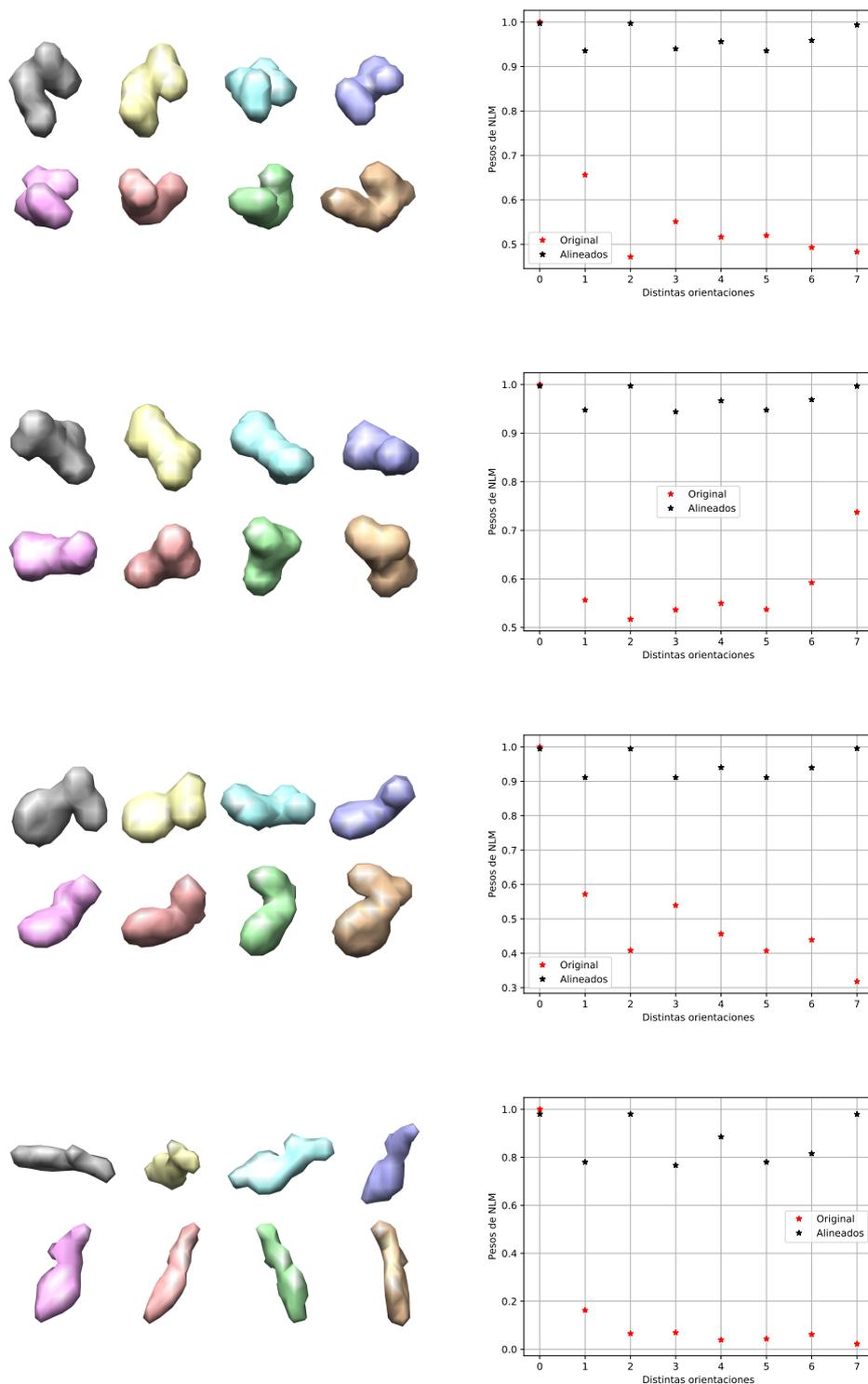


Figura 4.6: Comparación entre la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM al cotejar un aminoácido de referencia con el mismo aminoácido en otras orientaciones. La nueva medida de similitud da cercana a uno para todas las rotaciones. Izquierda: aminoácido de referencia y siete copias del mismo en distintas orientaciones. Umbral = 0.45. Derecha: gráfica de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM. De arriba a abajo: aminoácido ARG, GLU, PHE y TYR.

4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

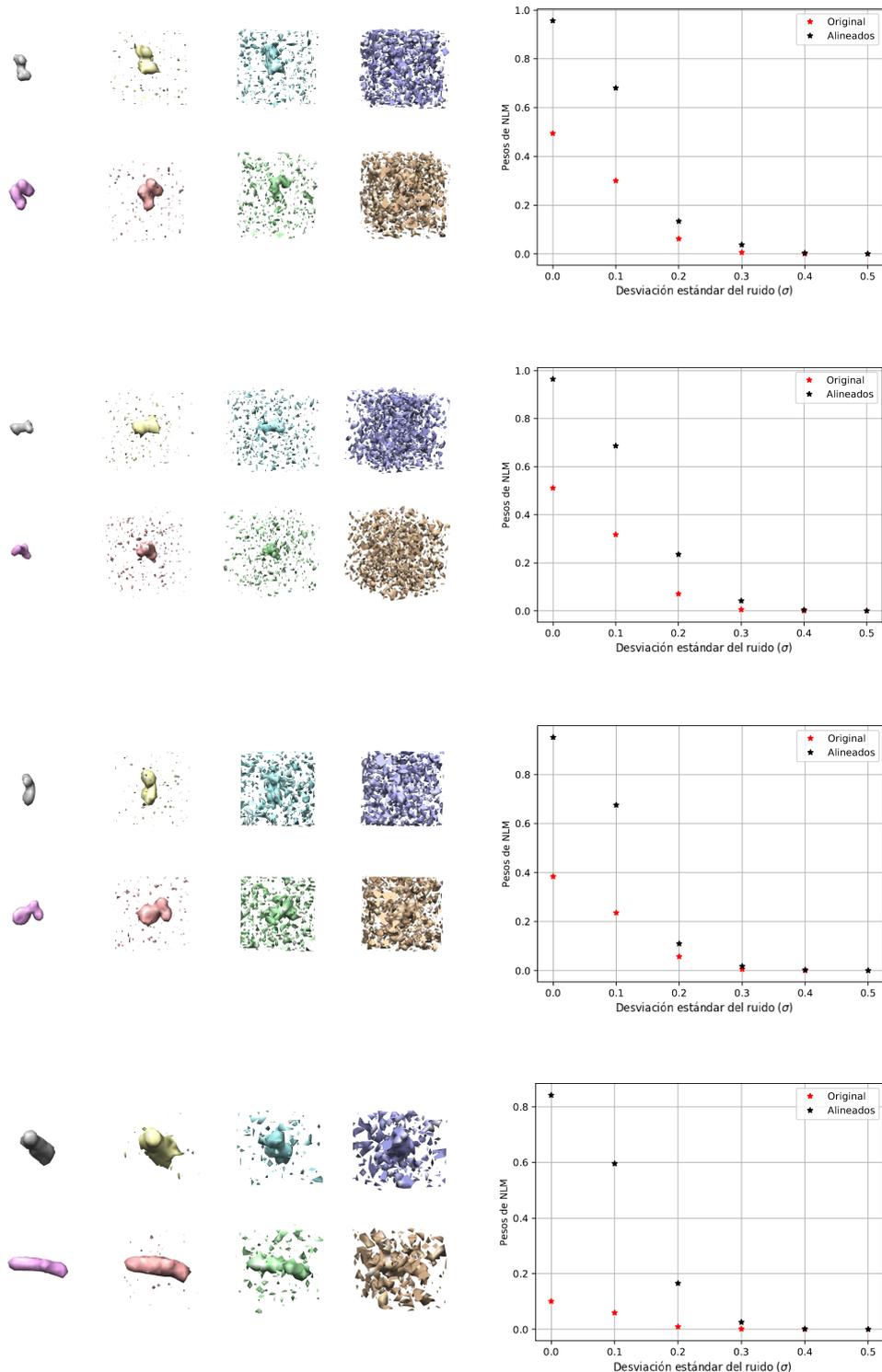


Figura 4.7: Degradación de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM al comparar dos copias del mismo aminoácido en orientaciones fijas diferentes para distintos niveles de ruido agregado. La nueva medida de similitud es más robusta al ruido que la tradicional. Izquierda: aminoácido de referencia y aminoácido rotado $\alpha = 45^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 0^\circ$, ambos con ruido de $\sigma = \{0; 0.1, 0.3, 0.5\}$ agregado. Umbral = 0.45. Derecha: gráfica de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM. De arriba a abajo: aminoácido ARG, GLU, PHE y TYR.

Capítulo 4. Desarrollo de una Extensión de Non-Local Means Invariante a Rotaciones (NNLM)

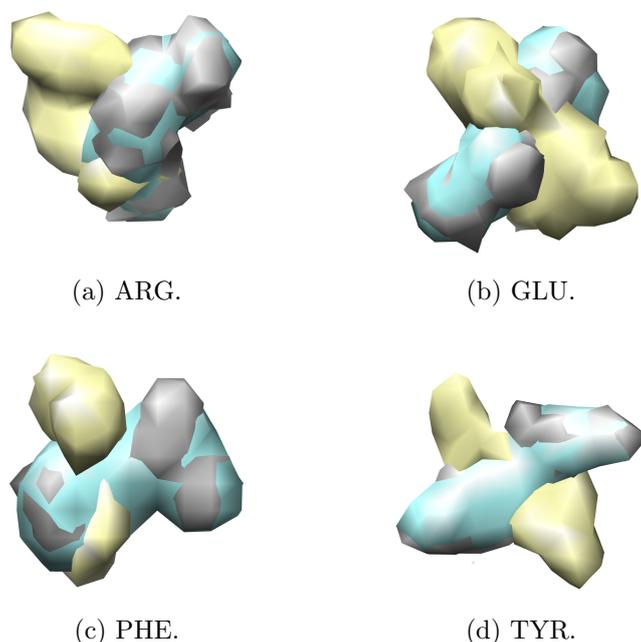


Figura 4.8: Ejemplo de los resultados del método de alineación para los aminoácidos ARG, GLU, PHE y TYR degradados con ruido de $\sigma = 0.2$. En gris se muestra el aminoácido original, en amarillo el mismo aminoácido rotado $\alpha = 45^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 0^\circ$ y en celeste el resultado de alinear el aminoácido rotado con respecto al original. Umbral = 0.55. Se elimina el ruido de fondo para facilitar la visualización.

Otra forma de evaluar si NNLM es invariante a rotaciones es simular una corrida del algoritmo en la cual el vecindario de referencia encierra un aminoácido y existen otros aminoácidos del mismo tipo en distintas orientaciones dentro de la ventana de búsqueda. Si los pesos asignados a estos vecindarios son altos, significa que el algoritmo los identifica como similares al de referencia y por lo tanto que la medida de similitud propuesta es efectivamente invariante a rotaciones.

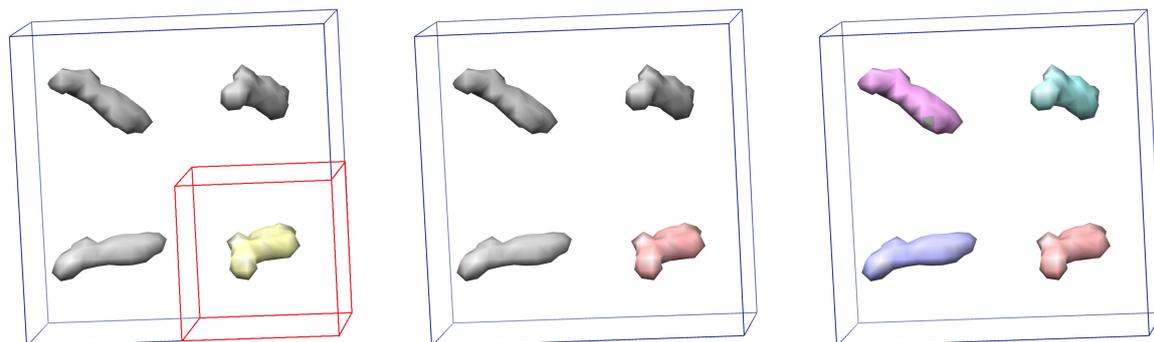
Para ello, se genera un volumen artificial de tamaño $26 \times 26 \times 13$ que contiene cuatro aminoácidos TYR en distintas orientaciones y se simula una corrida de NLM sobre él, considerando vecindarios de tamaño 13, ventanas de búsqueda de tamaño 26 y fijando un vecindario de referencia que encierra completamente a uno de los aminoácidos.

En la Figura 4.9 se muestra el volumen artificial, el vecindario de referencia y los vecindarios que son identificados como más similares al de referencia en NNLM y en NLM tradicional. En la corrida de NLM tradicional sólo el propio vecindario de referencia recibe un peso mayor a 0.8, mientras que en la corrida de NNLM todas las copias del aminoácido TYR en las distintas orientaciones reciben pesos mayores a 0.8. Estos resultados indican que con la medida de similitud propuesta, el algoritmo es capaz de recoger más información para hacer la restauración, lo cual podría redundar en una mejora en su desempeño.

Finalmente, se simula una corrida de NNLM y de NLM tradicional sobre el MRC de la enzima beta-galactosidasa generado a resolución 3 Å con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se consideran vecindarios de tamaño 4, ventanas de búsqueda de tamaño 20 y se fija un vecindario de referencia en un lugar arbitrario del volumen.

En la corrida de NLM tradicional sólo el propio vecindario de referencia recibe un peso mayor a 0.8, mientras que en la corrida de NNLM ocho vecindarios más también reciben pesos mayores a 0.8. La Figura 4.10a muestra dichos vecindarios para el caso de NNLM. Por otra parte, a modo

4.3. Validación de la Medida de Similitud Invariante a Rotaciones

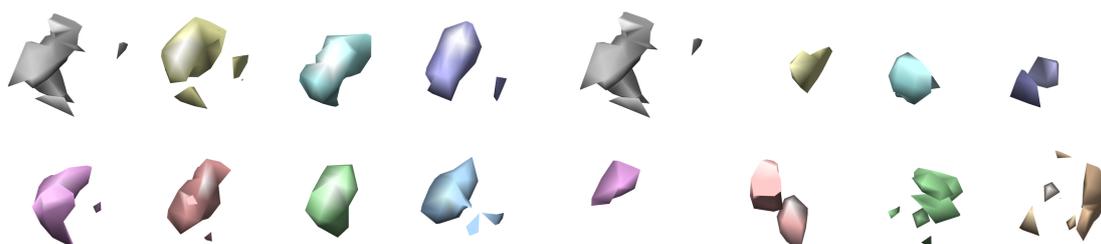


(a) Volumen artificial. Se resalta el vecindario de referencia que encierra completamente un aminoácido TYR.

(b) Corrida de NLM tradicional. En rojo se resalta el único vecindario que recibe un peso mayor a 0.8 en la ponderación.

(c) Corrida de NNLM. Se resaltan con distintos colores los vecindarios que reciben pesos mayores a 0.8 en la ponderación.

Figura 4.9: Simulación de una corrida de NNLM y NLM tradicional sobre un volumen artificial que contiene cuatro aminoácidos tipo TYR en distintas orientaciones. En la corrida de NLM tradicional sólo el propio vecindario de referencia recibe un peso mayor a 0.8. En la corrida de NNLM todas las copias del aminoácido TYR en las distintas orientaciones reciben pesos mayores a 0.8. Umbral = 0.7.



(a) Vecindarios que reciben pesos mayores a 0.8.

(b) Algunos vecindarios que reciben pesos menores a 0.1.

Figura 4.10: Vecindarios que reciben los mayores y menores pesos en una corrida de NNLM sobre el MRC de la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Para facilitar la visualización se presentan los vecindarios alineados al de referencia (coloreado en gris). Umbral = 0.4.

de referencia, en la Figura 4.10b se muestran los vecindarios que reciben los pesos más bajos en la ponderación. Para facilitar la visualización se presentan los vecindarios alineados al de referencia utilizando el procedimiento descrito en la sección 4.2. Se observa que las estructuras que reciben pesos altos en la ponderación son efectivamente similares a la estructura contenida en el vecindario de referencia, a menos de pequeñas diferencias ocasionadas por el ruido que degrada la señal y por los errores de interpolación inducidos en la rotación de volúmenes tan pequeños (vecindarios de tamaño $4 \times 4 \times 4$). Nuevamente se confirma, esta vez en un contexto más realista, que con la medida de similitud propuesta el algoritmo es capaz de recoger más información para hacer la restauración.

Los resultados presentados en esta sección indican que la medida de similitud propuesta tiene el potencial de mejorar el desempeño de NLM, ya que permite que el algoritmo aproveche mejor la redundancia en la estructura a restaurar.

Capítulo 5

Evaluación del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM

Resumen

En este capítulo se evalúa el desempeño de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre el MRC de la beta-galactosidasa generado a resolución 3 Å y degradado con distintos niveles de ruido gaussiano. Inicia con una introducción donde se enfatiza la motivación de los experimentos realizados y los criterios con los que se evalúa el desempeño de los algoritmos. Luego, para cada algoritmo se determina la elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño, se cuantifica la mejora de resolución obtenida para distintos niveles de ruido en la estructura de entrada, se realiza una evaluación cualitativa de las estructuras restauradas y se mide su tiempo de ejecución. Finalmente, se compara el desempeño de los cuatro algoritmos, contrastando la mejora de resolución alcanzada por cada uno de ellos, la calidad de las estructuras restauradas y su tiempo de ejecución.

Con la mejor elección de parámetros, NLM logra una mejora promedio de resolución de 12.9%, BM4D de 28.4% y N2V de 27.7% para los niveles de ruido considerados. Los algoritmos con mejor desempeño y más robustos al ruido son BM4D y N2V. NNLM supera en desempeño a NLM tradicional para niveles de ruido en la estructura de entrada de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$. Incluso paralelizando el código para aprovechar al máximo todos los recursos disponibles, el tiempo de ejecución de NNLM es abismalmente superior al de los demás algoritmos.

Contenido

5.1. Introducción	37
5.1.1. Insumo para los Experimentos: Beta-galactosidasa	37
5.1.2. Justificación y Descripción General de los Experimentos	37
5.2. Non-Local Means	39
5.3. Block-Matching and 4D Filtering	45
5.4. Noise2Void	49
5.5. Nuevo Non-Local Means	53
5.6. Comparación entre los Algoritmos	58

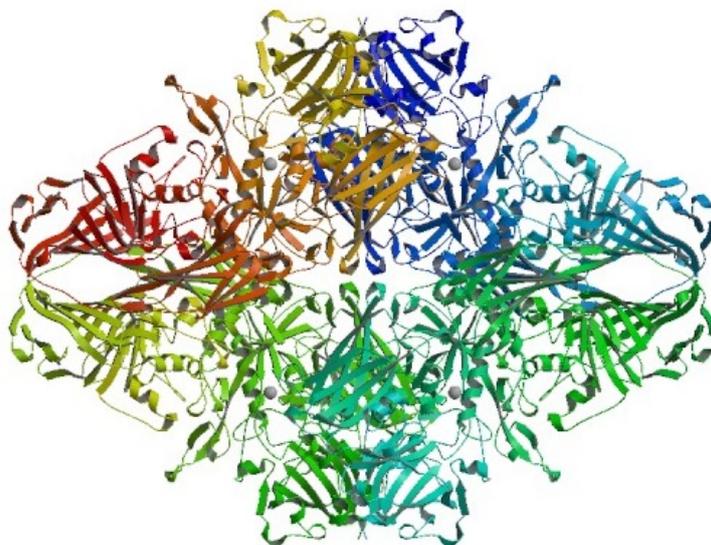


Figura 5.1: Diagrama de la estructura cuaternaria de la enzima beta-galactosidasa.

5.1. Introducción

5.1.1. Insumo para los Experimentos: Beta-galactosidasa

La beta-galactosidasa, también llamada beta-gal, es una enzima bacteriana presente en muchos organismos vivos. La beta-gal es producida naturalmente en el cuerpo humano y su principal función es descomponer la lactosa en glucosa y galactosa, componentes esenciales en el proceso de glucólisis mediante el cual se extrae energía para el metabolismo celular. Es fundamental para el cuerpo humano contar con niveles regulares de beta-gal, puesto que el déficit de esta enzima puede derivar en problemas de salud como por ejemplo la intolerancia a la lactosa [57].

El PDB de la estructura beta-galactosidasa obtenida mediante SPA está disponible en la base de datos *Protein Data Bank* (ID 3J7H). Esta enzima tiene una masa molecular de 465 kDa y su conformación activa es un homotetrámero (complejo protéico formado por cuatro subunidades idénticas) donde cada subunidad o cadena comprende 1.023 aminoácidos [58]. La Figura 5.1 muestra la representación de la estructura cuaternaria de la enzima beta-gal, en donde se aprecia la conformación espacial de la secuencia de aminoácidos en alfa-hélices y beta-láminas.

Para los experimentos presentados a continuación, se utiliza como insumo el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 Å. El tamaño del volumen es $200 \times 155 \times 107$ vóxeles, con un $v_s = 1$ Å. A este volumen se le agrega ruido gaussiano de media nula y desviación estándar $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. A modo de ejemplo, en la Figura 5.2 se muestra una isosuperficie del MRC sin ruido y con ruido agregado de $\sigma = 0.5$, $\sigma = 1$ y $\sigma = 1.5$, superpuestos sobre el PDB. Se observa que el MRC sin ruido se ajusta bastante bien al modelo atómico, mientras que cuanto mayor es el ruido, más difícil resulta reconocer la señal. No se agregan ruidos de $\sigma > 1.5$ ya que estos dominan totalmente la señal, que toma valores en el rango $[0, 3.3]$.

5.1.2. Justificación y Descripción General de los Experimentos

Como se menciona en el capítulo 2.2, la FSC pertenece a una familia de medidas de resolución que evalúan la auto-consistencia de los datos. Generalmente las dos reconstrucciones tridimensionales independientes generadas a partir de la mitad del conjunto de proyecciones

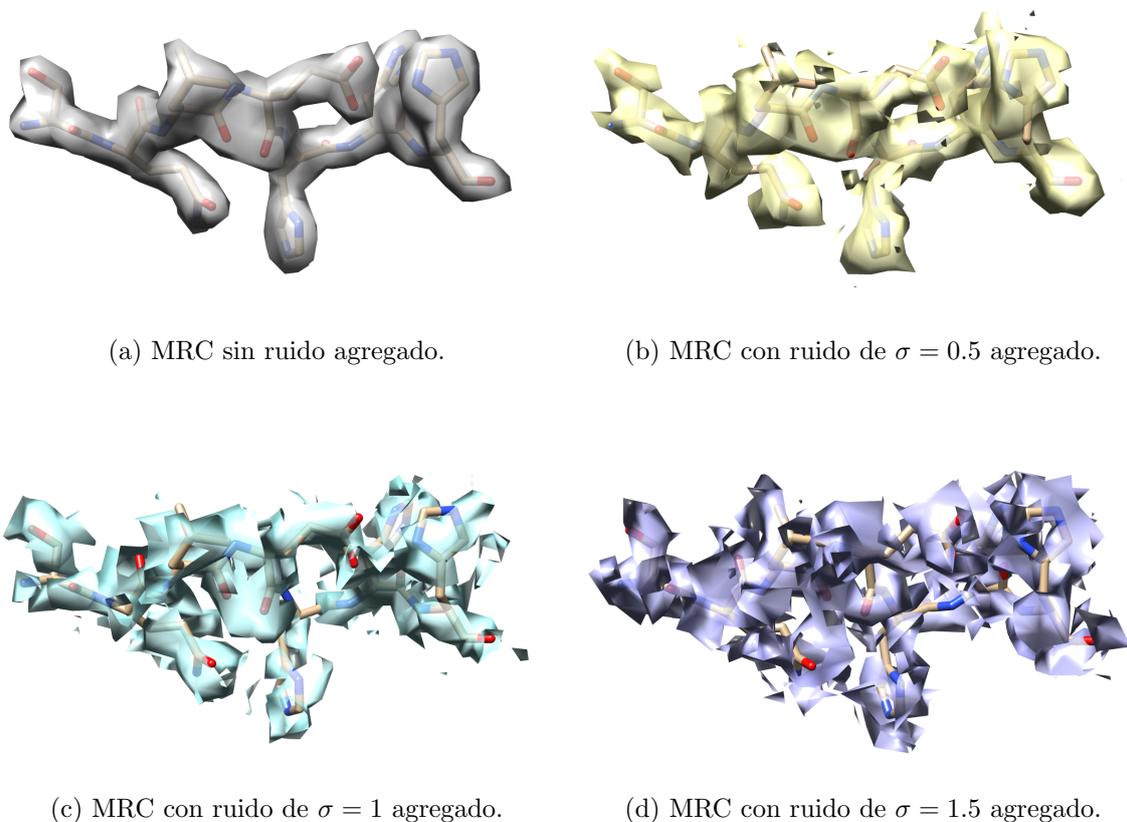


Figura 5.2: Ejemplo de estructuras de entrada a los algoritmos. Se muestran isosuperficies (Umbral = 1) del MRC de la beta-gal superpuestas sobre el modelo atómico de la estructura. El MRC sin ruido se ajusta bastante bien al modelo atómico, mientras que cuanto mayor es el ruido, más difícil resulta reconocer la señal. Se elimina el ruido de fondo para facilitar la visualización.

de la macromolécula son muy similares entre sí, pero difieren en los detalles finos, es decir, las altas frecuencias. Un criterio usual para determinar la resolución de una estructura es tomar el inverso de la frecuencia espacial para la cual $FSC = 0.5$. Los mapas obtenidos con criomicroscopía electrónica tienen ruido. Al aplicar métodos que eliminan el ruido, la curva de FSC toma valores más altos para un rango de frecuencias espaciales mayor y, por lo tanto, la intersección de la curva con 0.5 se da para una frecuencia espacial más alta, resultando en una mejora en la resolución de la estructura. En este sentido, se puede pensar que eliminar el ruido es equivalente a mejorar la resolución de un modelo.

En particular se evalúan cuatro algoritmos: NLM, BM4D, N2V y NNLM. Todos ellos se basan en aprovechar la auto-similitud en la señal para disminuir el nivel de ruido. Para evaluar cada uno de los cuatro métodos de disminución de ruido, lo primero que se hace es determinar la elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño del algoritmo. Luego, con esos parámetros se cuantifica la mejora de resolución obtenida para distintos niveles de ruido en la estructura de entrada. Finalmente, se hace una evaluación cualitativa de las estructuras restauradas y se mide el tiempo de ejecución del algoritmo.

Medidas de Desempeño de los Algoritmos

Para evaluar los experimentos realizados en este capítulo, se utiliza la medida de FSC de una forma ligeramente distinta a la tradicional. Por un lado, se calcula la curva de FSC de la estructura ruidosa de entrada (X_R) con respecto a un *ground truth* (X_{GT}), que es el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 Å sin ruido agregado ($FSC(X_R, X_{GT})$). Estas estructuras son iguales excepto que la primera tiene ruido gaussiano de media nula agregado. La curva de FSC correspondiente toma valores altos para frecuencias espaciales bajas y luego decrece para frecuencias espaciales altas, donde domina el ruido que afecta la señal. Por otro lado, se calcula la curva de FSC de la estructura restaurada (X_D) por cada uno de los algoritmos con respecto al *ground truth* ($FSC(X_D, X_{GT})$). Se considera que el algoritmo tiene un buen desempeño si logra eliminar gran parte del ruido, es decir, si la curva de FSC toma valores altos para un mayor rango de frecuencias.

Para evaluar cuantitativamente el desempeño de los algoritmos, es deseable tener un único valor de resolución y no una curva, por lo que se considera la integral bajo la curva de FSC (AUC, por sus siglas en inglés) como indicador de la resolución de la estructura. En particular, siendo $AUC(X_D) = \int_w FSC(X_D, X_{GT})dw$ la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada y $AUC(X_R) = \int_w FSC(X_R, X_{GT})dw$ la integral bajo la curva de FSC de la estructura ruidosa, el incremento porcentual en la resolución Δ_r alcanzada por un algoritmo se calcula como:

$$\Delta_r = \frac{AUC(X_D) - AUC(X_R)}{AUC(X_R)} \times 100. \quad (5.1)$$

Otro criterio para evaluar la calidad de la restauración es inspeccionar y comparar visualmente las estructuras de entrada y salida de cada algoritmo. Para realizar el referido análisis, en este proyecto se utiliza el software *Chimera*¹. Se considera que el algoritmo tiene un buen desempeño si cualitativamente se logra observar que la restauración se ajusta más al *ground truth* y al modelo atómico que la estructura de entrada.

Finalmente, se calcula el tiempo de ejecución como indicador de la complejidad de cada algoritmo.

En resumen, se consideran tres criterios para evaluar los algoritmos analizados:

1. Curva de FSC.
2. Integral bajo la curva de FSC.
3. Evaluación cualitativa.

5.2. Non-Local Means

Como se explicó en el capítulo 3, la idea básica detrás de NLM consiste en elegir un vecindario de referencia y recorrer el volumen buscando vecindarios similares. Luego, el vóxel central del vecindario de referencia se sustituye por un promedio ponderado de los centros de los vecindarios similares de acuerdo a la ecuación (3.6). Esta ponderación se calcula en base a la medida de similitud entre los distintos vecindarios y el de referencia presentada en la ecuación (3.7).

Elección de Parámetros

Los principales parámetros que se pueden variar en la implementación de NLM son el tamaño de los vecindarios ($p_s \times p_s \times p_s$), el tamaño de la ventana de búsqueda ($w_s \times w_s \times w_s$) y el factor de decaimiento exponencial de los pesos (h).

¹<https://www.cg1.ucsf.edu/chimera/>

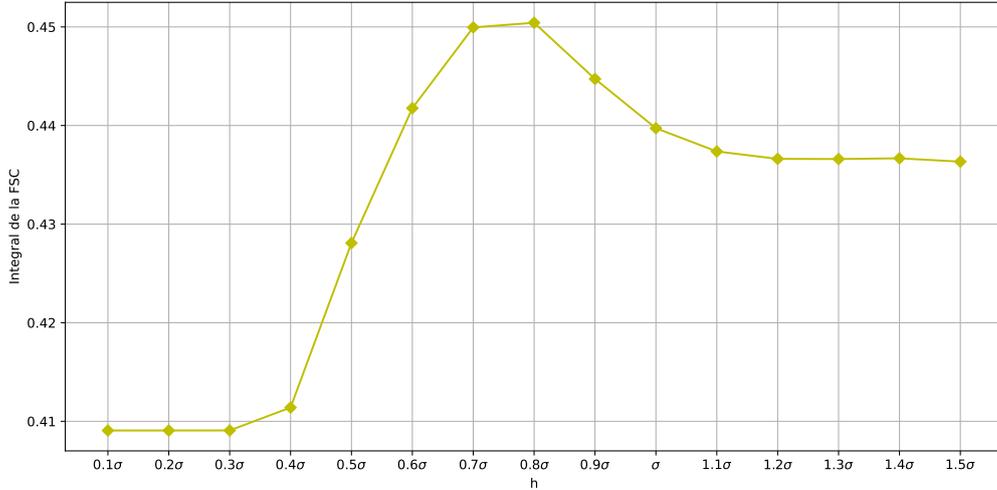


Figura 5.3: Desempeño de NLM para distintos h sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h . Los mejores resultados se obtienen para $h = 0.8\sigma$.

El parámetro h puede pensarse intuitivamente como un parámetro de sensibilidad del algoritmo, cuanto más grande el h más vecindarios se consideran para realizar la restauración, lo cual frecuentemente implica incorporar vecindarios que no son tan similares al de referencia. Por el contrario, cuanto más restrictivo el h , menos vecindarios se consideran para realizar la restauración pero a su vez más parecidos son estos vecindarios al de referencia. Para determinar cuál es el valor h que resulta en un mejor desempeño de NLM, se corre el algoritmo sobre el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 \AA con ruido agregado de $\sigma = 0.3$ para $h = \{0.1\sigma, 0.2\sigma, \dots, 1.5\sigma\}$. En la Figura 5.3 se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h . Se observa que el mejor desempeño del algoritmo se obtiene para $h = 0.8\sigma$. La forma de la curva de la Figura 5.3 es razonable, elegir un h muy grande impacta negativamente en el desempeño del algoritmo ya que ocasiona que ocurra un efecto de borroneo por promediado, mientras que elegir un h muy pequeño tampoco es bueno ya que si se restringe mucho la cantidad de vecindarios que se incluyen en la ponderación, el algoritmo pierde la capacidad de eliminar el ruido. Los siguientes experimentos se realizan con $h = 0.8\sigma$.

A continuación, se aplica NLM para distintos p_s y w_s sobre el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 \AA con ruido agregado de $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. Para todos los niveles de ruido se obtienen resultados similares a los de la Figura 5.4, que muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada por NLM en función de los distintos valores de los parámetros para el caso $\sigma = 0.3$.

En la Figura 5.4b se observa que para todos los valores de w_s considerados, cuanto mayor es p_s , peor es el desempeño de NLM. Como NLM no es invariante a rotaciones, solo encuentra similares a aquellos vecindarios que contienen estructuras parecidas en la misma orientación. Al considerar tamaños de vecindario pequeños es más probable encontrar estructuras similares y por lo tanto el algoritmo cuenta con más información para hacer la restauración. A medida que se aumenta el tamaño del vecindario, se encuentran cada vez menos vecindarios que contienen estructuras similares en la misma orientación y por lo tanto se terminan promediando cosas que no son tan parecidas. Esto se traduce en un peor desempeño en la restauración.

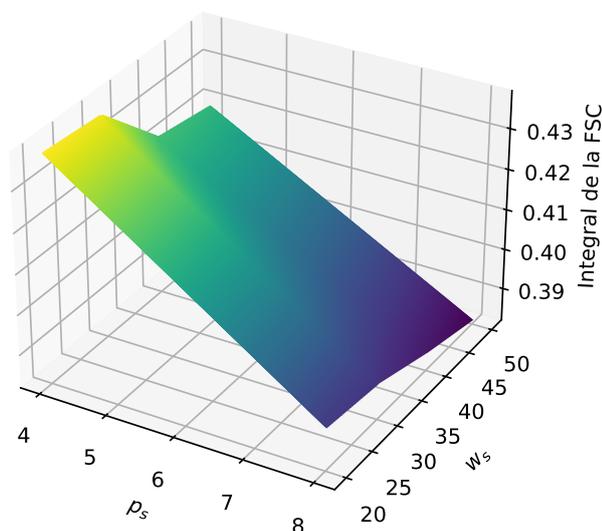
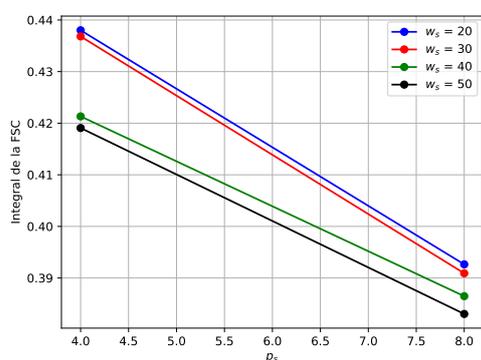
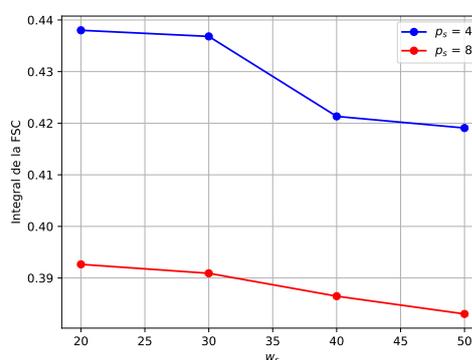
(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s y w_s .(b) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s .(c) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de w_s .

Figura 5.4: Desempeño de NLM para distintos p_s y w_s sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 20$.

Por otro lado, en la Figura 5.4c se observa que para todos los valores de p_s considerados, cuanto mayor es w_s , peor es el desempeño de NLM. Esto en principio puede parecer contraintuitivo, no obstante, se explica por el hecho de que en el MRC predominan las zonas no homogéneas y los bordes. Al promediar vecindarios que no contienen los mismos detalles que el vecindario de referencia, se pierden sus características únicas generándose un efecto de borrono. Tomar w_s pequeño contribuye a preservar los detalles en la estructura al evitar que se promedien vecindarios que no son tan similares [59].

A partir de los resultados presentados en la Figura 5.4 se concluye que la elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño del algoritmo es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 20$. En los siguientes experimentos se evalúa el desempeño de NLM con estos parámetros.

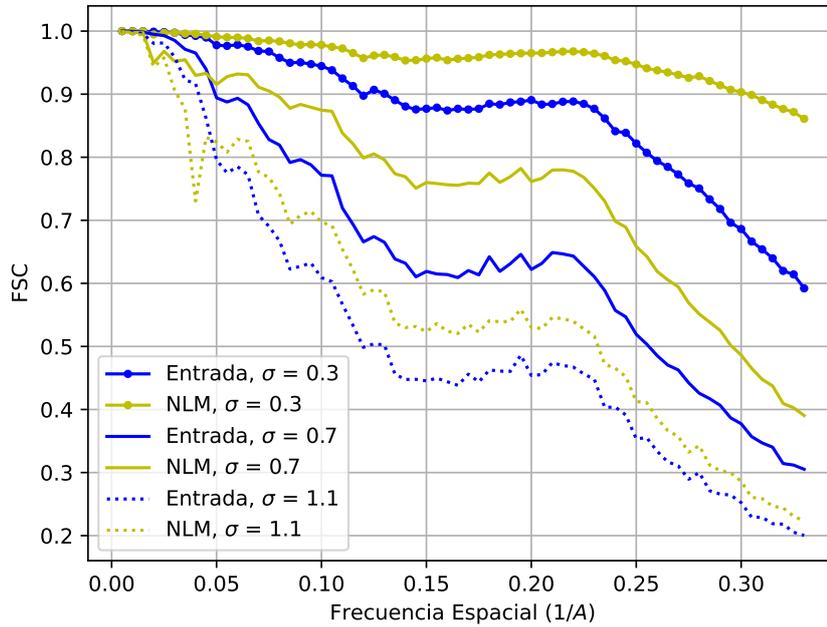


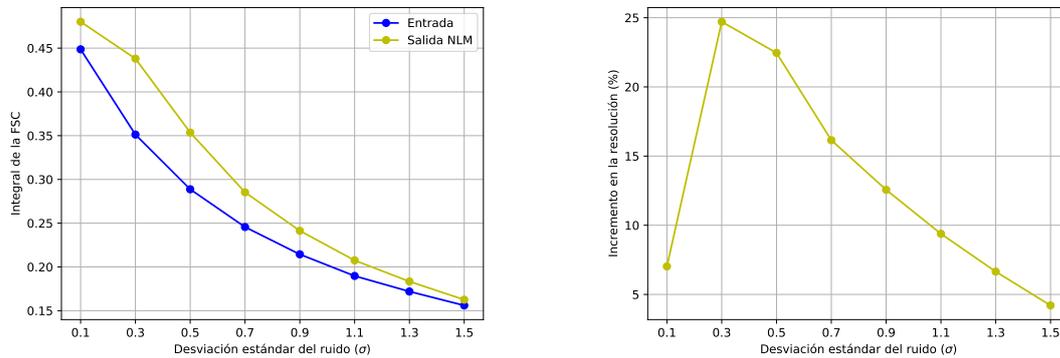
Figura 5.5: Corrida de NLM sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.

Desempeño con la Mejor Elección de Parámetros

En la Figura 5.5 se grafica la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NLM para $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. En todos los casos se comprueba que la resolución de la estructura restaurada es mejor que la resolución de la estructura de entrada, ya que la curva de FSC toma valores más altos para un rango mayor de frecuencias.

Con el objetivo de cuantificar la mejora de resolución que logra el algoritmo, en la Figura 5.6a se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NLM para $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. A partir de estos resultados y utilizando la fórmula (5.1), en la Figura 5.6b se grafica el incremento porcentual de resolución alcanzado por el algoritmo para cada valor de σ . Si bien se observa para todos los niveles de ruido que la resolución de la estructura restaurada es mejor que la resolución de la estructura de entrada, el desempeño del algoritmo empeora considerablemente al aumentar el ruido en la estructura de entrada. Para $\sigma = 0.1$ el incremento de resolución es pequeño, lo cual es razonable teniendo en cuenta que la estructura casi no tiene ruido y por lo tanto hay poco margen de mejora. A medida que se aumenta el nivel de ruido en la estructura de entrada el incremento de resolución logrado por NLM es cada vez más significativo, alcanzando un máximo de 25% para $\sigma = 0.3$. Al continuar aumentando el ruido, el incremento de resolución comienza a disminuir tornándose prácticamente insignificante para $\sigma \geq 1.3$. Estos resultados muestran que el incremento de resolución alcanzado por NLM es significativo (mayor a 10%) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 0.9$ y que el algoritmo es poco robusto al ruido en la estructura de entrada. Esto ocurre debido a que, para niveles de ruido alto en la entrada, la medida de similitud termina comparando principalmente el ruido entre los vecindarios, en lugar del contenido de señal. Es decir, la estimación se ajusta al predominante ruido y no a la señal [60].

5.2. Non-Local Means



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NLM en función de σ . (b) Incremento porcentual en la resolución alcanzado por NLM en función de σ .

Figura 5.6: Evaluación cuantitativa del desempeño de NLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por NLM es significativo (mayor a 10%) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 0.9$.

En la Figura 5.7 se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada por NLM para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Lo primero a resaltar es que el desempeño de NLM empeora cuanto mayor es la desviación estándar del ruido. Para $\sigma = 0.1$ y $\sigma = 0.3$ el desempeño del algoritmo es muy bueno. La estructura restaurada se asemeja mucho al *ground truth* y se ajusta muy bien al modelo atómico. Con un círculo rojo se resaltan algunas zonas de interés en la visualización de los resultados. Para $\sigma = 0.5$, la restauración de la señal sigue siendo muy buena, logrando incluso recuperar detalles finos como las aberturas presentes en el *ground truth*, pero el algoritmo comienza a fallar en eliminar el ruido de fondo en zonas donde no hay señal.

Correr NLM con $p_s = 4$ y $w_s = 20$ sobre la beta-gal en el *cluster* de *Duke University* con 300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo insume 20 horas 15 minutos.

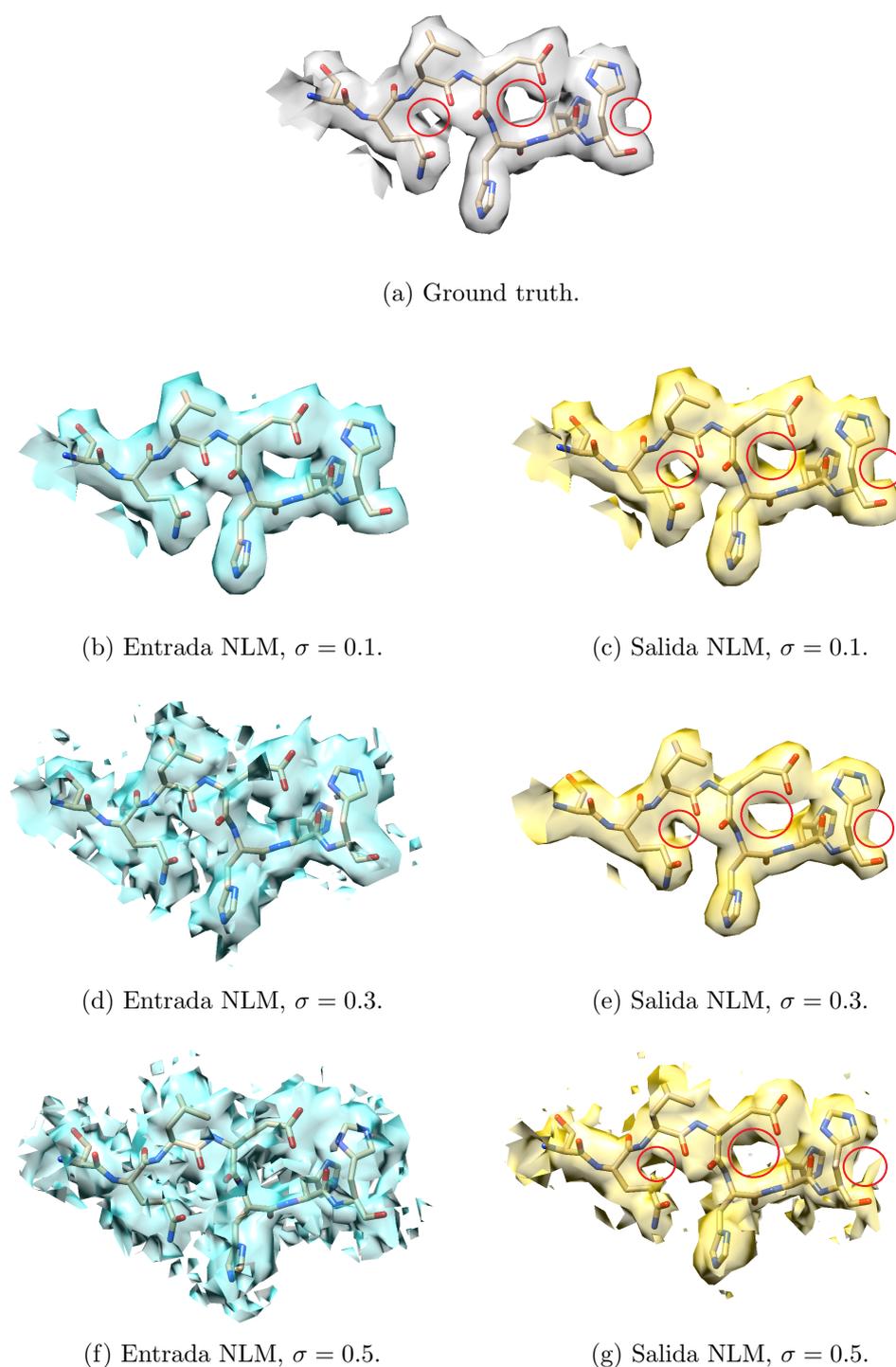


Figura 5.7: Evaluación cualitativa del desempeño de NLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.

5.3. Block-Matching and 4D Filtering

BM4D extiende la idea básica de NLM incorporando un filtrado más avanzado que el promediado llamado filtrado colaborativo. El algoritmo consta de dos pasos de agrupación en bloques de vecindarios similares, filtrado colaborativo y agregación de resultados. En el primero se obtiene una versión preliminar del volumen sin ruido que luego es utilizada en el segundo para aplicar un mejor filtrado al volumen ruidoso, obteniendo así la restauración final.

Elección de Parámetros

De forma análoga a los experimentos realizados para NLM, se aplica BM4D para distintos p_s y w_s sobre el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 Å con ruido agregado de $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. La Figura 5.8 muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de los distintos valores de los parámetros para el caso $\sigma = 0.3$.

En la Figura 5.8b se observa que para todos los valores de w_s considerados, cuanto mayor es p_s , peor es el desempeño de BM4D. Este resultado coincide con el de NLM y su justificación es la misma, al considerar tamaños de vecindario pequeños es más probable encontrar estructuras similares y por lo tanto el algoritmo cuenta con más información para hacer la restauración, lo cual se traduce en un mejor desempeño en la restauración.

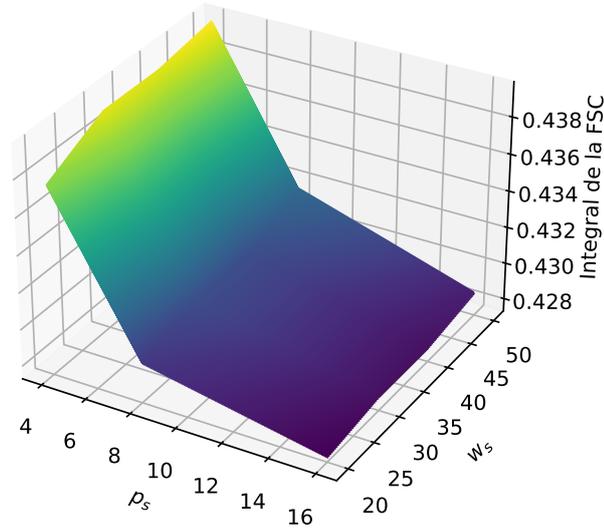
Por otro lado, en la Figura 5.8c se observa que para todos los valores de p_s considerados, cuanto mayor es w_s , mejor es el desempeño de BM4D. Este resultado difiere del hallado para NLM, en donde el efecto de borroneo por promediado obliga a considerar ventanas de búsqueda más pequeñas y por lo tanto a desaprovechar parte de la auto-similitud en la estructura. Sin embargo, BM4D utiliza un filtrado más avanzado que el promediado llamado filtrado colaborativo. Este filtrado permite aprovechar la señal compartida entre vecindarios similares a la vez que preserva las características únicas de cada vecindario [47]. De esta forma, agrandar w_s e incorporar más vecindarios en la comparación permite reducir en mayor medida el ruido, a la vez que se preservan los detalles de cada vecindario.

A partir de los resultados presentados en la Figura 5.8 se concluye que la elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño del algoritmo es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 50$. En los siguientes experimentos se evalúa el desempeño de BM4D con dichos parámetros.

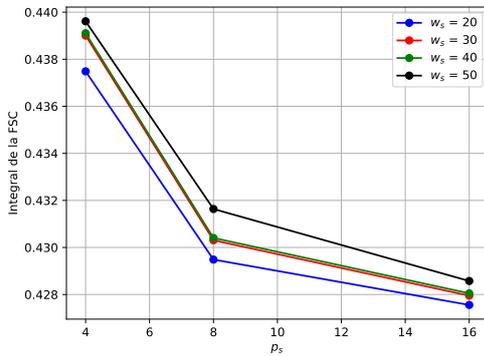
Desempeño con la Mejor Elección de Parámetros

En la Figura 5.9 se grafica la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por BM4D para $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. En todos los casos se comprueba que la resolución de la estructura restaurada es mejor que la resolución de la estructura de entrada, ya que la curva de FSC toma valores más altos para un rango mayor de frecuencias.

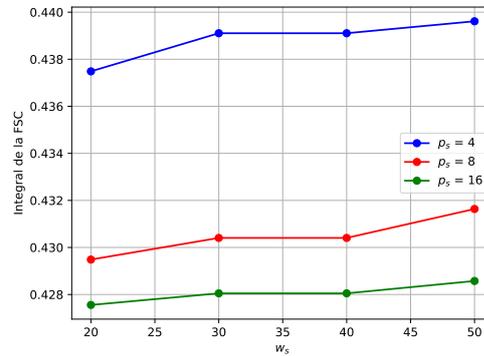
Análogamente al análisis realizado para NLM, en la Figura 5.10a se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por BM4D para $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. A partir de estos resultados y utilizando la fórmula (5.1), en la Figura 5.10b se grafica el incremento porcentual de resolución alcanzado por el algoritmo para cada valor de σ . Nuevamente se observa para todos los niveles de ruido que la resolución de la estructura restaurada es mejor que la resolución de la estructura de entrada. De forma similar al caso de NLM, a medida que se aumenta el nivel de ruido en la estructura de entrada el incremento de resolución logrado por BM4D es cada vez más significativo, alcanzando un máximo de 35% para $\sigma = 0.7$ y $\sigma = 0.9$ y luego decreciendo ligeramente para estructuras de entrada muy ruidosas. Estos resultados muestran que el desempeño de BM4D es muy bueno, alcanzándose una mejora de resolución significativa para estructuras de entrada con ruido de



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s y w_s .



(b) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s .



(c) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de w_s .

Figura 5.8: Desempeño de BM4D para distintos p_s y w_s sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 50$.

desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$. En comparación con NLM, BM4D es mucho más robusto al ruido en la estructura de entrada.

En la Figura 5.11 se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada por BM4D para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. En todos los casos BM4D logra disminuir gran parte del ruido en la estructura de entrada, siendo peores los resultados cuanto más grande la desviación estándar del ruido. En particular, en la restauración para $\sigma = 0.5$ se pierden algunos detalles de la señal que sí aparecen en el *ground truth*. Se resaltan con un círculo rojo algunas zonas de la molécula en las que se aprecia bien esta diferencia.

Correr BM4D con $p_s = 4$ y $w_s = 50$ sobre la beta-gal en el *cluster* de *Duke University* con 300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo insume 4 horas 10 minutos.

5.3. Block-Matching and 4D Filtering

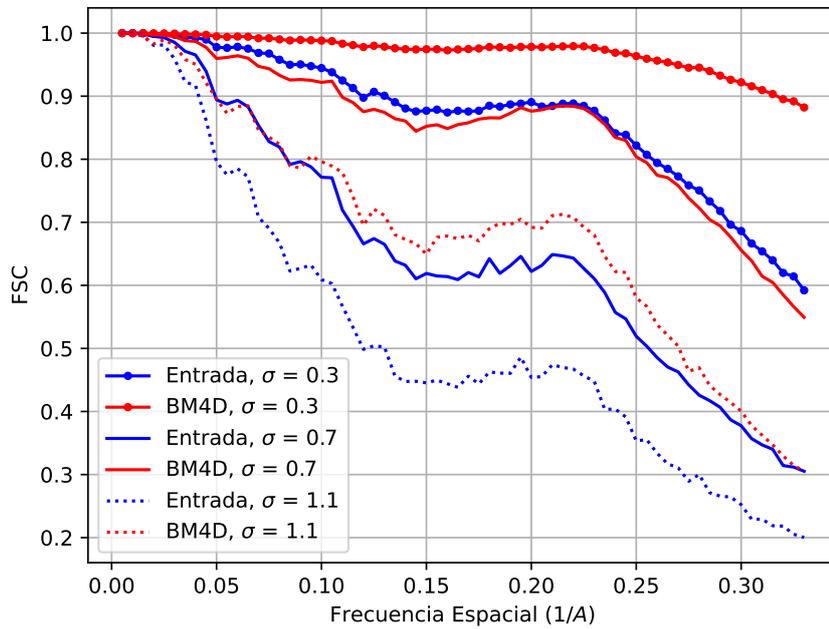
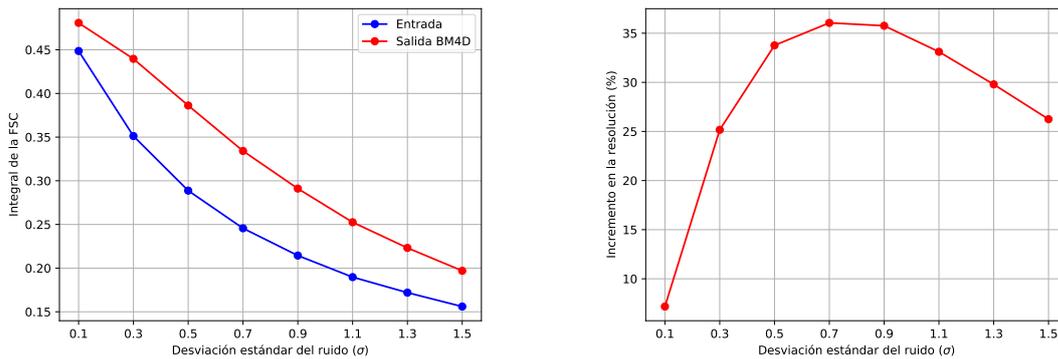


Figura 5.9: Corrida de BM4D sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por BM4D en función de σ .

(b) Incremento porcentual en la resolución alcanzado por BM4D en función de σ .

Figura 5.10: Evaluación cuantitativa del desempeño de BM4D sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por BM4D es significativo (mayor a 10%) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$.

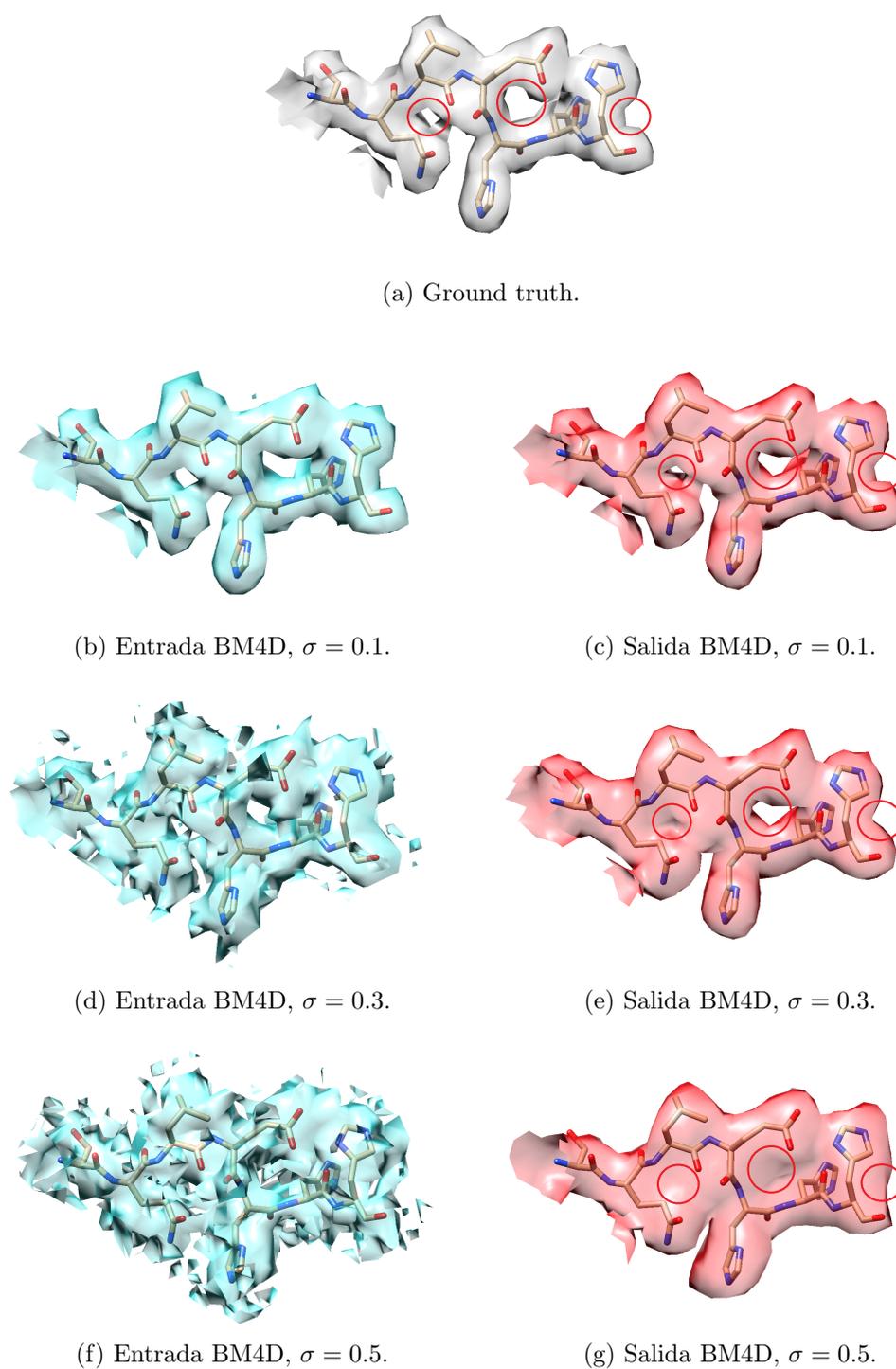


Figura 5.11: Evaluación cualitativa del desempeño de BM4D sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.

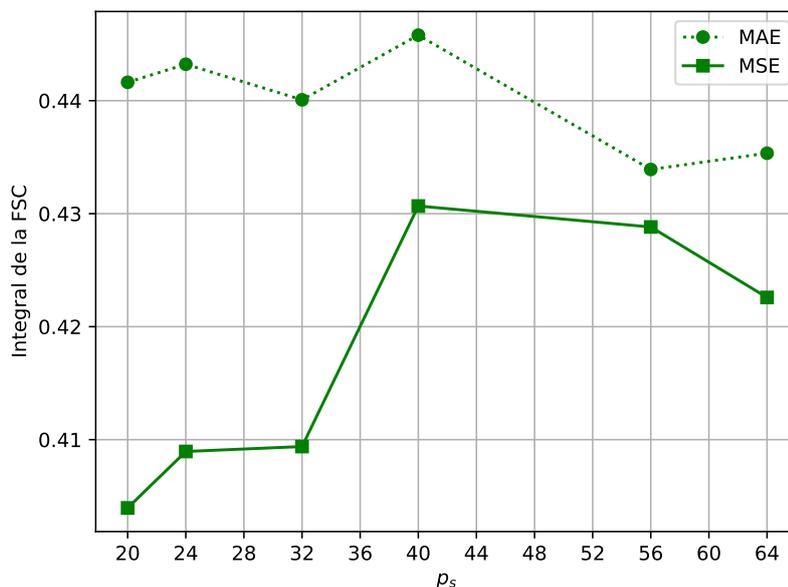


Figura 5.12: Desempeño de N2V para distintos p_s y funciones de costo sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s para MAE y MSE. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 40$ y MAE como función de costo.

5.4. Noise2Void

N2V es un método de aprendizaje profundo que divide el volumen ruidoso en vecindarios de tamaño fijo y predice el valor de cierta cantidad de vóxeles en cada uno de ellos a partir del valor de los demás vóxeles del vecindario. El entrenamiento de la red se realiza minimizando una función de costo entre cada predicción y el verdadero valor del vóxel.

Elección de Parámetros

A continuación, se explora el desempeño del algoritmo al variar el tamaño de los vecindarios ($p_s \times p_s \times p_s$) y la función de costo, que puede ser el error cuadrático medio (MSE, por sus siglas en inglés) o el error absoluto medio (MAE, por sus siglas en inglés).

Se aplica N2V sobre el MRC de la beta-gal a resolución 3 Å degradada con ruido de desviación estándar $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$, para diferentes p_s y con ambas funciones de costo. La red es entrenada durante 50 épocas con un *learning rate* de 0.0005 usando el 90 % de los vecindarios; con el 10 % restante se valida el entrenamiento. Para todos los niveles de ruido considerados se obtienen resultados similares a los de la Figura 5.12, que muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de los distintos valores de los parámetros para el caso $\sigma = 0.3$. El mejor desempeño del algoritmo se obtiene utilizando MAE como función de costo y $p_s = 40$. Esto es razonable, puesto que si se elijen vecindarios muy pequeños se dispone de menos información para realizar la predicción, mientras que si se elijen vecindarios muy grandes se pierde la localidad de la estimación y ya no se cumple la hipótesis de señal correlacionada vóxel a vóxel.

Una vez fijados estos parámetros, se evalúa la mejora de resolución de la estructura restaurada para diferentes niveles de ruido en la estructura de entrada.

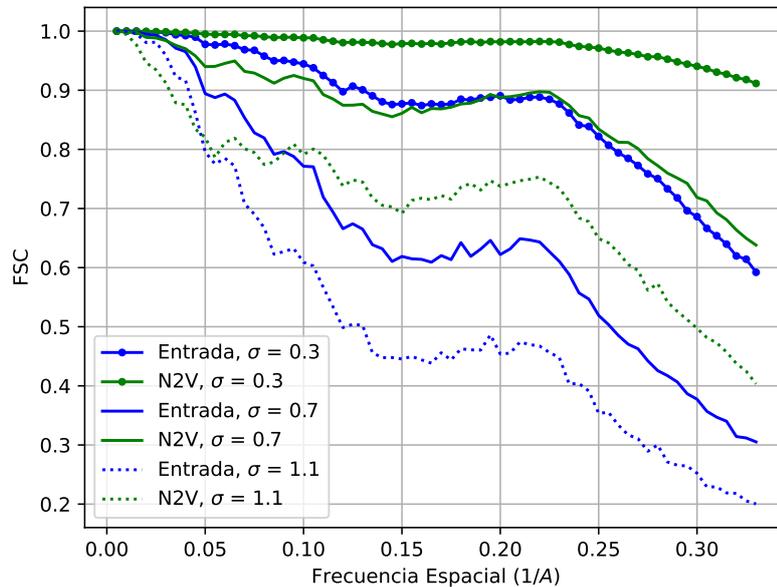


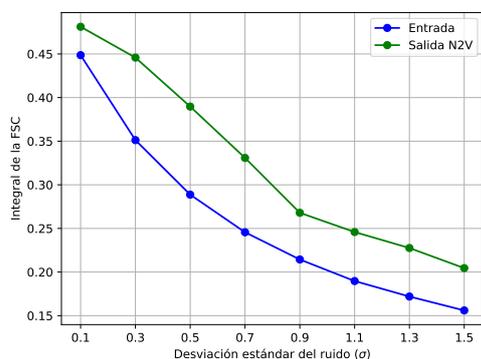
Figura 5.13: Corrida de N2V sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.

Desempeño con la Mejor Elección de Parámetros

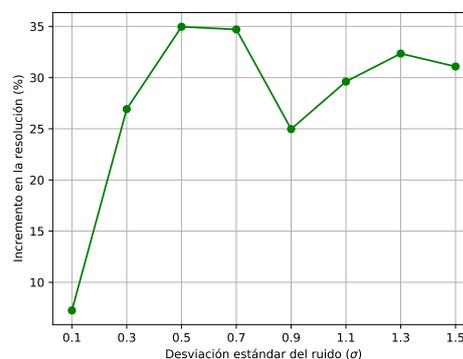
En la Figura 5.13 se muestra la FSC de la estructura de entrada y la estructura restaurada por N2V para $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. En todos los casos se obtiene una mejora en la resolución del volumen, que además aumenta para niveles de ruido más altos.

Al igual que para NLM y BM4D, en la Figura 5.14a se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por N2V para $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. A partir de estos resultados y utilizando la fórmula (5.1), en la Figura 5.14b se grafica el incremento porcentual de resolución alcanzado por el algoritmo para cada valor de σ . Se logra una mejora significativa de resolución para estructuras de entrada con desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$. El mínimo incremento se obtiene para $\sigma = 0.1$. Luego, a medida que se aumenta el nivel de ruido en la estructura de entrada el incremento de resolución logrado por N2V es cada vez más significativo, alcanzando un máximo de 35% para $\sigma = 0.5$ y $\sigma = 0.7$. Se observa una caída en el incremento porcentual de la resolución para $\sigma = 0.9$, aunque para niveles mayores de ruido la mejora de resolución vuelve a aumentar. Esto puede explicarse por la naturaleza estocástica de la implementación de N2V, que resulta del hecho de que en las distintas corridas del algoritmo, el entrenamiento de la red se realiza con distintos puntos ciegos seleccionados de forma aleatoria dentro de cada vecindario. Esto ocasiona que los resultados presenten ciertas oscilaciones. Al igual que BM4D, N2V es robusto al ruido en la estructura de entrada.

Con el fin de intentar mejorar aún más el desempeño del algoritmo, se explora la posibilidad de incrementar artificialmente la cantidad de datos de entrenamiento de la red. Por defecto la implementación incluye rotaciones cada 90° en el plano xy . Además, se agregan los reflejos respecto al eje z y se repite el mismo esquema para los planos yz y zx . En las Figuras 5.15a y 5.15b se constata un incremento de resolución con respecto al algoritmo sin modificar para todos los niveles de ruido en la estructura de entrada, siendo más notoria la mejoría para los niveles de ruido más altos. Sin embargo, al ir un paso más lejos y aplicar rotaciones cada 45° el desempeño del algoritmo se deteriora, presumiblemente debido a los errores de interpolación en la rotación

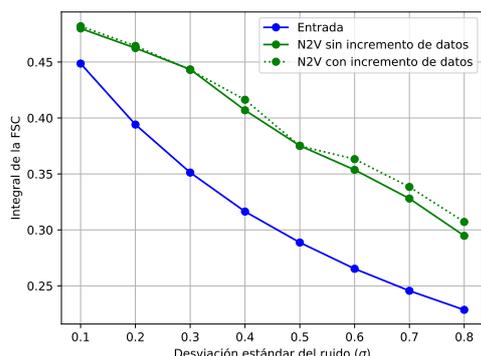


(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por N2V en función de σ .

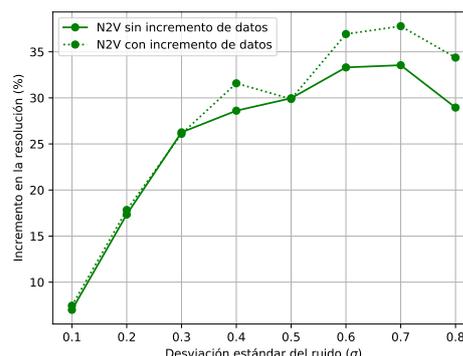


(b) Incremento porcentual en la resolución alcanzado por N2V en función de σ .

Figura 5.14: Evaluación cuantitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por N2V es significativo (mayor a 10%) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$.



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por N2V en función de σ .



(b) Incremento porcentual en la resolución alcanzado por N2V en función de σ .

Figura 5.15: Evaluación cuantitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido, incrementando la cantidad de datos de entrenamiento.

y a la introducción de una área vacía (sin señal ni ruido) en el vecindario.

Las pequeñas diferencias entre las curvas de las Figuras 5.14 y 5.15 se deben a la naturaleza estocástica del N2V mencionada anteriormente.

En la Figura 5.16 se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada comparada con la estructura restaurada por N2V, para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Al igual que en el caso de BM4D, se logra en todos los casos una disminución importante del ruido, siendo peores los resultados cuando más grande el σ . Se resaltan con un círculo rojo algunas zonas de la molécula en las que la restauración no logra preservar detalles de la molécula que sí se observan en el *ground truth*.

Correr N2V con vecindarios de tamaño 40 y MAE como función de costo sobre la beta-gal en el *cluster* de *Duke University* con 300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo insume 10 minutos.

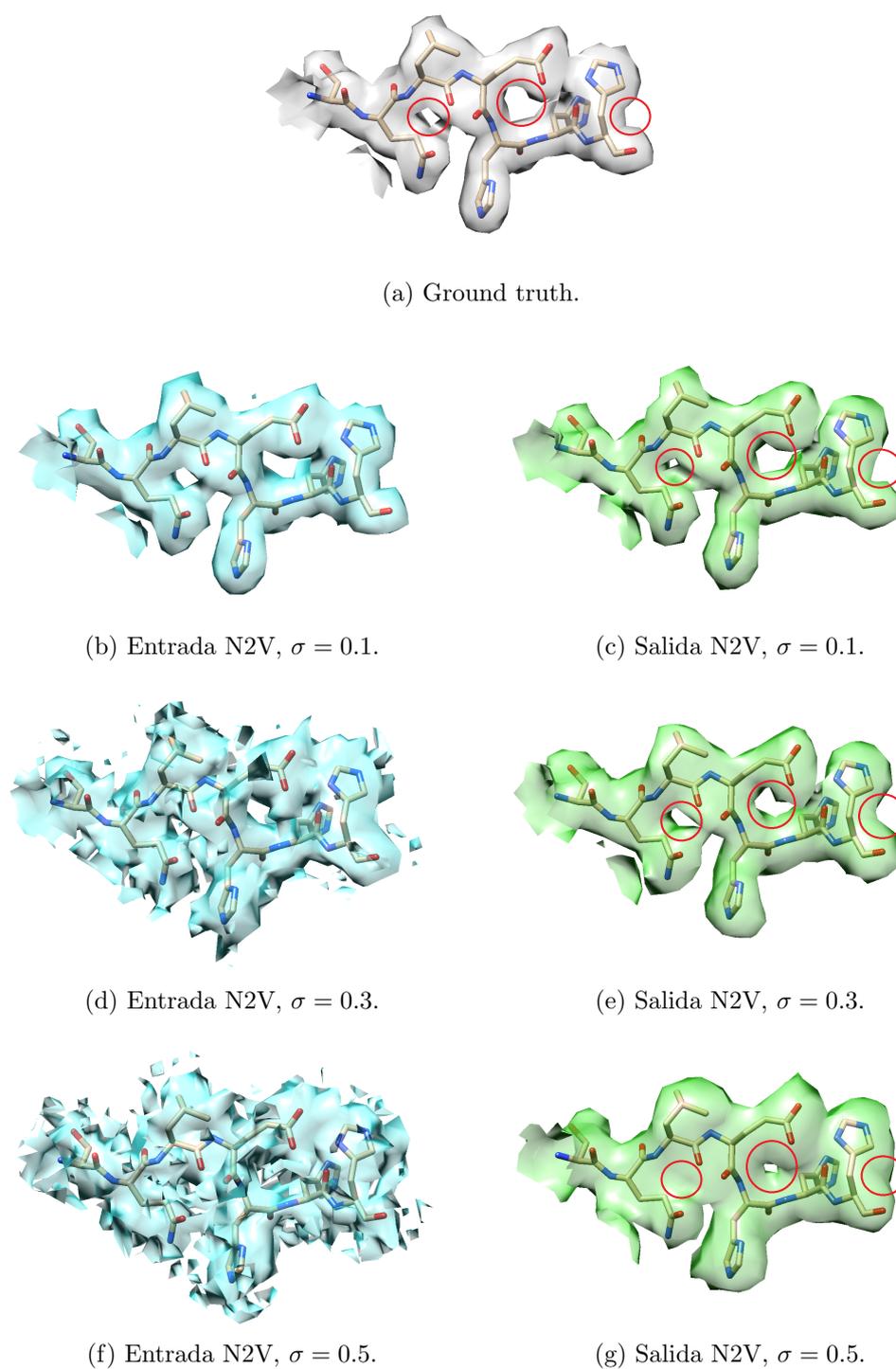


Figura 5.16: Evaluación cualitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.

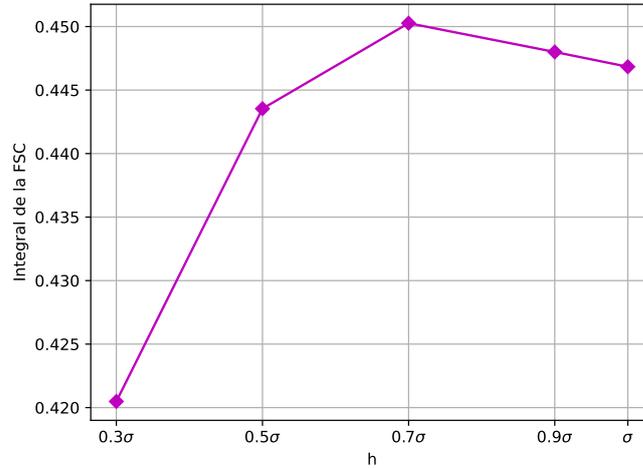


Figura 5.17: Desempeño de NNLM para distintos h sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h . Los mejores resultados se obtienen para $h = 0.7\sigma$.

5.5. Nuevo Non-Local Means

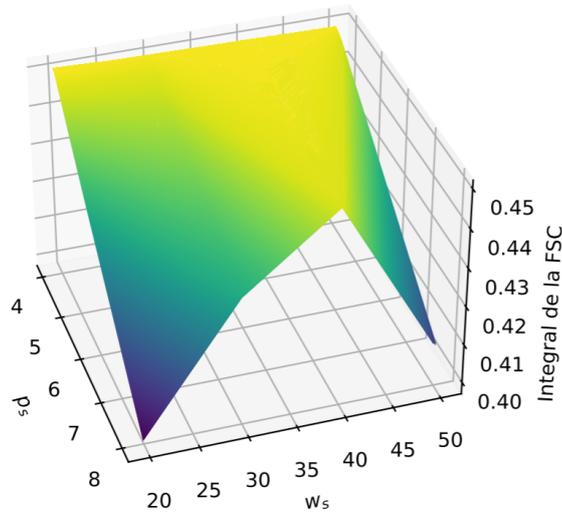
Como se explicó en la sección 4.2, la extensión de NLM invariante a rotaciones consiste en sustituir la medida de similitud de NLM tradicional por la propuesta en la ecuación (4.14).

La incorporación de la nueva medida de similitud involucra sumar en cada iteración del algoritmo una etapa de alineación de todos los vecindarios de la ventana de búsqueda con respecto al vecindario de referencia, ocasionando que el tiempo total de ejecución del algoritmo aumente considerablemente. Por esta razón, los experimentos en esta sección se realizan considerando vecindarios de referencia en una sección del volumen de tamaño $30 \times 30 \times 30$. Este tamaño es suficientemente grande como para que se logre apreciar claramente la calidad de la restauración en zonas donde hay señal y zonas donde no hay señal (fondo), pero a la vez lo suficientemente pequeño como para que el tiempo de ejecución sea razonable. Asimismo, al recorrer la ventana de búsqueda se eligen vecindarios cuyos centros están separados tres vóxeles en cada dirección entre sí. De esta forma se logra agilizar aún más el tiempo de ejecución del algoritmo.

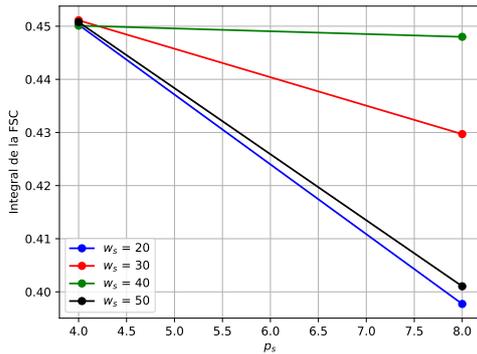
Los principales parámetros que se pueden ajustar en NNLM son el p_s , el w_s y el h .

De forma análoga al análisis realizado para NLM tradicional, se inicia explorando la mejor elección del parámetro h . Para ello se corre el NNLM sobre el MRC de la beta-gal generado a resolución 3 \AA con ruido agregado de $\sigma = 0.3$ para $h = \{0.1\sigma, 0.3\sigma, \dots, \sigma\}$. En la Figura 5.17 se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h y se verifica que el mejor desempeño del algoritmo se obtiene para $h = 0.7\sigma$. Como se comprobó en la sección 4.3, al incorporar invarianza a rotaciones NNLM es capaz de encontrar muchos más vecindarios similares al de referencia que NLM tradicional. Entonces, es razonable que en NNLM se pueda elegir un h ligeramente más restrictivo que en NLM tradicional, sin correr el riesgo de quedarse sin suficientes vecindarios para realizar la restauración. De esta forma, se prescinde de algunos vecindarios que no son tan similares al de referencia, mejorando así la calidad de la restauración. Los siguientes experimentos se realizan con $h = 0.7\sigma$.

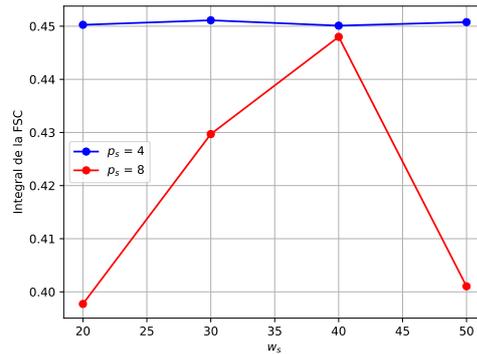
Una vez identificado el mejor valor de h , resta determinar el p_s y el w_s que resultan en un mejor desempeño del algoritmo. La Figura 5.18 muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada por NNLM para distintos p_s y el w_s para el caso $\sigma = 0.3$.



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s y w_s .



(b) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s .



(c) Integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función del tamaño de w_s .

Figura 5.18: Desempeño de NNLM para distintos p_s y w_s sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. El mejor desempeño se obtiene con $p_s = 4$. La diferencia de desempeño para distintos w_s con $p_s = 4$ no es significativa.

En la Figura 5.18b se observa que para todos los valores de tamaño de w_s considerados, cuanto mayor es p_s , peor es el desempeño de NNLM. Este resultado coincide con el hallado para NLM tradicional y para BM4D. Si bien NNLM es invariante a rotaciones, se sigue cumpliendo que al considerar tamaños de vecindario pequeños, es más probable encontrar estructuras similares y por lo tanto el algoritmo es capaz de recoger más información para hacer la restauración.

Por otro lado, en la Figura 5.18c se observa que para $p_s = 8$ el mejor desempeño del algoritmo se obtiene para $w_s = 40$, mientras que para $p_s = 4$ no hay grandes diferencias en el desempeño del algoritmo al variar w_s . Al incorporar invarianza a rotaciones, interpretar los resultados no es trivial ya que el análisis de los parámetros no resulta intuitivo. Hay dos factores determinantes que influyen en direcciones opuestas en el desempeño de los algoritmos. Por un lado, incrementar w_s permite incorporar más vecindarios en la ponderación y recoger más información para realizar la restauración, pero a la vez, incluir vecindarios que no contienen los

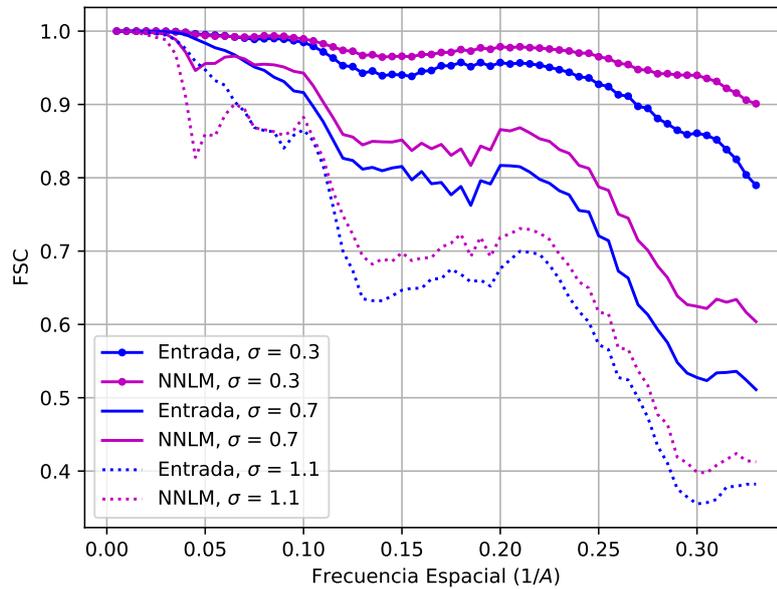


Figura 5.19: Corrida de NNLM sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.

mismos detalles que el vecindario de referencia genera un efecto de borroneo por promediado. En el caso de $p_s = 4$, seguramente tomando una ventana de búsqueda pequeña ya haya suficientes vecindarios similares al de referencia como para hacer una buena restauración y por lo tanto, incrementar el tamaño de la ventana de búsqueda no tiene gran impacto. No obstante, cuanto más grandes son las estructuras que se comparan, más difícil resulta encontrar vecindarios similares al de referencia y por ende hay que ir a buscarlos más lejos. Es entonces razonable que para $p_s = 8$ sea más conveniente considerar ventanas de búsqueda más grandes.

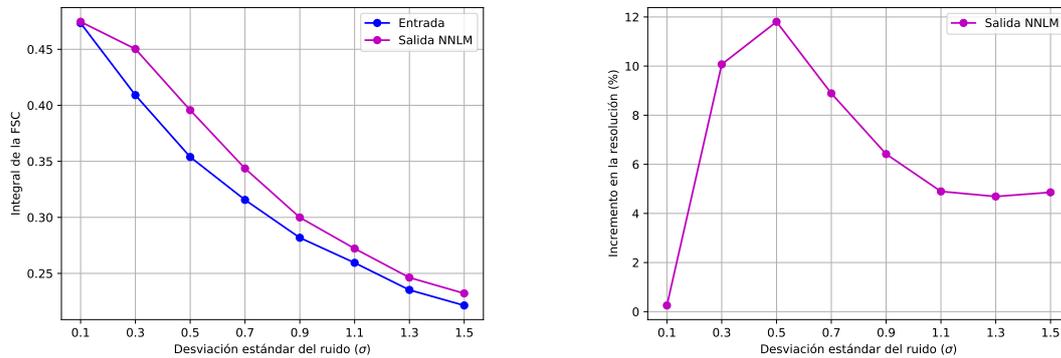
Se concluye que la mejor elección de parámetros teniendo en cuenta los tiempos de ejecución del algoritmo y los resultados presentados en la Figura 5.18, es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 20$. En los siguientes experimentos se evalúa el desempeño de NNLM con estos parámetros.

En la Figura 5.19 se grafica la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NNLM para $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. En los tres casos se observa que la resolución de la estructura restaurada es mejor que la resolución de la estructura de entrada.

Para tener una noción cuantitativa de la mejora de resolución que alcanza el algoritmo, en la Figura 5.20a se grafica la integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NNLM para $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$. A partir de estos resultados y utilizando la fórmula (5.1), en la Figura 5.20b se grafica el incremento porcentual de resolución alcanzado por el algoritmo para cada valor de σ . Los resultados obtenidos son muy similares a los hallados para NLM tradicional. Para $\sigma = 0.1$, la mejora de resolución es insignificante, lo cual es razonable ya que al haber tan poco ruido en la estructura, el margen de mejora es mínimo. Para $\sigma = 0.3$ y $\sigma = 0.5$ se obtienen los máximos incrementos de resolución, de 10% y 12% respectivamente. Luego, al igual que para NLM tradicional, el desempeño del algoritmo disminuye considerablemente al aumentar el nivel de ruido en la estructura de entrada. Esto demuestra que NNLM también es poco robusto al ruido en la estructura de entrada.

Finalmente, resulta fundamental resaltar que hacer disminución de ruido sobre una sección

Capítulo 5. Evaluación del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM



(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por NNLM en función de σ . (b) Incremento porcentual en la resolución alcanzado por NNLM en función de σ .

Figura 5.20: Evaluación cuantitativa del desempeño de NNLM sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ degradada con distintos niveles de ruido.

de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ en lugar de sobre la estructura entera repercute directamente en la calidad de la restauración. En la Figura 5.20b se observa que el máximo incremento de resolución alcanzado por NNLM es de 12% aproximadamente, mientras que para niveles de ruido mayores la mejora está en el orden de 5%. Estos valores contrastan fuertemente con las mejoras de alrededor de 30% alcanzadas por los demás algoritmos corridos sobre la estructura entera. Esto puede explicarse por el hecho de que todos los algoritmos analizados eliminan muy bien el ruido de fondo, es decir, el ruido en las zonas donde no hay señal. Sin embargo, su desempeño no es tan bueno al restaurar vóxeles que contienen una señal degradada con ruido. Intuitivamente, se puede pensar en el concepto de mejora de resolución local. En las zonas donde no hay señal (únicamente ruido) el incremento de resolución es muy bueno, mientras que en las zonas donde hay una señal degradada con ruido, el incremento de resolución es considerablemente menor. Cuando se corre un algoritmo sobre la beta-gal completa, se puede medir la mejora de resolución global en toda la estructura, incluyendo zonas donde hay señal y zonas donde hay únicamente ruido. Esta mejora de resolución global es notoriamente mayor que la mejora de resolución local sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ que contiene casi en su totalidad vóxeles donde hay señal.

En la Figura 5.21 se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada comparada con la estructura restaurada por NNLM, para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Para $\sigma = 0.1$ y $\sigma = 0.3$, NNLM logra disminuir gran parte del ruido en la estructura de entrada, conservando los detalles finos marcados con círculos rojos. Para $\sigma = 0.5$, si bien se recuperan bien las aberturas que presenta el *ground truth*, puede observarse ruido en zonas del volumen donde no hay señal.

Correr NNLM con parámetros óptimos sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ en el *cluster* de *Duke University*, con 300 GB de RAM y paralelizando la ejecución en 21 equipos con 70 CPUs cada uno, insume 1 hora.

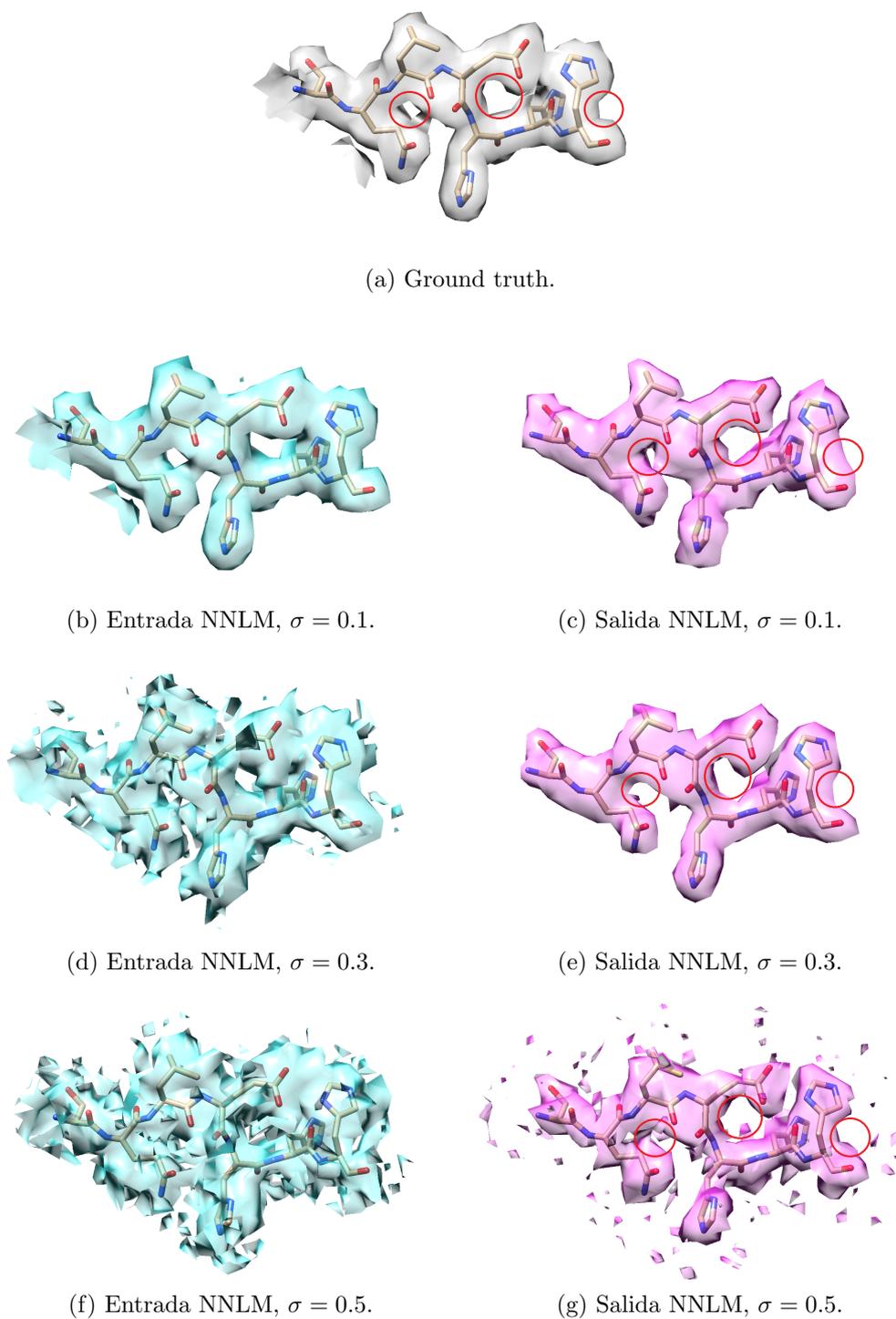


Figura 5.21: Evaluación cualitativa del desempeño de NNLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.

Capítulo 5. Evaluación del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM

	p_s	w_s	h
NLM	4	20	0.8σ
BM4D	4	50	No corresponde
N2V	40	No corresponde	No corresponde
NNLM	4	20	0.7σ

Tabla 5.1: Elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre la beta-gal.

5.6. Comparación entre los Algoritmos

La Tabla 5.1 resume la elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño de NLM, BM4D, N2V y NNLM.

Como se muestra en la Tabla 5.1, en el caso de NLM, BM4D y NNLM el tamaño de vecindario óptimo es $p_s = 4$. Sin embargo, las implementaciones de NLM y NNLM trabajan solamente con tamaños de vecindario impares, por lo que el tamaño de vecindario óptimo en estos casos es realmente $p_s = 5$. En la Tabla 5.2 se muestra el tamaño en Ångström de cada uno de los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza, calculado como el tamaño del menor prisma que puede encerrar cada aminoácido. De manera general, es importante resaltar que los tamaños de los aminoácidos son muy similares al tamaño de vecindario óptimo obtenido para NLM, BM4D y NNLM. En otras palabras, con la mejor elección de p_s , la restauración se hace comparando vecindarios que encierran en algunos casos aminoácidos, y en otros, partes de aminoácidos. En particular, los aminoácidos de tipo ALA, GLY, PRO, SER y THR quedarían completamente contenidos dentro de un vecindario de referencia de tamaño $5 \times 5 \times 5$. Es importante recordar que todos los aminoácidos tienen la misma estructura (grupo amino y grupo carboxilo) y difieren únicamente en su cadena lateral (que está unida al carbono α) (Ver Figura 1.1a). Esto significa que considerando tamaños de vecindario menores al tamaño de los aminoácidos, también se pueden encontrar subestructuras similares que pueden aprovecharse para realizar la restauración del volumen.

Para comparar el desempeño de NLM, BM4D, N2V y NNLM, se evalúa el incremento de resolución alcanzado por cada uno de ellos al aplicarlos con los parámetros óptimos sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido gaussiano. Correr NNLM con parámetros óptimos sobre la beta gal entera y utilizando todos los recursos disponibles del *cluster* de *Duke University* insume 120 horas, mientras que correrlo sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ insume 1 hora. Teniendo en cuenta las restricciones temporales del proyecto, sólo se alcanzó a correr este algoritmo para la beta-gal entera degradada con ruidos de desviación estándar $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Por lo tanto, en esta sección se compara, por un lado, el desempeño de los cuatro algoritmos sobre la beta-gal entera con ruidos de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$ y, por otro, el desempeño de los cuatro algoritmos sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ degradada con ruidos de $\sigma = \{0.1, 0.3, \dots, 1.5\}$.

La Figura 5.22 muestra el desempeño de NLM, BM4D, N2V y NNLM en función del nivel de ruido en la estructura de entrada para la beta-gal entera y para la sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$. En ambos casos se observa que para los niveles de ruido más bajos, la mejora de resolución de todos los algoritmos es muy similar. Sin embargo, para $\sigma \geq 0.5$, el desempeño de NNLM y NLM tradicional se degrada notoriamente respecto al desempeño de BM4D y N2V. Para los niveles de ruido más altos N2V logra los mejores resultados, superando ampliamente a los demás algoritmos.

Los resultados presentados en la Figura 5.22 muestran que NNLM y NLM tradicional son

5.6. Comparación entre los Algoritmos

Aminoácidos	Δx	Δy	Δz
ALA	4	4	5
ARG	5	8	6
ASN	5	5	6
ASP	5	5	6
GLN	4	6	7
GLU	6	6	7
GLY	4	3	4
HIS	6	6	5
ILE	5	5	3
LEU	5	5	6
LYS	7	5	8
MET	7	4	5
PHE	3	6	7
PRO	4	5	4
SER	5	5	3
THR	4	3	5
TRP	8	6	5
TYR	6	4	10
VAL	5	4	6

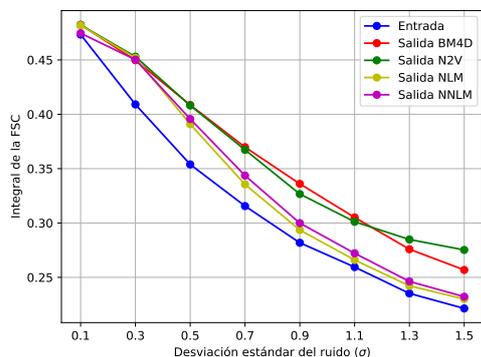
Tabla 5.2: Tamaño en Å de cada uno de los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza, calculado como el tamaño del menor prisma que puede encerrar cada aminoácido.

poco robustos a niveles de ruido altos en la estructura de entrada. Esto puede explicarse recordando la sección 4.3, en la que se verifica que la calidad de la alineación entre vecindarios en NNLM se degrada considerablemente al aumentar el nivel de ruido en la estructura de entrada. Esto significa que si el nivel de ruido que afecta la señal es muy grande, el NNLM pierde la capacidad de alinear correctamente los vecindarios en la ventana de búsqueda y por lo tanto pierde la cualidad de invarianza a la rotación. Por la forma en que se planteó la medida de similitud para el NNLM en la ecuación (4.14), si la calidad de la alineación es mala, el NNLM coincide con el NLM tradicional, siendo entonces razonable que si NLM es poco robusto al ruido, NNLM también lo sea.

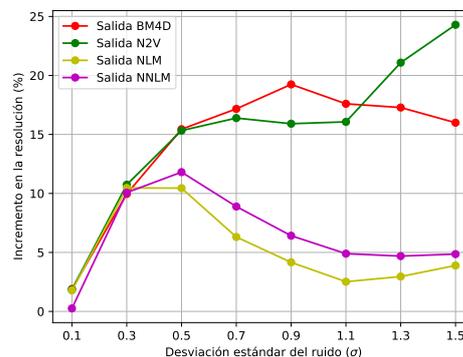
Para complementar las Figuras 5.22b y 5.22d, en la Tabla 5.3 se muestra el valor numérico de incremento porcentual de resolución alcanzado por cada algoritmo para cada nivel de ruido en la sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ y en la beta-gal entera. Es importante resaltar que tanto en la sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ como en la beta-gal entera, el desempeño de NNLM es considerablemente superior al de NLM para $0.5 \leq \sigma \leq 1.5$ y para $0.5 \leq \sigma \leq 1.1$ respectivamente. Esto demuestra la importancia de introducir una medida de similitud entre vecindarios invariante a rotaciones para aprovechar mejor la redundancia presente en la señal.

En la Figura 5.23 se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada por cada algoritmo para distintos niveles de ruido, con el fin de comparar cualitativamente los resultados obtenidos y complementar las medidas de desempeño cuantitativas presentadas anteriormente. En particular se muestra el *ground truth*, las estructuras ruidosas de entrada y las estructuras restauradas por NLM, BM4D, N2V y NNLM para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1\}$. En todos los casos se resaltan con círculos rojos zonas de interés para ayudar en la comparación visual de los resultados.

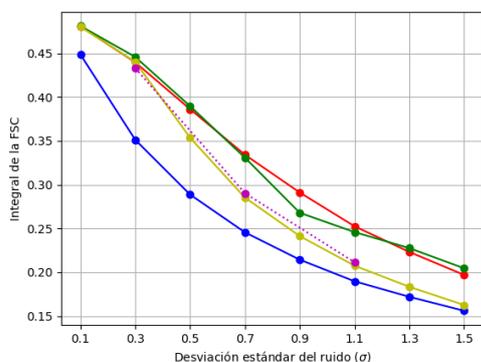
Capítulo 5. Evaluación del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM



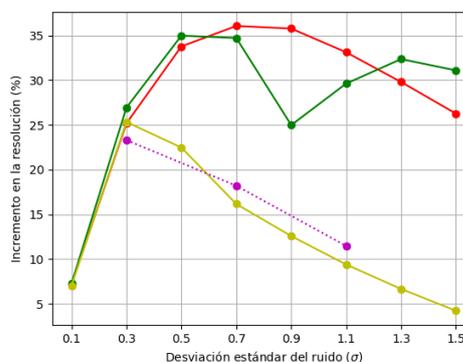
(a) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada.



(b) Incremento porcentual en la resolución.



(c) Integral bajo la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada.



(d) Incremento porcentual en la resolución.

Figura 5.22: Evaluación del incremento de resolución logrado por NLM, NNLM, BM4D y N2V en función del nivel de ruido en la estructura de entrada. Arriba: Sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$. Abajo: Beta-gal entera.

En líneas generales, lo primero que salta a la vista de la Figura 5.23 es que tanto BM4D como N2V son mucho más robustos al ruido en la estructura de entrada que NLM y NNLM, lo cual concuerda con los resultados cuantitativos.

Más específicamente, para $\sigma = 0.1$ se aprecia que las estructuras restauradas por los cuatro algoritmos son muy similares entre sí y al *ground truth*. En este caso es difícil identificar qué algoritmo tiene mejor desempeño porque al ser tan pequeño el ruido en la estructura de entrada, no hay mucho margen de mejora.

Para $\sigma = 0.3$ se empiezan a notar diferencias en las restauraciones de los distintos algoritmos. Al observar las zonas marcadas con círculos rojos, se puede apreciar que BM4D y N2V pierden detalles importantes de la señal, mientras que NLM y NNLM logran restaurar las aberturas que aparecen en el *ground truth*. Si bien cuantitativamente para $\sigma = 0.3$ N2V tenía el mejor desempeño (5.3), cualitativamente la restauración de NLM y NNLM parece ser de mejor calidad, ya que se tiene en cuenta la detección de estructuras relevantes. La importancia de dichas estructuras fue basada en la valoración experta de los tutores.

Si se sigue aumentando el nivel de ruido, para $\sigma = 0.5$ se puede ver que NLM y NNLM no son capaces de eliminar completamente el ruido de fondo en zonas donde no hay señal, pero sí

5.6. Comparación entre los Algoritmos

Sección de la beta-gal					Beta-gal entera				
σ	NLM	BM4D	N2V	NNLM	σ	NLM	BM4D	N2V	NNLM
0.1	1.78	1.89	1.85	0.25	0.1	7.02	7.17	7.25	-
0.3	10.46	9.95	10.73	10.07	0.3	25.32	25.17	26.93	23.29
0.5	10.44	15.44	15.33	11.80	0.5	22.46	33.77	34.97	-
0.7	6.03	17.16	16.38	8.89	0.7	16.15	36.05	34.70	18.19
0.9	4.16	19.24	15.91	6.41	0.9	12.56	35.76	24.97	-
1.1	2.51	17.59	16.06	4.89	1.1	9.38	33.11	29.61	11.46
1.3	2.96	17.28	21.08	4.68	1.3	6.65	29.79	32.35	-
1.5	3.89	15.99	24.29	4.85	1.5	4.21	26.25	31.08	-
Promedio	5.3	14.3	15.2	6.5	Promedio	12.9	28.4	27.7	No corresponde

Tabla 5.3: Incremento porcentual de resolución alcanzado por NLM, BM4D, N2V y NNLM para cada nivel de ruido en la estructura de entrada. Se muestran los resultados sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ y sobre la beta-gal entera.

logran restaurar las aberturas presentes en el *ground truth*. En BM4D y N2V se aprecia una gran suavidad en los bordes del volumen y se logra eliminar el ruido de fondo, pero al fijarse en las zonas marcadas con círculos rojos, se observa que se pierde información de la señal. Cuantitativamente BM4D y N2V mostraban un desempeño muy superior a NLM y NNLM, pero cualitativamente se observa que estos últimos logran recuperar mucho mejor los detalles finos de la señal.

Para $\sigma = 0.7$ y $\sigma = 1$, se verifican comportamientos similares a los relatados anteriormente. Por un lado, el desempeño de NLM y NNLM se degrada enormemente para niveles de ruido en la entrada elevados. Por su parte, BM4D y N2V devuelven volúmenes muy suaves, a costa de perder ciertos detalles de la señal. Por ejemplo, hay zonas en las que el MRC no cubre el modelo atómico, lo cual significa que se está eliminando, además de ruido, información de la señal.

Del análisis cualitativo se desprende que la red neuronal en N2V, y el pasaje al espacio transformado en BM4D, imponen una regularización en los resultados que conduce a que se pierdan los cambios rápidos en la señal. El suavizado en el volumen restaurado por estos algoritmos puede ser contraproducente para la identificación de la estructura atómica en el caso del estudio de una macromolécula desconocida. En términos sencillos, una superficie muy suavizada podría corresponder a muchos aminoácidos distintos, en cambio una superficie que preserva detalles finos (por ejemplo una abertura), aunque tenga un poco de ruido, facilita la identificación del aminoácido que está en esa ubicación.

La Tabla 5.4 muestra los tiempos de ejecución de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM al aplicarlos sobre la beta-gal completa tomando la mejor elección de parámetros para cada uno de ellos. NLM, BM4D y N2V fueron corridos solicitando los mismos recursos y sin paralelizar, mientras que NNLM fue corrido paralelizando la ejecución en 21 equipos con 70 CPUs cada uno. Se observa que los tiempos de ejecución de los algoritmos difieren en órdenes de magnitud. Particularmente el tiempo de ejecución de NNLM es abismalmente superior al de los demás algoritmos. Como se mencionó anteriormente, esto se debe a que la incorporación de la invarianza a rotación involucra sumar en cada iteración del algoritmo una etapa de alineación de todos los vecindarios de la ventana de búsqueda con respecto al vecindario de referencia, ocasionando que el tiempo total de ejecución del algoritmo escale enormemente.

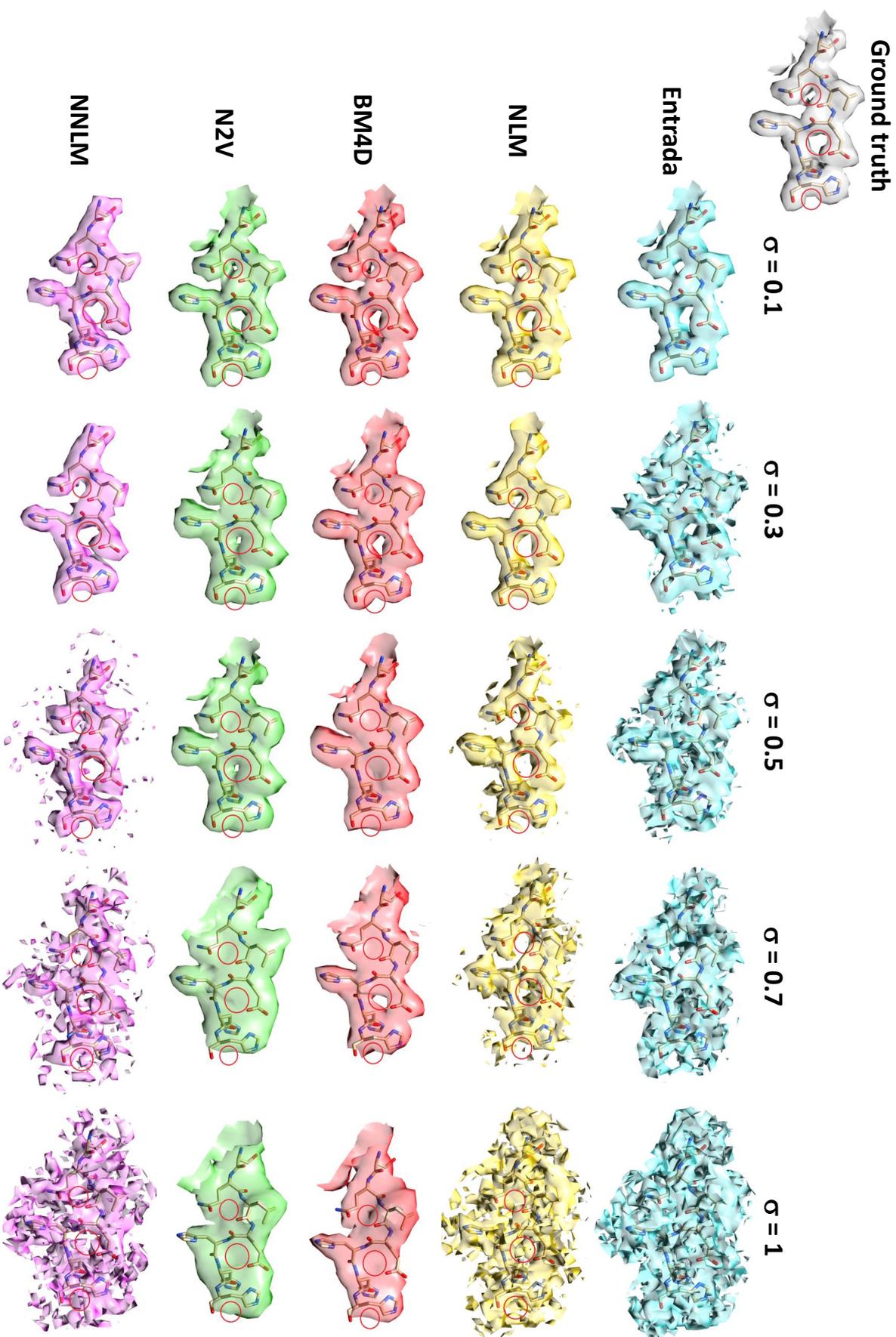


Figura 5.23: Comparación cualitativa de la calidad de la restauración de NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1\}$. Con un círculo rojo se resaltan zonas en las se pierden detalles en la restauración al aumentar el nivel de ruido. Umbral = 0.3.

5.6. Comparación entre los Algoritmos

Algoritmo	Recursos Utilizados	Tiempo de Ejecución
NLM	300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo	20 horas
BM4D	300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo	4 horas
N2V	300 GB de RAM, 1 nodo y 1 núcleo con 1 GPU	10 minutos
NNLM	300 GB de RAM, 21 equipos con 70 CPUs cada uno	120 horas

Tabla 5.4: Tiempo de ejecución de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM al correrlos sobre la beta-gal completa tomando la mejor elección de parámetros.

Capítulo 6

Resultados Preliminares del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre Datos Reales

Los experimentos del capítulo 5 fueron realizados sobre el MRC de la beta-gal generado a partir del PDB con distintos niveles de ruido gaussiano de media nula agregado. Esta decisión se tomó con el fin de trabajar en un contexto controlado donde se conocía la estadística del ruido que degradaba la señal. No obstante, el fin último de este trabajo es que los algoritmos analizados puedan aplicarse sobre MRC reales obtenidos con criomicroscopía electrónica para mejorar su resolución. Si bien esta es una línea de investigación en sí misma donde hay mucho por explorar, en este capítulo se presenta una prueba de concepto en la que se evalúa el desempeño de NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre el MRC de la beta-gal a resolución 2.2 Å descargado del EMDB [23]. Como se mencionó en el capítulo 2, este MRC contiene ruido inherente al proceso de reconstrucción del modelo tridimensional. En la Figura 6.1 se muestra una isosuperficie del MRC que se entrega como insumo a los algoritmos. Dicho volumen tiene un tamaño de $292 \times 292 \times 292$ píxeles, con un $v_s = 0.637$ Å.

Debido a las restricciones temporales del proyecto, no fue posible realizar un análisis minucioso para determinar la mejor elección de parámetros para estos datos de entrada. Por esta razón, se fijan los parámetros de los algoritmos en base a los valores óptimos hallados en el capítulo 5. Como el v_s en este caso es aproximadamente la mitad que el de los volúmenes trabajados en la capítulo 5, se decide considerar $p_s = 8$ (el doble que en el capítulo 5) para BM4D, NLM y NNLM. De esta forma, se logra que los vecindarios encierren estructuras de aproximadamente el mismo tamaño que en los experimentos sobre la beta-gal con ruido agregado. El resto de los parámetros para los cuatro algoritmos se toman igual que en la Tabla 5.1. Para reducir el tiempo de ejecución de los algoritmos, se procede de forma similar al análisis de NNLM, considerando vecindarios de referencia en una sección del volumen de tamaño $30 \times 30 \times 30$.

La mejora de resolución alcanzada por cada uno de los algoritmos se evalúa mediante la curva de FSC, igual que en el capítulo 5. Por un lado, se calcula la curva de FSC de la estructura ruidosa de entrada (X_R) con respecto a un *ground truth* (X_{GT}) que es el MRC de la beta-gal generado a resolución 2.2 Å a partir del PDB ($FSC(X_R, X_{GT})$), y por otro lado se calcula la curva de FSC de la estructura restaurada (X_D) por uno de los algoritmos con respecto al mismo *ground truth* ($FSC(X_D, X_{GT})$).

En la Figura 6.2a se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de las estructuras restauradas por cada uno de los algoritmos. Se observa que la resolución de las estructuras restauradas por los cuatro algoritmos es muy similar, motivo por el cual en la Figura 6.2b se

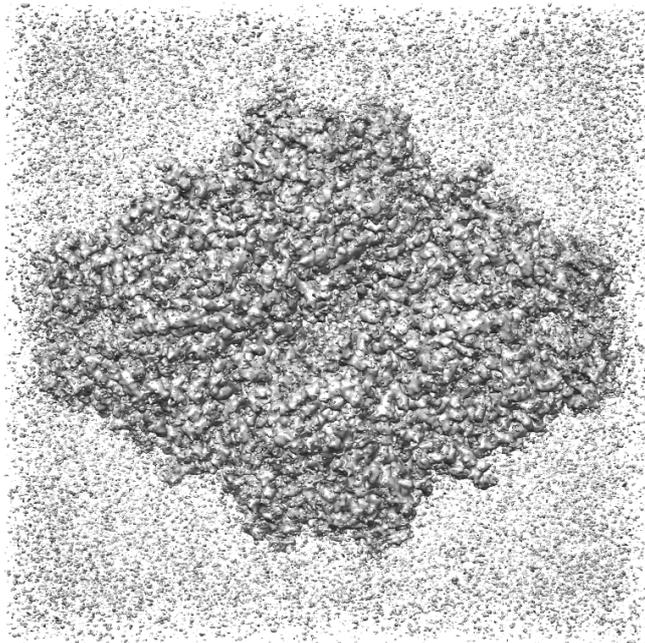


Figura 6.1: Isosuperficie (umbral= 0.005) del MRC de la beta-gal descargado del EMDB [23].

muestra un zoom donde se pueden apreciar mejor las diferencias. Si bien las curvas se mantienen prácticamente iguales, NLM y NNLM parecen tener un desempeño ligeramente superior que BM4D y N2V. Vale la pena destacar además que en este caso se está trabajando con una estructura cuya resolución es menor a la descrita anteriormente

Llaman la atención dos aspectos al comparar estos resultados con los presentados en el capítulo 5:

1. La mejora de resolución alcanzada por cualquiera de los algoritmos es mucho más significativa sobre la beta-gal con ruido agregado que sobre los datos reales. Esto se explica, por un lado, porque la resolución del MRC de la beta-gal descargado del EMDB es 2.2 Å, mientras que la del MRC de la beta-gal con ruido agregado es 3 Å. Cuanto mejor resolución tiene la estructura de entrada, más difícil resulta perfeccionarla, puesto que el margen de mejora es menor. Por otro lado, en el caso de los datos reales, no hay certeza de que la estadística del ruido cumpla con las hipótesis que establecen los algoritmos, por lo que su desempeño se puede ver fuertemente deteriorado.
2. En el caso de los datos reales, NLM y NNLM tienen un desempeño ligeramente superior que BM4D y N2V, mientras que sobre la beta-gal con ruido agregado, BM4D y N2V tienen un desempeño notoriamente superior. Esto puede explicarse por el hecho de que no se ajustaron los parámetros de los algoritmos para maximizar su desempeño sobre estos datos en particular. En el capítulo 5 se comprobó que un cambio en los parámetros puede significar considerables diferencias en el desempeño de los algoritmos.

En la Figura 6.3 se realiza una evaluación cualitativa de la calidad de la restauración de NLM, BM4D, N2V y NNLM. Se muestra el *ground truth*, la estructura de entrada y la estructura restaurada por cada uno de los cuatro algoritmos. Con un círculo rojo se resaltan regiones donde se aprecian diferencias entre los volúmenes. Si se observa la esfera de arriba a la derecha, se puede

Capítulo 6. Resultados Preliminares del Desempeño de los Algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre Datos Reales

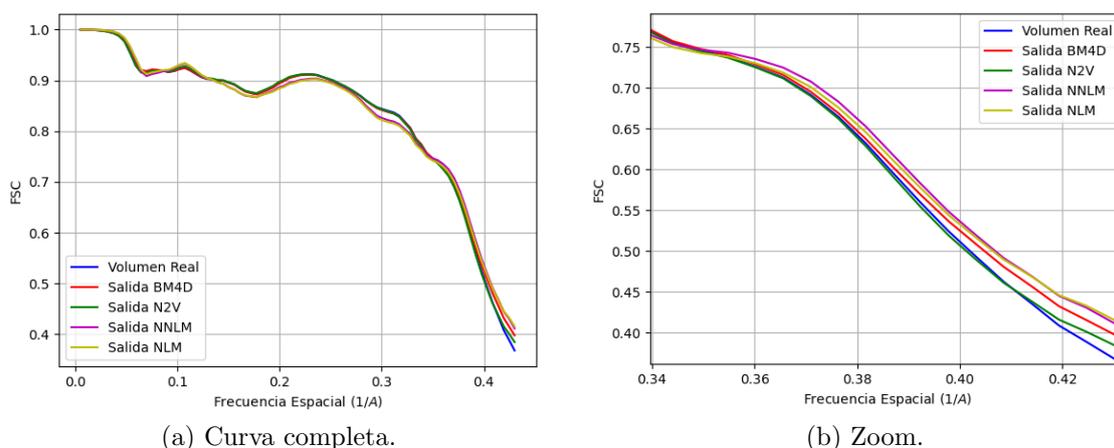


Figura 6.2: Desempeño de BM4D, N2V, NLM y NNLM sobre el MRC de la beta-gal descargado del EMDB [23]. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por cada algoritmo.

apreciar que todos los algoritmos la logran conservar excepto por NLM, lo cual indica que con la elección de parámetros considerada, NLM pierde información de la señal al hacer la restauración. En cuanto a la otra región resaltada, se observan resultados distintos para cada algoritmo. El BM4D logra restaurar la zona de manera bastante uniforme y aproximarse más al ground truth. En N2V no se aprecia prácticamente ninguna diferencia respecto a la entrada. NLM elimina excesivamente el ruido, causando que se pierda información de la señal, mientras que NNLM suaviza la región pero sin erosionar tanto la señal. Cualitativamente, el mejor desempeño entre todos los algoritmos es el de BM4D. Se destaca también que la calidad de la restauración de NNLM es superior a la de NLM. Un análisis más exhaustivo de la mejor elección de parámetros para estos datos de entrada en particular, que no se pudo realizar por restricciones de tiempo, podría conducir a mejores resultados en el desempeño de los algoritmos. Específicamente, de la inspección cualitativa queda claro que la elección de parámetros para NLM no es la adecuada, ya que se está eliminando demasiado ruido y en consecuencia perdiendo información de la señal.

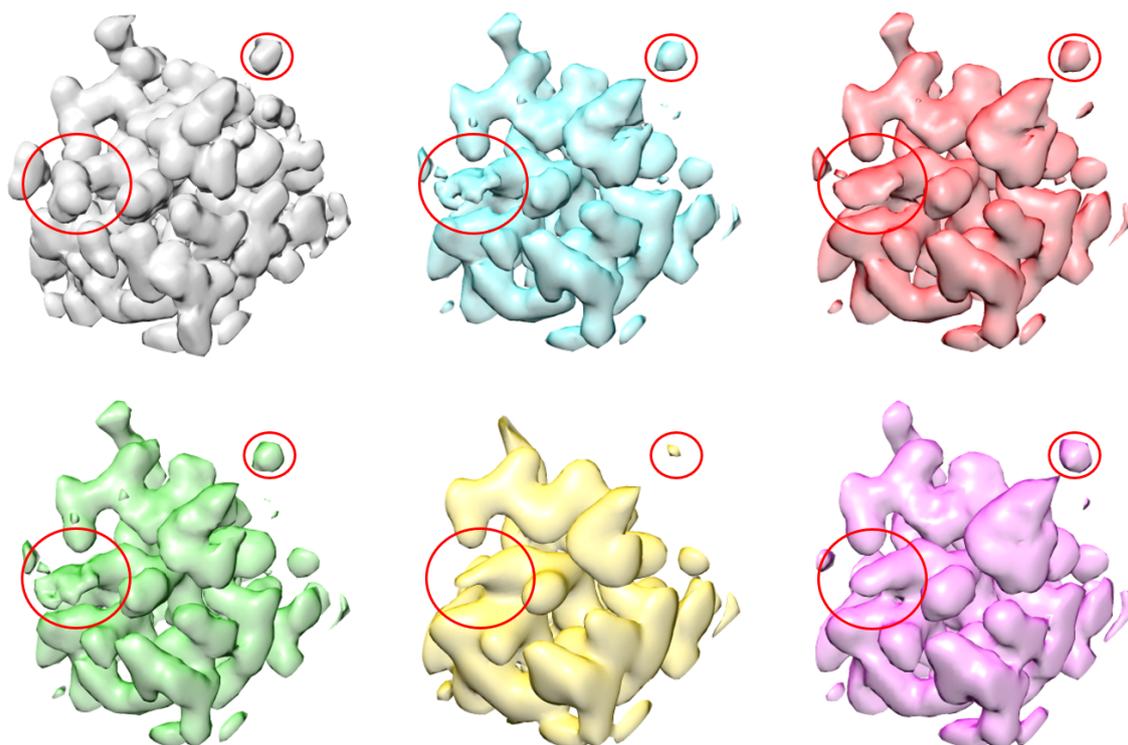


Figura 6.3: Evaluación cualitativa de la calidad de la restauración de NLM, BM4D, N2V y NNLM. Se muestra una isosuperficie (umbral= 0.1) del *ground truth* (gris), la estructura de entrada (celeste), y la restaurada por BM4D (rojo), N2V (verde), NLM (amarillo) y NNLM (violeta).

Capítulo 7

Observaciones Finales y Trabajo a Futuro

Resumen

En este capítulo se exponen las conclusiones y reflexiones finales respecto al desarrollo del proyecto. Se realiza un análisis de los resultados obtenidos en relación a los criterios de éxito planteados al inicio del proyecto y se presentan líneas de investigación a futuro con el fin de continuar avanzando en el perfeccionamiento de la técnica criomicroscopía electrónica.

Contenido

7.1. Conclusiones Generales	68
7.2. Evaluación de los Resultados Respecto a los Criterios de Éxito del Proyecto	69
7.3. Dificultades y Aprendizajes	70
7.4. Trabajo a Futuro	71

7.1. Conclusiones Generales

Al ser éste un proyecto de investigación, en primer lugar se destaca el haber incursionado en un tema actual, de gran relevancia científica y con inmensurable potencial como es la criomicroscopía electrónica. Previo a desarrollar los experimentos presentados en las secciones 4 y 5, se estudiaron los fundamentos y las distintas etapas de procesamiento que involucra la técnica de criomicroscopía electrónica. Asimismo, se exploraron diferentes técnicas de segmentación, alineación y promediado de volúmenes, y se analizaron y compararon diferentes algoritmos de disminución de ruido. Finalmente, se estudió la teoría de armónicos esféricos y su aplicación en problemas de alineación de volúmenes.

En el capítulo 4 se diseñó y validó una medida de similitud entre volúmenes invariante a rotaciones utilizando herramientas de los armónicos esféricos para alinear los volúmenes antes de compararlos. A partir de esta medida de similitud se propuso una extensión del algoritmo NLM capaz de identificar como similares vecindarios que contienen estructuras parecidas en distintas orientaciones, logrando así recoger más información para la restauración.

En el capítulo 5 se realizó un análisis exhaustivo del desempeño de *Non-Local Means*, *Block-Matching and 4D filtering*, *Noise2Void* y Nuevo *Non-Local Means* sobre la enzima beta-galactosidasa degradada con distintos niveles de ruido agregado (gaussiano y de media nula).

7.2. Evaluación de los Resultados Respecto a los Criterios de Éxito del Proyecto

Se identificó la mejor elección de parámetros para cada uno de los cuatro algoritmos, lográndose en todos los casos una mejora significativa en la resolución de la estructura. La mejora de resolución promedio alcanzada por NLM fue de 12.9 %, la de BM4D de 28.4 % y la de N2V de 27.7 %. NNLM supera en desempeño al NLM tradicional para niveles de ruido en la estructura de entrada de desviación estándar $0.5 \leq \sigma \leq 1.5$. Complementando los resultados numéricos, la inspección cualitativa de las estructuras restauradas por cada algoritmo presentadas en la Figura 5.23 refleja dos aspectos fundamentales para el análisis de los algoritmos. Por un lado, el desempeño de NLM y NNLM se degrada abismalmente para niveles altos de ruido en la entrada, mientras que BM4D y N2V son mucho más robustos al ruido. Por otro lado, si bien NLM y NNLM no son capaces de eliminar completamente el ruido que degrada la señal, sí logran recuperar muy bien los detalles finos presentes en el *ground truth*. Por el contrario, BM4D y N2V disminuyen en gran medida el ruido pero en dicho proceso también pierden información de la señal.

Los experimentos del capítulo 5 fueron realizados sobre una simulación de un mapa de densidad ruidoso en lugar de sobre un MRC real resultante de la técnica de criomicroscopía electrónica. Dichos experimentos permitieron desarrollar herramientas que luego pueden aplicarse sobre datos reales. En el capítulo 6, se presentan resultados preliminares del desempeño de los algoritmos sobre un mapa de densidad real descargado del *Electron Microscopy Data Bank*. Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de algoritmos de disminución de ruido tiene el potencial de incrementar significativamente la resolución de los modelos tridimensionales reales de macromoléculas obtenidos con esta técnica. Por lo tanto, es un camino que vale la pena seguir explorando para continuar desplazando el límite de la máxima resolución alcanzable por la técnica de criomicroscopía electrónica. Asimismo, se desarrolló una extensión de NLM invariante a rotaciones cuyo desempeño supera al de NLM tradicional para esta aplicación en particular y que a su vez podría constituir una valiosa herramienta de eliminación de ruido en otros sets de datos.

7.2. Evaluación de los Resultados Respecto a los Criterios de Éxito del Proyecto

Al inicio del proyecto se elaboró un plan de trabajo y se establecieron cuatro criterios de éxito. A continuación se analizan los resultados alcanzados en relación a estos criterios.

1. Incursionar en un tema actual, de alta relevancia y con inmenso potencial de desarrollo abordando un problema abierto.

Se logró adentrarse en el campo de la biología estructural, partiendo de los conceptos más básicos de aminoácido y proteína y entendiendo la importancia de conocer la conformación tridimensional de las macromoléculas para estudiar su función. Luego, se realizó una revisión bibliográfica para introducirse en el campo de la criomicroscopía electrónica, comprendiendo sus fundamentos, su importancia y su gran espectro de aplicaciones. Asimismo, se estudiaron las distintas etapas de procesamiento que involucra la obtención de un modelo tridimensional de una macromolécula con esta técnica. Se revisó una gran cantidad de artículos científicos para adentrarse más en el tema y comprender el estado del arte de la criomicroscopía electrónica. Se aprendió a manipular con solvencia los formatos de archivos y bibliotecas típicamente utilizadas en esta técnica. Una vez inmersos en este campo, se enfocó el proyecto en abordar dos problemas abiertos muy interesantes: la escasez de trabajos que exploren la posibilidad de aplicar algoritmos de disminución de ruido en volúmenes para mejorar la resolución de modelos

Capítulo 7. Observaciones Finales y Trabajo a Futuro

tridimensionales obtenidos con criomicroscopía electrónica, y la falta de técnicas de disminución de ruido en volúmenes que sean invariantes a rotaciones. Los resultados presentados en este proyecto apuntan a llenar una brecha de conocimiento que ayude a avanzar hacia el perfeccionamiento de una técnica en constante desarrollo que permite afrontar problemas novedosos y desafiantes.

2. Determinar una elección de parámetros óptima para NLM, BM4D y N2V que resulte en una mejora de la resolución de la estructura de entrada de al menos un 10 %.

Se identificó la mejor elección de parámetros para cada uno de los tres algoritmos. La Tabla 5.1 resume los resultados hallados.

Con la mejor elección de parámetros, NLM alcanza una mejora de resolución mayor a 10 % para estructuras de entrada degradadas con ruido de $0.3 \leq \sigma \leq 0.9$, mientras que BM4D y N2V alcanzan una mejora de resolución mayor a 10 % para estructuras de entrada degradadas con ruido de $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$. En la Tabla 5.3 se muestra el incremento porcentual de resolución alcanzado por cada algoritmo para cada nivel de ruido en la estructura de entrada.

3. Diseñar una medida de similitud entre vecindarios del volumen de la macromolécula que sea invariante a rotaciones.

Se generó una medida de similitud entre volúmenes invariante a rotaciones. Esta herramienta fue validada mediante una serie de experimentos. En primer lugar, se comprobó que la medida de similitud propuesta asigna pesos cercanos a uno a aminoácidos del mismo tipo en ocho orientaciones diferentes, para los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza. Se verificó también que la nueva medida de similitud es más robusta al ruido que la de NLM tradicional. Finalmente, al correr ambos algoritmos sobre la beta-gal con la misma elección de parámetros, se constató que NNLM encuentra muchos más vecindarios similares al de referencia en la ventana de búsqueda que NLM tradicional. Esto ocurre porque la medida de similitud propuesta es capaz, no solo de hallar estructuras similares en la misma orientación, sino también estructuras similares que se encuentran en distintas orientaciones.

4. Incorporar esta medida en el algoritmo NLM y lograr una mejora de la resolución de la estructura de entrada de al menos 10 %.

Se identificó la mejor elección de parámetros para NNLM. La Tabla 5.1 resume los resultados hallados.

Con la mejor elección de parámetros se comprobó que NNLM logra un incremento porcentual en la resolución mayor a 10 % para estructuras de entrada degradadas con ruido de $0.3 \leq \sigma \leq 1.1$. Además, NNLM supera en desempeño al NLM tradicional para niveles de ruido en la entrada de $0.5 \leq \sigma \leq 1.1$. En la Tabla 5.3 se muestra el incremento porcentual de resolución alcanzado por el algoritmo para cada nivel de ruido en la estructura de entrada.

7.3. Dificultades y Aprendizajes

Durante el desarrollo del proyecto fue necesario sortear dificultades de diversa índole. A continuación se presentan los principales inconvenientes que hubo que afrontar como equipo y también algunos aprendizajes que surgieron de estas experiencias.

Prácticamente la totalidad del proyecto transcurrió durante la pandemia de SARS-COV-2. Esto significó que los encuentros entre los integrantes del grupo y los tutores se dieran mayoritariamente en forma virtual. Al tratarse de un proyecto de investigación y desarrollo de

software, nunca fue estrictamente necesario reunirse presencialmente para avanzar en el trabajo. Sin embargo, el aislamiento social comprometió la posibilidad de tener valiosos intercambios en persona para discutir ideas y propuestas.

Durante el desarrollo del trabajo, se encontraron diversos desafíos relacionados a la falta de conocimiento del tema, que se debieron afrontar para lograr una visión integral del proyecto, decidir cómo enfocar el problema de investigación y generar intuición sobre los datos. Por esta razón, se debió invertir un tiempo y esfuerzo considerables para lograr dominar los conceptos básicos de criomicroscopía electrónica y manejar con solvencia los datos. La revisión bibliográfica inicial fue determinante para poder analizar la idoneidad de diferentes algoritmos de eliminación de ruido para mejorar la resolución de modelos tridimensionales obtenidos con criomicroscopía electrónica y para el posterior desarrollo de la extensión de NLM invariante a rotaciones.

Por otra parte, trabajar en tres dimensiones presentó una dificultad superior que la que hubiera supuesto trabajar en dos dimensiones, especialmente para visualizar cualitativamente los resultados y porque el costo computacional de correr algoritmos sobre volúmenes grandes es inmenso. El problema de visualización de las estructuras se resolvió utilizando el software *Chimera*. Por su parte, la limitación que impusieron los extensos tiempos de ejecución de los algoritmos tuvo que sortearse aprendiendo a paralelizar los algoritmos. Esto supuso un gran desafío ya que la programación paralela era un tema completamente nuevo para los integrantes del equipo. La disminución en los tiempos de ejecución alcanzada con la paralelización fue indispensable para poder llevar adelante los experimentos en un tiempo razonable y suficiente para concluir el proyecto dentro de los plazos establecidos. Adicionalmente, depender de los recursos compartidos en el *cluster* de *Duke University* significó una restricción adicional, en tanto con frecuencia la corrida de los algoritmos se vio interrumpida por problemas ajenos a nuestro dominio. Por ejemplo, se constató que cuando se desarrollaban otros procesos con máxima prioridad en dicho *cluster* o cuando se superaba un determinado tiempo de ejecución, nuestros procesos se interrumpían.

Finalmente, durante el desarrollo del proyecto fue necesario combinar programas disponibles en tres lenguajes diferentes: *C*, *Python* y *Matlab*. Esto significó que se requiriera desarrollar código adicional para la comunicación entre estos bloques, incrementándose los tiempos de ejecución de los experimentos.

7.4. Trabajo a Futuro

A partir del trabajo presentado se abren varias líneas de investigación a futuro con el fin de continuar trabajando hacia el perfeccionamiento de la criomicroscopía electrónica y hacia el desarrollo de técnicas de disminución de ruido en volúmenes.

En primer lugar, un área a explorar es la incorporación de la medida de similitud propuesta en el algoritmo BM4D. Esta era la idea original del proyecto, que no se pudo concretar debido a que, a pesar de haber logrado una comunicación fluida con los autores del algoritmo, resultó imposible acceder al código fuente de la implementación. La incorporación de invarianza a rotaciones en este algoritmo podría mejorar aún más su desempeño, que ya de por sí es cercano a los límites teóricos de disminución de ruido [48]. En este sentido, esta herramienta constituiría un valioso aporte al campo de las técnicas de disminución de ruido en volúmenes.

Por otra parte, también resulta altamente relevante profundizar en la evaluación del desempeño de los algoritmos sobre mapas de densidad reales que se presentó en el capítulo 6. Por cuestiones de tiempo, no se pudo realizar el análisis de la mejor elección de parámetros para estos datos de entrada en particular, pero hacerlo seguramente conducirá a mejores resultados en el desempeño de los algoritmos. Asimismo, también sería interesante aplicar estos algoritmos

Capítulo 7. Observaciones Finales y Trabajo a Futuro

sobre otras macromoléculas biológicas de diferente tamaño, diferente resolución, que contengan otra secuencia de aminoácidos o que difieran en su conformación tridimensional.

En lo que refiere a NNLM, hay algunas posibilidades para mejorar su eficacia y eficiencia que se podrían explorar. Por un lado, como se mencionó en la sección 4.2, la rotación que maximiza la correlación entre las proyecciones esféricas de dos vecindarios, no necesariamente es la rotación que minimiza la distancia entre dichos vecindarios en NLM. Puede haber una rotación que alinee los mapas esféricos pero no los vecindarios correspondientes. Para ganar robustez, se podrían calcular las n rotaciones que mejor alineen los mapas esféricos y luego optar por la que minimice la distancia de NLM entre los vecindarios completos correspondientes [13]. Asimismo, el algoritmo actual, incluso disponiendo de 300 GB de RAM y paralelizando el código en 21 procesos independientes con 70 CPUs cada uno, demora más de cien horas en correr sobre la beta-gal completa (tamaño $200 \times 155 \times 107$). Al realizar un análisis de rendimiento de software (*profiling*) se observó que el cuello de botella del código es la ejecución del programa de C que recibe dos mapas esféricos y devuelve la rotación que mejor alinea dichos mapas. Este programa se precompila y luego se ejecuta en cada iteración al comparar el vecindario de referencia con cada uno de los demás vecindarios en la ventana de búsqueda. Estudiando al detalle la implementación de este programa, seguramente se podría aumentar su eficiencia y de esa forma disminuir sustancialmente el tiempo de ejecución de NNLM. Otra posible estrategia para abordar este problema es desarrollar una implementación de todo el algoritmo que pueda ejecutarse en GPU para aprovechar los beneficios de la paralelización masiva.

Finalmente, una vez que se logre que NNLM corra en un tiempo más razonable, se podría explorar su aplicación en otros campos en los que se utilicen técnicas de disminución de ruido en volúmenes. En los experimentos realizados en este proyecto, el ruido que se intenta eliminar supone casi un 50 % del máximo valor que alcanza la señal, y además las subestructuras que se comparan tienen un tamaño muy pequeño, lo cual introduce grandes errores de interpolación al hacer la alineación. Se prevé que el desempeño del algoritmo sea superior en otros datos que no presenten características tan desafiantes.

Más allá de las líneas de investigación específicas propuestas, continuar investigando en pos de mejorar la resolución de las estructuras tridimensionales de macromoléculas es fundamental para el desarrollo de la biología estructural ya que conduce hacia modelos atómicos más precisos. Esto a su vez, permite analizar en profundidad la función y los modos de interacción de las proteínas de forma de comprender mejor distintos procesos biológicos inherentes a la vida y desentrañar la relación entre estructura y función. En particular, contar con modelos atómicos precisos de determinadas proteínas puede ser clave en el diseño de fármacos y vacunas para atacar diferentes enfermedades en un área de investigación conocida como *structure-based drug design* [61].

Referencias

- [1] A. L. Lehninger, *Principios de bioquímica*. No. 04; QD415, L4 2001., 2001.
- [2] E. Nogales, “Breve historia criomicroscopía electrónica,” *Investigación y ciencia*, 2016.
- [3] A. Buades, B. Coll, and J.-M. Morel, “A non-local algorithm for image denoising,” in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, vol. 2, pp. 60–65, IEEE, 2005.
- [4] M. Maggioni, V. Katkovnik, K. Egiazarian, and A. Foi, “Nonlocal transform-domain filter for volumetric data denoising and reconstruction,” *IEEE transactions on image processing*, vol. 22, no. 1, pp. 119–133, 2012.
- [5] A. Krull, T.-O. Buchholz, and F. Jug, “Noise2void-learning denoising from single noisy images,” in *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 2129–2137, 2019.
- [6] S. Zimmer, S. Didas, and J. Weickert, “A rotationally invariant block matching strategy improving image denoising with non-local means,” in *Proc. 2008 International Workshop on Local and Non-Local Approximation in Image Processing*, pp. 135–142, 2008.
- [7] S. Grewenig, S. Zimmer, and J. Weickert, “Rotationally invariant similarity measures for nonlocal image denoising,” *Journal of Visual Communication and Image Representation*, vol. 22, no. 2, pp. 117–130, 2011.
- [8] Z. Ji, Q. Chen, Q.-S. Sun, and D.-S. Xia, “A moment-based nonlocal-means algorithm for image denoising,” *Information Processing Letters*, vol. 109, no. 23-24, pp. 1238–1244, 2009.
- [9] K. Ramlaul, C. M. Palmer, T. Nakane, and C. H. Aylett, “Mitigating Local Over-fitting During Single Particle Reconstruction with SIDESPLITTER,” *Journal of Structural Biology*, 2020.
- [10] Ramírez-Aportela *et al.*, “Automatic local resolution-based sharpening of cryo-EM maps,” *Bioinformatics*, vol. 36, no. 3, pp. 765–772, 2020.
- [11] A. J. Jakobi, M. Wilmanns, and C. Sachse, “Model-based local density sharpening of cryo-EM maps,” *Elife*, vol. 6, 2017.
- [12] D. Tegunov, L. Xue, C. Dienemann, P. Cramer, and J. Mahamid, “Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.7 Å inside cells,” *bioRxiv*, 2020.
- [13] A. Bartesaghi, P. Sprechmann, J. Liu, G. Randall, G. Sapiro, and S. Subramaniam, “Classification and 3D averaging with missing wedge correction in biological electron tomography,” *Journal of structural biology*, vol. 162, no. 3, pp. 436–450, 2008.

Referencias

- [14] J. A. Kovacs and W. Wriggers, “Fast rotational matching,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 58, no. 8, pp. 1282–1286, 2002.
- [15] T. Bendory, A. Bartesaghi, and A. Singer, “Single-particle cryo-electron microscopy: Mathematical theory, computational challenges, and opportunities,” *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 37, no. 2, pp. 58–76, 2020.
- [16] P. J. Mohr, D. B. Newell, and B. N. Taylor, “CODATA recommended values of the fundamental physical constants: 2014,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 45, no. 4, 2016.
- [17] S. Subramaniam, “Bridging the imaging gap: visualizing subcellular architecture with electron tomography,” *Current opinion in microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. 316–322, 2005.
- [18] G. Jensen, “Lecture series: Getting started in cryo-em,” 2013. URL: <http://cryo-em-course.caltech.edu/>. Last visited on 29/09/2020”.
- [19] F. Lecumberry, *Topics in Image Processing and Applications to Structural Biology and Object Segmentation*. PhD thesis, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 3 2012.
- [20] R. Kanno, A. Koike-Takeshita, K. Yokoyama, H. Taguchi, and K. Mitsuoka, “Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from *Thermus thermophilus* encapsulating substrate inside the cavity,” *Structure*, vol. 17, no. 2, pp. 287–293, 2009.
- [21] C. Chaudhry *et al.*, “Role of the γ -phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL-GroES: function, structure and energetics,” *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 19, pp. 4877–4887, 2003.
- [22] Y. Wang, D. Yu, Q. Ouyang, and H. Liu, “The determinant factors for model resolutions obtained using CryoEM method,” *arXiv preprint arXiv:1712.09254*, 2017.
- [23] A. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee, D. Matthies, X. Wu, J. L. Milne, and S. Subramaniam, “2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor,” *Science*, vol. 348, no. 6239, pp. 1147–1151, 2015.
- [24] R. Yan, Y. Zhang, Y. Guo, L. Xia, and Q. Zhou, “Structural basis for the recognition of the 2019-nCoV by human ACE2,” *BioRxiv*, 2020.
- [25] D. Wrapp *et al.*, “Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation,” *Science*, vol. 367, no. 6483, pp. 1260–1263, 2020.
- [26] X.-c. Bai, G. McMullan, and S. H. Scheres, “How cryo-EM is revolutionizing structural biology,” *Trends in biochemical sciences*, vol. 40, no. 1, pp. 49–57, 2015.
- [27] P. A. Penczek, “Resolution measures in molecular electron microscopy,” in *Methods in enzymology*, vol. 482, pp. 73–100, Elsevier, 2010.
- [28] J. Frank, “Single-particle reconstruction of biological macromolecules in electron microscopy—30 years,” *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 42, no. 3, pp. 139–158, 2009.
- [29] G. Tang *et al.*, “EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy,” *Journal of structural biology*, vol. 157, no. 1, pp. 38–46, 2007.

- [30] V. R. Dubach and A. Guskov, “The resolution in x-ray crystallography and single-particle cryogenic electron microscopy,” *Crystals*, vol. 10, no. 7, 2020.
- [31] H. M. Berman *et al.*, “The protein data bank,” *Nucleic Acids Res*, vol. 28, pp. 235–242, 2000.
- [32] A. Cheng *et al.*, “MRC2014: Extensions to the MRC format header for electron cryo-microscopy and tomography,” *Journal of structural biology*, vol. 192, no. 2, pp. 146–150, 2015.
- [33] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [34] P. D. Bank, “The protein data bank contents guide: Atomic coordinate entry format description,” 1995.
- [35] L. Fan, F. Zhang, H. Fan, and C. Zhang, “Brief review of image denoising techniques,” *Visual Computing for Industry, Biomedicine, and Art*, vol. 2, Jul 2019.
- [36] M. C. Motwani, M. C. Gadiya, R. C. Motwani, and F. C. Harris, “Survey of image denoising techniques,” in *Proceedings of GSPX*, pp. 27–30, 2004.
- [37] D. C. Montgomery, G. C. Runger, and E. G. U. Medal, *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería*. No. 968-18-5914-6. 01-A1 LU. AL-PyE. 1., McGraw-Hill México DF, 1996.
- [38] C. Tomasi and R. Manduchi, “Bilateral filtering for gray and color images,” in *Sixth International Conference on Computer Vision (IEEE Cat. No.98CH36271)*, pp. 839–846, 1998.
- [39] A. Graps, “An introduction to wavelets,” *IEEE Computational Science and Engineering*, vol. 2, no. 2, pp. 50–61, 1995.
- [40] N. Wiener, “Extrapolation, interpolation and smoothing of stationary,” *Time Series, with Engineering Applications*, 1949.
- [41] G. Yu and G. Sapiro, “Dct image denoising: a simple and effective image denoising algorithm,” *Image Processing On Line*, vol. 1, pp. 292–296, 2011.
- [42] G. Motta, E. Ordentlich, I. Ramirez, G. Seroussi, and M. Weinberger, “The iDUDE Framework for Grayscale Image Denoising,” *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 20, pp. 1–21, jan 2011.
- [43] D. Bank, N. Koenigstein, and R. Giryes, “Autoencoders,” *arXiv preprint arXiv:2003.05991*, 2020.
- [44] D. Ulyanov, A. Vedaldi, and V. Lempitsky, “Deep image prior,” in *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 9446–9454, 2018.
- [45] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, “U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation,” in *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*, pp. 234–241, Springer, 2015.
- [46] P. Milanfar, “A tour of modern image filtering: New insights and methods, both practical and theoretical,” *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 30, pp. 106–128, 09 2013.

Referencias

- [47] K. Dabov, A. Foi, V. Katkovnik, and K. Egiazarian, "Image Denoising by Sparse 3-D Transform-Domain Collaborative Filtering," *IEEE transactions on image processing*, vol. 16, pp. 2080–95, 09 2007.
- [48] P. Chatterjee and P. Milanfar, "Is denoising dead?," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 19, no. 4, pp. 895–911, 2009.
- [49] M. Lebrun, "An analysis and implementation of the BM3D image denoising method," *Image Processing On Line*, vol. 2, pp. 175–213, 2012.
- [50] J. Lehtinen *et al.*, "Noise2noise: Learning image restoration without clean data," *arXiv preprint arXiv:1803.04189*, 2018.
- [51] W. Luo, Y. Li, R. Urtasun, and R. Zemel, "Understanding the effective receptive field in deep convolutional neural networks," in *Advances in neural information processing systems*, pp. 4898–4906, 2016.
- [52] M.-K. Hu, "Visual pattern recognition by moment invariants," *IRE transactions on information theory*, vol. 8, no. 2, pp. 179–187, 1962.
- [53] M. R. Teague, "Image analysis via the general theory of moments," *JOSA*, vol. 70, no. 8, pp. 920–930, 1980.
- [54] W. Jarosz, *Efficient Monte Carlo Methods for Light Transport in Scattering Media*. PhD thesis, UC San Diego, September 2008.
- [55] G. B. Arfken and H. J. Weber, *Mathematical methods for physicists*. American Association of Physics Teachers, 1999.
- [56] R. N. Bracewell and R. N. Bracewell, *The Fourier transform and its applications*. McGraw-Hill New York, 1986.
- [57] J. Lasky, "Beta-galactosidase.," *Salem Press Encyclopedia of Science*, 2019.
- [58] A. Bartesaghi, D. Matthies, S. Banerjee, A. Merk, and S. Subramaniam, "Structure of β -galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 32, pp. 11709–11714, 2014.
- [59] R. Verma and R. Pandey, "Non local means algorithm with adaptive isotropic search window size for image denoising," in *2015 Annual IEEE India Conference*, pp. 1–5, IEEE, 2015.
- [60] Hao Xu, Jizheng Xu, and Feng Wu, "On the biased estimation of nonlocal means filter," in *2008 IEEE International Conference on Multimedia and Expo*, pp. 1149–1152, 2008.
- [61] N. Boodhun, "Seeing is believing: structures and functions of biological molecules," *Bio-Techniques*, vol. 64, no. 4, pp. 143–146, 2018.

Índice de tablas

5.1. Elección de parámetros que resulta en un mejor desempeño de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre la beta-gal.	58
5.2. Tamaño en Å de cada uno de los veinte aminoácidos que existen en la naturaleza, calculado como el tamaño del menor prisma que puede encerrar cada aminoácido.	59
5.3. Incremento porcentual de resolución alcanzado por NLM, BM4D, N2V y NNLM para cada nivel de ruido en la estructura de entrada. Se muestran los resultados sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ y sobre la beta-gal entera.	61
5.4. Tiempo de ejecución de los algoritmos NLM, BM4D, N2V y NNLM al correrlos sobre la beta-gal completa tomando la mejor elección de parámetros.	63

Índice de figuras

1.1.	Arriba: Estructura general de un aminoácido. Abajo: Modelo atómico de los veinte tipos de aminoácidos que existen en la naturaleza.	2
1.2.	Ejemplo de redundancia en la enzima beta-galactosidasa. En verde se resaltan las múltiples ocurrencias del aminoácido alanina.	3
2.1.	Espectro de aplicación de distintas técnicas de imagenología según el tamaño en Daltons del espécimen a analizar. La microscopía de electrones de alta resolución cubre una brecha existente entre la resolución alcanzada por la cristalografía de rayos X y la microscopía de luz. Imagen adaptada de [17].	8
2.2.	Diagrama del proceso de SPA. Se coloca la muestra congelada a temperaturas criogénicas en un microscopio electrónico y se capturan múltiples proyecciones en 2D (micrógrafos). Se identifican, clasifican y alinean las proyecciones de las partículas para obtener promedios de clases con mayor SNR. Se realiza la reconstrucción tridimensional a través de un algoritmo de maximización de la esperanza y con esa información se estima un modelo atómico de la macromolécula. Imagen creada a partir de [20] y [21].	10
2.3.	Cantidad y resolución promedio de estructuras que se determinaron por año con la técnica de criomicroscopía electrónica en el período 2002-2019. Imagen adaptada de [15].	11
2.4.	Diagrama del procedimiento para calcular la FSC de un modelo. Se separa el conjunto de proyecciones en dos grupos iguales, se generan dos reconstrucciones independientes a partir de cada uno de los subconjuntos y se calcula la correlación entre las transformadas de Fourier de las dos reconstrucciones sobre cascarones de igual frecuencia espacial.	12
2.5.	Ejemplo de una curva de FSC típica. Comienza en uno para frecuencias espaciales bajas y luego decrece gradualmente a cero para frecuencias espaciales más altas. Se indican los umbrales de corte $FSC = 0.143$ y $FSC = 0.5$ para estimar de la resolución. Imagen adaptada de [30].	14
3.1.	Diagrama de NLM. Búsqueda de vecindarios Q similares al de referencia R restringida a una ventana de búsqueda W	18
3.2.	Diagrama de bloques de BM3D. Consta de dos pasos, en el primero se obtiene una versión preliminar de la imagen sin ruido que luego es utilizada en el segundo para aplicar un mejor filtrado a la imagen ruidosa, obteniendo así la restauración final. Cada paso consiste en una etapa de agrupación en bloques de vecindarios similares, una etapa de filtrado colaborativo (umbralización o Wiener) y una etapa de agregación de resultados. Imagen adaptada de [49].	19

3.3. Ejemplo ilustrativo de la existencia del *receptive field* en una CNN. El valor del píxel i en la salida depende únicamente de un vecindario en la capa intermedia debido a que se calcula mediante una convolución. A su vez, cada píxel del vecindario en la capa intermedia depende de una porción de la capa anterior (en este caso la entrada). 21

3.4. Ejemplo de $x_{RF(i)}$ con y sin puntos ciegos. En la práctica, para generar un punto ciego se sustituye el valor de la imagen en i por el de un píxel cercano elegido al azar. 22

4.1. Ejemplo de dos vecindarios idénticos a menos de una rotación de 90° . La flecha continua va desde el centro hacia el centroide del vecindario (píxeles oscuros corresponden a valores altos de intensidad). La flecha punteada en el vecindario de la izquierda apunta a un píxel arbitrario, mientras que la flecha punteada en el vecindario de la derecha apunta al píxel correspondiente considerando la rotación [8]. 25

4.2. Sistema de coordenadas esféricas y su correspondiente representación en un plano. $\theta \in [0, \pi]$ es el ángulo polar (ángulo de colatitud) y $\varphi \in [0, 2\pi]$ es el ángulo azimutal (ángulo de longitud). 26

4.3. Ejemplo sintético del procedimiento de alineación. Se calcula el módulo de la transformada de Fourier de los volúmenes V_1 y V_2 y se proyectan dichas transformadas sobre la esfera unidad, obteniéndose las funciones esféricas f_1 y f_2 . Se calcula la función *SCC* y se obtiene la rotación \mathcal{R} que mejor alinea f_2 respecto a f_1 . Finalmente se aplica \mathcal{R} a V_2 , quedando éste alineado a V_1 28

4.4. Ejemplo del procedimiento de alineación sobre un aminoácido tipo ARG. Se calcula el módulo de la transformada de Fourier de los volúmenes V_1 y V_2 y se proyectan dichas transformadas sobre la esfera unidad, obteniéndose las funciones esféricas f_1 y f_2 . Se calcula la función *SCC* y se obtiene la rotación \mathcal{R} que mejor alinea f_2 respecto a f_1 . Finalmente se aplica \mathcal{R} a V_2 , para alinearlo a V_1 29

4.5. Ejemplo de los resultados del método de alineación para cuatro aminoácidos distintos: ARG, GLU, PHE y TYR. En gris se muestra el aminoácido original, en amarillo el mismo aminoácido rotado según la terna de ángulos indicada en cada subfigura y en celeste el resultado de alinear el aminoácido rotado con respecto al original. Umbral = 0.45. 30

4.6. Comparación entre la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM al cotejar un aminoácido de referencia con el mismo aminoácido en otras orientaciones. La nueva medida de similitud da cercana a uno para todas las rotaciones. Izquierda: aminoácido de referencia y siete copias del mismo en distintas orientaciones. Umbral = 0.45. Derecha: gráfica de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM. De arriba a abajo: aminoácido ARG, GLU, PHE y TYR. 32

4.7. Degradación de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM al comparar dos copias del mismo aminoácido en orientaciones fijas diferentes para distintos niveles de ruido agregado. La nueva medida de similitud es más robusta al ruido que la tradicional. Izquierda: aminoácido de referencia y aminoácido rotado $\alpha = 45^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 0^\circ$, ambos con ruido de $\sigma = \{0; 0.1, 0.3, 0.5\}$ agregado. Umbral = 0.45. Derecha: gráfica de la nueva medida de similitud y la tradicional de NLM. De arriba a abajo: aminoácido ARG, GLU, PHE y TYR. 33

Índice de figuras

4.8.	Ejemplo de los resultados del método de alineación para los aminoácidos ARG, GLU, PHE y TYR degradados con ruido de $\sigma = 0.2$. En gris se muestra el aminoácido original, en amarillo el mismo aminoácido rotado $\alpha = 45^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 0^\circ$ y en celeste el resultado de alinear el aminoácido rotado con respecto al original. Umbral = 0.55. Se elimina el ruido de fondo para facilitar la visualización.	34
4.9.	Simulación de una corrida de NNLM y NLM tradicional sobre un volumen artificial que contiene cuatro aminoácidos tipo TYR en distintas orientaciones. En la corrida de NLM tradicional sólo el propio vecindario de referencia recibe un peso mayor a 0.8. En la corrida de NNLM todas las copias del aminoácido TYR en las distintas orientaciones reciben pesos mayores a 0.8. Umbral = 0.7.	35
4.10.	Vecindarios que reciben los mayores y menores pesos en una corrida de NNLM sobre el MRC de la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Para facilitar la visualización se presentan los vecindarios alineados al de referencia (coloreado en gris). Umbral = 0.4.	35
5.1.	Diagrama de la estructura cuaternaria de la enzima beta-galactosidasa.	37
5.2.	Ejemplo de estructuras de entrada a los algoritmos. Se muestran isosuperficies (Umbral = 1) del MRC de la beta-gal superpuestas sobre el modelo atómico de la estructura. El MRC sin ruido se ajusta bastante bien al modelo atómico, mientras que cuanto mayor es el ruido, más difícil resulta reconocer la señal. Se elimina el ruido de fondo para facilitar la visualización.	38
5.3.	Desempeño de NLM para distintos h sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h . Los mejores resultados se obtienen para $h = 0.8\sigma$	40
5.4.	Desempeño de NLM para distintos p_s y w_s sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 20$	41
5.5.	Corrida de NLM sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.	42
5.6.	Evaluación cuantitativa del desempeño de NLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por NLM es significativo (mayor a 10 %) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 0.9$	43
5.7.	Evaluación cualitativa del desempeño de NLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.	44
5.8.	Desempeño de BM4D para distintos p_s y w_s sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 4$ y $w_s = 50$	46
5.9.	Corrida de BM4D sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.	47

5.10. Evaluación cuantitativa del desempeño de BM4D sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por BM4D es significativo (mayor a 10 %) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$	47
5.11. Evaluación cualitativa del desempeño de BM4D sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.	48
5.12. Desempeño de N2V para distintos p_s y funciones de costo sobre la beta-gal con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de p_s para MAE y MSE. La elección de parámetros que resultan en un mejor desempeño es tomar $p_s = 40$ y MAE como función de costo.	49
5.13. Corrida de N2V sobre la beta-gal con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.	50
5.14. Evaluación cuantitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. El incremento de resolución alcanzado por N2V es significativo (mayor a 10 %) para estructuras de entrada con ruido de desviación estándar $0.3 \leq \sigma \leq 1.5$	51
5.15. Evaluación cuantitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido, incrementando la cantidad de datos de entrenamiento.	51
5.16. Evaluación cualitativa del desempeño de N2V sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.	52
5.17. Desempeño de NNLM para distintos h sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. Se muestra la integral bajo la curva de FSC de la estructura restaurada en función de h . Los mejores resultados se obtienen para $h = 0.7\sigma$	53
5.18. Desempeño de NNLM para distintos p_s y w_s sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido de $\sigma = 0.3$ agregado. El mejor desempeño se obtiene con $p_s = 4$. La diferencia de desempeño para distintos w_s con $p_s = 4$ no es significativa.	54
5.19. Corrida de NNLM sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ con ruido agregado de $\sigma = \{0.3, 0.7, 1.1\}$. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada para cada nivel de ruido.	55
5.20. Evaluación cuantitativa del desempeño de NNLM sobre una sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$ degradada con distintos niveles de ruido.	56
5.21. Evaluación cualitativa del desempeño de NNLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5\}$. Arriba: molécula sin ruido agregado. Izquierda: Estructuras de entrada. Derecha: Estructuras restauradas. Con un círculo rojo se resaltan zonas de interés en la visualización de los resultados. Umbral = 0.3.	57

Índice de figuras

5.22. Evaluación del incremento de resolución logrado por NLM, NNLM, BM4D y N2V en función del nivel de ruido en la estructura de entrada. Arriba: Sección de la beta-gal de tamaño $30 \times 30 \times 30$. Abajo: Beta-gal entera.	60
5.23. Comparación cualitativa de la calidad de la restauración de NLM, BM4D, N2V y NNLM sobre la beta-gal degradada con distintos niveles de ruido. Se muestra una isosuperficie de la estructura de entrada y la restaurada para $\sigma = \{0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1\}$. Con un círculo rojo se resaltan zonas en las se pierden detalles en la restauración al aumentar el nivel de ruido. Umbral = 0.3.	62
6.1. Isosuperficie (umbral= 0.005) del MRC de la beta-gal descargado del EMDB [23].	65
6.2. Desempeño de BM4D, N2V, NLM y NNLM sobre el MRC de la beta-gal descargado del EMDB [23]. Se muestra la curva de FSC de la estructura de entrada y de la estructura restaurada por cada algoritmo.	66
6.3. Evaluación cualitativa de la calidad de la restauración de NLM, BM4D, N2V y NNLM. Se muestra una isosuperficie (umbral= 0.1) del <i>ground truth</i> (gris), la estructura de entrada (celeste), y la restaurada por BM4D (rojo), N2V (verde), NLM (amarillo) y NNLM (violeta).	67

Esta es la última página.
Compilado el martes 10 noviembre, 2020.
<http://iie.fing.edu.uy/>