



Instituto Tecnológico
de Buenos Aires

Proyecto Final de Carrera

Bioingeniería

**Análisis comparativo de *pipelines* de
procesamiento y algoritmos de
detección de ensamblajes neuronales para
imágenes de calcio**

Martin Mandelbaum

Tutor: Dr. Emilio Kropff
Laboratorio de Fisiología y Algoritmos del Cerebro
Fundación Instituto Leloir

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Emilio, por su dedicación, constancia e inagotable paciencia.

También a los chicos de Laboratorio 7, Felipe Murchison y Joaquín Torres, por su ayuda y colaboración en la implementación y comparación de los *pipelines*.

A Joaquín especialmente quiero darle las gracias, no solo por su amistad, sino también por sus incontables aportes a este proyecto.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en este camino.

A todos los familiares que me apoyan aun preguntando que hace un bioingeniero.

A mis padres por darme todo y bancarme hasta acá.

A Luli por estar en mi vida, ahora y siempre.

Abstract

En los últimos años, las imágenes de calcio se han convertido en una valiosa herramienta para registrar actividad neuronal en diversas áreas del cerebro. La disponibilidad de microscopios de fluorescencia miniaturizados y de bajo costo permite un mayor acceso a investigaciones de neurociencias, entre las cuales se destaca el estudio de la formación y consolidación de memorias en el hipocampo.

El gran caudal de células que pueden ser visualizadas con estas técnicas, y la posibilidad de realizar estudios con animales comportándose libremente permiten obtener información valiosa sobre diversas áreas de interés. Estos registros, sin embargo, deben ser acompañados por extensos procesos de corrección, procesamiento, y deconvolución de las señales para aportar información útil. En este proyecto se trabajó con registros de actividad en la región CA3 del hipocampo de un ratón (*Mus musculus*) sobre el cual se implementaron distintos pipelines de procesamiento de imágenes de calcio, los cuales fueron comparados según su robustez ante distintos niveles de ruido. También se evaluó la consistencia de algoritmos de detección de ensambles neuronales, conjuntos de neuronas que presentan coactivación y que se cree que forman la base del procesamiento neuronal de la información.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Áreas anatómicas de interés | 1 |
| 1.1.1. Anatomofisiología del hipocampo | 2 |
| 1.1.2. Plasticidad y ensamblajes neuronales | 4 |
| 1.2. Potenciales de acción | 5 |
| 1.3. Imágenes de calcio | 6 |
| 1.4. Microscopía de fluorescencia | 6 |
| 1.4.1. Miniscope | 9 |
| 2. Antecedentes y Objetivos | 11 |
| 3. Materiales y métodos | 14 |
| 3.1. Procesamiento de imágenes | 15 |
| 3.2. Extracción de señales neuronales | 16 |
| 3.2.1. Análisis de componentes independientes (ICA) | 17 |
| 3.2.2. Análisis de componentes principales (PCA) | 17 |
| 3.3. CNMF-Factorización restringida no negativa | 19 |
| 3.3.1. CNMF-E | 20 |
| 3.3.2. Pipelines de CNMF/CNMF-E | 21 |
| 3.4. Suite2p | 22 |
| 3.5. Detección de ensamblajes mediante SVD | 23 |
| 4. Resultados | 26 |
| 4.1. <i>Pipelines</i> de procesamiento | 26 |
| 4.1.1. Resultados preliminares de implementación | 26 |
| 4.1.2. Comparación cuantitativa de capacidad de segmentación entre pipelines | 27 |
| 4.2. Detección de ensamblajes neuronales mediante SVD | 32 |
| 5. Discusión | 39 |

1 Introducción

En el campo de las neurociencias, resulta primordial contar con técnicas adecuadas para la visualización de neuronas. En efecto, gran parte del caudal de conocimiento que se puede producir en este campo está condicionado por el desarrollo de nuevas y mejores técnicas para obtener información sobre el más complejo de los sistemas biológicos.

En la actualidad se cuenta con dos enfoques para realizar registros de actividad en cerebros de seres vivos comportándose, es decir registros *in vivo*: en primer lugar, siguiendo la cronología de su implementación, se encuentran las técnicas de electrofisiología, que implican la medición la actividad eléctrica de células mediante el uso de electrodos. Existen muchas aplicaciones de técnicas electrofisiológicas en diversos sistemas biológicos, entre las cuales se destaca la electroencefalografía, la cual hasta recientemente ha sido la técnica por excelencia para la mayor parte de los estudios neurofisiológicos.

La segunda técnica, y la cual resulta de mayor interés para este trabajo es la de visualización por imágenes de calcio. Esta técnica mide por medios ópticos la actividad de las neuronas a través de un censo de la concentración intracelular de los iones de calcio (Ca^{2+}). Para el funcionamiento de esta técnica, se requiere que las células de interés expresen moléculas llamadas indicadores de calcio, cuya fluorescencia dependa de la concentración de calcio en la célula.

Para introducir los conceptos primordiales sobre los que se basa este proyecto, primero se detallará la biología de las áreas de interés, y los procesos que se desea observar. Luego, se profundizará sobre la tecnología utilizada para la obtención de registros

1.1. Áreas anatómicas de interés

Para este trabajo, el área del cerebro sobre la que se trabajará será exclusivamente el hipocampo, un área crucial para la formación de memorias y aprendizaje en mamíferos. Si bien por cuestiones éticas y de aparatología se ha trabajado casi exclusivamente con imágenes en ratones, la fisiología del hipocampo de los roedores es sumamente similar a

la de los seres humanos. Es por esto que los ratones han sido un modelo extensamente estudiado en neurociencias, y han contribuido enormemente a profundizar nuestros conocimientos sobre el cerebro [1].

1.1.1. Anatomofisiología del hipocampo

El hipocampo es una estructura del cerebro ubicada en los ventrículos laterales del lóbulo temporal. Su nombre proviene de su similitud, al estar unido con el fornix, al animal marino homónimo. También ha recibido el nombre de cuerno de Amón, en referencia a los cuernos de cabra de la deidad egipcia, como se ilustra en la figura 1.1. Este nombre se ha mantenido en cada una de las secciones denominadas CA, que numeradas de uno a cuatro y junto al giro dentado forman los dos hipocampos propiamente dichos[2].

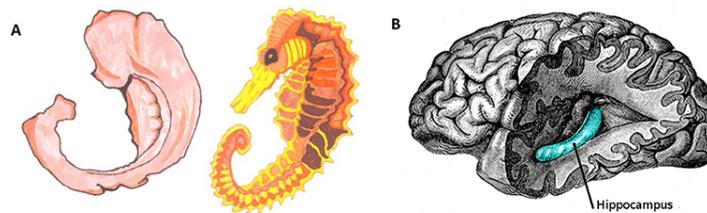


Figura 1.1: Justificación etimológica del hipocampo

El hipocampo cumple un rol esencial en los procesos de memoria declarativa y aprendizaje, además de ubicación espacial. Para todos estos procesos la vía principal de entrada es la corteza entorrhinal, y la salida se realiza a través de CA1 hacia el subículo. Estas vías a través del hipocampo son importantes en la formación de nuevos recuerdos, y en la consolidación de la memoria de corto a largo plazo.

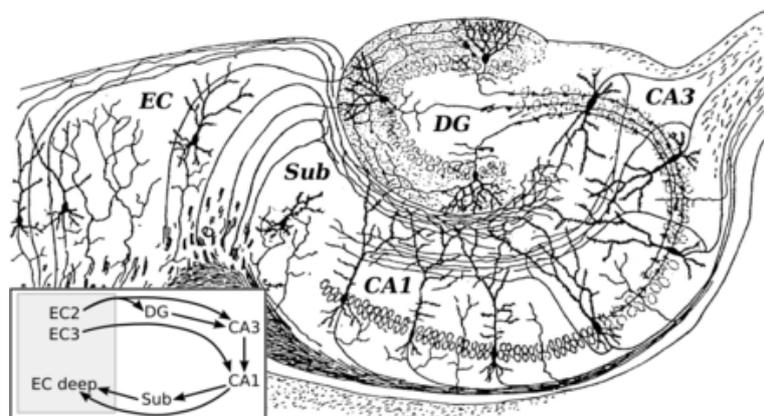


Figura 1.2: Esquema del hipocampo, mostrando segmentos CA, giro dentado, y corteza entorrhinal. Dibujado por Ramón y Cajal, 1911

Gran parte del conocimiento del hipocampo previo a las técnicas modernas de

neurociencias se obtuvo en base a observaciones de pacientes con lesiones relacionadas al hipocampo. La relación del hipocampo con el almacenamiento de memorias de largo plazo se estableció con el caso clínico del paciente H.M, que sufría de amnesia anterógrada (imposibilidad de crear nuevos recuerdos) luego de una lobectomía bilateral del lóbulo temporal que incluyó ambos hipocampos[3].

Además de la salida del hipocampo, el área CA1, otras dos áreas han sido ampliamente estudiadas: CA3, por ser el área donde, según se cree, se forman las asociaciones que dan lugar a la memoria; y el giro dentado, donde ocurre un proceso único en el cerebro llamado neurogénesis. Las secciones detalladas del hipocampo se pueden ver esquematizadas en el dibujo presentado en la figura 1.2.

Neurogénesis y separación de patrones

Fisiológicamente, el hipocampo presenta un alto nivel de plasticidad, esencial para los procesos de aprendizaje y formación de memorias[2]. Las células del hipocampo presentan una gran cantidad de conexiones neuronales, las cuales se ven promovidas por la formación constante de nuevas neuronas en esta región particular del cerebro, gracias a la neurogénesis [4].

Debido a su rol en la formación y evocación de memorias, el hipocampo resulta un área de sumo interés en el estudio y tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

La formación de memoria en el hipocampo se da a través de un proceso denominado separación de patrones [5], mediante el cual el cerebro almacena recuerdos distintos entre sí e individualizables en base a una serie de entradas de alta semejanza. Este fenómeno se da principalmente en las áreas del hipocampo y el giro dentado, y se supone que involucra a una población de células inmaduras que se renueva constantemente mediante la neurogénesis.

CA3 y almacenamiento de nuevos patrones

En cuanto a CA3, se cree que está involucrada en la generación de memorias nuevas, que una vez generadas son transferidas a la corteza a través de CA1. La recolección de una memoria implica al proceso inverso a la separación de patrones, el completamiento de patrones, o terminación, que permite evocar una memoria completa en base a algunos elementos de su patrón[6].

Se piensa entonces que CA3 cumple una función crucial como intermediario o buffer en la formación de memorias de largo plazo, y también en la modificación de memorias

previamente adquiridas.

El hipocampo, junto con la corteza entorrinal cumplen un rol en la memoria espacial y en la navegación durante el desplazamiento locomotor. La corteza entorrinal presenta unas neuronas especializadas llamadas células de red o *grid cells*, las cuales cumplen un rol en la orientación espacial del cerebro, y por consiguiente del individuo[7]. Su nombre deviene de la observación de que su activación se corresponde con posiciones concretas en el espacio físico, creando así una especie de sistema de coordenadas cartesianas biológico.

1.1.2. Plasticidad y ensambles neuronales

Las mejoras en técnicas de registro, tanto electrofisiológicas como de calcio, han permitido acceder a conjuntos de neuronas cada vez mayores. Un creciente número de estudios busca dar sentido a la actividad conjunta de un gran número de células.[?]. Es debido a esto que el foco de la neurociencia esta cambiando de la neurona, como primero desarrolló Ramon y Cajal a principios del siglo XX, a un conjunto de neuronas llamado ensamble neuronal.

Un ensamble puede definirse como un grupo de neuronas que se coactivan, es decir, que presentan una actividad eléctrica consistente y sincronizada entre un mismo número de células, que se reproduce durante un período de tiempo. La hipótesis de estos conjuntos semi permanentes de neuronas sincronizadas fue planteada por primera vez por el psicólogo Donald Hebb en 1949 [8], en su libro "The Organization of Behaviour", en el cual postuló que las neuronas formaban redes de coactivación, las cuales podían reforzarse con repetición de ciertos procesos, planteando así una explicación para la capacidad de aprendizaje mediante asociación.

La hipótesis Hebbiana postula dos procesos relacionados a estos ensambles: la formación de una red o conjunto de neuronas que adquieren interdependencia al activarse de forma sincrónica, y la consolidación que estos grupos refuerzan al ser evocados repetidas veces. Este refuerzo puede darse naturalmente como acostumbramiento, o artificialmente, mediante técnicas optogenéticas de excitación de un conjunto de células[8].

El estudio del ensamble neuronal como unidad básica del procesamiento de información se ha encontrado con desafíos, principalmente relacionados con la dificultad de visualizar grandes números de neuronas simultáneamente, y también por la complejidad de establecer patrones de coactivación que muestren cuales son las células que se están activando conjuntamente.

Recientemente, Carrillo-Reid et al.(2016) han demostrado la capacidad de generar

ensambles artificiales, al estimular optogenéticamente una población de neuronas en la corteza visual[8]. Una vez generado este ensamble nuevo, la estimulación de una neurona causó la coactivación de los demás elementos del ensamble, lo cual puede verse en la explicación gráfica de la figura 1.3. Este trabajo usó el código desarrollado para detectar estos ensambles, detallado en [9].

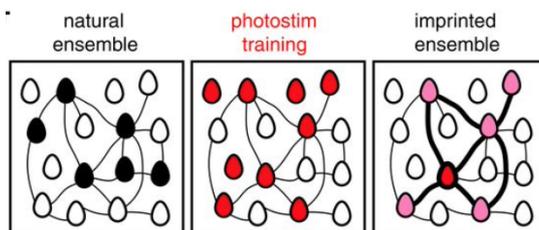


Figura 1.3: La repetición en la activación de un conjunto de células lleva a la formación y refuerzo de un ensamble neuronal [8].

1.2. Potenciales de acción

La actividad del sistema nervioso tiene como elemento clave la comunicación entre neuronas, y la transmisión de señales a través de estas. Debido al movimiento de iones a través de la membrana celular se producen potenciales de acción, los cuales cumplen un rol central en la comunicación entre células

En neuronas, este proceso se activa cuando el potencial de una neurona aumenta desde su potencial de reposo (aproximadamente -70 mV) hasta sobrepasar el potencial umbral (-55 mV). Esto genera que la neurona se despolarice rápidamente para luego volver repolarizarse. La transmisión de este impulso eléctrico a través de los axones de una neurona a sus células vecinas genera la propagación de señales en el cerebro y en el sistema nervioso.

La variación en el potencial eléctrico de una célula se debe a los cambios en la concentración de iones tanto en su interior como su exterior. La regulación de las concentraciones extra e intracelular de iones de sodio (Na), potasio (K) y calcio(Ca) se da mediante los canales iónicos regulados por voltaje . Mediante el ingreso de sodio, y en algunos casos calcio, al interior de la célula, se despolariza la membrana y se genera un potencial de acción, mientras que la salida de iones de potasio repolariza la membrana y restaura los potenciales eléctricos previos.

Es posible utilizar la concentración de iones de calcio en una célula para extraer información sobre su actividad eléctrica a lo largo del tiempo. Para poder cuantificarla, es necesario usar moléculas llamadas indicadores de calcio, que se describirán en la siguiente sección.

1.3. Imágenes de calcio

La técnica de imágenes de calcio permite estudiar la fisiología del cerebro de manera más directa, ya que se trabaja observando directamente a las células. En primer lugar, las imágenes de calcio ofrecen la ventaja de poder seleccionar con alta precisión el área del cerebro que se desea visualizar, y de poder ver simultáneamente la actividad y la organización espacial. Esto es de gran ayuda para poder estudiar regiones específicas del cerebro, como lo fue en el caso de esta investigación el hipocampo.

Comparándola con otras técnicas, permite realizar seguimientos a un mismo grupo de neuronas durante meses, en vez de días. Adicionalmente, resulta más económica que la electrofisiología tradicional.

Un elemento clave de las imágenes de calcio, que permitió su popularización en los últimos años, son los indicadores de calcio. Estos son moléculas que reaccionan en presencia de iones de calcio, alterando su estructura. El indicador de calcio con el que se trabajó es GCaMP6, el cual es una proteína sintética conformada por GFP (Green Fluorescent Protein), calmodulina (a su vez una abreviación de Calcium Modulated Protein) y una secuencia peptídica de quinasa llamada M13. El número 6 hace referencia a que es la sexta iteración de este indicador, desde su primera implementación[10]

Los indicadores de calcio reaccionan ante la presencia de iones de calcio que ingresan durante el potencial de acción. Adicionalmente, midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida se puede tener una idea del nivel relativo de actividad eléctrica en cada momento.

1.4. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se define como aquella en que la fuente de luz es el objeto que se quiere observar. En este caso, el principio de funcionamiento de estos aparatos requiere iluminar una muestra con una longitud de onda en particular, que cause la excitación de la muestra, y por lo tanto que comience a emitir en una longitud de onda específica, distinta a la de excitación. La fluorescencia de las neuronas se logra, como ya se mencionó, mediante la expresión de la proteína fluorescente modulada por calcio GCaMP6, cuya expresión se logra en las neuronas de interés mediante la inyección de un vector viral en la zona que desea estudiarse previo al comienzo de los experimentos, o mediante la utilización de animales transgénicos cuyas células expresan la proteína naturalmente.

En la figura 1.4 se pueden observar las imágenes obtenidas en distintas áreas del cerebro

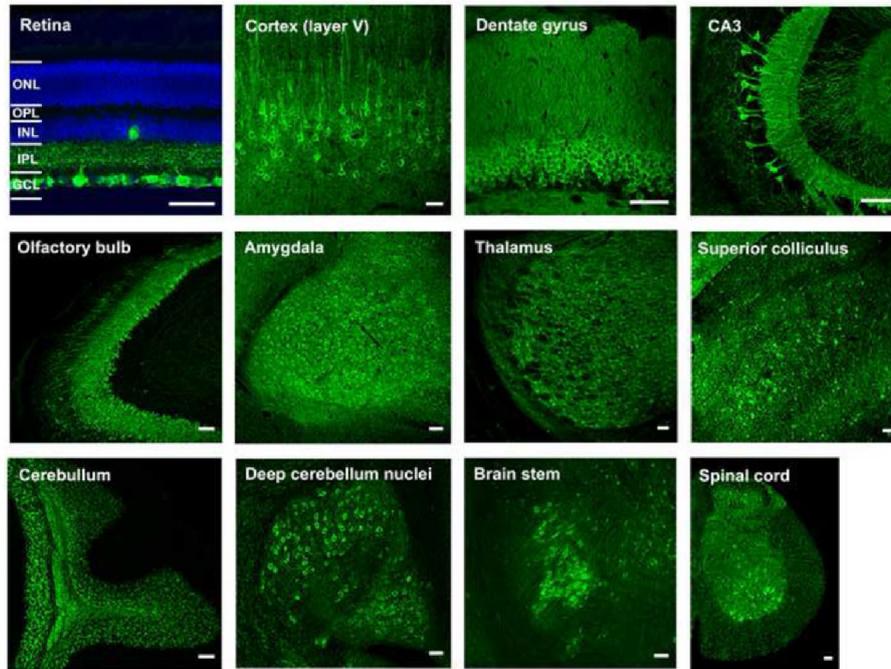


Figura 1.4: Imágenes de distintas regiones del cerebro de ratón expresando GCaMP6[11].

con fluorescencia verde debido a la expresión de GCaMP6, mientras que en la figura 1.5 se puede ver un esquema del funcionamiento óptico de un microscopio de fluorescencia.

Además de contar con una capacidad de localización mayor, una ventaja clave de las imágenes de calcio es que permiten observar un número mucho mayor de neuronas simultáneamente que las técnicas electrofisiológicas, en números de hasta miles de neuronas a la vez[12]. Adicionalmente, esta técnica tiene una gran estabilidad en el tiempo, lo que brinda una mayor resolución espacial, ayudando a identificar singularmente células, además de tener información sobre su entorno y neuronas cercanas.

Los componentes principales de un microscopio de fluorescencia son la fuente de luz, los filtros que eliminan las longitudes de onda que no son la de excitación ni la de emisión, y un espejo dicroico, que refleje la luz de excitación pero permita el paso de la de emisión solamente, para que sea esta únicamente la que llegue al ocular y al detector[13].

Una distinción entre las técnicas de microscopía de fluorescencia radica en el modo de excitación de las células objetivos, existiendo técnicas de 1 fotón, o 2 fotones, según cuántos fotones colisionan con la muestra al mismo tiempo, causando la excitación y emisión.

En la microscopía de 1 fotón, la emisión de luz se debe a que el fotón posee suficiente energía para hacer saltar a un electrón a un estado de energía superior, causando la

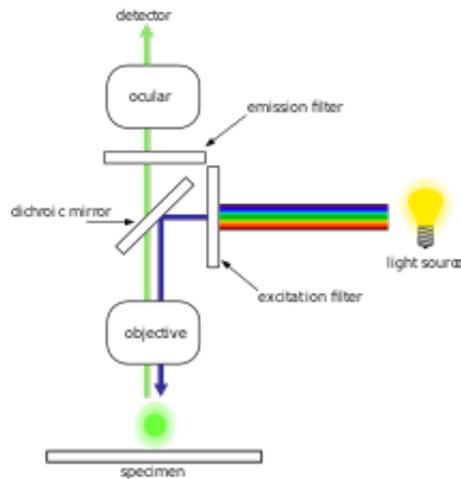


Figura 1.5: Principio de funcionamiento de un microscopio de fluorescencia [12]

emisión de un fotón, el cual es captado ópticamente. Expresado simplemente, un microscopio de dos fotones divide la energía que previamente transportaba un fotón a la mitad, por lo que ahora la emisión de luz ocurrirá al chocar dos fotones simultáneamente con la muestra, un evento mucho más raro. La energía transmitida por los fotones es directamente proporcional a su frecuencia, y por lo tanto, inversamente proporcional a su longitud de onda. Esto quiere decir que a menor longitud de onda, mayor será la energía transmitida, lo cual resulta de importancia para la técnica de dos fotones.

La ventaja principal de usar dos fotones es que la baja probabilidad del evento hace que el volumen de muestra que emite fluorescencia en un momento dado sea mucho más pequeño, alcanzándose fácilmente una escala sub-celular, lo cual aumenta la resolución de la muestra. Además, al llevar la mitad de la energía, cada fotón tiene el doble de longitud de onda que el fotón equivalente usado en la de 1 fotón, por lo que su penetración será mayor y presentará menor dispersión. Ambos efectos contribuyen a que la imagen recopilada tenga mejor resolución y mayor relación señal-ruido (SNR). Además, permite visualizar tejidos más profundos, y con localización más precisa[10].

Las desventajas de la técnica de dos fotones son el costo adicional de los láseres y la óptica necesarios, y el mayor tamaño de estos microscopios, que impiden el estudio *in vivo* "libre", donde el animal puede moverse, ya que para usar este tipo de microscopios el animal debe estar inmovilizado. Además, la superficie o volumen observados deben recorrerse, para lo cual es preciso tener sistemas de barrido muy precisos, mientras que en la microscopía de un fotón se captura una imagen de todo el plano focal simultáneamente.

1.4.1. Miniscope

El factor limitante de los microscopios de fluorescencia para su utilización en estudios de neurociencias es su tamaño y su interfaz con el sujeto de estudio. Debido a esto, hasta hace unos años el uso de un microscopio de fluorescencia para visualización cerebral requería al sujeto inmovilizado, o incluso sedado, lo cual limitaba importantemente el rango de experimentos realizables, además de socavar la universalidad de los resultados obtenidos.

Recientemente se ha tendido a la miniaturización de estos equipos [14], a fin de desarrollar un microscopio lo menos intrusivo posible, culminando en el actual *Miniscope*, desarrollado en UCLA[12]. El *Miniscope* es un microscopio miniaturizado *open-source*, con un costo fuertemente reducido respecto a microscopios de fluorescencia tradicionales.

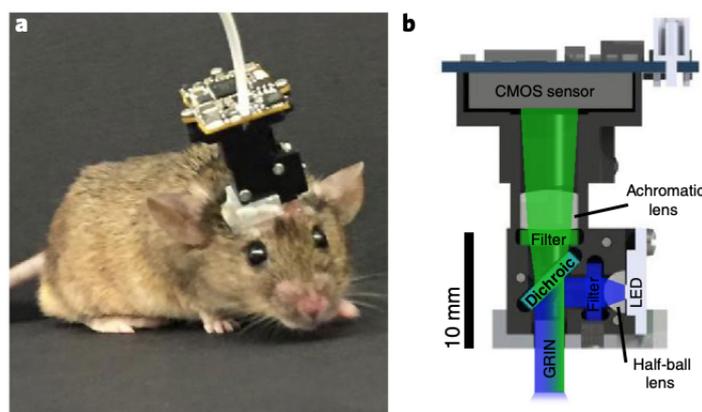


Figura 1.6: **a**:Miniscope implantado en un raton.**b** :esquema de componentes del Miniscope [12].

Como puede verse en la figura 1.6, el funcionamiento del miniscope es idéntico al que se ha explicado en la figura 1.5 para microscopios de 1 fotón. La luz emitida es configurable, aunque es habitual usar GCaMP6 con longitudes de onda azul y verde para excitación y fluorescencia, respectivamente. El miniscope tiene un peso menor a los 3 gramos, y requiere de una cirugía previa a su implantación para instalar una lente GRIN transcranealmente. El miniscope puede ser removido y vuelto a colocar, permitiendo realizar múltiples registros para un mismo individuo a lo largo de varias sesiones, extendiendo el tiempo durante el cual se puede registrar la actividad de un mismo grupo de neuronas. Además, la identificación de neuronas, gracias a la fijación espacial, permite reconocer fehacientemente grupos específicos de neuronas, y volver a observar el mismo grupo en distintas sesiones, algo que resulta más difícil utilizando técnicas electrofisiológicas.

La principal ventaja de un microscopio miniaturizado es la posibilidad de realizar

experimentos conductuales, con el animal moviéndose libremente por un área, lo que aporta significativamente más información que los estudios con animales inmovilizados, en particular en áreas clásicas como el estudio de la memoria y aprendizaje espacial en el hipocampo.

En la figura 1.7 se pueden ver en mas detalle los componentes que conforman al Miniscope.

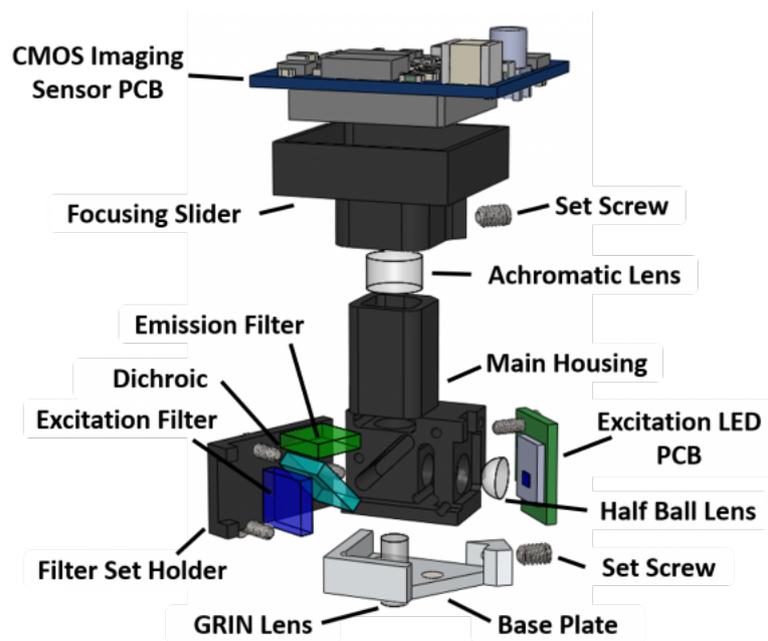


Figura 1.7: Vista expandida de los componentes del Miniscope [12].

2 Antecedentes y Objetivos

Originalmente, los objetivos de este trabajo consistían en lograr registros propios de imágenes de calcio en la región CA3 del hipocampo de ratones. Debido a esto se investigó extensamente el principio de funcionamiento y operación del *Miniscope*, la cual hubiera sido la herramienta dispuesta para realizar las observaciones.

El objetivo concreto de los experimentos hubiera sido estudiar el rol de las neuronas inmaduras del hipocampo en la generación de memorias, mediante el proceso conocido como separación de patrones, es decir, la sincronización de un grupo dado de neuronas que codifican una memoria particular.

Los experimentos hubieran incorporado no solo las etapas conductuales y de memoria, sino también la preparación, configuración e implantación del Miniscope. La transfección del virus codificante de GCaMP6, y la inserción quirúrgica de la lente implantable previa a la fijación del miniscope se detallan en el siguiente protocolo [15].

Ante la imposibilidad de acceder al bioterio del Instituto Leloir, se decidió reorientar la investigación a las etapas posteriores al proceso de adquisición de imágenes, especialmente a todos los procesos de procesamiento posteriores a la adquisición en sí de los videos de imágenes de calcio. Dada la existencia de repositorios de videos del hipocampo de ratones, y de registros preexistentes las cuales podían ser prestadas para procesar, se decidió trabajar en base a estos registros.

Se trabajó en un principio con los videos de demostración incluidos en los pipelines de análisis, con los videos usados por Yang y colegas(2020)[16] (el cual incluía un repositorio de los datos utilizados, para ratones anestesiados y despiertos de los cuales se utilizaron los datos de ratones despiertos, o de control), y con registros provistos por el Dr. Pablo Jercog, del Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Un registro del área CA1 de este último grupo fue la más ampliamente utilizada, y a menos que se explicito lo contrario, todos los resultados expuestos se obtuvieron en base al mismo.

La investigación realizada se orientó en dos grandes bloques. En primer lugar, estudiar la implementación de un número de pipelines de procesamiento libremente disponibles y

de uso corriente en la comunidad neurocientífica. Luego de comprobar su facilidad de implementación y correcto funcionamiento, se eligieron dos *pipelines* para contrastar su rendimiento. En particular se buscó evaluar la eficiencia de segmentación de la imagen entre los dos métodos para distintos niveles de ruido agregado artificialmente.

En segundo lugar, se trabajó con un algoritmo disponible de detección de ensamblajes neuronales, tomado de los materiales y métodos de Carrillo(2016) [8] y descrito en profundidad en Carrillo(2015) [9]. En base a este algoritmo se investigó la consistencia de la detección de ensamblajes para distintas ventanas temporales del video procesado.

El objetivo de ambas partes fue testear la robustez de distintas herramientas de post procesamiento de imágenes de calcio, ya que estas son de suma importancia para la extracción de información relevante de las imágenes crudas. Debido a la gran dimensionalidad de las imágenes analizadas, tanto por su duración como por el gran número de células, y elementos no celulares que pueden causar falsos positivos, como células de la glia, la pericia humana y el know-how del observador resultan de poca utilidad al compararlos con los algoritmos y herramientas de procesamiento existentes. Es por esto que aun más que en otras disciplinas, las herramientas informáticas resultan fundamentales para cualquier investigación o experimento, y estas deben ser rigurosamente testeadas, ponderadas y catalogadas cuantitativa y comparativamente.

Otro problema para las investigaciones basadas en imágenes de calcio, y uno que no puede ser saltado en este proyecto, es la ausencia de una evidencia empírica observada directamente. Esto afecta a los resultados obtenidos, ya que no hay manera de garantizar con absoluta certeza que la información arrojada por los pipelines de procesamiento refleja correctamente la actividad de cada una de las células, ni que los conjuntos de células detectados sean efectivamente aquellos presentes y disparando sincrónicamente en el área elegida para la observación.

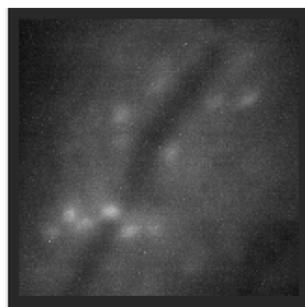


Figura 2.1: Frame crudo de un video de calcio, ilustrativo de la necesidad de post procesamiento para obtener información útil. La mancha oscura diagonal en la imagen corresponde a un vaso sanguíneo

La necesidad de herramientas de procesamiento se ve ilustrada por el ejemplo de una imagen cruda extraída de un video, visible en la figura 2.1.

Algunas investigaciones[17] han creado conjuntos de datos de picos de calcio artificiales, para poder contrastar con los resultados arrojados por diversos métodos de detección de ensamblajes. Su rendimiento se evalúa de acuerdo a la detección del número correcto de ensamblajes, y de la identificación de las células que componen a cada ensamblaje. Sin embargo, el análisis de datos fabricados artificialmente no reemplaza a la evidencia empírica porque no incluye todas las fuentes de error que se desconocen o son difíciles de estimar. Otra manera de evaluar las herramientas en ausencia de evidencia empírica es estudiar su robustez frente al ruido, o a variaciones en los parámetros de los algoritmos de análisis. En este proyecto se trabajará en esta dirección.

Específicamente, en este trabajo se realizará, en una primera sección un análisis comparativo entre distintos pipelines de procesamiento, evaluando cualitativamente su dificultad de implementación, y cuantitativamente su robustez ante distintos niveles de ruido de fondo agregado. En la segunda sección, se evaluará la performance de un algoritmo de detección de ensamblajes neuronales (SVD) para un mismo video, variando artificialmente la frecuencia de muestreo de datos mediante distintas ventanas temporales. También se comparará la performance de este algoritmo con un algoritmo de clustering no especializado, K Means.

3 Materiales y métodos

Si bien este trabajo fue hecho en base a videos de Miniscope previamente grabados, un objetivo original fue la obtención de imágenes propias. El protocolo [15] para la obtención de imágenes incluye la preparación e inyección del virus para la expresión de GCaMP6, y la constatación de que no haya sub ni sobreexpresión, y que esta se encuentre localizada correctamente; la selección de una lente GRIN del diámetro y longitud apropiados para la profundidad de tejido que se desee visualizar seguida de una craneotomía para su implantación.

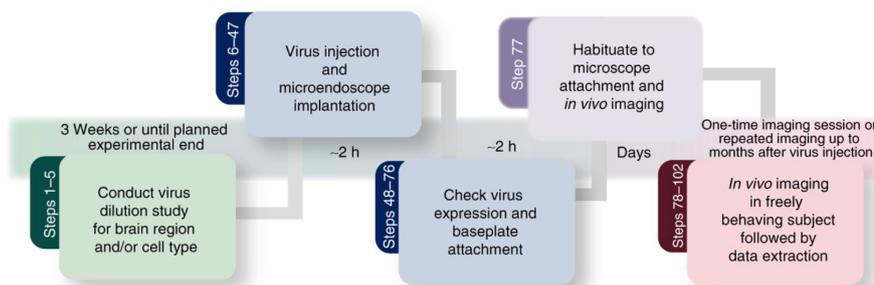


Figura 3.1: Procedimiento experimental para la obtención de imágenes de calcio en ratones [15].

Durante la cirugía se inserta una lente directamente en contacto con el tejido que expresa GCaMP6, la cual es fijada con un cemento adhesivo. Además de la lente, se insertan tornillos fijados al cráneo del ratón, donde se conectará la placa base para la fijación del *Miniscope*, lo cual se ve detallado y esquematizado en las figuras 3.1 y 3.2 respectivamente. Este procedimiento permite retirar y volver a colocar el miniscope varias veces para un mismo animal, lo que permite utilizar a un mismo ratón para muchos experimentos, o realizar pruebas durante un período de días o incluso semanas. Además, permite economizar los costos al poder usar un mismo miniscope para muchos animales.

Por todo lo que se ha descrito sobre el método de obtención de imágenes en ratones, resulta evidente que dada su invasividad esta técnica no puede ser aplicada en humanos, y que por lo tanto las investigaciones sobre el rol del hipocampo en la memoria

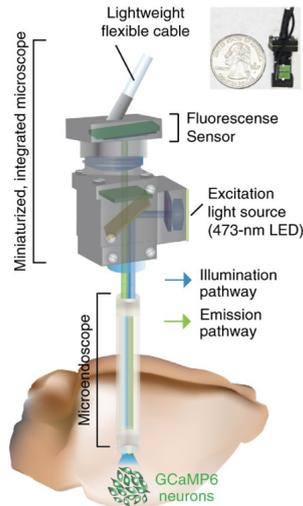


Figura 3.2: Esquema de la colocación del miniscope en el cráneo de un ratón para la visualización del hipocampo [15].

declarativa deberán extrapolarse de modelos animales en el futuro previsible.

3.1. Procesamiento de imágenes

Las imágenes capturadas por los microscopios de fluorescencia aportan escasa información por sí mismos. A diferencia de los registros de electrofisiología, que capturan la actividad de una neurona directamente a lo largo del tiempo, las señales de calcio deben ser procesadas para poder extraer la misma información. [18].

Existe un gran número de *pipelines* de procesamiento de registros de actividad de calcio, los cuales abordan los mismos problemas, por lo que sus pasos se pueden resumir en 4 etapas: corrección por movimiento y eliminación de ruido, segmentación y detección de regiones de interés, deconvolución de la señal, validación y evaluación de los datos, como puede verse en la figura 3.3.

Algunos ejemplos de pipelines disponibles son Suite2P[19], CaImAn[20], MiniAn[21] y Min1pipe[22]. Para este trabajo se utilizaron principalmente CaImAn y Suite2P.

Ya sea que el sujeto esté anestesiado o que el registro sea *in vivo*, el movimiento del cerebro respecto a la cámara es inevitable. Es por esto que resulta necesario preceder el análisis de la actividad fluorescente con un algoritmo de corrección de movimiento. Se busca alinear cada frame de modo que cada pixel represente la misma ubicación espacial durante todo el registro. Esta corrección puede ser rígida (si la traslación de frames se hace respecto a una referencia) o no.

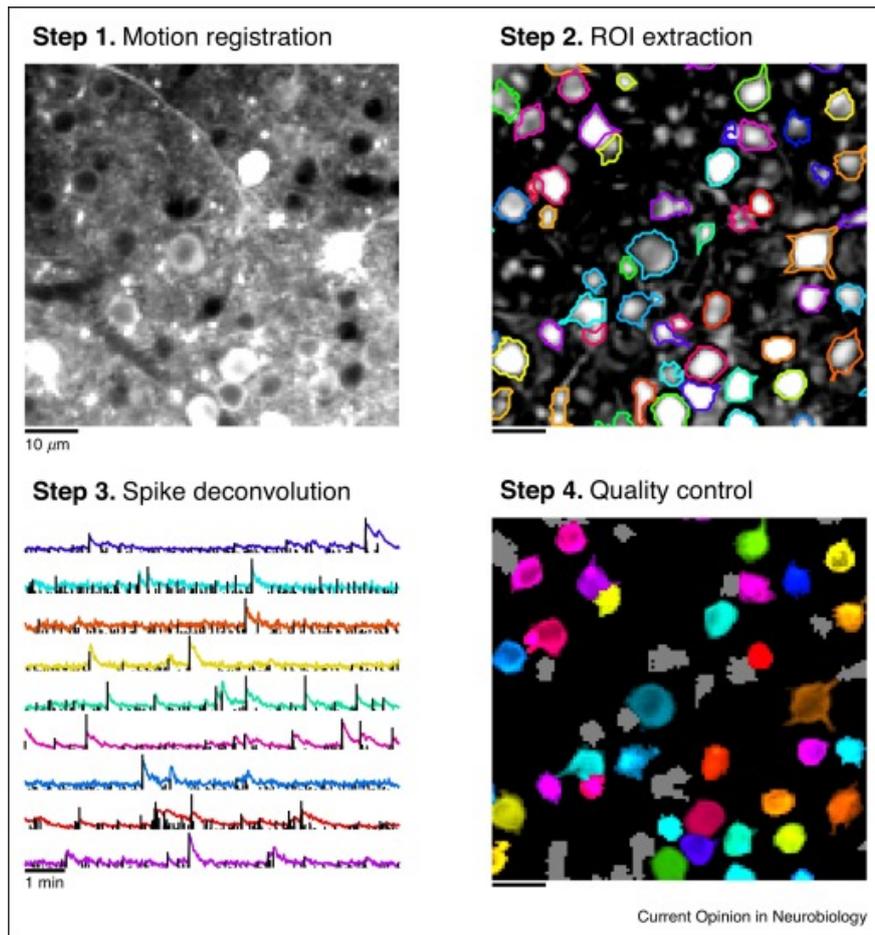


Figura 3.3: Etapas comunes en los programas de procesamiento de imágenes de calcio [18]

Una vez formada una imagen de consenso, se detectan las regiones de interés, registrando las coordenadas donde hay variaciones en la intensidad de luz capturada. Exceptuando artefactos que pueden surgir de la acumulación de varias células en el plano perpendicular a la imagen, se identifica un número de componentes correspondientes a la actividad de neuronas individualizadas.

Este paso puede resultar trivial para registros en regiones escasas en neuronas, pero su complejidad aumenta abruptamente cuando se visualiza un gran número de neuronas para el campo de visión del microscopio. Por lo tanto, siempre hay un balanceo entre el tamaño de muestra que se desea estudiar y la resolución espacial con la que se puede visualizar dicha área.

3.2. Extracción de señales neuronales

Una vez individualizadas las neuronas presentes en la muestra de tejido cerebral observado, y reducidos los artefactos de movimiento y ruido presentes, se procede a

extraer la variación temporal de la concentración de calcio en el interior de la célula, como subrogado de su actividad a lo largo del tiempo.

Para este motivo, existen diversos métodos numéricos basados en objetivos comunes, los cuales se definirán a continuación. En general, se busca separar de la actividad celular la *comunicación cruzada*, la superposición entre dos señales luminosas debido a la proximidad o superposición espacial entre dos o más células, además del ruido de oscuridad propio de la cámara, y un término de campo medio dependiente de las condiciones de iluminación en la region cerebral[22][23].

La señal puede modelarse de la siguiente forma

$$I(x, y, t) = S(x, y, t) + DN(x, y, t) + MF(x, y, t) \quad (1)$$

donde I es la señal captada por medios ópticos, S es la señal ideal, DN es el ruido propio del método de captura y MF es el término de ruido de campo medio o background noise.

3.2.1. Análisis de componentes independientes (ICA)

Uno de los primeros métodos que se aplicó a este problema es el de *Análisis de componentes independientes* o ICA, por sus siglas en inglés[23]. Este método es apto para abordar lo que se conoce como *efecto de la fiesta de cóctel*, el cual se explica como la capacidad del cerebro de poder distinguir a una sola fuente en medio de una cacofonía de emisores similares, como lo puede ser mantener una conversación en un salón ruidoso con mucha gente hablando al mismo tiempo. Análogamente, aquí se busca desprender cada célula emisora de luz de su entorno y células vecinas, sin eliminar ningún componente[24].

El criterio de aplicación de este método presupone que las señales entremezcladas son independientes entre sí, una condición que es aparente si hablamos de voces superpuestas, pero no necesariamente verdadero al tratarse de células activandose secuencialmente en una misma región del cerebro, como se explicará más adelante.

3.2.2. Análisis de componentes principales (PCA)

Un método complementario a ICA es el análisis de componentes principales, o PCA, el cual es una técnica de descomposición matricial que busca reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos formado por muchas variables interrelacionadas, manteniendo la variabilidad presente en el conjunto. Esto se logra mediante una transformación lineal

que convierte las variables en otras, llamadas componentes principales, que no están relacionadas entre sí eligiéndose solamente las que concentran la mayor variación en las primeras componentes.

Implementación PCA/ICA

Estos dos métodos se usan en conjunto en el primer *pipeline* de procesamiento con el que se trabajó, llamado *CellSort* [23]. El primer paso es reducir la dimensionalidad del video además de eliminar el ruido, ya que las dimensiones de la matriz vienen dadas por los píxeles de la imagen y los frames del registro. Mediante PCA se conservan solo los componentes con más varianza, eliminando aquellos con poca varianza que corresponden al fondo o a ruido.

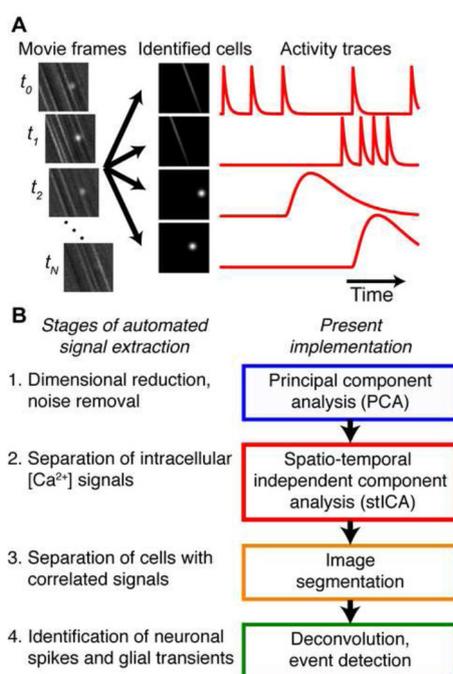


Figura 3.4: Pipeline de PCA/ICA [23].

En base a los resultados restringidos a los componentes principales, se busca identificar los componentes individuales correspondientes a neuronas usando ICA. Luego, se clasifican las componentes individuales según la asimetría de cada uno respecto a la distribución probabilística. Finalmente, las componentes aceptadas como neuronas se deconvolucionan para obtener su actividad temporal para todos los frames del video. La implementación de estos procesos se ve esquematizada en la figura 3.4.

3.3. CNMF-Factorización restringida no negativa

Un método más nuevo y más diseminado actualmente como herramienta de procesamiento de imágenes de calcio es el de Factorización restringida no negativa (*constrained nonnegative matrix factorization*) o CNMF. Este consiste en una factorización matricial que expresa la actividad fluorescente como el producto de una matriz espacial que codifica la huella espacial de cada neurona en el campo de visión y una matriz temporal que representa la concentración de calcio en cada neurona en función del tiempo [21].

Este método realiza en un mismo paso la identificación espacial de cada célula, su segmentación y posterior deconvolución y puede considerarse una alternativa más “hecha a medida” a la problemática de neurociencias que la más general ICA/PCA. Una comparación entre los resultados de estas dos técnicas se observa en la figura 3.5

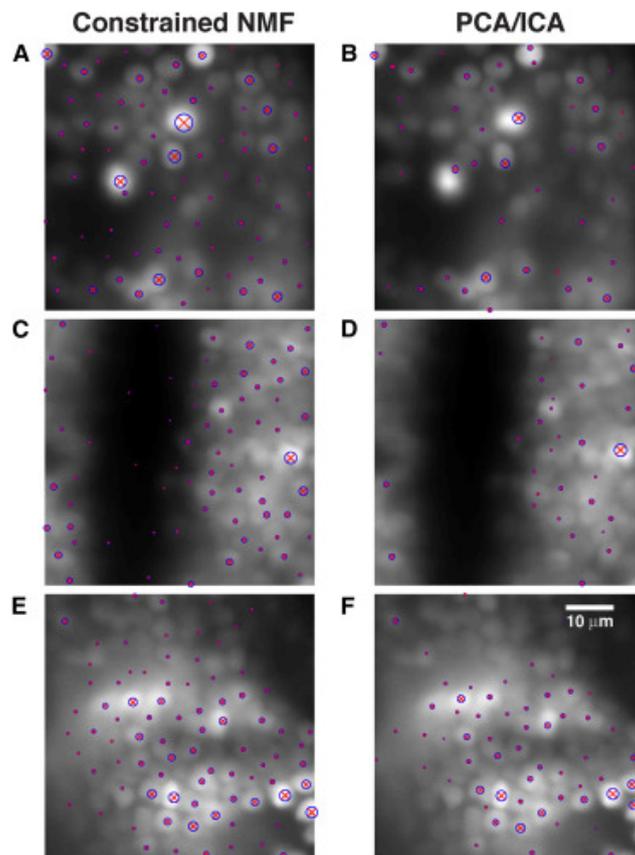


Figura 3.5: Comparación de la eficiencia de localización de neuronas debiles en pez cebra [21].

El método modela la relación entre la concentración de calcio en la célula y la fluorescencia observada, según:

$$y(t) = \alpha[c(t) + b] + \epsilon(t) \quad (2)$$

donde y es la fluorescencia, $\alpha > 0$ es una constante, y b es la concentración base. Es por lo tanto una relación lineal con ruido epsilon gaussiano de media nula. Aunque $y(t)$ podría tomarse como un resultado, suele agregarse un paso extra de deconvolución para obtener los picos de actividad explícitamente[25].

En la literatura se modela el problema a resolver computacionalmente como:

$$F(x, t) = \sum_{i=1}^K a_i(x)c_i(t) + B(x, t) \quad (3)$$

donde la fluorescencia $F(t)$ viene dada por la actividad de las matrices a y c , que representan la actividad espacial y temporal respectivamente, para cada una de las K células totales. La matriz B representa la actividad de fondo o de neuropilo para la posición x y momento t .

La fluorescencia observada, como se expreso anteriormente, corresponde a la fluorescencia $F(x, t)$ más un ruido gaussiano. Las ecuaciones anteriores se pueden expresar matricialmente de la siguiente forma

$$\begin{cases} S = CG^T \\ F = AC + B \\ Y = F + E \end{cases} \quad (4)$$

donde A, C siguen correspondiendo a la actividad espacial y temporal, Y a la fluorescencia observada, y B a la actividad de neuropilo. La matriz S corresponde a los picos de concentración de calcio.

Para resolver este problema, se restringe el problema a matrices A y C no negativas y ralas (*sparse*, con muchos ceros). Determinando la dinámica autoregresiva e inicializando las matrices A, C , b y f , se las actualiza iterativamente siguiendo la restricción de factorización hasta llegar a la convergencia, actualizando y mezclando o descartando componentes hasta extraer la actividad temporal de cada neurona.

3.3.1. CNMF-E

Aunque CNMF es un método ampliamente aceptado y usado en la comunidad científica, su uso fue diseñado para microscopios de fluorescencia de dos fotones, y no para microendoscopios de 1 fotón, como lo es el Miniscope. El método tiene problemas especialmente en situaciones con baja relación señal ruido, o de grandes fluctuaciones en el fondo. Para esto se diseñó una metodología más nueva que itera sobre el concepto de CNMF denominada CNMF-E (extendida)[26], que agrega restricciones adicionales sobre

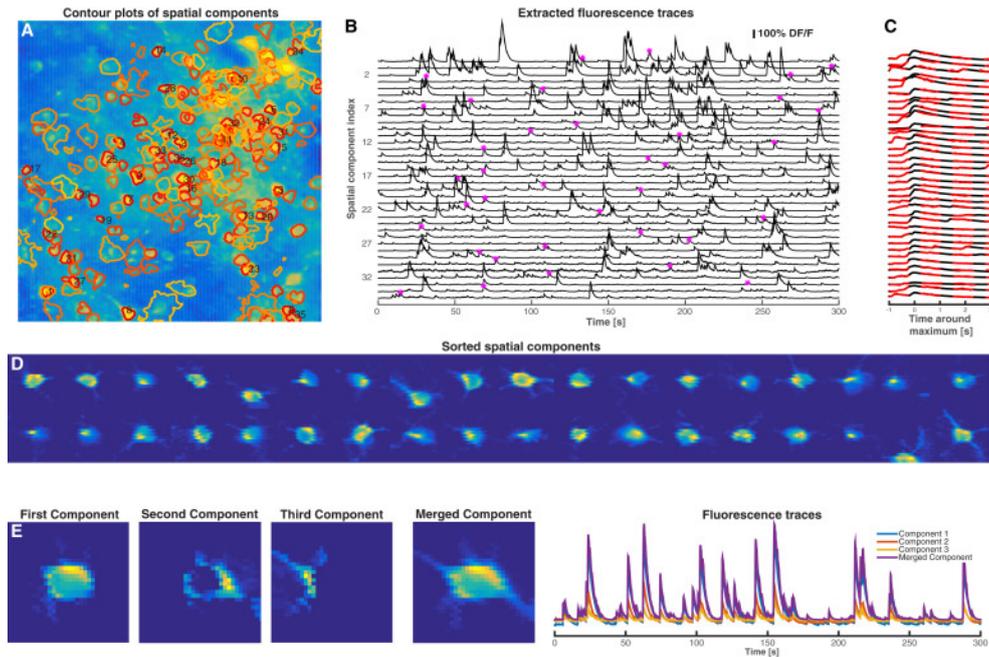


Figura 3.6: Procesamiento de imagen de calcio en base a datos de ratón con GCaMP6. Identificación de componentes espaciales [21].

la matriz B (background), para compensar la baja claridad de la imagen respecto al fondo del video.

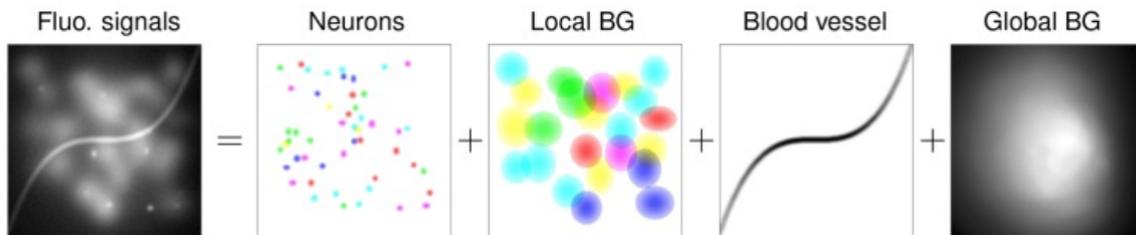


Figura 3.7: Esquema de fondo y relación señal ruido para imágenes tomadas con microscopios de 1 fotón[26].

En las figuras 3.6 y 3.7 pueden verse respectivamente la extracción de picos de fluorescencia e identificación de componentes espaciales usando CNMF y la identificación de neuronas del ruido de fondo del video tomada de registros con microscopios de 1 fotón.

3.3.2. Pipelines de CNMF/CNMF-E

A diferencia de PCA/ICA, CNMF y CNMF-E han sido implementados en un número de pipelines, entre los cuales se destacan **CaImAn**[20], **Min1pipe**[22] y **Minian**¹, los

¹<https://github.com/DeniseCaiLab/minian>

cuales son de libre acceso y con implementaciones disponibles en librerías de GitHub.

Generalmente, todos siguen una estructura similar: en primer lugar una corrección de movimiento, ya sea rígida o usando Normcorre[27][20], un método de corrección de movimiento diseñado específicamente para imágenes de calcio de 1 fotón, implementado por defecto en CaImAn. Luego sigue el paso de segmentación propiamente dicho, para el cual CaImAn utiliza CNMF o CNMF-E, según la implementación que se elija, además de una deconvolución final que también resulta opcional. Min1pipe utiliza un paso intermedio llamado *saneamiento de fuentes* (*seeds cleansing*) para eliminar el fondo y así poder utilizar solamente CNMF.

Cabe destacar que todos los métodos descritos son computacionalmente costosos, y que para muestras de gran tamaño y/o larga duración puede resultar conveniente el uso de un *cluster* por sobre una computadora ordinaria.

3.4. Suite2p

Un *pipeline* alternativo que utiliza su propia metodología y es una de las opciones más utilizadas es **Suite2p**[19]. Este método está orientado a detectar un mayor número de células que otros métodos disponibles, llegando a detectar hasta 10000 células simultáneamente según la literatura[19] y a un costo computacional menor, ya que es capaz de procesar registros de hasta varias horas en GPUs disponibles comercialmente.

El algoritmo sigue 4 pasos generales: *Registro de imagen*, que realiza un mapa de correlación cruzada entre distintos cuadros del video, buscando un pico de correlación para corregir el movimiento entre los distintos frames del video; luego, la *detección de regiones de interés(ROI)*, eliminando las señales correspondientes al neuropilo (dendritas, axones que no corresponden al soma neuronal).

Luego, se realiza un curado manual por parte del usuario, usando una GUI propia de este método, para eliminar señales incorrectas o limitar la búsqueda a solo unas células de interés. Esta GUI aporta un mayor grado de interactividad con el usuario, y en un formato más fácilmente accesible que otros métodos. Por último, la deconvolución de los spikes se logra usando una factorización similar a la utilizada por CNMF. Este proceso se puede ver ilustrado en la figura 3.8.

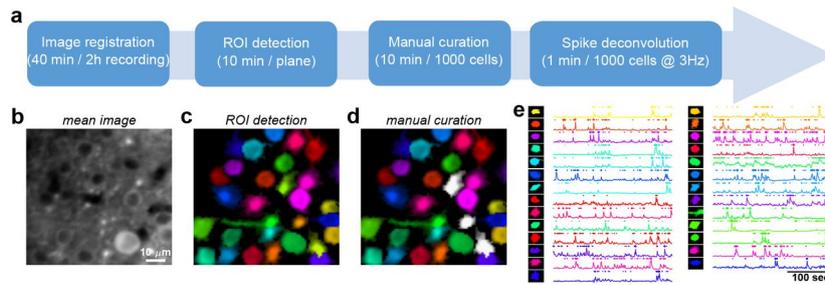


Figura 3.8: Pipeline de funcionamiento de Suite2P. Fuente: [19]

3.5. Detección de ensambles mediante SVD

El proceso de detección de ensambles neuronales es el mismo usado por Carrillo Reid et al. para detectar sincronización en la corteza visual[8]. Este método fue originalmente diseñado[9] para ser usado en videos tomados con microscopios de dos fotones en la corteza visual, por lo que resulta innovador usarlo para detectar ensambles tomados con un *miniscope*, que utiliza la técnica de un solo fotón, y en el hipocampo.

Para identificar los grupos de neuronas que se coactivan, primero se crean vectores temporales que representan las células activadas para cada *frame* del video. Nótese que como el objeto de estudio es únicamente la activación de cada neurona, se ignora la intensidad relativa de cada neurona, y el tamaño de cada *spike* de calcio, tomando solo ceros y unos. Cada vector tiene la dimensión del número total de células identificadas, y permite convertir al video en una secuencia temporal de todos estos vectores.

Luego, todos los vectores se evalúan según su TF-IDF (Term Frequency- Inverse Document Frequency) una estadística utilizada en procesamiento de textos para encontrar la relevancia de una palabra dada para el total del texto. En este caso, se busca encontrar las células más relevantes para cada frame. El peso de cada elemento en la matriz se asigna como $TF * IDF$, donde TF (*term frequency*) toma en cuenta el número de veces que una neurona se activa, normalizada por la cantidad total de neuronas activas en cada frame. IDF (*inverse document frequency*) se usa para evitar que ciertos elementos poco representativos eclipsen a otros más significativos pero menos frecuentes (por ejemplo, en su uso original como procesador de textos, evita que las búsquedas de motores de búsqueda se vean saturadas por palabras comunmente utilizadas como "the"), en este caso se usa para evitar que las células de mucha actividad, o que permanecen activadas durante un período más largo eclipsen en relevancia a las demás células de cada ensamble.

Para cada par de vectores de la matriz de TF-IDF se computa su índice de similitud, calculando el coseno del ángulo entre ambos vectores. En el contexto de una red neuronal, un valor alto de semejanza (cercano a 1, correspondiente a ángulos cercanos a

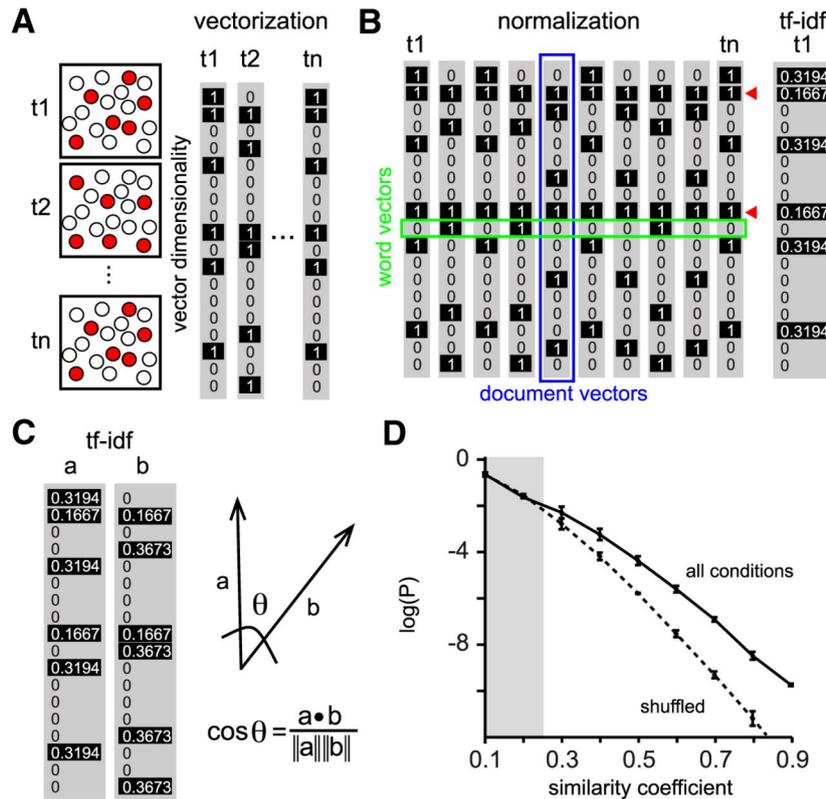


Figura 3.9: Representación vectorial de la actividad cerebral. Fuente:[9]

0) indica que distintos grupos de neuronas presentan coactivación sostenida a lo largo del tiempo.

Para la detección de los ensambles neuronales, se uso una matriz de la correlación definida por el coseno de cada par de vectores. Sobre este mapa de similitud, se realizo la descomposición en valores singulares (SVD) para extraer las características principales de un sistema. La descomposición en valores singulares convierte a una matriz M en

$$M = U * \Sigma * V^t \quad (5)$$

donde U y V son bases ortonormales y los elementos de son los autovalores de M. El número de valores singulares determina el número de ensambles detectados. La ventaja principal de usar este método es que no requiere especificar un número esperado de ensambles, como otros algoritmos de *clustering*, por lo que puede procesar un video independientemente y sin requerir la participación de un observador o de otro tipo de clasificador.

En la figura 3.9 se ven ilustrados los procesos de representación vectorial de la actividad neuronal que permite analizar la conformación de ensambles neuronales. Se observa que luego de representar cada instancia temporal como vectores binarios, se aplica TF-IDF

seguido del cálculo de distancia entre los vectores resultantes para establecer su semejanza. Por último, se utiliza el coeficiente de similitud para mantener únicamente los ensambles que presentan actividad por encima de la probabilidad aleatoria.

La implementación de este algoritmo se encuentra disponible² en GitHub.

²<https://github.com/hanshuting/SVDensamble>

4 Resultados

4.1. *Pipelines* de procesamiento

4.1.1. Resultados preliminares de implementación

En primer lugar se buscó implementar los *pipelines* previamente mencionados, Cellsort, Min1pipe, Minian, CaImAn y suite2p, utilizando los videos provistos con cada uno de ellos a modo de demostración, y usando el video de CA1 provisto para verificar su funcionamiento con material externo a cada método.

Estos métodos son inflexibles respecto al formato de video que pueden aceptar como entrada, siendo **.avi** y **.tif** las opciones aceptadas más comunes. Dadas las características de los videos disponibles, se elaboró un *script* que convirtiera todos los videos a formato **.tif**.

Al testear cada uno de los *pipelines*, se comprobó que CellSort se encuentra desactualizado hace algunos años, y que actualizar sus modulos a los que se encuentran en uso requeriría un esfuerzo y compromiso de tiempo injustificables para este proyecto, por lo que fue descartado.

Minian fue la opción original sugerida para este tipo de procesamiento, debido al involucramiento de sus desarrolladores con el laboratorio que creó el miniscope. El código de minian¹, implementado en Python, tiene una estructura altamente modular, con pasos separados para la corrección de movimiento, segmentación de neuronas y deconvolución de spikes.

Se logró procesar uno de los videos incluidos a modo de demo para constatar el funcionamiento del pipeline, pero este fracasaba al llegar al paso de la deconvolución usando CNMF. Debido a un problema con las dependencias necesarias, el código no era funcional en el período en que fue probado, y dada la compleja arquitectura y el tiempo esperado para que sus desarrolladores resolvieran el problema encontrado, se decidió

¹<https://github.com/DeniseCaiLab/minian>

descartar también este método.

Una implementación similar es Min1pipe, que sigue los principios de diseño de Minian, procesamiento de imágenes de 1 fotón usando CNMF-E, pero implementado en MatLab, y con un método distinto para eliminar el ruido y movimiento de la imagen. Debido a la actualización de las librerías utilizadas a la última versión disponible de MatLab, se decidió descartar también este método.

A diferencia de estos dos métodos, que son computacionalmente costosos y poco adecuados para ser probados en una computadora personal, CaImAn fue diseñado para poder ser usado en hardware más modesto que el especializado para investigaciones en neurociencias[20], aunque también utiliza factorización no negativa como su herramienta de deconvolución. Tiene una gran modularidad ya que permite realizar dos tipos de corrección de movimiento, rígida o rígida por partes, y también especificar si la imagen proviene de un microscopio de 2 fotones, para el cual se utilizara CNMF, o de uno de 1 fotón, caso en el cual se usara CNMF-E. CaImAn cuenta con implementaciones en Python y en Matlab, las cuales son funcionalmente idénticas. Para este trabajo, se optó por trabajar exclusivamente con la implementación en Python.

Por otra parte, también se implementó con éxito el pipeline suite2p, el cual también resulta computacionalmente eficiente, y fácil de usar. La principal diferencia de suite2p respecto a los otros métodos de análisis es el uso de una GUI (graphic user interface) como herramienta general de interacción con el usuario. Para un usuario menos diestro en programación en lenguaje Python, la interfaz gráfica puede brindar una mejor experiencia, más similar a la de un software convencional.

Por otra parte, la mejor experiencia de usuario y facilidad de uso brindadas por suite2p se ven contrarrestadas por una menor modularidad, y una mayor dificultad de modificar el código base de este pipeline. Un ejemplo de la interfaz gráfica de suite2p se incluye en la figura 4.1.

4.1.2. Comparación cuantitativa de capacidad de segmentación entre pipelines

Comparar cuantitativamente la performance de estos dos pipelines no resulta sencillo, debido a la falta de evidencia empírica en el caso del video procesado. Dado que no se puede saber con absoluta certeza cual es el número de células presentes en la región del cerebro visualizada por el miniscope, el análisis comparativo de los pipelines debe centrarse en este caso en su resiliencia a condiciones externas a la extracción de datos. Específicamente, se decidió analizar la capacidad de segmentar correctamente el mismo conjunto de células para niveles crecientes de ruido en el video original. Preliminar a

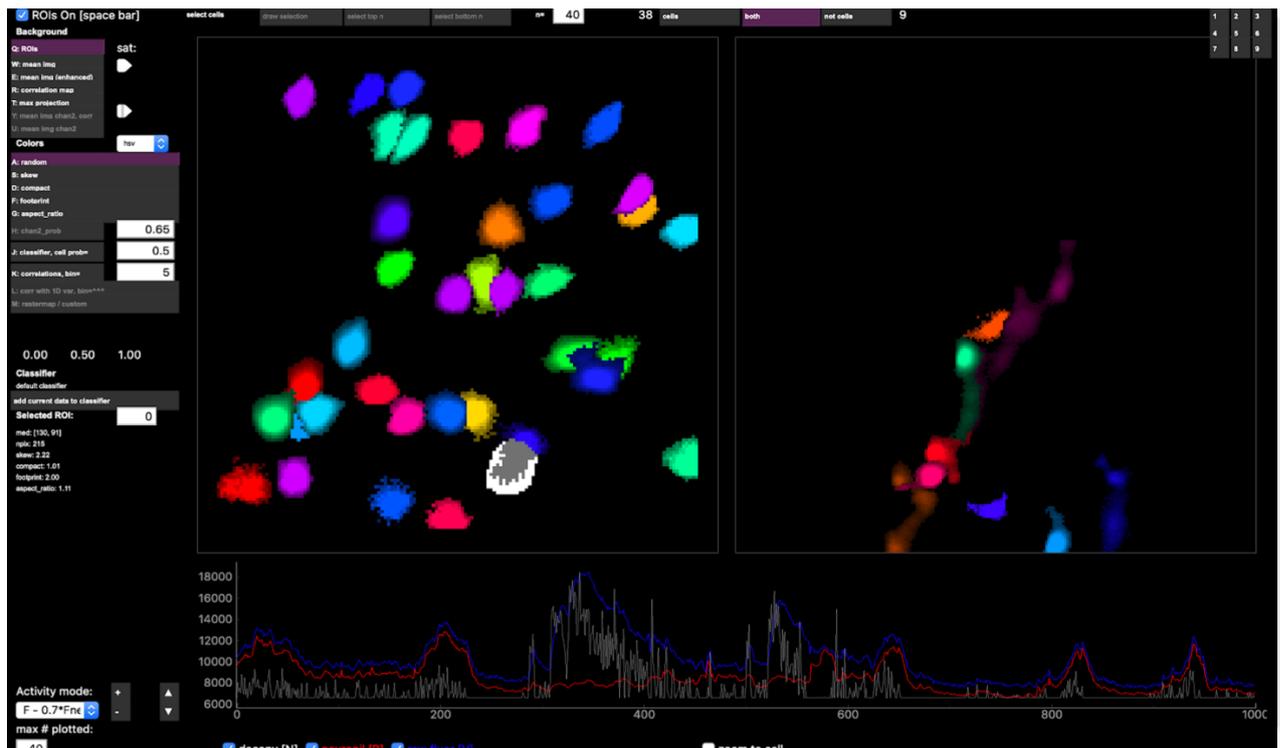


Figura 4.1: Segmentación de un video obtenido mediante imágenes de calcio usando suite2p. En la pantalla izquierda se ven las ROI identificadas, y en la derecha las componentes rechazadas. En la parte inferior de la pantalla pueden verse los plots temporales de las neuronas seleccionadas.

cualquier análisis cuantitativo, los resultados de identificación de células para ambos métodos se observan en la figura 4.2.

Concretamente, la presencia de ruido en la muestra es una realidad ineludible dadas las condiciones de obtención *in vivo*, por lo que la robustez de cada método frente a distintos niveles de ruido es una característica valiosa de conocer para los investigadores que deban decidir entre estas opciones para sus propios experimentos.

Teniendo en cuenta que cada *pipeline* incluye su propio método de corrección de movimiento, el cual puede impactar en la etapa de segmentación, se evaluó no solo el desempeño de cada pipeline entero por separado, sino también la etapa de segmentación de cada uno para un video cuyo movimiento ya había sido corregido. Es decir, se aisló la etapa de segmentación del código, y se evaluó si usar un método de corrección de movimiento distinto al incorporado en cada método impactaba negativamente en la identificación de neuronas.

Como criterio de evaluación se tomó el de CellTrackingChallenge² un desafío comunitario donde los investigadores pueden comparar métodos de detección y rastreo de células para distintos algoritmos o métodos. Si bien no se encuentra especializado en

²<http://celltrackingchallenge.net>

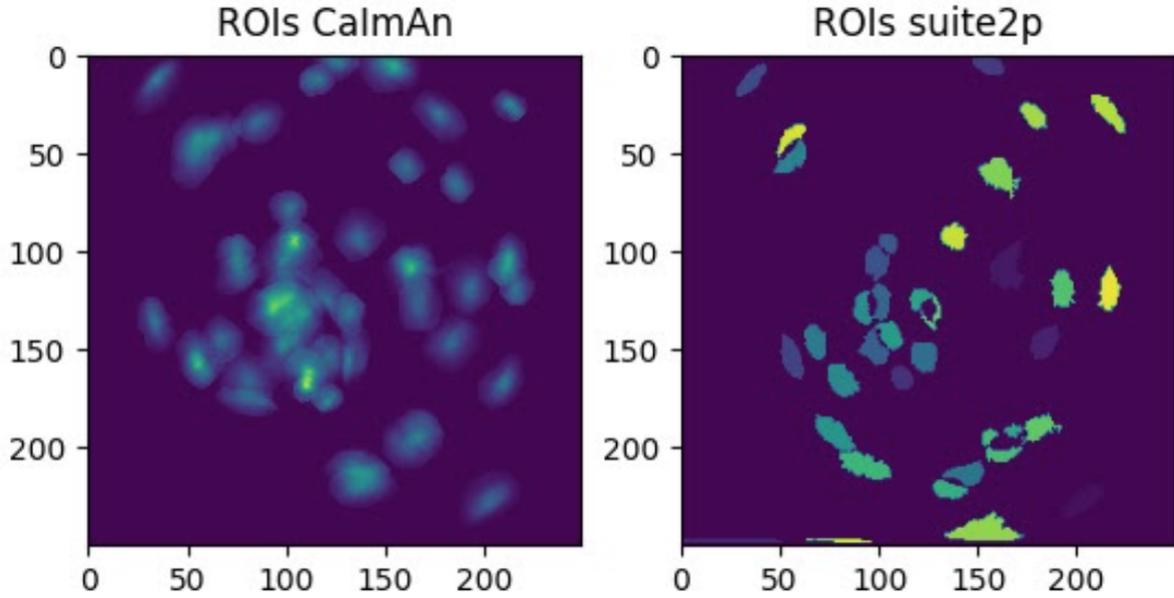


Figura 4.2: ROI identificadas mediante cada método para un mismo video. Cada componente aceptada corresponde a una neurona

imágenes de calcio, su metodología resulta de utilidad para esta investigación. En particular, se utilizó el índice de Jaccard, definido como

$$J(R, S) = \frac{|R \cap S|}{|R \cup S|} \quad (1)$$

donde R representa los píxeles de una imagen de referencia, y S a los de una imagen segmentada. El índice de Jaccard por lo tanto va de 0 a 1, donde 1 representa igualdad entre la imagen segmentada y la original, indicando en este caso que el conjunto de células detectadas fue idéntico. Si bien esta métrica requiere normalmente que el conjunto R esté segmentado correctamente, dada la previamente mencionada falta de evidencia empírica, tomamos la segmentación original con cada método como referencia.

El ruido se agregó adicionándole a la imagen una máscara del fondo de la imagen, es decir, la región que no corresponde a células observadas. Para cuantificar el nivel de ruido agregado, se identificó la región de la imagen correspondiente al fondo usando el método de Otsu[28]. Explicado simplemente, este método de procesamiento de imágenes genera un umbral automático que divide la imagen en dos clases, fondo y frente.

En la figura 4.3 se observa el resultado de la segmentación mediante el método de Otsu, que divide a la imagen en dos conjuntos, fondo o *background*, y frente o *foreground* según su intensidad. Una vez obtenida esta región de la imagen, se le sumó al video original, normalizando su nivel de intensidad máximo a un porcentaje de la intensidad total de la

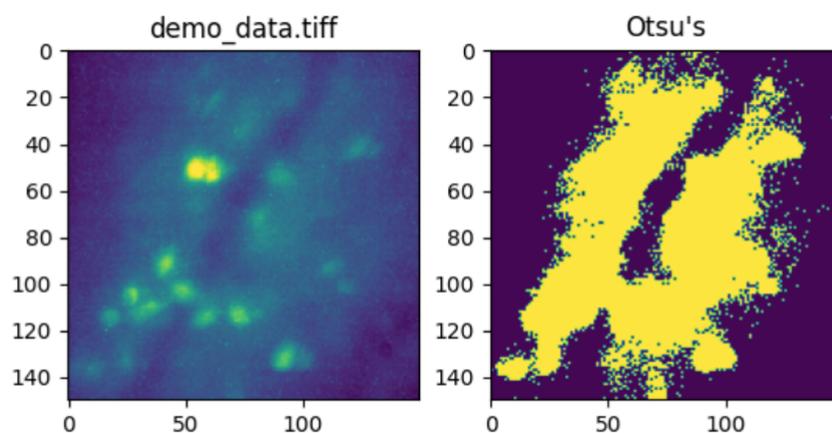


Figura 4.3: Método de Otsu aplicado a la proyección del video demodata.tiff. Las regiones en violeta corresponden al fondo de la imagen, o todo lo que no es una neurona.

imagen.

Se puede observar en la figura 4.4 al mismo video con distintos niveles de intensidad de ruido de fondo agregados, para 0, 10, 50 o 100 por ciento de intensidad adicional. Para ambos métodos, se analizó mediante el índice de Jaccard la similitud a la imagen de referencia para distintos porcentajes de ruido agregado. Esto se realizó para cada método completo, incluido su módulo de corrección de movimiento, y también para la etapa de segmentación únicamente, es decir, con la corrección de movimiento hecha previamente y externa al *pipeline* en cuestión.

Por último, en la figura 4.5 se observa la evolución del índice de Jaccard para distintas magnitudes de ruido para cada *pipeline*, suite2p a la izquierda, y CaImAn a la derecha, tanto para la corrección de movimiento previamente integrada, o hecha independientemente. Si bien ambos muestran un deterioro de la capacidad de identificación a mayores niveles de ruido, al procesar un video con su propio método de corrección de movimiento integrado, CaImAn mantiene un índice de Jaccard notablemente más alto que suite2p, que se deteriora marcadamente, aún para el mínimo de ruido agregado.

Video con niveles de ruido agregados artificialmente

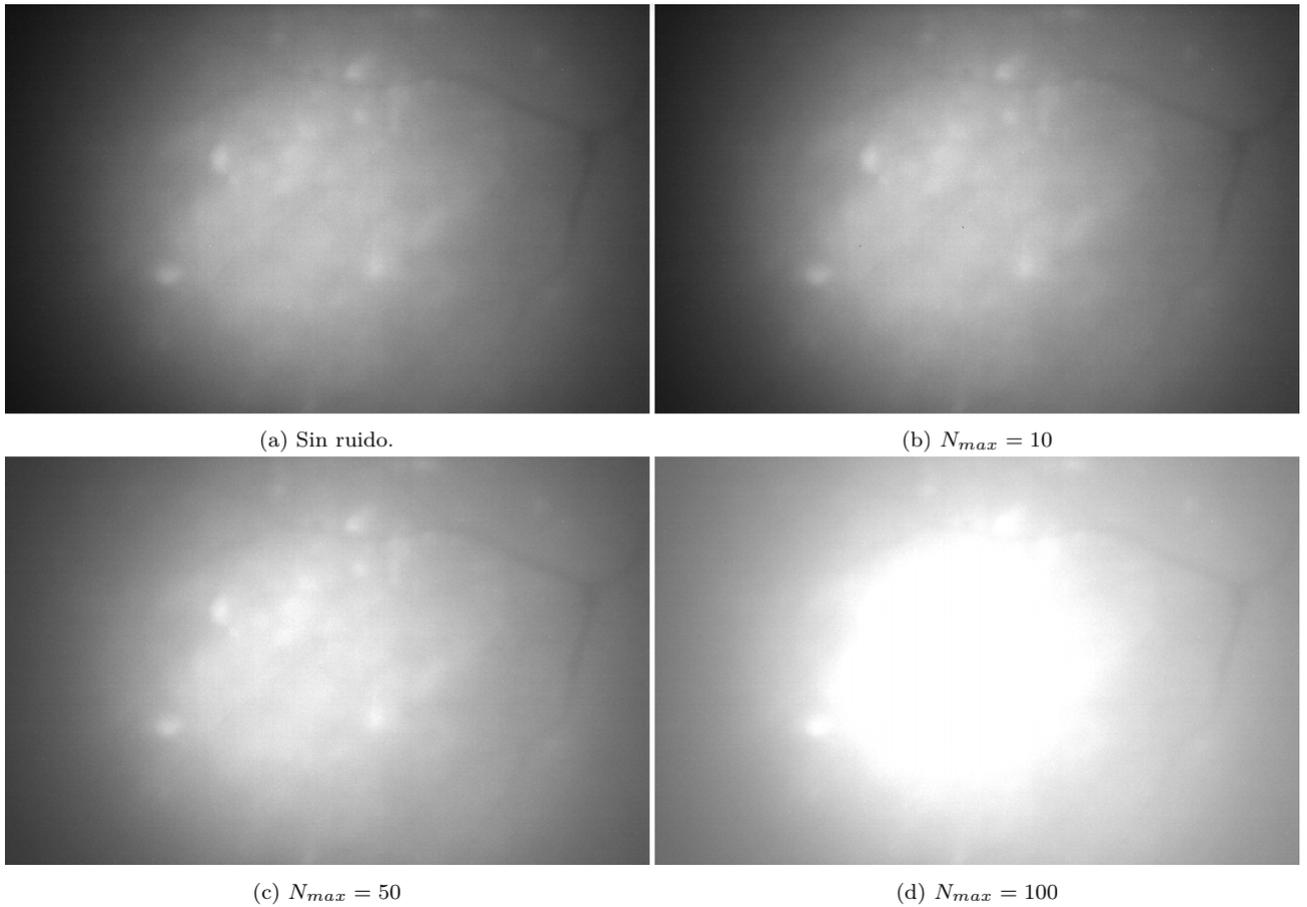


Figura 4.4: Video con distintas magnitudes de ruido de fondo agregado, entre 0 y 100 por ciento de la intensidad total del video original.

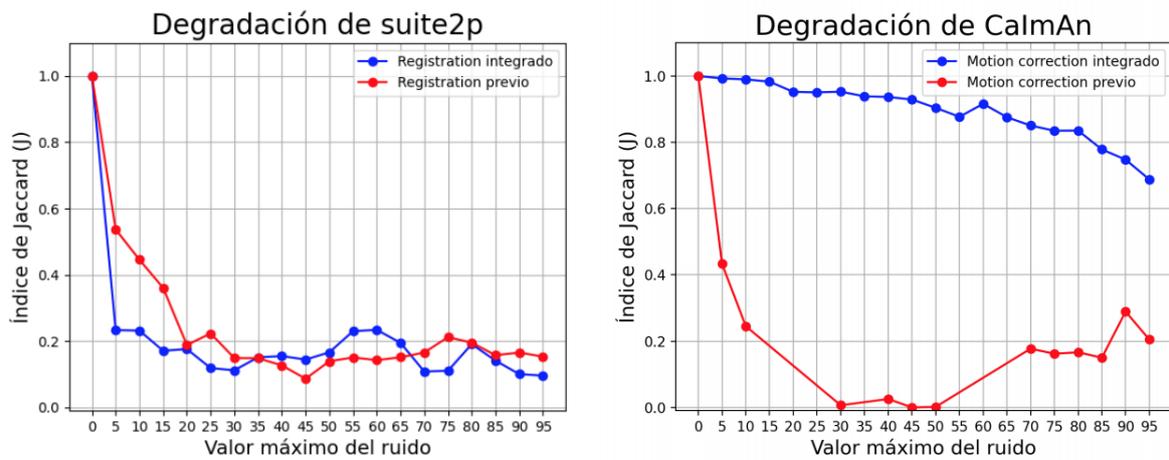


Figura 4.5: Degradación de cada *pipeline* para distintos niveles de ruido de fondo simulado. El ruido varía entre 0 y 100 por ciento de la intensidad del fondo del video original.

4.2. Detección de ensamblajes neuronales mediante SVD

Para la evaluación de la performance del algoritmo de detección de *clusters* neuronales utilizando descomposición en valores singulares (*single value decomposition* o **SVD**) se utilizó una implementación del mismo disponible en Matlab³, y como punto de comparación, se realizó una detección de *clusters* con un algoritmo no especializado para imágenes neuronales, para lo cual se eligió un agrupamiento de K-medias (**K Means Clustering**), uno de los métodos más simples de partición de conjuntos en un conjunto de datos.

En primer lugar, dado que la detección de ensamblajes es un proceso posterior a la extracción de señales neuronales de las imágenes de calcio, se debió realizar un procesamiento completo, siguiendo alguno de los *pipelines* descritos en la primera parte de este trabajo. Se eligió procesar el video usando suite2p debido al formato de salida, y la facilidad de documentación de cada archivo.

Suite2p genera 5 archivos como output, donde se encuentran las señales de fluorescencia extraídas en bruto, las señales correspondientes a neuropilo, las señales deconvolucionadas, las correcciones de movimiento, y demás información sobre cada célula que no resultan relevantes para este proyecto. Se utilizaron particularmente dos archivos: *spks.npy* y *stat.npy*. Ambos son arreglos *numpy*, esencialmente matrices de matrices que contienen la información relevante indexada según el número de células presentes en el video. El archivo *spks.npy* contenía la información de los picos de actividad para cada una de las 36 células detectadas, a lo largo de 15989 frames de video tomados a una frecuencia de 30 frames por segundo, mientras que *stat.npy* contiene un diccionario con estadísticas de cada célula, además de los resultados del tracking de cada célula por corrección de movimiento. En base a estos dos archivos se crearon dos matrices: una, con las coordenadas espaciales de las 36 células, y otra, con la actividad temporal de las células para cada frame. Estas dos matrices luego fueron cargadas a Matlab. Las coordenadas espaciales de las células identificadas se ven en la figura 4.6, donde las coordenadas cartesianas corresponden a los píxeles de la cámara del Miniscope.

La implementación del algoritmo de detección de ensamblajes neuronales específica que como input debe proveerse una matriz binaria de $N \times P$, siendo N el número de células y P el número de frames de video procesado. La matriz obtenida hasta el momento tenía sus valores como números sin normalizar, por lo que variaban considerablemente en intensidad para distintas células, ya que los picos presentes tenían diferencias importantes de tamaño.

³<https://github.com/hanshuting/SVDensamble>

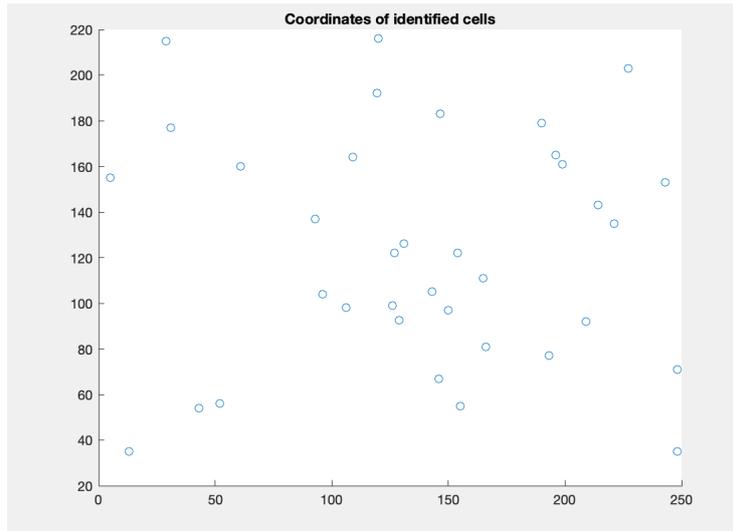


Figura 4.6: Coordenadas de todas las células identificadas mediante el pipeline suite2p. Las coordenadas cartesianas corresponden a los píxeles de resolución del campo de vista de la cámara (255 por 255)

El criterio elegido para convertir todos los valores de actividad celular a binario fue convertir la matriz según su puntaje Z , que asigna a cada valor su desvío estándar respecto a la media. Una vez convertida en valores de desvío estándar, se asigna un 1 únicamente a los valores que se encontraran dos desvíos estándar por encima de la media, y un 0 a todos los demás, explicándolos como actividad baseline, ruido y picos de baja intensidad que deben ser desestimados.

Componentes de los ensambles detectados usando suite2p

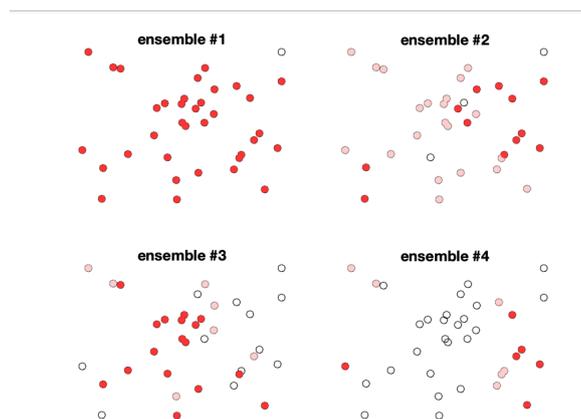


Figura 4.7: Ensamblas neuronales detectados mediante el algoritmo SVD, tomando como umbral 2 desviaciones estándar por arriba de la media. Las coordenadas cartesianas corresponden a los píxeles de resolución del campo de vista de la cámara (255 por 255)

En base a estos parámetros, el algoritmo encontró 4 clusters, y devolvió como *output* la figura con los componentes de cada uno (figura 4.), además de la actividad de cada cluster para cada *frame* del video. Cabe destacar que a diferencia de muchos métodos

de *clustering*, SVD asigna automáticamente el número de *clusters* presentes, sin requerir del usuario un número estimado de *clusters* para detectar.

Como se planteó en la sección de objetivos, se buscó estudiar la consistencia de este método para distintas ventanas temporales, especialmente considerando que el video utilizado en la publicación donde se caracterizó este método fue obtenido con un microendoscopio de un *frame* por segundo, y que el *miniscope* captura nativamente a treinta *frames*. Para emular cambios en la ventana temporal para un mismo video, se promediaron n elementos de cada fila de la matriz original, donde n corresponde a la tasa de muestreo reducido o *downsampling* que se le busca dar al video. Es decir, que si tomando a la matriz original, con sus 15989 elementos correspondientes al video capturado a 30 *frames* por segundo, promediamos para cada célula 30 *frames* devolviendo un solo valor, la matriz resultante representa la misma información en 533 elementos. De esta manera, se corrió múltiples veces el código, para distintos niveles de muestreo, yendo desde 1 (para la matriz original, de 30 cuadros por segundo hasta 40 veces (valor más allá del cual no converge el método debido al pequeño tamaño de la matriz). Un ejemplo de los resultados tras correr el código con la señal muestreada se ve en la figura 4.8

Componentes de los ensambles detectados en el video muestreado a 0.25 de la frecuencia original

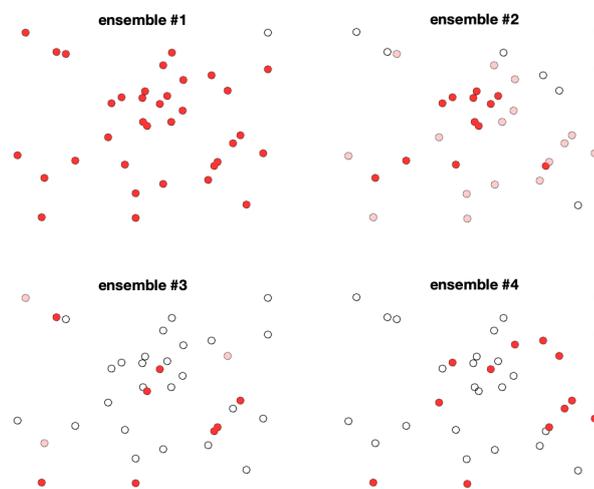


Figura 4.8: Clusters identificados para la matriz muestreada a 4 veces su frecuencia original. Las coordenadas cartesianas corresponden a los píxeles de resolución del campo de vista de la cámara (255 por 255)

Una vez obtenidos los distintos conjuntos de clusters para cada ventana temporal, se buscó un criterio para cuantificar la semejanza entre los distintos conjuntos de clusters. Se tomaron como modelos de referencia los clusters correspondientes a 30 frames y 1 frame por segundo, debido a que como ya se mencionó, son la frecuencia de captura del

miniscope, y la frecuencia utilizada originalmente por los autores del método[8]. Se vectorizaron todos los clusters, creando vectores binarios de 36 dimensiones donde cada elemento corresponde a la presencia o ausencia de cada célula para el vector dado. Para todos los vectores se comparó su similitud con los conjuntos de referencia calculando el coseno del ángulo entre ellos:

$$\text{Cos}(\theta) = \frac{\langle \mathbf{a}, \mathbf{b} \rangle}{|\mathbf{a}| |\mathbf{b}|} \quad (2)$$

Para cada vector se buscó su mejor proyección con los clusters de referencia, y luego se promedió este valor para cada cluster de un conjunto, obteniéndose así un valor entre 0 y 1, donde 1 representa que dos conjuntos son idénticos, y 0 que no comparten ningún elemento.

Como se puede observar a simple vista, algunos de los *clusters* detectados abarcan a casi la totalidad de las células, y dado que este patrón se repite para distintas observaciones, se decidió excluirlas de la evaluación para evitar que distorsionaran los puntajes. Se decidió lo mismo para los *clusters* mayoritariamente vacíos, y arbitrariamente se fijó como condición de consideración que los *clusters* debían contar con entre 5 y 30 células para así eliminar los casos extremos.

Los resultados de la métrica de comparación de similitud para todos los grupos de clusters respecto a la frecuencia natural del video, 30 frames por segundo y la frecuencia de captura usada en los experimentos de la publicación original del método SVD, 1 frame por segundo se pueden observar en la figura 4.9, tanto para los clusters filtrados según su tamaño, como para el conjunto completo de resultados sin filtrar.

En la figura 4.9 se puede observar que tomando como referencia para la comparación el video en su frecuencia original, el algoritmo de detección de ensamblajes va perdiendo la capacidad de reconocer consistentemente los mismos conjuntos de neuronas, hasta llegar a valores casi sin significado, al reducir la frecuencia mediante muestreo 20 veces o más, donde el índice de similitud es apenas superior a la probabilidad aleatoria. En el gráfico de la derecha, que repite el mismo experimento pero tomando el video downsampleado a una frecuencia de 1 *frame* por segundo como punto de referencia, se observa que la detección de ensamblajes es poco precisa, y que más allá de unos puntajes superiores a altas frecuencias, muestra una baja similitud a lo largo de la banda de frecuencias evaluadas.

El gráfico comparando todas las frecuencias con una frecuencia downsampleada muestra una baja correlación para todos los *clusters*, indicando que este es un mal punto de comparación, y que toda la información derivada de este gráfico resulta de poca relevancia científica.

Efectos sobre la consideración de ensambles mayoritariamente vacíos o llenos sobre el puntaje del índice de similitud

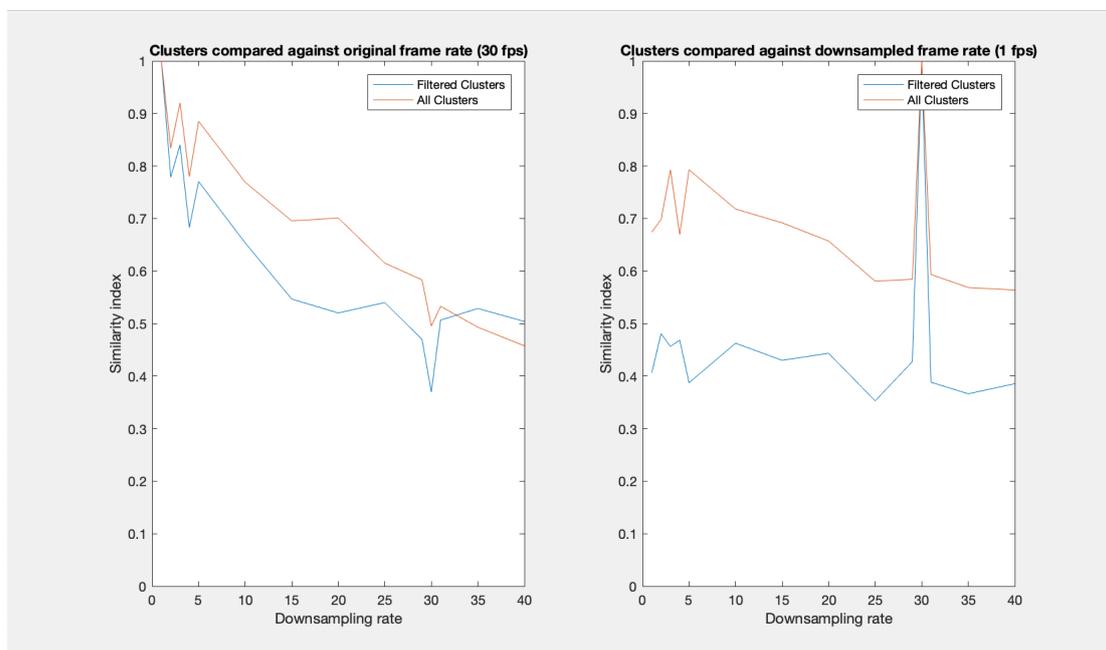


Figura 4.9: Resultados de la comparación de clusters para distintas ventanas temporales, tomando como referencia los *clusters* identificados para los videos con frecuencia 30 fps y 1 fps

El gráfico comparando las frecuencias con la del video original muestra en cambio una clara tendencia decreciente para frecuencias de menor valor. Si bien la señal usada como *input* siempre mantiene sus características principales, perdiendo resolución temporal debido al *downsampling*, el algoritmo no devuelve los mismos clusters para cada conjunto downsampleado. Como se observa en el gráfico, el índice de similitud decrece mientras se reduce la frecuencia, indicando un deterioro de la performance del algoritmo, quizás atribuible al acortamiento de la duración de la matriz de input al promediar sus elementos (de un video original consistente en casi 16.000 frames, al downsamplear 30 veces quedan poco mas de 500).

Por último, para tomar un punto de comparación para el algoritmo de *clustering* SVD, se decidió repetir el experimento utilizando un algoritmo de *clustering* no especializado en la detección de ensambles neuronales, buscando que sea lo más sencillo y de fácil implementación posible.

Se optó por repetir el clasificado usando la implementación disponible en MatLab del algoritmo de K Means Clustering ⁴, el cual busca particionar un *data set* en K *clusters* buscando reducir al mínimo la distancia euclidiana de cada variable a un centroide ubicado aleatoriamente. El algoritmo funciona ubicando K centroides (el número de

⁴<https://www.mathworks.com/help/stats/kmeans>

centroides y por consiguiente clusters debe ser especificado por el usuario previamente) y asignando a cada uno todos los puntos más cercanos a ese centroide. Luego, los centroides se desplazan al centro de todos los puntos que le fueron asignados, y se vuelven a calcular las distancias. El algoritmo continúa hasta que los centroides no se desplazan.

Debido a que k-means es un método heurístico, puede encontrar soluciones sub-óptimas, quedando atascado en mínimos locales. Por este motivo, se corrió el algoritmo 100 veces para cada valor, y se utilizó solo el resultado mejor puntuado, es decir, aquel con el menor valor de suma de distancias entre cada elemento del cluster y su centroide.

Ensamblajes detectados usando agrupamiento por K-medias para $K=4$ y $K=9$

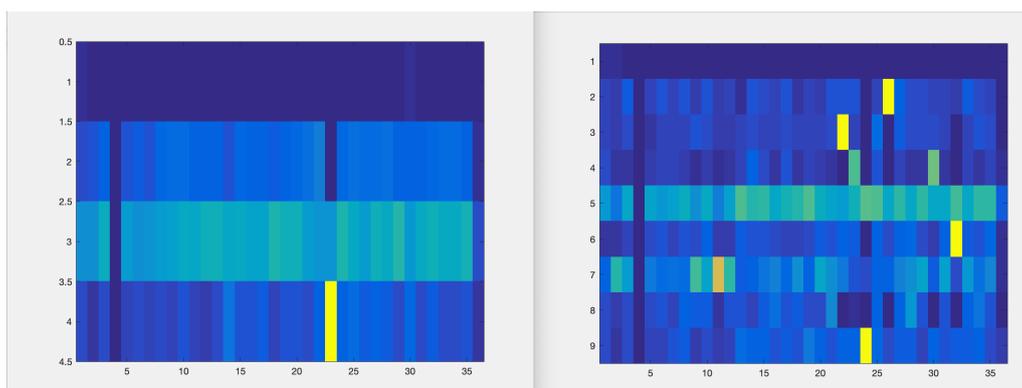


Figura 4.10: Resultados de la segmentación en K clusters para un mismo dataset. Representación grafica para 4 clusters (izquierda) y 9 clusters (derecha). Cada columna del gráfico corresponde a una célula y cada fila a un potencial ensamble. La presencia de una célula un en ensamble dado se indica mediante colores claros

El resultado de cada agrupamiento puede visualizarse matricialmente, donde cada columna representa una célula, cada fila un cluster, y el color relativo de cada celda indica la pertenencia de cada celula en cada cluster (Figura 4.10).

A diferencia de SVD, donde tanto el input como el output se daban en forma binaria, y por lo tanto una célula estaba o no definitivamente en un cluster dado, K Means asigna a cada célula un valor entre 0 y 1 respecto a su pertenencia, siendo cualquiera de los extremos poco probable.

Adicionalmente, dado que el algoritmo conforma exactamente el número de clusters especificado, muchos de los clusters son estadísticamente insignificantes, y muestran muy baja intensidad para todas las células, indicando que se deben más a artefactos de la clasificación que a grupos de neuronas coactivadas. Para eliminar estos clusters de baja intensidad se implementó un criterio de *thresholding* similar al de SVD: se consideraron únicamente los clusters que tuvieran más de 5 células con niveles de participación por encima de 0.1 y menos de 30 por encima de 0.9, logrando así eliminar clusters que afectarían desproporcionadamente el puntaje de similitud.

Dado que K Means requiere especificar el número de *clusters* para el cual se realizará la clasificación, y que el método SVD lo calcula automáticamente, se repitió la comparación para distintos números de *clusters* esperados, yendo del mínimo al máximo de *clusters* identificados para todas las frecuencias por SVD.

Comparación de similitud entre los ensambles detectados para distintas frecuencias, tomando como referencia 30 Hz (I) y 1 Hz (D)

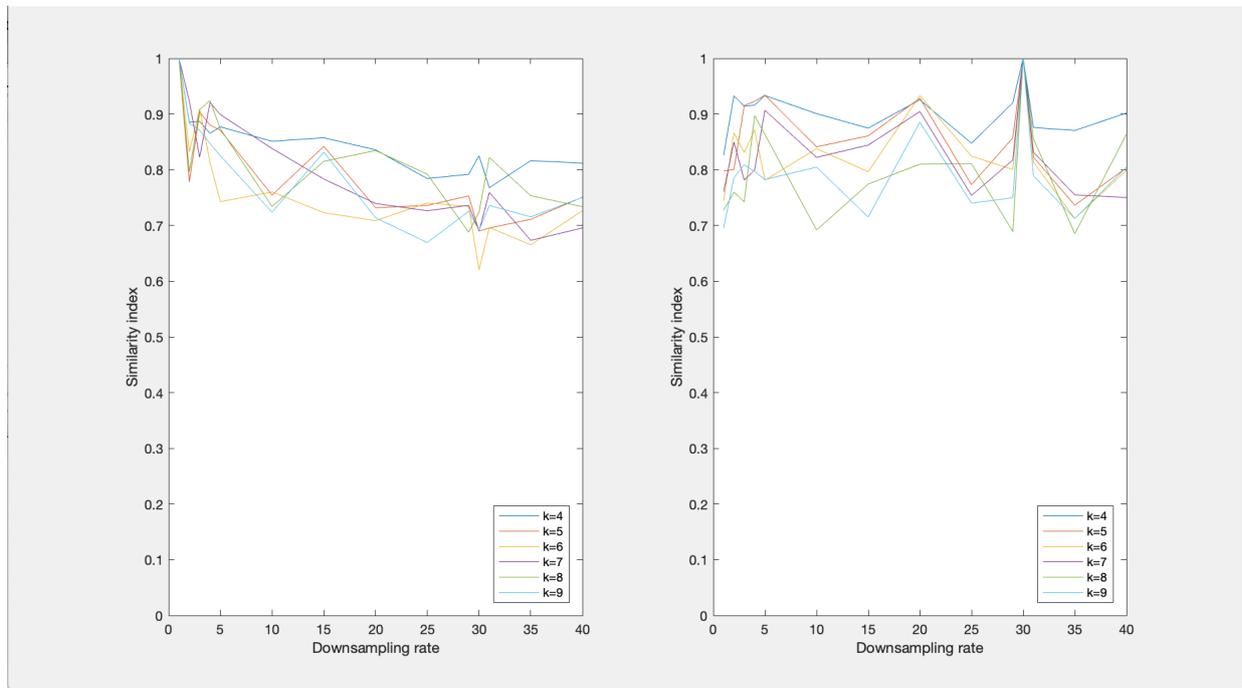


Figura 4.11: Resultados de la comparación de *clusters* identificados mediante K Means para distintas ventanas temporales, tomando como referencia los *clusters* identificados para los video con frecuencia 30 fps y 1 fps, para distintos números de *clusters*

En la figura 4.11 se puede ver la misma comparación entre frecuencias, tomando nuevamente como referencia el video a 30 *frames* y 1 *frame* por segundo respectivamente. Se repitió la comparación mediante índice de similitud, 6 veces en cada caso, especificando un número distinto de K clusters para detectar, entre 4 y 9, ya que este fue el rango detectado en las pruebas con el algoritmo SVD. Los resultados siguen una tendencia similar a los obtenidos mediante SVD, es decir, un buen puntaje para las frecuencias altas al comparar con el video original, y una baja especificidad de detección al comparar con el video downsampleado. También parece observarse a simple vista un mejor puntaje al buscar un número menor de *clusters*, ya que en ambos casos k=4 obtuvo casi universalmente mejores puntajes que los otros números de *clusters*.

5 Discusión

Como se explicó en la sección anterior, hay un gran número de *pipelines* de procesamiento de imágenes de calcio, que comparten en gran medida sus principios de funcionamiento y lógica computacional. Dentro de las alternativas estudiadas se destacan *suite2p* y *CaImAn*, principalmente debido a su eficiencia computacional, ya que fueron los que mejor performance obtuvieron en una computadora portátil estándar, sin necesidad de acceder a módulos de cómputo más potentes. Otras de sus ventajas son su facilidad de implementación y actualización, su documentación completa y la posibilidad de modularizarlos y adaptarlos a un *pipeline* personalizado.

Comparando la robustez de ambos métodos ante ruido ambiental agregado, se observa la degradación del índice de Jaccard para niveles crecientes de ruido, indicando un deterioro de la capacidad de segmentación de imagen para ambos métodos. Tomando cada *pipeline* con su método integrado de corrección de movimiento, *CaImAn* mantiene niveles altos de índice de Jaccard, aun para niveles altos de ruido, indicando que este método conseguiría mejores resultados en condiciones de ruido moderado o alto.

Sin embargo, al quitar el paso de corrección de movimiento del pipeline, y realizando la corrección con un método externo a ambos, se observa un comportamiento similar en los dos, con una degradación mucho más pronunciada en ambos casos. Esto resalta una lógica de diseño *tood en uno*, donde las partes individuales de un *pipeline* se encuentran diseñadas para optimizar su integración, y no particularmente para ser usadas por separado. Posiblemente, *CaImAn* resulta tan robusto al usar *NormCorre*, su algoritmo de corrección integrado, debido a que el promediado espacial que realiza resulta particularmente efectivo para el tipo de ruido analizado. Análogamente, quizás el algoritmo de corrección de *suite2p* no es el más adecuado para analizar ruido independiente de la señal, como lo es el ruido de fondo.

La peor performance de *suite2p* en esta prueba no significa que este *pipeline* sea inferior. *Suite2p* tiene ventajas por sobre *CaImAn* y otros métodos, que incluyen su mayor modularidad respecto al registro de células y la posibilidad de realizar un curado manual, la implementación en una GUI que ofrece mayor información y facilidad de uso, y un control más fino sobre la extracción de datos.

Respecto a los resultados obtenidos para los algoritmos de detección de clusters, en primer lugar podemos concluir que los valores correspondientes al downsampling a 1 frame por segundo (*downsampling rate* = 30) pierden representatividad de la señal original, ya que aún sus valores vecinos arrojaron resultados con una similitud apenas por encima de la aleatoriedad. Los grupos de *clusters* elegidos para servir como referencia para la comparación fueron tomados debido a ser la señal a su frecuencia original (30 Hz) y la señal a la frecuencia capturada por los aparatos usados en el paper donde se describió el método(1 Hz)[9].

Un aspecto que cabe destacar es que se desconoce cuál es la frecuencia de sampleo ideal para reconocer ensambles neuronales. Es posible que el tiempo medio que se mantiene activo un ensamble dependa del área del cerebro que se está estudiando. Por ejemplo, ensambles que representan memoria de trabajo en la corteza prefrontal deberían mantenerse activos por varios segundos, con lo cual cualquier *sampling rate* debería reconocerlos de manera similar. Por otra parte, cabe esperar que ensambles en la corteza visual primaria (sobre los cuales se basó el método de SVD) tengan un tiempo de activación mucho más efímero, consistente con la velocidad con la que cambian los estímulos visuales. Sin embargo, distintas fuentes de evidencia señalan al ritmo gamma, presente en múltiples regiones del cerebro, y en particular en la corteza y el hipocampo, como un mecanismo fundamental en la actividad de ensambles [29]. Este ritmo se ubica entre los 30 y los 90 Hz, lo que sugiere que un sampleo de 1Hz puede estar perdiéndose muchos detalles de la dinámica de ensambles, y que es necesario utilizar frecuencias de sampleo mayores para asegurar su identificación.

La decisión de ignorar los clusters mayoritariamente vacíos o llenos (menos de 5 células o más de 30 presentes) causó un deterioro de los puntajes para todas las frecuencias. Esto se debe a que la metodología de puntuación encontraba una alta semejanza entre dos vectores que estuvieran compuestos predominantemente por unos o ceros, lo cual causaba que muchas comparaciones fueran dominadas por estos clusters anómalos, debido a la cual la decisión de ignorarlos derivó en un mayor rango de puntajes, mostrando una mayor distancia entre los grupos de clusters y bajando el puntaje total para ambos gráficos.

Otro aspecto que merece una mención debido a que fue una decisión consciente externa al algoritmo fue la de la binarización de la información de spikes, la cual estaba en un principio presentada analógicamente. El método no especifica un criterio de conversión a binario ni una proporción entre los estados encendido y apagado más allá de la mención de que el método funciona mejor para matrices escasas o ralas. La conversión elegida, utilizando desvíos estándar por encima de la media como criterio, permite la modificación del número de desvíos tomados como umbral para ser considerados como "1".

Los ensambles detectados a una frecuencia de 1HZ dependen fuertemente de la frecuencia de muestreo, por lo cual resultan casi arbitrarios. Sin embargo, a mayores frecuencias se detecta una mayor estabilidad en los ensambles encontrados, dándole credibilidad a la presencia de esos ensambles en el video. Esto es particularmente claro usando un método simple como lo es K-means, aunque también se ve corroborado al usar un método más sofisticado como SVD

Este último factor ilustra otra de las dificultades de evaluar la performance de cualquier algoritmo de detección de clusters: la performance puede cuantificarse respecto al número de clusters detectados, y a las células que componen cada uno de ellos. Es especialmente complejo evaluar conjuntos de clusters de distinto tamaño, como fue necesario hacer al obtener un mayor número de clusters para frecuencias más bajas. El número total de clusters fue observado, pero se prestó más atención a las células componentes de cada uno a la hora de asignar un puntaje.

La baja performance respecto a la identificación de células constituyentes para cada cluster no resulta sorprendente si se tiene en cuenta la literatura [17]. En estudios comparativos de algoritmos de detección sobre clusters artificiales (es decir en situaciones donde se conocía con certeza absoluta su composición) mostró que SVD identifica correctamente la cantidad de ensambles presentes, pero con una baja especificidad respecto a las células que los componen.

Respecto a la comparación entre los algoritmos de clustering, se puede observar que K means, un algoritmo "naive", mucho más sencillo en cuanto a su complejidad e implementación, y para nada especializado en neurociencias o detección de clusters no muestra una gran variabilidad respecto a la frecuencia de la muestra analizada. Si bien la comparación con la frecuencia original muestra también un deterioro para frecuencias menores, este es menos marcado que para SVD, llegando también a valores más altos de similitud entre clusters.

Cabe mencionar que los resultados usados son los mejores puntuados luego de 100 iteraciones del algoritmo, dando un grado de reproducibilidad a los resultados obtenidos, aunque menor que SVD, que no dependía en absoluto de una inicialización aleatoria. Otra diferencia entre los métodos es que K means realiza el agrupamiento sobre los valores originales de spikes, sin necesidad de transformarlos a valores binarios, aportando así quizás un mayor grado de sutileza o matices que pueden perderse al clasificar cada frame.

La pertenencia de cada célula a un *cluster* dado tampoco es categórica al usar K means como clasificador. En cambio, cada *cluster* se expresa como un vector donde cada elemento representa entre 0 y 1 la distancia al centroide del *cluster*. Si bien el criterio usado para la evaluación comparativa fue idéntico al usado para SVD, si se quisiera usar

exclusivamente K means para identificar *clusters* (lo cual es altamente desaconsejable) debería implementarse algún criterio de umbral de pertenencia a cada *cluster*.

Otro aspecto de K means que aporta variabilidad a los resultados es la necesidad de especificar el número de *clusters* que serán detectados. Como se mencionó, usando SVD se detectaron conjuntos de 4,5, 8 o 9 *clusters* para distintas frecuencias, siendo 4 el más común para frecuencias altas y 9 el más común para las bajas. Para evaluar la robustez de K means, y debido a la incerteza del número indicado de *clusters*, se realizó 6 veces cada prueba, para el número de *clusters* entre 4 y 9. Los resultados muestran una leve ventaja al menor número de *clusters*, pero es difícil establecer una tendencia al deterioro al aumentar el número de *clusters*. Cabe mencionar que en todos los casos K means devolvió *clusters* extremadamente escasos, donde ningún valor superaba 0.1 de proximidad a cualquier *cluster*. Para evitar que estos *clusters* cuasi vacíos dominaran el puntaje, al igual que con SVD se los eliminó de la consideración.

Al comparar los resultados con los obtenidos usando K means, independientemente del número de *clusters*, SVD muestra un mayor deterioro en la capacidad de replicar la identificación de *clusters* para distintas ventanas temporales. Esta baja adaptabilidad a la frecuencia puede impactar negativamente en la versatilidad del algoritmo de SVD a la hora de ser utilizado por distintos laboratorios o usando distintos aparatos para la obtención de imágenes.

Dado que las investigaciones con imágenes de calcio usan distintos microendoscopios o microscopios confocales, y distintos *setups* experimentales, la frecuencia de captura de video no está para nada estandarizada, y es una responsabilidad adicional del *software* de procesamiento garantizar un funcionamiento estable para el mayor rango de valores posible.

Estos resultados no evalúan, sin embargo, la idoneidad de SVD como método de detección de *clusters* neuronales. Es altamente probable que replicando las condiciones experimentales del laboratorio autor del algoritmo se pueda mejorar la performance. Queda resaltada la complejidad de aislar un componente de un *pipeline* buscando extrapolar su funcionamiento a otras condiciones experimentales, sin realizar el *tuning* necesario para replicar los resultados esperados.

6 Conclusión

A lo largo de este proyecto se pudo identificar algunos de los desafíos asociados con la extracción de información neurológica útil y tangible en base a imágenes de calcio. Si bien esta técnica ha abierto las puertas a un número de estudios neurológicos antes impensado, aún existen limitaciones técnicas que deben ser resueltas.

Comparando las alternativas existentes de todo el proceso de procesamiento posterior a la obtención de las imágenes, se identifica la adaptabilidad y facilidad de modificación como uno de los factores clave que debe ser estudiada al considerar cada opción. Si bien algunos *pipelines* y algoritmos tienen un gran nivel de confiabilidad y robustos resultados en la literatura, resultan poco prácticos de adaptar a otros instrumentos o condiciones experimentales. El grueso de la investigación sobre ensembles neuronales se ha hecho en base a estímulos visuales y al estudio de la corteza visual, en el lóbulo occipital. En este trabajo, se adaptaron esos procesos al estudio del hipocampo, en el lóbulo temporal, un área del cerebro con una disposición espacial y concentración en número y tipos celulares completamente distinta.

El paso a la virtualidad pura impidió controlar las condiciones de obtención de los videos de calcio usados, y una perspectiva a futuro que se desprende de este trabajo es la de estudiar el impacto que tiene el entrenamiento de la memoria mediante experimentos conductuales en la formación o consolidación de ensembles neuronales.

A modo de cierre, paralelamente a la investigación llevada a cabo se pudieron adquirir extensos conocimientos de neurociencias, además de experiencia en equipos multidisciplinarios, biología traslacional y experimentación *in silico*. Esta experiencia fue de gran valor para adquirir y profundizar experiencia práctica sobre neurociencias y el trabajo en centros de investigación.

Bibliografía

- [1] Robert E Clark and Larry R Squire. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 Suppl 2(Suppl 2):10365–10370, Jun 2013.
- [2] Cynthia G Wible. Hippocampal physiology, structure and function and the neuroscience of schizophrenia: a unified account of declarative memory deficits, working memory deficits and schizophrenic symptoms. *Behav Sci (Basel)*, 3(2): 298–315, Jun 2013.
- [3] Larry R Squire. The legacy of patient h.m. for neuroscience. *Neuron*, 61(1):6–9, Jan 2009.
- [4] Benedetta Leuner and Elizabeth Gould. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol*, 61:111–140, 2010.
- [5] Arnold Bakker, C Brock Kirwan, Michael Miller, and Craig E L Stark. Pattern separation in the human hippocampal ca3 and dentate gyrus. *Science*, 319(5870): 1640–1642, Mar 2008.
- [6] Lorena Deuker, Christian F Doeller, Juergen Fell, and Nikolai Axmacher. Human neuroimaging studies on the hippocampal ca3 region - integrating evidence for pattern separation and completion. *Front Cell Neurosci*, 8:64, 2014.
- [7] Edvard I Moser, Emilio Kropff, and May-Britt Moser. Place cells, grid cells, and the brain’s spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*, 31:69–89, 2008.
- [8] Yuki Bando Darcy S. Peterka Rafael Yuste Luis Carrillo-Reid, Weijian Yang. Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science*, 353(1):691–694, 2016.
- [9] Luis Carrillo-Reid, Jae-eun Kang Miller, Jordan P. Hamm, Jesse Jackson, and Rafael Yuste. Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *Journal of Neuroscience*, 35(23):8813–8828, 2015.

- [10] Christine Grienberger and Arthur Konnerth. Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73(5):862–885, 2012.
- [11] Q. Chen, J. Cichon, Wenting Wang, L. Qiu, Seok-Jin Lee, Nolan R. Campbell, Nicholas DeStefino, Michael J. Goard, Z. Fu, R. Yasuda, L. Looger, B. Arenkiel, W. Gan, and G. Feng. Imaging neural activity using thyl-gcamp transgenic mice. *Neuron*, 76:297–308, 2012.
- [12] Daniel Aharoni, Baljit S. Khakh, Alcino J. Silva, and Peyman Golshani. All the light that we can see: a new era in miniaturized microscopy. *Nature Methods*, 16(1): 11–13, 2019.
- [13] Ziqiang Wei, Bei-Jung Lin, Tsai-Wen Chen, Kayvon Daie, Karel Svoboda, and Shaul Druckmann. A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology. *PLoS Comput Biol*, 16(9):e1008198, Sep 2020.
- [14] Kunal K Ghosh, Laurie D Burns, Eric D Cocker, Axel Nimmerjahn, Yaniv Ziv, Abbas El Gamal, and Mark J Schnitzer. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature Methods*, 8(10):871–878, 2011.
- [15] Shanna L Resendez, Josh H Jennings, Randall L Ung, Vijay Mohan K Namboodiri, Zhe Charles Zhou, James M Otis, Hiroshi Nomura, Jenna A McHenry, Oksana Kosyk, and Garret D Stuber. Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses. *Nature Protocols*, 11(3):566–597, 2016.
- [16] Wei Yang, Mattia Chini, Jastyn A. Pöppelau, Andrey Formozov, Patrick Piechocinski, Cynthia Rais, Fabio Morellini, Olaf Sporns, Ileana L. Hanganu-Opatz, and J. Simon Wiegert. Anesthetics uniquely decorrelate hippocampal network activity, alter spine dynamics and affect memory consolidation. *bioRxiv*, 2020.
- [17] Jan Mölter, Lilach Avitan, and Geoffrey J. Goodhill. Detecting neural assemblies in calcium imaging data. *BMC Biology*, 16(1):143, 2018.
- [18] Marius Pachitariu Carsen Stringer. Computational processing of neural recordings from calcium imaging data. *Current opinion in neurobiology*, 55(4):22–31, 2019.
- [19] Marius Pachitariu, Carsen Stringer, Sylvia Schröder, Mario Dipoppa, L. Federico Rossi, Matteo Carandini, and Kenneth D. Harris. Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *bioRxiv*, 2016.

- [20] Andrea Giovannucci, Johannes Friedrich, Pat Gunn, Jérémie Kalfon, Brandon L Brown, Sue Ann Koay, Jiannis Taxidis, Farzaneh Najafi, Jeffrey L Gauthier, Pengcheng Zhou, Baljit S Khakh, David W Tank, Dmitri B Chklovskii, and Eftychios A Pnevmatikakis. Caiman an open source tool for scalable calcium imaging data analysis. *Elife*, 8, Jan 2019.
- [21] Eftychios A. Pnevmatikakis, Daniel Soudry, Yuanjun Gao, Timothy A. Machado, Josh Merel, David Pfau, Thomas Reardon, Yu Mu, Clay Lacefield, Weijian Yang, Misha Ahrens, Randy Bruno, Thomas M. Jessell, Darcy S. Peterka, Rafael Yuste, and Liam Paninski. Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data. *Neuron*, 89(2):285–299, 2016.
- [22] Jinghao Lu, Chunyuan Li, Jonnathan Singh-Alvarado, Zhe Charles Zhou, Flavio Fröhlich, Richard Mooney, and Fan Wang. Min1pipe: A miniscope 1-photon-based calcium imaging signal extraction pipeline. *Cell Rep*, 23(12):3673–3684, Jun 2018.
- [23] Eran A Mukamel, Axel Nimmerjahn, and Mark J Schnitzer. Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data. *Neuron*, 63(6):747–760, Sep 2009.
- [24] A. Hyvärinen and E. Oja. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Networks*, 13(4):411–430, 2000.
- [25] Eftychios A Pnevmatikakis. Analysis pipelines for calcium imaging data. *Current Opinion in Neurobiology*, 55:15–21, 2019.
- [26] Pengcheng Zhou, Shanna L Resendez, Jose Rodriguez-Romaguera, Jessica C Jimenez, Shay Q Neufeld, Andrea Giovannucci, Johannes Friedrich, Eftychios A Pnevmatikakis, Garret D Stuber, Rene Hen, Mazen A Kheirbek, Bernardo L Sabatini, Robert E Kass, and Liam Paninski. Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. *Elife*, 7, Feb 2018.
- [27] Eftychios A. Pnevmatikakis and Andrea Giovannucci. Normcorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods*, 291:83–94, 2017.
- [28] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [29] John E Lisman and Ole Jensen. The -neural code. *Neuron*, 77(6):1002–1016, Mar 2013.