

# PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2022

## INFORME DEL PROYECTO REF. SV-22-GIJON-22

### 1. Datos del proyecto

**Título:** (IA4NEURON) Análisis automático de cultivos de neuronas mediante Inteligencia Artificial. Identificación automática de neuronas

**Fechas inicial y final del proyecto:** Del 3/5/2022 al 31/12/2022

**Investigador/a Principal:** Víctor Manuel González Suárez

**Otros investigadores:** María Teresa Fernández Sánchez

**Personal contratado:** Paula Puerta González

**Fechas inicial y final de contratación:** De 4/07/2022 a 31/12/2022

**Empresas o instituciones colaboradoras:** Biocrew Healthcare y Hospital Universitario de Burgos (HUBU)

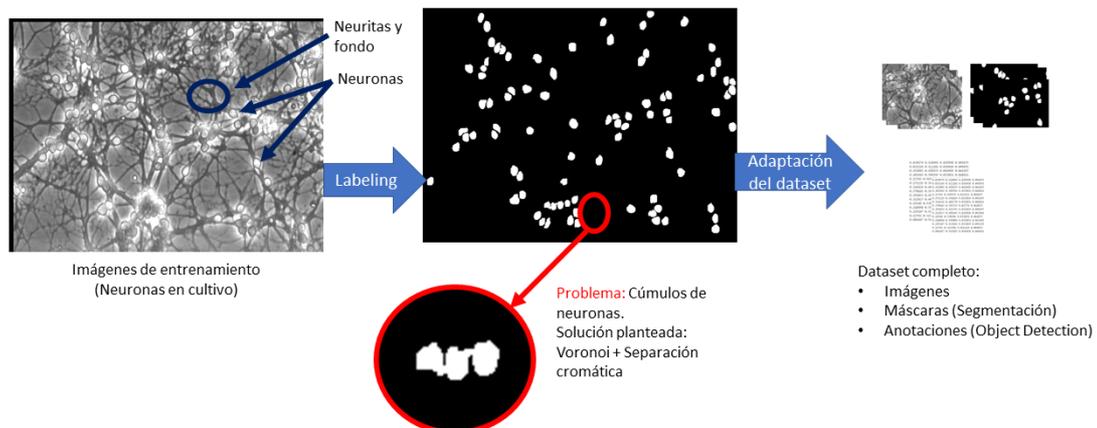
**Redes sociales de investigadores y empresas (Linkedin, Twitter, Instagram):**

<https://www.linkedin.com/company/biocrew-healthcare/?originalSubdomain=es>

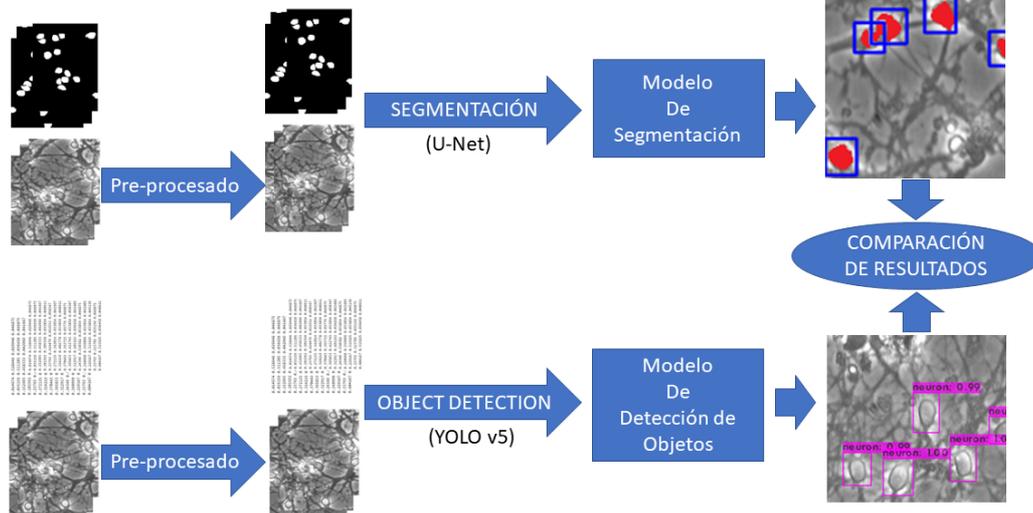
<https://www.linkedin.com/company/hospital-universitario-burgos/?originalSubdomain=es>

### 2. Resumen Gráfico

#### FASE 1: PREPARACIÓN DEL DATASET



FASE 2: ENTRENAMIENTO SISTEMAS DE DETECCIÓN DE NEURONAS



### 3. Memoria descriptiva del proyecto

#### 3.1 Resumen ejecutivo

Los cultivos primarios de células del Sistema Nervioso Central (SNC) son modelos experimentales muy útiles para el estudio de su fisiología y de los mecanismos que conducen a la neurotoxicidad y la neurodegeneración. Así, los cultivos primarios de neuronas y células gliales de cerebelo se utilizan con frecuencia en estudios toxicológicos destinados a comprender los mecanismos que determinan el daño neuronal evocado por la activación excesiva o prolongada de los receptores de aminoácidos excitatorios (excitotoxicidad), e implicados en la patogénesis del daño cerebral en insultos agudos y en enfermedades neurodegenerativas. Estos cultivos se utilizan asimismo para la determinación de la neurotoxicidad de las toxinas ambientales tales como toxinas marinas de origen algal presentes en los mariscos, o los metales como el aluminio.

Una limitación importante en estos estudios es la falta de herramientas que permitan realizar el seguimiento automático de la evolución de un cultivo, en aspectos tales como el crecimiento de las neuronas, su movimiento, el proceso de establecimiento y crecimiento de conexiones sinápticas (neuritas) con las neuronas vecinas, etc. Todos estos aspectos son clave en el funcionamiento neuronal (incluyendo el aprendizaje y la memoria) y la plasticidad sináptica.

Para abordar este problema proponemos el desarrollo de un nuevo sistema para el seguimiento automático de cultivos de neuronas basado en Inteligencia Artificial (IA) capaz de rastrear las neuronas y determinar la integridad y fuerza de las neuritas durante su desarrollo en cultivo. Este sistema será de gran utilidad en la evaluación de los efectos de los fármacos o toxinas sobre la función del SNC, así como para el cribado de nuevos compuestos neuroactivos. Además, también permitirá generar nuevo conocimiento de gran interés a partir de la información obtenida en los cultivos neuronales.

A continuación se indican los objetivos planteados inicialmente y el grado de consecución alcanzado en este tiempo. También se las tareas realizadas y los resultados obtenidos así como los trabajos futuros a desarrollar.

### 3.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

El objetivo principal inicialmente establecido era el desarrollo de un nuevo sistema mediante técnicas de IA aplicadas al tratamiento de imágenes para el seguimiento automático de cultivos de neuronas. La idea era que el sistema permitiese la identificación y seguimiento de posibles patrones de movimiento de neuronas y las características de las conexiones entre las mismas (neuritas) durante su desarrollo en cultivo, así como la posible modificación de dichos patrones en presencia de agentes neurotóxicos.

Ese objetivo inicial se desagregó en los siguientes ocho objetivos parciales:

1. Alineación de imágenes. El seguimiento de los cultivos de neuronas se hace mediante imágenes captadas con una cámara digital acoplada al microscopio, durante un periodo de tiempo concreto y con una frecuencia determinada. Dado que el cultivo no se puede mantener en el microscopio durante largos periodos de tiempo porque no sobreviviría en las condiciones ambientales normales, es necesario colocar dicho cultivo en el microscopio cada vez que se quiere tomar una imagen del mismo. Esto provoca que por mucho cuidado que se ponga en dicho proceso, las imágenes tomadas no estén perfectamente alineadas.

Este objetivo se cumplió completamente al resolver el objetivo que se indicará a continuación, ya que los algoritmos empleados habitualmente para resolver ese reto, no requieren de la previa alineación de las imágenes.

Por otro lado, existen dispositivos como los mostrados en las siguientes figuras denominados "Time lapse microscope" que integran una cámara de cultivo y un microscopio. Este tipo de dispositivos permiten que el cultivo sobreviva dentro del microscopio al crear una cámara de cultivo con condiciones de CO<sub>2</sub>, temperatura y humedad controladas. De esa forma, la placa de cultivo permanece estática durante todo el tiempo que dura el experimento, evitándose problemas de desenfoques, desalineamientos, rotaciones, desajustes en la elección del campo, etc.

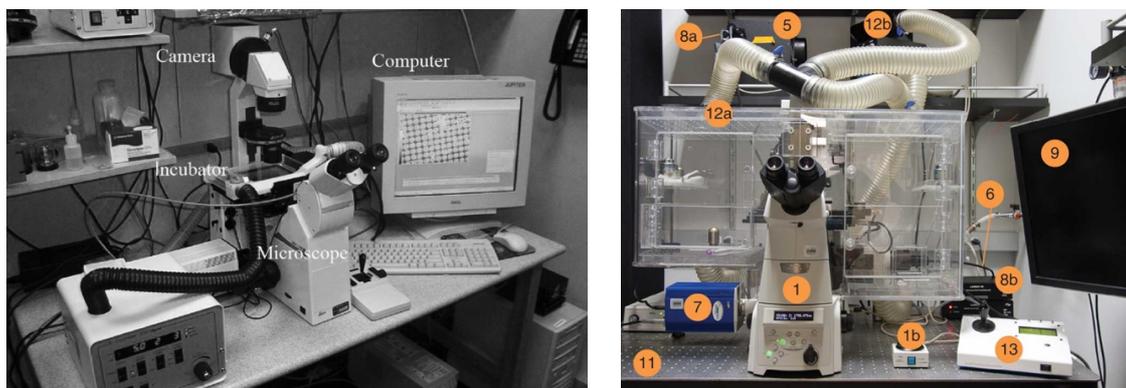


Figura 1 · Dos ejemplos de "Microscopio Time-lapse".

2. Identificación automática de neuronas mediante técnicas de IA. La identificación de las neuronas presentes en un cultivo se hace tradicionalmente a "mano". El objetivo perseguido con este proyecto es desarrollar un sistema capaz de hacerlo de forma automática. Dada la complejidad de las imágenes a tratar, esta tarea solo es posible realizarla mediante técnicas de IA.

Este objetivo se logró totalmente. Las técnicas empleadas para su consecución fueron dos modelos de reconocimiento de imágenes; (i) uno basado en Segmentación y (ii) otro basado en Detección de Objetos. La Detección de Objetos permite una rápida identificación de las áreas (rectángulos) donde se detecta una neurona. Por su parte la Segmentación permite reconocer a nivel de píxel el área exacta que delimita la forma de cada neurona. Ambas técnicas son comparables entre sí y compatibles mutuamente, permitiendo a los investigadores manejar un mayor número de datos que permitan obtener diferentes conclusiones.

3. Recuento de neuronas y otros elementos del cultivo. Una vez identificados qué elementos del cultivo son neuronas y cuáles no, se procedió a hacer un recuento automático de las mismas, facilitando de esta forma el trabajo de los biólogos. En esta fase de la investigación sólo se entrenó el algoritmo desarrollado para detectar neuronas, ignorando cualquier otro elemento del cultivo. En fases posteriores de la investigación se abordará la identificación de otros tipos de elementos del cultivo según las necesidades de los investigadores.

4. Seguimiento del movimiento neuronal. El seguimiento del movimiento de las neuronas de un cultivo a lo largo del tiempo es un factor clave en el estudio del desarrollo y la función neuronal. Este proceso se realiza en la actualidad de forma manual, aunque la complejidad de los movimientos neuronales en el cultivo a lo largo del tiempo hace que dicha tarea sea extremadamente difícil y propensa a errores. Por este motivo se fijó como objetivo el desarrollo de un sistema automático capaz de llevar a cabo el seguimiento o "tracking" del movimiento de las neuronas a lo largo del tiempo.

Este objetivo no ha podido ser resuelto en el tiempo transcurrido en este proyecto, ya que la complejidad del objetivo número 2 hizo que se tuviese que invertir la mayor parte del tiempo disponible en su resolución. Aun así, se comenzó a trabajar en la resolución del mismo tomando imágenes de cultivos y etiquetando de forma individual las neuronas presentes en el mismo. Se concluyó que la frecuencia empleada para la toma de imágenes era demasiado baja, lo que impedía el poder aplicar los algoritmos presentes en la literatura actual. Se concluyó que se deben tomar imágenes con una frecuencia más alta, lo que implica, (i) o bien llevar a cabo un trabajo de campo más intenso (es necesario hacer el trabajo por las noches), o (ii) es necesario emplear un microscopio "Time-lapse" como el mostrado en la figura del objetivo 1 (se ha localizado un dispositivo de este tipo en la Universidad de Oviedo y se está en proceso de la contratación de su uso). En cualquiera de los dos casos, hay que planificar adecuadamente el trabajo porque implicará a varias personas. Este es el siguiente paso en el desarrollo del proyecto.

5. Micro sistema de coordenadas. Un reto importante que se plantea a la hora de rastrear el movimiento de una neurona a lo largo del tiempo, esto es, el desplazamiento que sufre entre dos "frames" o imágenes consecutivas de la secuencia de imágenes de la evolución del cultivo, es la necesidad de disponer de puntos de referencia en el espacio, los cuales deben permanecer fijos a lo largo de toda la secuencia. Como además cuando se toma una imagen de un cultivo no se hace del mismo en su conjunto sino de una parte concreta (campo), se hace imprescindible poder determinar que siempre se están tomando las imágenes del mismo campo. Inicialmente, antes de conocer la existencia de los microscopios "Time-lapse", se pensó que una opción que facilitaría el trabajo sería contar con un sistema de "micro coordenadas" o un sistema de coordenadas microscópico.

Se investigó la posibilidad de emplear discos de cultivo que llevan impreso en el fondo un eje de coordenadas microscópico, pero dichos sistemas de coordenadas dan información relativa al origen de coordenadas en vez de información absoluta relativa a cada punto concreto de la placa, y al hacer zoom para poder tomar la imagen del campo deseado se pierde la referencia al origen de coordenadas, lo que merma la utilidad de dicho sistema de coordenadas (además estos discos de cultivo son extremadamente caros).

A priori, la utilización de un microscopio de tipo "Time-lapse" parece que resolvería este problema al no ser necesario la utilización de este tipo de discos de cultivo, pero se plantean muchas incógnitas al respecto tales como: ¿sobrevivirá el cultivo de neuronas en el entorno del microscopio el tiempo necesario para realizar los experimentos (las neuronas son células muy sensibles)?; ¿será viable desde el punto de vista económico realizar este tipo de experimentos?; ¿será posible programar la toma de imágenes o deberá realizarse de forma manual?, etc.

Se requiere más investigación para resolver este problema.

6. Análisis de neuritas. Otro de los aspectos imprescindibles para los biólogos a la hora de analizar la evolución de un cultivo de neuronas es poder detectar y medir las variaciones que sufren las neuritas que las neuronas van desarrollando a lo largo del tiempo.

Este objetivo aún no pudo ser abordado por falta de tiempo.

Se intuye que, el uso de microscopios de tipo "Time-lapse" sería imprescindible para poder abordar este problema, ya que permitiría obtener secuencias de imágenes (casi vídeos) que ayudarían en gran medida a entender la evolución de las neuritas.

7. Difusión de resultados. En el periodo de tiempo de ejecución de este proyecto no ha sido posible obtener resultados susceptibles de ser divulgados mediante una publicación. El grueso del trabajo realizado se dedicó a la comprensión de la magnitud del problema al que nos enfrentábamos y de sus condicionantes de contorno, a la revisión bibliográfica de las soluciones existentes para este mismo problema o para problemas afines (otros tipos de cultivos), a la elección de las soluciones (algoritmos) más adecuados a implementar, etc.

8. Propiedad Intelectual. Los resultados obtenidos hasta la fecha no son susceptibles de ser registrados aún. En el futuro, a medida que se obtengan resultados registrables, se procederá a su protección.

### 3.3 Tareas realizadas

- Algoritmo de separación de neuronas: Las máscaras de segmentación presentan un problema para la definición de las neuronas, y es que cuando la imagen muestra un cúmulo o agrupación de neuronas solapadas, la máscara binaria muestra píxeles solapados. Esto hace que el sistema no pueda diferenciar si lo que se está definido con la máscara es una o varias neuronas. Para resolver este problema se optó por utilizar el algoritmo de Voronoi [1], el cual, calcula los puntos centrales de las diferentes regiones de una imagen, consiguiendo delimitar dichas regiones asignando el resto de los puntos por cercanía al punto central definido. La salida de la implementación utilizada de este algoritmo es una imagen en escala de grises donde dos objetos identificados tienen diferente tonalidad de gris. A continuación, el algoritmo desarrollado analiza los colores que rodean a cada uno de los píxeles de la imagen buscando aquellos que tienen algún vecino de diferente tonalidad cromática. Cuando se detecta alguna de estas diferencias, se marca dicho píxel con el color del fondo (negro), separando de esta manera cualquier neurona solapada, tal como se puede ver en la figura 2.



Figura 2 · Solución al problema del solapamiento de neuronas.

- Script de adaptación de anotaciones: Al utilizar dos sistemas diferentes para la extracción de información visual de las neuronas (Segmentación y Detección de Objetos), se precisó de la realización de un script que convirtiera máscaras de segmentación (imágenes binarias donde se define la posición de las neuronas en cada imagen de entrenamiento), a documentos de anotaciones de Detección de Objetos (documentos de texto en los que en cada línea se definen las cuatro coordenadas que definen una neurona). En la figura 3 se muestra el proceso de conversión.

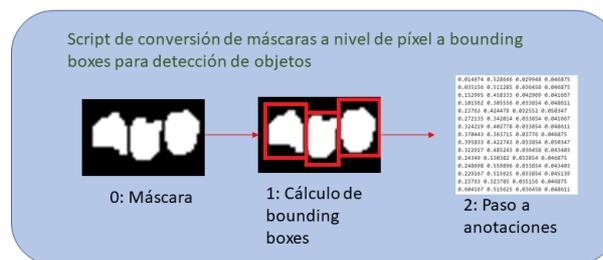


Figura 3 · Conversión de máscaras de segmentación a documentos de anotaciones.

- Generación del modelo de Segmentación: Partiendo de un set de 300 imágenes de entrenamiento y sus correspondientes máscaras de segmentación se ha entrenado un modelo U-Net [3] de segmentación de neuronas tras implementar una fase de preprocesamiento de imágenes de entrada.
- Generación del modelo de Detección de Objetos: Partiendo del mismo set de 300 imágenes de entrenamiento y sus respectivas anotaciones obtenidas mediante el proceso mostrado en la figura 3, se ha entrenado un modelo YOLO v5 [2] de detección de neuronas tras implementar una fase de preprocesamiento de imágenes de entrada.
- Fase de pruebas de ambos modelos: Se realizan dos fases de pruebas paralelas, una de validación cruzada en 10 folds que permita obtener métricas individuales de ambos modelos, así como una validación tradicional 70%-30% preservando ambos sets de entrenamiento-test en ambos modelos con el fin de poder hacer comparaciones objetivas entre ambos.
- 

### 3.4 Resultados obtenidos

Al haber empleado dos modelos diferentes para la identificación de neuronas, se han obtenido dos grupos de resultados.

Por un lado, los resultados del modelo de Segmentación son de un 93% de IOU y una precisión también del 93%.

Los resultados finales del modelo de detección de neuronas alcanzan una tasa de detección del 96%, así como una precisión del 94% sobre el conjunto de imágenes de prueba.

Cabe destacar que estos resultados no son directamente comparables entre sí tal cual se muestran previamente ya que el modelo de Segmentación trabaja a nivel de píxel, es decir, identifica la pertenencia o no de cada píxel de la imagen a una neurona o al fondo, mientras que el modelo de Identificación de Objetos trabaja directamente a nivel de neurona, es decir, indica qué neuronas hay

en la imagen. Para poder comparar ambos resultados, es imprescindible identificar primero qué píxeles conforman cada neurona y a continuación transformar las métricas obtenidas a nivel de píxel en métricas a nivel de neurona.

Por otro lado, los algoritmos necesarios para poder llevar a cabo el entrenamiento de ambos modelos tuvieron una eficacia del 100%, no detectándose ningún fallo en los resultados obtenidos. Por una parte, las máscaras generadas con el algoritmo de separación de neuronas no presentan ningún píxel de unión entre las más de 300 neuronas inicialmente solapadas. Por otra parte, se pudo comprobar que la conversión de máscaras a anotaciones fue completamente satisfactoria gracias a la generación gráfica de las "bounding boxes" sobre imágenes de salida y su posterior comprobación manual.

### 3.5 Trabajos o necesidades futuras

Los trabajos futuros a desarrollar en este proyecto consisten en:

1.- Transformación de las métricas obtenidas con el modelo de Segmentación a nivel de Píxel en métricas de nivel de instancia, para poder compararlas con las métricas del modelo de Identificación de Objetos.

2.- Implementación de un modelo de Segmentación a nivel de Instancia y su comparación con los dos modelos anteriores, de forma tal que se pueda establecer cuál es más adecuado para el trabajo de los investigadores biólogos.

3.- Seguimiento del movimiento de las neuronas. En este sentido será clave determinar si es viable la utilización de un microscopio "Time-Lapse" que permita tomar imágenes de los cultivos con una frecuencia mayor que la que se venía empleando hasta ahora. Es imprescindible aumentar dicha frecuencia porque en los estados iniciales del desarrollo neuronal, éstas realizan grandes desplazamientos (a escala microscópica) llegando incluso a salirse en poco tiempo del campo que está siendo analizado (del que se están tomando las imágenes).

Es posible que para poder realizar el correcto seguimiento del movimiento de las neuronas sea necesario tomar imágenes no solo de un campo, sino de varios campos adyacentes. Esto implicaría la necesidad de que el microscopio a emplear, además de incorporar una cámara de cultivo (es decir ser de tipo "Time-lapse"), contase con la posibilidad de programar el campo o campos de los cuales tomar imágenes y la posibilidad de desplazarse entre ellos de forma automática.

4.- Análisis de la evolución de las neuritas. De nuevo para poder realizar el seguimiento y análisis de la evolución de las neuritas que conectan las neuronas, es necesario contar con un microscopio de tipo "Time-lapse" que permita tomar imágenes del cultivo de forma reiterada con una frecuencia dada.

Tampoco es descartable pensar que las neuronas comiencen a desarrollar sus conexiones antes de haber alcanzado su ubicación definitiva dentro del cultivo, por lo que en ese caso de nuevo sería necesario contar con un microscopio que permitiese tomar imágenes de forma automática de diferentes campos previamente definidos.

El análisis de las neuritas implica medir parámetros diferentes a los medidos al analizar el movimiento de las neuronas, tales como grosor, longitud, orientación, etc. El análisis de esas características implicará inevitablemente el uso de técnicas diferentes a las empleadas para el análisis del movimiento de las neuronas.

La difusión de los resultados y llegado el caso su protección, son tareas que se intensificarán en el futuro inmediato.

### 3.6 Divulgación de los resultados

Uno de los objetivos establecidos inicialmente consistía en la publicación de resultados. Hasta este momento no ha sido posible lograr este objetivo ya que el desarrollo de la propia investigación ha llevado más tiempo de lo inicialmente planeado.

En estos momentos se está en la fase de comparación de los resultados obtenidos al aplicar las dos técnicas desarrolladas para la detección de neuronas (objetivo 2), por lo que ya se ha comenzado a elaborar el contenido de un artículo científico que será sometido a evaluación a una publicación internacional de alto impacto a lo largo del mes de enero.

## 4. Memoria económica

### 4.1 Gastos:

En el desarrollo del proyecto participaron los investigadores indicados en la solicitud, Víctor Manuel González y María Teresa Fernández, además de la persona contratada.

Se estima que el trabajo realizado por estas personas, excepto el de la persona contratada, asciende a un total de 15.000,0€.

Se estima que el uso del equipamiento necesario para el desarrollo de este proyecto, fundamentalmente ordenadores, la cámara para el cultivo de neuronas y el microscopio y cámara para la toma de imágenes, implica un coste imputable a este proyecto por amortización de 2.000,0€.

Los materiales fungibles necesarios para cultivar las neuronas imputables a este proyecto ascienden a 500,0€

Los viajes realizados para el desarrollo del proyecto ascienden a 1.000,0€.

Concepto	Gasto
Personal	15.000,0€
Amortización	2.000,0€
Fungibles	500,0€
Viáticos	1.000,0€
<b>TOTAL GASTOS</b>	<b>18.500,0€</b>

### 4.2 Ingresos:

Para el desarrollo de este proyecto se recibió una ayuda por parte del Instituto Universitario de Tecnología Industrial de Asturias de 2.801,0€ que se dedicó íntegramente al pago de la contribución de la persona contratada a tal efecto.

La Universidad de Oviedo cubrió los gastos del personal investigador (a excepción de la persona contratada) por un importe de 15.000€.

El grupo de investigación cubrió el resto de gastos del proyecto por un importe de 3.500,0€ con recursos propios procedentes de un fondo de investigación.

Entidad/Empresa financiadora Ref. Proyecto/Contrato	Concepto	Ingreso
Universidad de Oviedo	Personal	15.000,0€
Recursos propios	Amortización, Fungibles y Viáticos	3.500,0€
Ayuda IUTA	Contrato	2.801,0€
<b>TOTAL INGRESOS</b>		<b>18.500,0€</b>

## 5. Bibliografía

1. *Documentación oficial de la implementación del algoritmo de Voronoi de la librería PyClesperanto [Online]* Disponible en: [https://haesleinhuepf.github.io/BioImageAnalysisNotebooks/20\\_image\\_segmentation/11\\_voronoi\\_otsu\\_labeling.html?highlight=voronoi](https://haesleinhuepf.github.io/BioImageAnalysisNotebooks/20_image_segmentation/11_voronoi_otsu_labeling.html?highlight=voronoi)
2. *Ultralytics "YOLOv5" 2021 [Online]*. Disponible en: <https://github.com/ultralytics/yolov5>
3. Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In: Navab, N., Hornegger, J., Wells, W., Frangi, A. (eds) Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015. MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science(), vol 9351. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28)
4. Du, X., Liu, M., & Sun, Y. (2022). *Segmentation, Detection, and Tracking of Stem Cell Image by Digital Twins and Lightweight Deep Learning*. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6003293>
5. Ghafari, M., Mailman, D., Hatami, P., Peyton, T., Yang, L., Dang, W., & Qin, H. (2022). *A Comparison of YOLO and Mask-RCNN for Detecting Cells from Microfluidic Images*. *4th International Conference on Artificial Intelligence in Information and Communication, ICAIIC 2022 - Proceedings*, 204–209. <https://doi.org/10.1109/ICAIIIC54071.2022.9722616>
6. Lee, Y., Xie, J., Lee, E., Sudarsanan, S., Lin, D.-T., Chen, R., & Bhattacharyya, S. S. (2020). *Real-Time Neuron Detection and Neural Signal Extraction Platform for Miniature Calcium Imaging*. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 14, 43. <https://doi.org/10.3389/fncom.2020.00043>
7. Schiegg, M., Hanslovsky, P., Haubold, C., Koethe, U., Hufnagel, L., & Hamprecht, F. A. (2015). *Graphical model for joint segmentation and tracking of multiple dividing cells*. *Bioinformatics*, 31(6), 948–956. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu764>
8. Vuola, A. O., Akram, S. U., & Kannala, J. (2019). *Mask-RCNN and u-net ensembled for nuclei segmentation*. *Proceedings - International Symposium on Biomedical Imaging*, 2019-April, 208–212. <https://doi.org/10.1109/ISBI.2019.8759574>