



**I
N
A
O
E**

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

REPORTE TÉCNICO

No. 690

COORDINACIÓN DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
BIOMÉDICAS

**Caracterización de neuronas piramidales de
corteza prefrontal de rata mediante
microscopía y visión por computadora**

M.C. Eréndira Vázquez Palacios

Dra. Hayde Peregrina Barreto

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

26 de septiembre, 2023

Luis Enrique Erro 1, Sta. Ma. Tonantzintla, 72840, Puebla,
México.

©INAOE 2023

Derechos reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir
copias de este reporte técnico en su totalidad o en partes
mencionando la fuente.



Índice general

1. Introducción	1
1.1. Hipótesis y pregunta de investigación	4
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo general	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
1.3. Alcances y limitaciones	6
2. Marco teórico	7
2.1. Neurociencias	7
2.1.1. Neurona	8
2.1.2. Potencial de acción	9
2.1.3. Sinapsis	9
2.1.4. Neurotransmisores	10
2.1.5. Neurona piramidal	11
2.2. Visión por computadora	11

2.2.1.	Análisis de imágenes	12
2.2.2.	Extracción de características	12
2.3.	Neuroinformática	13
3.	Trabajo relacionado	15
3.1.	Herramientas para digitalizar la morfología neuronal	15
3.2.	Discusión	19
4.	Metodología propuesta	21
4.1.	Descripción general	21
4.2.	Base de datos	22
4.2.1.	Protocolo de adquisición de datos	22
5.	Experimentos y resultados preliminares	27
5.1.	Metodología para la segmentación	27
5.1.1.	Explorando las imágenes	27
5.1.2.	Experimento 1	28
5.1.3.	Experimento 2	32
5.1.4.	Experimento 3	34
5.2.	Segmentación	36
5.2.1.	Filtro Gaussiano	36
5.2.2.	Filtro de entropía	39

5.2.3. Umbral Otsu	40
5.2.4. Morfología matemática	42
5.3. Resultados preliminares y discusión	43
5.3.1. Resultados de la segmentación	43
5.3.2. Mediciones	45
5.3.3. Discusión	46
5.4. Productos	46
6. Conclusiones y trabajo a futuro	49
6.1. Conclusiones	49
6.2. Trabajo a futuro y cronograma	50

Capítulo 1

Introducción

Los trastornos mentales o del comportamiento pueden afectar la salud mental y el comportamiento de las personas [1]. En 2019, una de cada ocho personas (970 millones) sufría algún trastorno mental [2]. Este problema aún se está estudiando con el objetivo de desarrollar tratamientos farmacológicos. Aunado a esto, todavía hay lagunas en nuestro conocimiento de la fisiología de las neuronas, por lo que comprender esta fisiología es esencial para entender mejor la actividad cerebral normal y las enfermedades mentales. La electrofisiología es un campo de las neurociencias que estudia la fisiología neural, en el cual es necesario seguir un protocolo experimental, donde el primer paso es analizar visualmente y seleccionar las neuronas que se van a estudiar bajo un microscopio [3, 4]. Sin embargo, se deben considerar algunas limitaciones de este análisis visual. Los microscopios ópticos tienen una resolución limitada, lo que dificulta ver las neuronas individuales y sus estructuras; las técnicas de tinción utilizadas para visualizar las neuronas pueden introducir artefactos que pueden confundirse con neuronas, malinterpretando los datos; y subjetividad, el análisis visual es un proceso subjetivo que puede introducir sesgos en los datos. Una solución directa podría ser utilizar un dispositivo avanzado como un microscopio de inmersión, lo que implica una inversión de alto costo.

Se podría llegar a una solución alternativa abordando las limitaciones del análisis visual por medios computacionales, ayudando a identificar y comprender la estructura y función de las neuronas. La utilidad de este enfoque es algo que los científicos tienen claro desde hace muchos años. Por ejemplo, Glaser en 1965, desarrolló un sistema semiautomático para analizar la morfología neuronal. El sistema consta de un microscopio óptico, una cámara de televisión para digitalizar las imágenes y una computadora para almacenarlas y analizarlas. Aunque las neuronas se identificaron manualmente, el sistema midió el tamaño y forma de las neuronas [5]. Otras ideas para la reconstrucción de neuronas asistida por computadora comenzaron a surgir de este trabajo, como en [6], donde se probaron varias configuraciones de análisis computacional para mejorar la visualización de las propiedades de las neuronas. Dado que las neuronas son las unidades básicas del sistema nervioso, es fundamental estudiar características como la morfología para comprender cómo funcionan en conjuntos (árboles dendríticos) [7] y en aislamiento. Por esta razón, las herramientas computacionales son relevantes para realizar un análisis sobre el funcionamiento neuronal que permita investigar los efectos de la geometría local sobre la neuroanatomía [8]. Las características electrofisiológicas, la conectividad sináptica y la capacidad de procesar información también son de gran interés en el estudio de las neuronas [9]. Uno de los principales desafíos en el estudio de las neuronas es la gran variabilidad de muestras biológicas (imágenes) y la necesidad de bases de datos grandes y que estén disponibles [10]. Actualmente, las neuronas se pueden observar bajo una variedad de tipos de microscopio. Por ejemplo, la microscopía electrónica de barrido/haz de iones enfocados (FIB/SEM) permite el recuento de sinapsis en el cerebro y la reconstrucción del tejido cerebral en 3D a escala nanométrica [11]; y el uso de microscopía de campo brillante de alto rendimiento para capturar imágenes de células. Además del análisis visual tradicional, las herramientas computacionales complementan el análisis de neuronas con software especializado, basado en el procesamiento de imágenes digitales, que incluye segmentación de cuencas hidrográficas basadas en marcadores, segmentación de región extrema máxima estable (MSER) y

umbralización adaptativa [12].

Las imágenes de microscopía biológica suelen tener ruido debido a la baja relación señal-ruido (SNR) del sistema de imágenes, lo que aumenta la necesidad de aplicar técnicas computacionales a las neurociencias, es decir, al área de la Neuroinformática. Radojevic et al. (2016) aplicaron filtrado unidireccional en imágenes de microscopía de fluorescencia para extraer características a lo largo de las principales líneas de corriente y lógica difusa para identificar la unión de dos o más ramas y su tipo [13]. Meiniel et al. [14] propuso un método de filtrado que combina la regularización espacial, la mejora de la información de baja frecuencia y los estimadores dispersos para mejorar la calidad en imágenes simuladas de la base de datos Neuro-morpho [15]. En la clasificación de neuronas, el método más utilizado son las redes neuronales. En [16], Zhang et al. utilizaron una red neuronal recurrente convolucional basada en árboles integradores (CNN-Tree-RNN) para extraer las características morfológicas de cada tipo de neurona. Li et al. (2022) aplicaron algoritmos de aprendizaje automático para clasificar y detectar con precisión una amplia gama de tipos de tejidos, tipos de células y entidades patológicas en imágenes de diapositivas completas (WSI)[17]. Aunque estos métodos permiten el procesamiento de grandes cantidades de imágenes, el proceso de selección de características aún se está determinando y necesita información explicativa. Es fundamental resaltar que la mayoría de los trabajos reportados utilizaron bases de datos con imágenes obtenidas de microscopios de alta resolución, imágenes sintéticas o imágenes preprocesadas. Aunque los microscopios como la microscopía de fluorescencia, la microscopía electrónica de barrido y transmisión, la microscopía confocal y la microscopía de excitación multifotónica proporcionan imágenes de alta resolución [18, 19], pocos laboratorios tienen uno. Por esta razón, la microscopía óptica todavía se usa ampliamente. Sin embargo, las imágenes de microscopía óptica tienen desafíos que abordar. En cuanto a la calidad de imagen, tienen muchas fuentes de ruido de la cámara, impurezas en el microscopio, la disposición óptica y el medio donde se observa la neurona.

Este trabajo se centra en mejorar la visualización de neuronas en imágenes obtenidas a partir de un microscopio de luz invertida con el objetivo de realizar una segmentación neuronal que, posteriormente, permita extraer características de interés asociadas al tipo neuronal. En la práctica, será de gran utilidad implementar técnicas de procesamiento de imágenes y visión por computadora para desarrollar una metodología que mejore la precisión y la reproducibilidad de esta tarea compleja y crucial.

1.1. Hipótesis y pregunta de investigación

Para abordar los problemas presentados para la identificación de neuronas, se presenta las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es el impacto de utilizar visión por computadora para automatizar la detección de características de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de la rata en el tiempo requerido para identificar neuronas viables y medir su corriente electrofisiológica?

¿cómo influye esto en la posibilidad de estudiar poblaciones más grandes de neuronas y reducir los tiempos y costos de las investigaciones que siguen esta metodología propuesta?

Entonces, la hipótesis se define como:

- Usar visión por computadora para automatizar la detección de las características de las neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata, permitirá identificar neuronas viables, a las que se les podrá medir la corriente electrofisiológica. Teniendo como consecuencia poblaciones de estudio más grandes y menor uso de modelos biológicos. Lo cual, a su vez, reducirá los tiempos y costos de las investigaciones que sigan la metodología que se propone.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar y validar una metodología automatizada para la identificación y caracterización de neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata, en imágenes obtenidas por microscopía, mediante visión por computadora.

1.2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos se enumeran a continuación.

- Desarrollar y validar un algoritmo de detección y segmentación, basado en técnicas de visión por computadora, que permita la identificación automática y precisa de las neuronas de interés, reduciendo el tiempo y la subjetividad del análisis visual.
- Describir cuantitativa y cualitativamente las características morfológicas, con la finalidad de poder diferenciarlas de otras células neuronales presentes en la región.
- Evaluar la validez y la eficacia de la metodología desarrollada mediante la comparación de los resultados que se obtengan con el método propuesto con los resultados obtenidos a partir de técnicas visuales por parte de un experto, con el fin de validar la precisión y la fiabilidad de la metodología automatizada y mejorar la eficiencia del proceso de identificación y caracterización de neuronas.

1.3. Alcances y limitaciones

El proyecto se enfocará en la caracterización de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de la rata, utilizando imágenes de la base de datos del Laboratorio de Neuromodulación y desarrollando una metodología automatizada basada en procesamiento de imágenes y visión por computadora.

Capítulo 2

Marco teórico

Este capítulo contiene una breve explicación de los conceptos clave que se mencionarán a lo largo de este proyecto. La sección 2.1 introduce una descripción de los conceptos de neurona y su funcionamiento, terminando con el concepto de neurotransmisores y la importancia de conocer su funcionamiento correcto. Además, se tiene una breve descripción de las neuronas piramidales las cuales serán el objeto de estudio en la metodología propuesta. En la Sección 2.2 se explica los conceptos de visión por computadora, análisis de imágenes y extracción de características, estos conceptos básicos ayudarán a introducir la metodología propuesta. Finalmente, la Sección 2.3 se explica el concepto de Neuroinformática y se explica como se unen los conceptos explicados en las secciones 2.1 y 2.2.

2.1. Neurociencias

Las neurociencias es un campo interdisciplinario que se enfoca en el estudio del sistema nervioso, abarcando aspectos relacionados con la estructura, función, desarrollo, genética, bioquímica, fisiología y patología del sistema nervioso en diversas especies. Se basan en la colaboración de diferentes disciplinas como la biología, la

psicología, la medicina, la bioquímica, la genética, la física y la matemática, entre otras. Los avances en neurociencias han llevado a importantes descubrimientos sobre la estructura y función del cerebro, así como a la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la comunicación entre las neuronas y su relevancia para la salud mental y física. Es importante destacar que las neurociencias continúan siendo un campo en constante desarrollo y crecimiento, con nuevas tecnologías y técnicas emergentes que permiten explorar de manera más profunda y precisa el funcionamiento del cerebro y sus implicaciones en la mente y el comportamiento humano. Además, ha permitido el desarrollo de tratamientos y terapias para trastornos neurológicos y psiquiátricos, como ansiedad, depresión, trastorno bipolar, trastorno de estrés postraumático, esquizofrenia y otros.

2.1.1. Neurona

Una neurona es un tipo de célula especializada que se encuentra en el sistema nervioso. Las neuronas son las células encargadas de transmitir información a través del sistema nervioso y están compuestas por un cuerpo celular, dendritas y un axón. El cuerpo celular de la neurona contiene el núcleo y otros organelos celulares, que controlan la actividad de la célula. Las dendritas son extensiones de la neurona que reciben señales de otras células nerviosas. Por otro lado, el axón es una prolongación larga y delgada de la neurona que se utiliza para transmitir señales a otras células nerviosas o músculos. Las señales nerviosas son transmitidas a través del sistema nervioso por medio de la actividad eléctrica y química en las neuronas. Cuando una neurona recibe una señal a través de sus dendritas, se produce un potencial de acción eléctrico que viaja por el axón y se transmite a través de una sinapsis a otra célula nerviosa o músculo.

2.1.2. Potencial de acción

El potencial de acción es un cambio transitorio en la diferencia de potencial eléctrico de la membrana celular de una neurona que se produce cuando la célula recibe una señal nerviosa. Este cambio eléctrico se propaga por toda la neurona y es la forma en que las señales nerviosas son transmitidas a través del sistema nervioso. El potencial de acción se produce cuando los iones positivos (como el sodio) entran en la célula y los iones negativos (como el cloro) salen de la célula. Esta fluctuación en la concentración de iones genera un cambio en el potencial eléctrico de la membrana celular, que es percibido por otras células nerviosas. El potencial de acción se origina en la dendrita de una neurona y se propaga por toda la célula hasta llegar al axón. Cuando el potencial de acción alcanza el extremo final del axón, se produce una liberación de neurotransmisores en la sinapsis que transmiten la señal nerviosa a otra neurona o músculo. El potencial de acción es un fenómeno fundamental en la neurociencia y es esencial para la transmisión de información en el sistema nervioso.

2.1.3. Sinapsis

La sinapsis es el proceso de conexión entre dos células nerviosas, o entre una neurona y un músculo, donde se transmite la señal nerviosa de una célula a otra. En el cerebro y en el sistema nervioso periférico, la mayoría de las conexiones entre las células nerviosas son sinápticas. La sinapsis es un proceso muy complejo formado por la terminal axónica de una célula nerviosa (que libera neurotransmisores), un espacio extracelular (sináptico) y la membrana plasmática de la célula nerviosa o músculo receptora (que recibe los neurotransmisores). Cuando una neurona recibe una señal nerviosa, se produce un cambio en el potencial de acción en su axón, que a su vez induce la liberación de neurotransmisores en la sinapsis. Los neurotransmisores se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula nerviosa

o músculo receptor, iniciando una señal nerviosa en el siguiente componente del circuito nervioso. Por tanto, es crucial en el sistema nervioso, ya que permite la transmisión de información a través del sistema nervioso y la coordinación de las funciones corporales. La comprensión de la biología y la fisiología de la sinapsis es esencial para la investigación en neurociencia y en la comprensión de enfermedades neurológicas.

2.1.4. Neurotransmisores

Los neurotransmisores son moléculas químicas producidas por las células nerviosas que se utilizan para transmitir señales nerviosas de una neurona a otra o a las células musculares. Los neurotransmisores se liberan en el espacio sináptico, el espacio entre las células nerviosas, y actúan uniéndose a receptores específicos en la célula receptora, que a su vez produce una respuesta biológica en la célula. Existen diferentes neurotransmisores, cada uno con propiedades únicas y efectos diferentes en el sistema nervioso. Algunos ejemplos incluyen al glutamato, que es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el cerebro humano. Su función principal es facilitar la transmisión de señales eléctricas entre neuronas en las sinapsis, que son las conexiones entre las neuronas; a la serotonina, que juega un papel importante en el control del humor y el sueño; a la dopamina, que está involucrada en el control de la motivación y el placer; y acetilcolina, que es un neurotransmisor importante en la contracción muscular y la memoria. La cantidad y la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso pueden ser influenciadas por muchos factores, incluyendo la alimentación, el ejercicio, la enfermedad y la edad. La disfunción en la liberación o acción de los neurotransmisores puede contribuir a enfermedades neurológicas. La comprensión de los neurotransmisores y su papel en el sistema nervioso es fundamental para la investigación en neurociencia y la identificación de tratamientos efectivos para enfermedades neurológicas.

2.1.5. Neurona piramidal

Las neuronas piramidales son un tipo de célula nerviosa que se encuentra en el cerebro humano. Son llamadas "piramidales" debido a su forma característica, que se asemeja a una pirámide. Las neuronas piramidales son consideradas células nerviosas principales porque son las encargadas de transmitir señales nerviosas a través de las sinapsis. Estas células son responsables de muchas funciones importantes, incluyendo la movilidad, la percepción sensorial, la memoria, el aprendizaje y la regulación del estado de ánimo. Además, las neuronas piramidales también juegan un papel importante en la formación de nuevas conexiones neurales y en la reorganización de las conexiones existentes en el cerebro. Estas células son críticas para la plasticidad cerebral y la capacidad de adaptación del cerebro a cambios en el entorno y en la experiencia.

2.2. Visión por computadora

La visión por computadora se refiere al campo de la informática que se enfoca en el desarrollo de algoritmos y sistemas que puedan interpretar y comprender imágenes y videos de forma similar a como lo hace el ser humano. Esto incluye tareas como la detección de objetos, la identificación de características, la segmentación de imágenes, la estimación de profundidad y la recuperación de información. La visión por computadora se aplica en una amplia variedad de ámbitos, incluyendo la robótica, la seguridad, la medicina, la realidad aumentada y la automatización industrial.

2.2.1. Análisis de imágenes

Proceso mediante el cual a partir de una imagen se obtiene una medición, interpretación o decisión. Para ello se siguen al menos los siguientes pasos:

- **Adquisición de la imagen:** Se obtiene la imagen adecuada del objeto de estudio. Dependiendo de la aplicación la imagen puede ser una fotografía, radiografía, termografía, etc.
- **Preprocesamiento:** Con el fin de mejorar la calidad de la imagen obtenida se emplean ciertos filtros digitales que eliminan el ruido en la imagen o bien aumentan el contraste.
- **Segmentación:** Se pretende separar el objeto de estudio del fondo de la imagen.

2.2.2. Extracción de características

Una vez segmentada la imagen, puede ser necesario extraer características de las distintas regiones de interés (ROI). El espacio de características puede ser muy grande y complejo. Sin embargo, no todas las características obtenidas son igualmente significativas. Dependiendo del tipo de características que se extraigan de la imagen, el espacio de características puede dividirse en tres categorías: características de intensidad, características geométricas y características de textura.

- Las características de intensidad es la aproximación más simple. Básicamente consiste en utilizar los valores de niveles de gris de cada ROI para caracterizar la misma. Otras aproximaciones utilizan características que representen la diferencia entre el nivel de gris medio de la ROI y el nivel de gris medio de los píxeles que circundan la ROI.

- Las características geométricas o morfológicas se basan en la forma de la ROI, calculando a partir del área y borde de esta (área, perímetro, convexidad, momentos de primer, segundo y tercer orden, oblicuidad, etc.).
- Las características de textura pueden obtenerse a partir de técnicas muy diversas, entre las que cabe destacar las matrices de concurrencia, también llamadas Matrices de Dependencia de Niveles de Gris o Space Gray Level Dependence Matrices (SGLDM), los vectores de estadísticas de diferencia de nivel de gris (GLDS) o las características de Run Length Statistics (RLS).

2.3. Neuroinformática

La neuroinformática es la intersección entre la neurociencia y la informática, donde se combinan conocimientos y herramientas de ambas disciplinas para el estudio de la estructura y función del cerebro y el desarrollo de tecnologías basadas en la comprensión de la misma. Este campo ha estado en constante evolución, se beneficia de los avances en las ciencias computacionales. ya que ha permitido el desarrollo de métodos y técnicas computacionales para almacenar, procesar y analizar información relacionada con el cerebro. Los softwares computacionales desempeñan un papel fundamental en el análisis y modelado de datos neurocientíficos, y han permitido realizar avances significativos en la comprensión del cerebro. En cuanto a la unión de la neuroinformática con los softwares computacionales actuales, podemos destacar varios aspectos:

- Recopilación y análisis de datos
- Modelado y simulación del cerebro
- Neuroimagen
- Herramientas de aprendizaje automático

Este trabajo se enfocará aportar al área de Neuroimagen con el fin de proporcionar una base objetiva para la identificación y selección de neuronas.

Capítulo 3

Trabajo relacionado

En este Capítulo, se revisará el trabajo previo en el estudio de la morfología de las neuronas. La Sección 3.1 se enlistan algunos de los softwares mas relevantes que fueron diseñados para el estudio de la morfología neuronal. Y, la Sección 3.2 muestra una discusión del trabajo relacionado y el método propuesto.

3.1. Herramientas para digitalizar la morfología neuronal

Conocer la morfología neuronal es de gran importancia para comprender la función cerebral. Las reconstrucciones digitales típicas representan la morfología neuronal como una serie de puntos a lo largo de las neuritas con sus posiciones, radio, conectividad y tipo de proceso (por ejemplo, soma, dendrita y axón) [20, 21].

Una de las primeras formas de automatizar la obtención de la morfología neuronal fue tomando el trazo guiado por el usuario, y de ahí medir el diametro y lineas centrales [22]. Sin embargo, automatizar el proceso ha sido una tarea que se ha buscado perfeccionar con el paso de los años[23].

Se han desarrollado muchas herramientas que permiten digitalizar la morfología neuronal una vez que fue visualizada por un microscopio óptico. Todos los softwares requieren cierta intervención por parte del usuario, por ejemplo: trazando los bordes del área de interés, definiendo a las neuritas o seleccionando parámetros que permiten la reconstrucción digital. A continuación se enlistan los softwares que más han destacado para generar reconstrucciones digitales:

- **Neurolucida.** Es un software comercial para la reconstrucción tridimensional de neuronas y el mapeo cerebral. El seguimiento semimanual se puede realizar en tiempo real desde la transmisión del microscopio, el usuario hace clic a lo largo de la línea central de la neurita, asigna el diámetro con un cursor circular, y el software conecta cada punto con el anterior [24, 23].
- **Filament Tracer.** Es un módulo del paquete comercial Imaris (Bitplane, Zúrich, Suiza) diseñado para la detección de neuronas, microtúbulos y filamentos en entornos 2D, 3D y 4D. La traza tridimensional se superpone a los datos de imagen en tiempo real y se ofrece una progresión de estrategias de reconstrucción que abarcan desde métodos manuales hasta detección y segmentación completamente automáticas. El software abarca utilidades de visualización y edición, además de realizar cálculos morfométricos y rastrear dendritas [25, 26].
- **Amira (Grupo de Ciencias de la Visualización).** Es un software comercial con numerosas extensiones para diversos conjuntos de datos. La extensión de Esqueletización respalda la reconstrucción y análisis de redes vasculares y dendríticas. Una herramienta de procesamiento de imágenes realiza la reconstrucción neuronal semiautomática a partir de imágenes confocales. Funciones adicionales comprenden opciones para una visualización avanzada, simulación y análisis cuantitativo [27, 28].
- **3DMA-Neuron.** Fue elaborado en la Universidad Estatal de Nueva York en

Stony Brook y es distribuido comercialmente por Nihon Visual Science (Tokio, Japón). Este software efectúa la reconstrucción automatizada a partir de imágenes de alta resolución de neuronas individuales junto con diversas mediciones morfológicas y análisis integrado de la morfología de las espinas [29, 30].

- Eutectic NTS (Neuron Tracing System). Fue fabricado comercialmente, pero el ejecutable ahora está disponible de manera gratuita por parte del desarrollador. Eutectic permite el trazado de neuronas directamente desde una única imagen y fue utilizado en la mayoría de las primeras publicaciones que emplearon reconstrucciones digitales. El usuario puede editar, fusionar, filtrar y visualizar la morfología en 3D, aunque esta visualización no es completamente interactiva [31].
- NeuronJ es un complemento en Java para ImageJ que posibilita el trazado y cuantificación semiautomáticos de estructuras alargadas en imágenes de escala de grises de 8 bits o en color indexado. El usuario señala el punto de inicio del trazado y desplaza el ratón a lo largo de la neurita. Para una representación más precisa de la neurita, los usuarios pueden intentar desplazarse en segmentos más cortos para evitar atajos en línea recta que distorsionen la curvatura neurítica. Aunque solo permite la reconstrucción en 2D, NeuronJ es ampliamente utilizado, ya que fue el primer producto gratuito en facilitar el trazado y análisis de neuritas en diversas plataformas informáticas [32, 33, 34].
- NeuRa (Algoritmo de Reconstrucción Neuronal) convierte automáticamente las pilas de imágenes obtenidas mediante microscopía de dos fotones en trazados digitales de estilo vectorial. Se requiere un preprocesamiento de la imagen para marcar y eliminar estructuras innecesarias. Después de la reconstrucción, el archivo se puede editar manualmente y guardar en formato NEURON. El programa ya no se desarrolla ni se mantiene activamente, pero hay un manual conciso disponible en el sitio web. NeuRa funciona solo en Mac con una interfaz

gráfica de usuario simple [35].

- NeuronStudio representa un programa gratuito autosuficiente para el trazado manual, semiautomático o automático de estructuras neuronales a partir de imágenes confocales y de multifotón. Las reconstrucciones pueden ser examinadas y editadas en 2D o 3D mediante el software complementario NeuroGL y guardadas en el formato SWC estándar. Además, el software lleva a cabo mediciones simples y procesamiento de imágenes, incluida la detección y clasificación de espinas dendríticas [36, 37, 38].
- ORION (Online Reconstruction and Imaging of Neurons). efectúa de manera automática la reconstrucción de la morfología neuronal a partir de pilas de imágenes segmentadas adquiridas mediante microscopía confocal o de multiphoton. El software considera variables experimentales como el ruido de fondo, artefactos visuales de pipetas de parche y el alineamiento de imágenes. Los árboles dendríticos completos pueden ser trazados en varios minutos sin intervención humana y guardados en formatos estándar SWC o NEURON. Desarrollado en C++ y MATLAB, ORION es compatible con Windows y Linux. Un blog en línea sirve como un foro de discusión para usuarios y desarrolladores [39, 40].
- Neuron-Morpho constituye un complemento de código abierto para ImageJ diseñado para el trazado digital semiautomático de neuronas. El usuario delinea la superficie de la neurita o soma trazando líneas rectas a lo ancho de la sección. Por ende, un soma elipsoide puede representarse como una serie de líneas rectas perpendiculares a la longitud del elipsoide. Información sobre el orden de la línea, el tipo, la conectividad, las coordenadas x, y, y z, y el radio se registra en una tabla [41].
- Vaa3D (Análisis Asistido por Visualización 3D) representa un sistema multifuncional para análisis de bioimágenes y objetos superficiales. El módulo

Vaa3D-Neuron traza la morfología a partir de imágenes en numerosos formatos de archivo, visualiza y mide la estructura 3D resultante y facilita análisis comparativos [42, 43, 44].

- CellProfiler. Es un software de código abierto diseñado para el análisis de imágenes de células y objetos en biología y ciencias relacionadas. El programa permite automatizar y cuantificar diversos tipos de mediciones a partir de imágenes microscópicas, lo que facilita el análisis de datos en estudios biológicos y experimentos. CellProfiler se utiliza para analizar una amplia variedad de características celulares, como la forma, el tamaño, la intensidad de la fluorescencia y la distribución subcelular [45, 46, 47].
- L-Measure es una herramienta que se utiliza en el análisis cuantitativo de morfología neuronal y otras estructuras en el campo de la neurociencia. Sin embargo, a diferencia de los otros programas mencionados previamente que se centran en la reconstrucción tridimensional de neuronas, L-Measure es una herramienta específica para la extracción de características cuantitativas de las reconstrucciones neuronales una vez que han sido generadas [48].

3.2. Discusión

Esta sección recopila algunos de los softwares más usados que utilizan diferentes técnicas de visión por computadora para analizar imágenes de neuronas, algunos logran hacer reconstrucciones 3D, árboles dendríticos, y obtener algunas mediciones como radios, áreas y perímetros. Sin embargo, también tienen ciertos inconvenientes, por ejemplo, que algunos se han desarrollado para uso comercial y es necesario pagar una licencia para poder hacer uso de ellos y los que usan imágenes de microscopía de alta resolución, esto implica que es necesario tener microscopios costosos y que no están al alcance de cualquier laboratorio. Los softwares NeuronJ y CellProfiler, son

dos softwares de uso libre, que se encuentran disponibles en la web para descargarlos y aceptan todo tipo de imágenes.

Hay que considerar que estos algoritmos estan diseñados de manera general, con las técnicas de procesamiento de imágenes más comunes y podrían no funcionar en imágenes que no tienen buena resolución. Este trabajo busca presentar una alternativa para imagenes que se han recopilado de microscopios ópticos, considerando que las imágenes obtenidas no son de alta resolución y podrían presentar problemas con el ruido.

Capítulo 4

Metodología propuesta

4.1. Descripción general

El diagrama de flujo de la metodología general se muestra en la Fig.4.1, el primer paso es extraer segmentar el área de interés (ROI), las neuronas. Esto permitirá reducir el gasto computacional para los siguientes pasos, este paso de gran importancia debido al alto ruido que presentan las imágenes. Una vez que se tenga la neurona segmentada en la imágenes se extraerán características relevantes que definan el tipo de neurona que se esta estudiando. Y finalmente, se evaluarán las caraterísticas extraidas en el paso anterior, aplicando métodos de clasificación automática.

A continuación, se describirá la base de datos y el protocolo de adquisición en la sección 4.2.

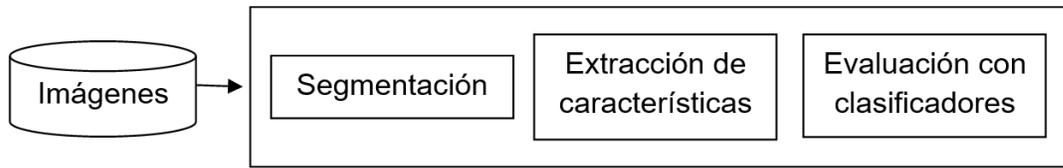


Figura 4.1: Metodología general

4.2. Base de datos

Las imágenes fueron obtenidas con una webcam, adaptada a un microscopio invertido, en formato JPG a 96 dpi(en inglés, "Pixels Per Inch") y 24 bits de profundidad(Fig. 4.2). Se extrajeron rebanadas del área de interés, para lo cual se utilizaron ratas macho Wistar de 30 días de edad. Se obtuvo imágenes de neuronas agudamente disociadas. El Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla proporcionó los modelos biológicos. Todos los procedimientos siguieron la Norma oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los residuos peligrosos biológico-infecciosos se gestionaron siguiendo la norma NOM-087-ECOL-SSA1-200. El laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la BUAP entregó una base de datos con 5000 imágenes de neuronas de rata de diferentes tipos, como gigantes colinérgicos, espinosos medianos, dopaminérgicos del área tegmentaria ventral y piramidales, como se mencionó en 1.3 este trabajo se limitará al análisis de Neuronas piramidales.

4.2.1. Protocolo de adquisición de datos

Para poder realizar estudios electrofisiológicos de células del sistema nervioso se necesita seguir un protocolo que permite disociar neuronas, es decir, poder separarlas de la red neuronal para estudiarlas de forma independiente. Algunos expertos



Figura 4.2: Neurona piramidal de corteza prefrontal de rata

en electrofisiología describen este protocolo de manera detallada [49, 50, 51], a continuación se presenta una de las versiones de este protocolo descrita en una tesis doctoral de neurociencias [52].

Las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a una dosis de $40 \frac{mg}{kg}$ y posteriormente se decapitan. Los cerebros son disecados rápidamente y se colocan en solución fría de isetonato con bajo calcio (en mM): 140 isetonato de sodio, 2 KCl , 2 $MgCl_2$, 0.1 $CaCl_2$, 23 glucosa, 15 HEPES, $pH = 7.4$, 300-310 $\frac{mOsm}{L}$ y suplementados con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 *NG-nitro-L-arginina*, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O_2 . Posteriormente se obtienen rebanadas coronales de $350 \mu m$ con ayuda de un vibrátomo (Campden) mientras están sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas, se diseccionan las capas V – VI

de la corteza prefrontal. Posteriormente las rebanadas disecadas se mantienen entre 45 a 90 minutos a temperatura de $30^{\circ}C$ en solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con: 95% O_2 , 5% CO_2 , pH = 7.4, ajustado con $NaOH$, 300-310 $\frac{mOsm}{L}$. Después, de 45 minutos de incubación se toma una rebanada de CPF para su tratamiento enzimático, el cual se realiza en una cámara de cultivo de 40 ml con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O_2 , conteniendo 0.75 $\frac{mg}{kg}$ de papaína (Calbiochem) a $33^{\circ}C \pm 1$, durante 10 minutos y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico. Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido es lavado con la solución de isetionato y posteriormente disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células es sembrada en cajas Petri de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión es lavada con una solución de fondo (en mM): 140 $NaCl$, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl , 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$ y 1% rojo fenol, burbujeada con O_2 , pH = 7.4 ajustado con $NaOH$, 300-310 $\frac{mOsm}{L}$; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa.

A continuación, se presenta un resumen ilustrado del protocolo experimental en Fig.4.3:

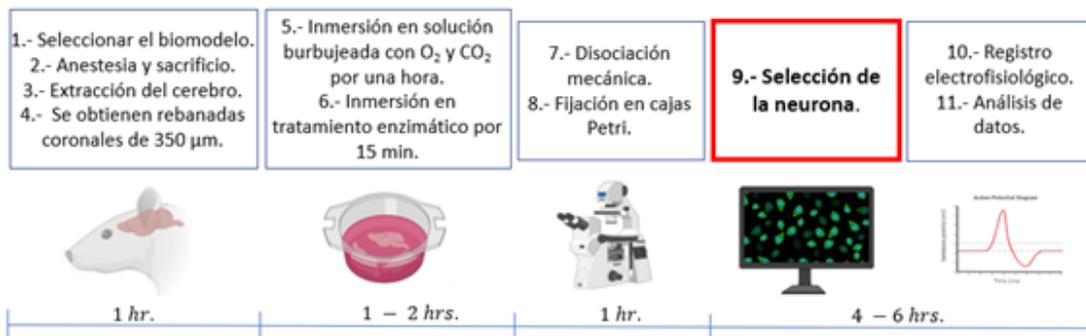


Figura 4.3: Protocolo experimental para el registro electrofisiológico de neuronas, en el punto 9 se guarda la imagen de la neurona que esta siendo estudiada.

Capítulo 5

Experimentos y resultados preliminares

5.1. Metodología para la segmentación

A continuación se presentan varios experimentos que realizaron aplicando técnicas de procesamiento de imágenes con la finalidad de encontrar una metodología funcional para la segmentación de la región de interés.

5.1.1. Explorando las imágenes

Para poder analizar de las neuronas es necesario entender con qué tipo de imágenes vamos a trabajar. En la Fig. 5.1 se presenta un ejemplo con una de las imágenes precargadas en MATLAB llamada "camaraman", en el inciso a) es su representación RGB, en el inciso b) se muestra representación en la escala de grises, en el c) se muestra el histograma y en el inciso d) representación en malla donde cada valor del pixel(0 a 255) se representa con un color(azul a rojo). Así mismo, en los siguientes incisos se muestra un ejemplo de las imágenes que contiene la base de datos que se usará en este trabajo, en e) se muestra la imagen en RGB, en f) la imagen en escala de grises, en g) se muestra el histograma de la imagen y en h)

tenemos la representación de malla de la imagen.

En la fig. 5.1 inciso d) se puede observar que los valores de sus pixeles están todo el rango de color, desde azul hasta rojo, con las regiones bien representadas y claramente separadas, esto también se puede observar en el histograma (fig. 5.1 c)), donde los valores de los pixeles de la imagen estan en dos grupos, uno correspondiente al objeto (0 a 50) que el gráfico de malla lo vimos representado con tonos azules y otro correspondiente al fondo (100 a 255). Ahora en la fig. 5.1 e), se observa un ejemplo de las imágenes de neuronas. En la fig. 5.1 h) se puede observar que se tiene un rango corto de valores de los pixeles representados principalmente con colores verdes, amarillos y rojos, además se observa que las regiones que corresponden a fondo y objeto tienen aproximadamente los mismos valores y por tanto en el histograma (fig. 5.1 g)) se observa un solo grupo de valores que van aproximadamente desde el 100 hasta el 255.

Esta comparación se presenta con el fin de mostrar porque algunos métodos de segmentación funcionan mejor en unas imágenes que en otras, y el porque a veces es necesario complementar con varias técnicas de procesamiento de imagenes para obtener los resultados que se esperan. En los ejemplos mostrados con el cameraman se puede observar que al aplicar un umbral entre los dos grupos de pixeles es posible segmentar fondo de objeto, mientras que en la imagen de la neurona, al estar todos los valores en un solo rango de valor, es complicado definir en que punto se coloca el umbral para separar una región de otra. A continuación se mostrarán los experimentos que se realizaron para lograr segmentar la neurona del resto de la imagen.

5.1.2. Experimento 1

Se exploraron las condiciones de las imágenes y se determinó que que era necesario aplicar filtros de suavizado debido al ruido que estaba presente en las imágenes,

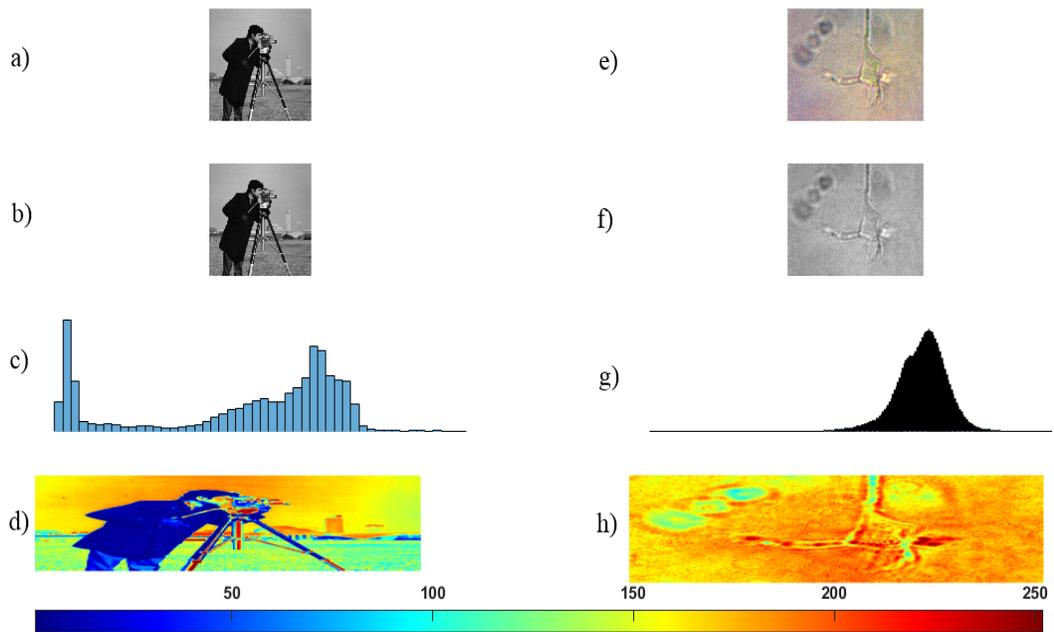


Figura 5.1: Camaraman en a) RGB, b) escala de grises, c) histograma y d) representación en malla. Neurona en e) RGB, f) escala de grises, g) histograma y h) representación de malla de la imagen.

se propuso hacer pruebas con los filtros: promedio, mediana y gaussino. Después, con las imágenes filtradas el siguiente paso era aplicar un umbral, este permitiría recuperar el objeto presente en la imagen y separarlo del fondo. Y finalmente, se aplicarían operadores de detección de bordes: Sobel, Prewitt y Canny.

Objetivos

- Remover el ruido presente en la imagen.
- Separar fondo de objeto.
- Obtener los bordes de todos los objetos presentes en la imagen.

Hipótesis

Al aplicar filtros de suavizado, umbralización y detección de bordes se espera que se obtengan los bordes de la neurona presente en la imagen, también se espera que estén presentes los bordes de manchas que están presentes en la imagen y de restos de otras neuronas presentes en la imagen.

Resultados

En la Fig. 5.2 se muestran los resultados de aplicar los filtros gaussiano (FG Fig. 5.2 1)), promedio (FP Fig. 5.2 2)), mediana (FM Fig. 5.2 3)), y posteriormente a estas imágenes filtradas se les aplicó el umbral Otsu (UO Fig. 5.2 4), 5) y 6)). Posteriormente, en Fig. 5.3, se muestra el resultado de una imagen con FG y UO se aplica detector de bordes Sobel (DS Fig. 5.3 7)), Prewitt (DP Fig. 5.3 10)), Canny (DC Fig. 5.3 13)), en la imagen con FP y UO también se aplica detector de bordes Sobel (DS Fig. 5.3 8)), Prewitt (DP Fig. 5.3 11)), Canny (DC Fig. 5.3 14)), y finalmente, en la imagen con FM y UO se aplica detector de bordes Sobel (DS Fig. 5.3 9)), Prewitt (DP Fig. 5.3 12)), Canny (DC Fig. 5.3 15)).

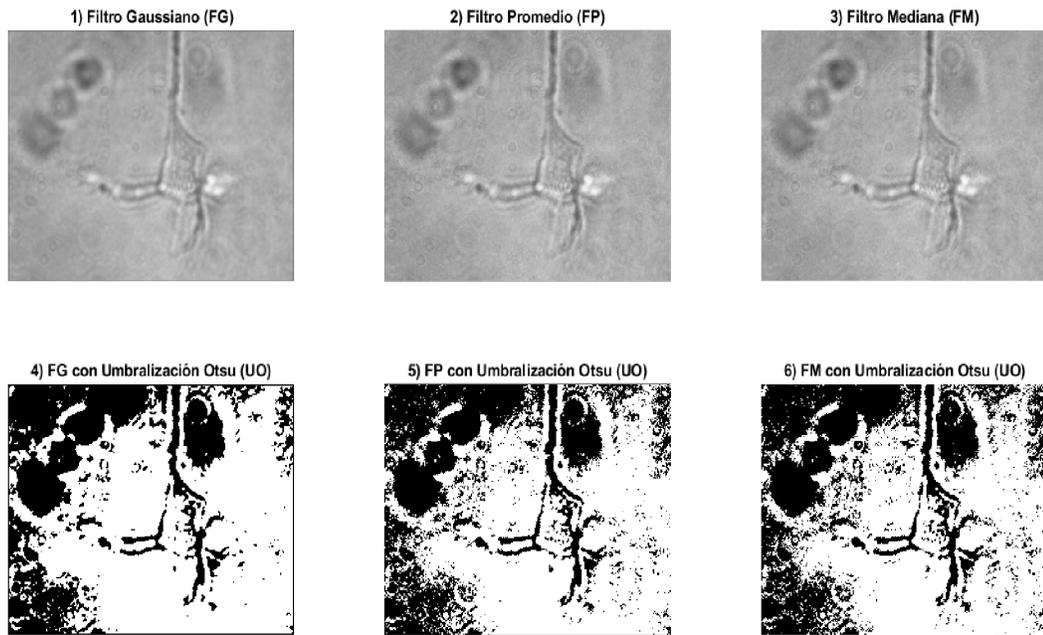


Figura 5.2: Resultado de aplicar filtros de suavizado: 1) gaussiano, 2) promedio y 3) mediana) y un umbralizado con el método Otsu (4, 5 y 6).

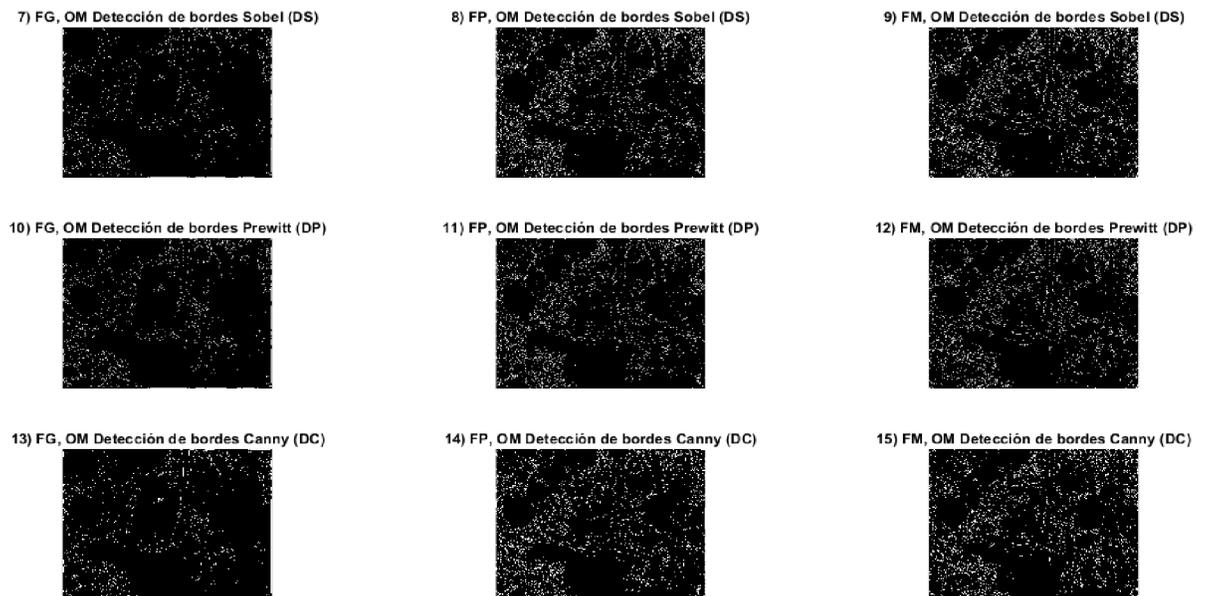


Figura 5.3: Resultado de aplicar los detectores de bordes Sobel (7,8 y 9), Prewitt (10, 11 y 12) y Canny (13, 14 y 15).

Conclusión

Se concluyó que el filtro gaussiano Fig. 5.2 4) tenía un mejor efecto de suavizado en la imagen. El umbralizado mostró que logró recuperar gran parte de la región de interés Fig. 5.2 5), 6) y 7). Sin embargo, cuando se hicieron las pruebas con métodos de detección de bordes Fig. 5.3 se logró observar que de rescataron los bordes de la región de interés, tal cual se esperaba en la hipótesis, pero también de muchas zonas que corresponden a ruido, lo cual no era lo esperado.

5.1.3. Experimento 2

Era necesario implementar otros pasos para poder recuperar toda la información importante de la neurona y a la vez ir eliminando la mayor parte del fondo y basura. Por tanto, se propone comparar la imagen de la neurona (Fig. 5.4 c) con una imagen que está tomada bajo las mismas condiciones pero sin la neurona (imagen basal), así todo lo que esté en la imagen corresponderá a basuras e impurezas del microscopio y no de la muestra. Se realizaron pruebas con 3 métricas: Desviación estándar, correlación y varianza.

A partir del primer experimento se determinó que era necesario implementar un método de pre-procesamiento que, además del filtro, permitiera retirar toda la información posible no deseada. Para ello, se propone comparar la imagen de la neurona con una imagen que está tomada bajo las mismas condiciones pero sin la neurona (imagen basal), usando las métricas: Desviación estándar, varianza y correlación.

La desviación estándar es una medida que cuantifica la dispersión de los valores en una distribución de datos. En el contexto de imágenes, al comparar la desviación estándar de la imagen con neurona presente y la imagen basal, se puede identificar si la presencia de la neurona realmente contribuye a una mayor variabilidad que no

puede ser atribuida a factores instrumentales normales.

La varianza es una medida similar a la desviación estándar y también evalúa la dispersión de los valores en un conjunto de datos. En el contexto de imágenes, la varianza puede ser útil para comprender cuánto cambian los niveles de intensidad de píxeles en una región específica.

La correlación mide la relación entre dos conjuntos de datos y puede indicar cómo cambian juntos. En este caso, si las dos imágenes están altamente correlacionadas, esto podría sugerir que la neurona no está agregando ninguna información significativa a la imagen, ya que las variaciones en ambas imágenes siguen patrones similares.

Objetivos

- Obtener una representación de la imagen, que indique las zonas que corresponden al ruido que es aportado por la instrumentación (cámara y microscopio) de la imagen, para posteriormente aplicar un umbralizado que permita retirar regiones de la imagen que corresponde al ruido.

Hipótesis

En áreas donde la neurona esté presente, se espera una desviación estándar más alta en comparación con las áreas donde solo hay basura. Esto se debe a que la neurona puede aportar variabilidad en los niveles de intensidad.

Las expectativas de la varianza son similares a las de la desviación estándar. Las áreas con la neurona podrían tener una varianza más alta, especialmente si hay diferencias en los niveles de intensidad debido a la neurona.

Si hay áreas en las que la correlación es baja, podría indicar que estas áreas

contienen señales distintas y únicas que no se encuentran en la imagen basal, respaldando la hipótesis de que la neurona está contribuyendo con información valiosa.

Resultados

En la Fig. 5.4 se muestra la representación de los valores obtenidos a partir de calcular la desviación estandar, varianza y correlación, en esta representación los valores que corresponden a cada pixel (0 a 255) se representan con un color (azul a rojo), donde azul será 0 y 255 rojo. Se cumplió lo esperado para la desviación estándar (Std) y la varianza (var), las zonas en las que se encuentra la neurona hay mayor Std y Var mientras que en las zonas donde coinciden las impurezas propias de la instrumentación se obtuvo una Std y Var bajas. Mientras que en los resultados obtenidos a partir de la correlación no se obtuvo lo esperado, esto puede deberse a que las imágenes no estén alineadas perfectamente en el proceso de comparación pixel a pixel, esto podría causar discrepancias en los resultados.

Conclusión

A pesar de que con desviación estandar y varianza se encontraron los resultados esperados, se llegó a la conclusión que cuando la neurona coincidiera con un área que corresponda a ruido, por ejemplo, manchas presentes en la imagen basal del microscopio, se estaría eliminando información relevante (parte de la neurona). En vista de esto, se optó por descartar este paso de la metodología de segmentación.

5.1.4. Experimento 3

Para este experimento se propuso explorar filtros de textura y morfología matemática. Se propuso usar un filtro de texturas por entropía, esto ayudaría a diferenciar los distintos niveles de entropía en la imagen y permitiría separar fondo

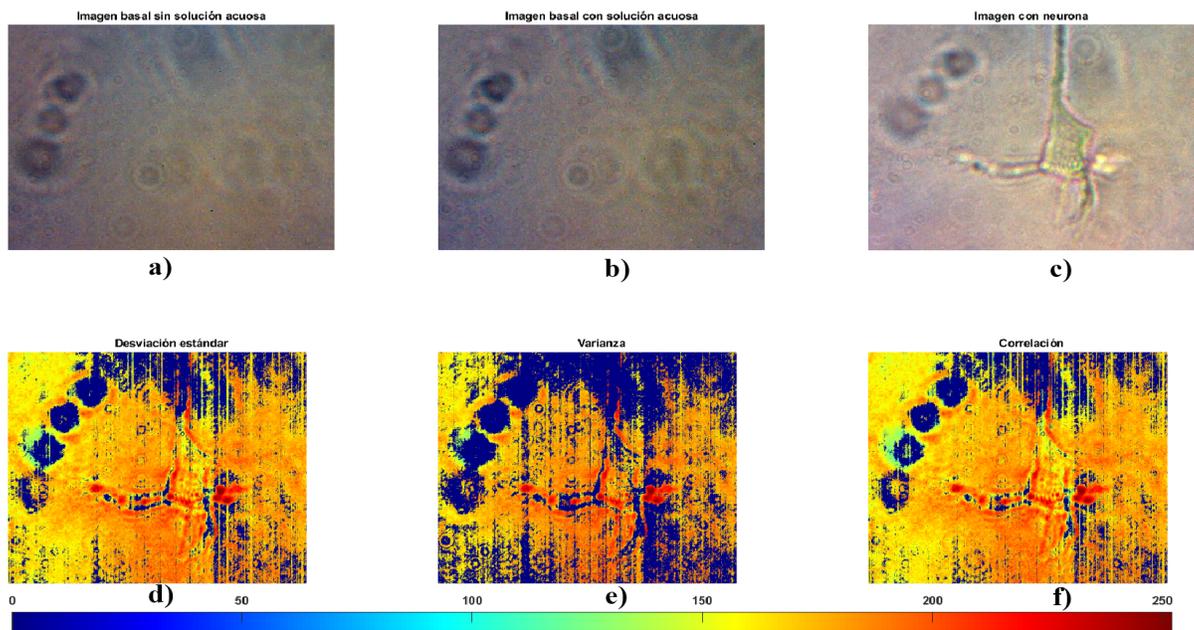


Figura 5.4: a) Imagen basal con la caja de petri sin solución acuosa, b) Imagen basal con la caja de petri con solución acuosa, c) Imagen de la neurona, d) Resultado de la Desviación Estandar al comparar a, b y c. e) Resultado de la Varianza entre a, b y c, y f) Resultado de la Correlación entre a, b y c.

de objeto. Posteriormente se podría aplicar la operación morfológica Erosión para segmentar el área de interés. Finalmente el resultado de la Erosión (imagen binaria) se multiplicaría por la imagen original para recuperar el área de interés. De los experimentos anteriores se mantiene el filtrado gaussiano y la umbralización. Con este experimento se obtuvieron los mejores resultados, y por tanto, se detalla a continuación en la sección 5.2.

5.2. Segmentación

En esta sección se explicará el proceso de segmentación de la región de interés (ROI). La segmentación es de interés debido a que las imágenes se vieron afectadas por diferentes fuentes de ruido, como las impurezas del microscopio, los residuos de otras neuronas en la muestra y la configuración experimental. Esto último ya que el camino óptico para capturar la imagen incluía una fuente de luz, el espacio (aire), la placa de Petri, las neuronas fijadas al fondo de la placa de Petri, el medio acuoso donde se mantienen vivas las neuronas y la cámara. Todos estos factores interactúan en la adquisición de muestras de un microscopio de luz invertida. La magnificación considerada fue de 40x, siendo proclive a las condiciones externas. Para la segmentación de neuronas, fue necesario utilizar técnicas de visión por computadora para realizar operaciones matemáticas con píxeles de imagen. Esto implica un cierto costo computacional que aumenta con el número de imágenes analizadas. A menudo, la neurona cubre una ROI específica y su segmentación reduce el área de análisis y el costo computacional. El proceso de segmentación se describe a continuación.

5.2.1. Filtro Gaussiano

Las imágenes originales presentan un ruido de moteado intenso general, generando cambios drásticos en el valor. Dado que este ruido también afecta a la región

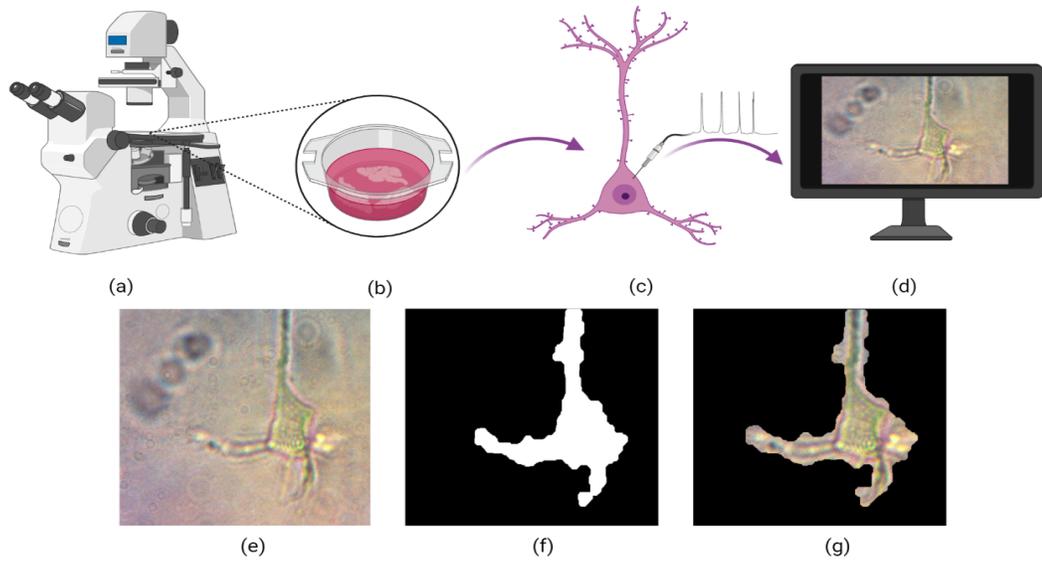


Figura 5.5: Metodología para la adquisición de la muestra: a) microscopio invertido, b) la muestra obtenida de rata, c) neuronas de interés, y d) su adquisición digital. Metodología de segmentación propuesta: e) Imagen digital original, f) Segmentación del ROI, g) Recuperación de valores originales del ROI. Imagen creada con Biorender.com

de la neurona, es necesario atenuarlo para generar regiones más uniformes. Además, también se presentan algunos artefactos correspondientes a residuos de otras células o impurezas del microscopio. Un filtro gaussiano atenúa las variaciones de valor en la imagen, reduce el ruido y homogeneiza las regiones, lo que ayuda a una mayor segmentación. El filtro gaussiano se define mediante la ecuación. 5.1, donde su función de densidad de probabilidad $P_q(x)$ se expresa en términos de la media μ y la varianza σ^2 de un variable aleatoria x [53].

$$P_q(x) = ((2\pi\sigma^2)^{-1/2})(e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2}) \quad (5.1)$$

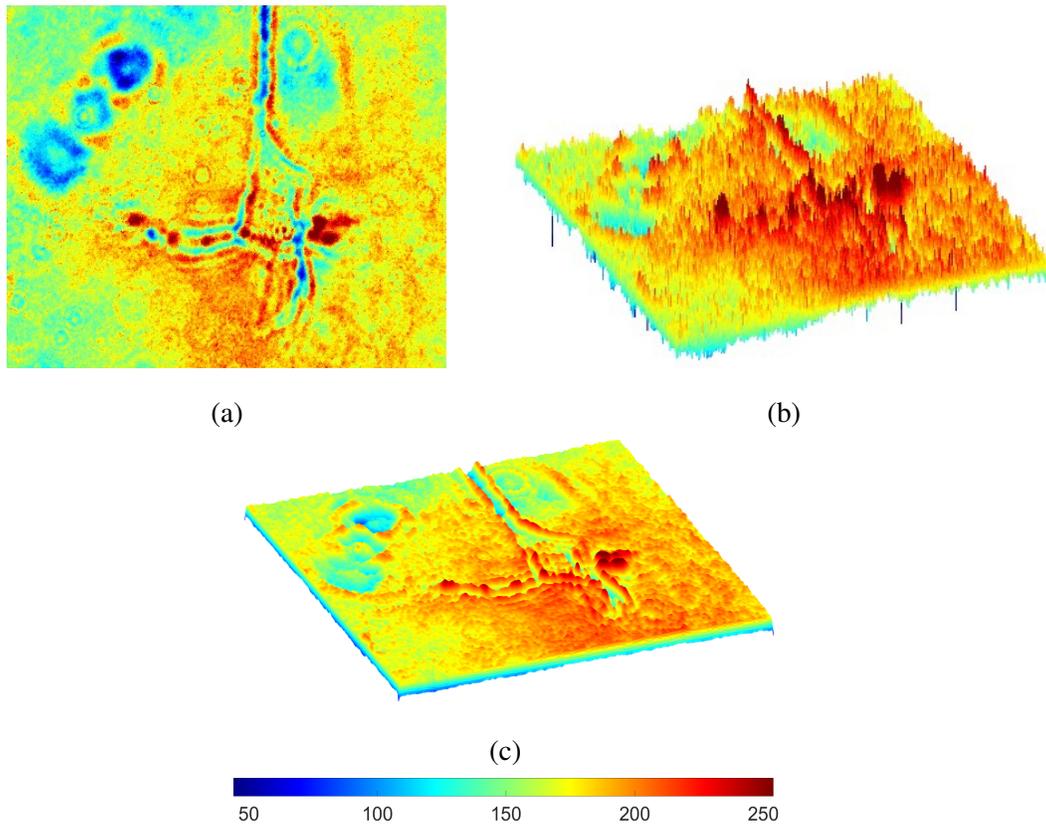


Figura 5.6: Representación de la Fig. 5.5e) en a) vista frontal y b) lateral como una superficie 3D con una paleta de colores de alto contraste, donde se observan altas variaciones de valor (ruido) en la imagen; c) su atenuación de ruido después de aplicar el filtro gaussiano. La paleta de colores corresponde a los valores del nivel de gris.

5.2.2. Filtro de entropía

La textura de una imagen es una cuantificación de la variación espacial de los valores de intensidad en una imagen, que puede ser útil para la segmentación de imágenes. La segmentación de texturas busca identificar regiones de la imagen con alta o baja variación en los valores de intensidad a través de técnicas de filtrado espacial. La entropía se usa para medir la aleatoriedad de los elementos de una matriz; cuando los valores en una región son totalmente aleatorios, la entropía tiene valores altos; de lo contrario, una región con valores similares tiene baja entropía. La ecuación 5.2 define el valor de entropía, donde i y j son niveles de gris adyacentes, y $P_{i,j}$ es su ocurrencia de probabilidad. Cuanto menor sea $P_{i,j}$, menor será la ocurrencia de la combinación de píxeles [54].

Corregir

$$H(x) = -\sum(P(x) \log_2(P(x))) \quad (5.2)$$

En imágenes como la Fig. 5.5e, el fondo y la neurona presentan una gran similitud de valores, lo que dificulta la identificación del ROI. Una forma de identificar la neurona es a través de valores de entropía. Se espera que las regiones de ruido o bordes tengan altos niveles de entropía mientras que las regiones homogéneas tengan baja entropía. La figura 5.7 muestra el mapa resultante de calcular la entropía local donde la mayoría de las regiones con alta entropía (rojo) corresponden a los bordes de las neuronas y baja entropía (azul) corresponden al fondo. Los valores de píxel se normalizaron entre 0 y 1 durante este proceso.

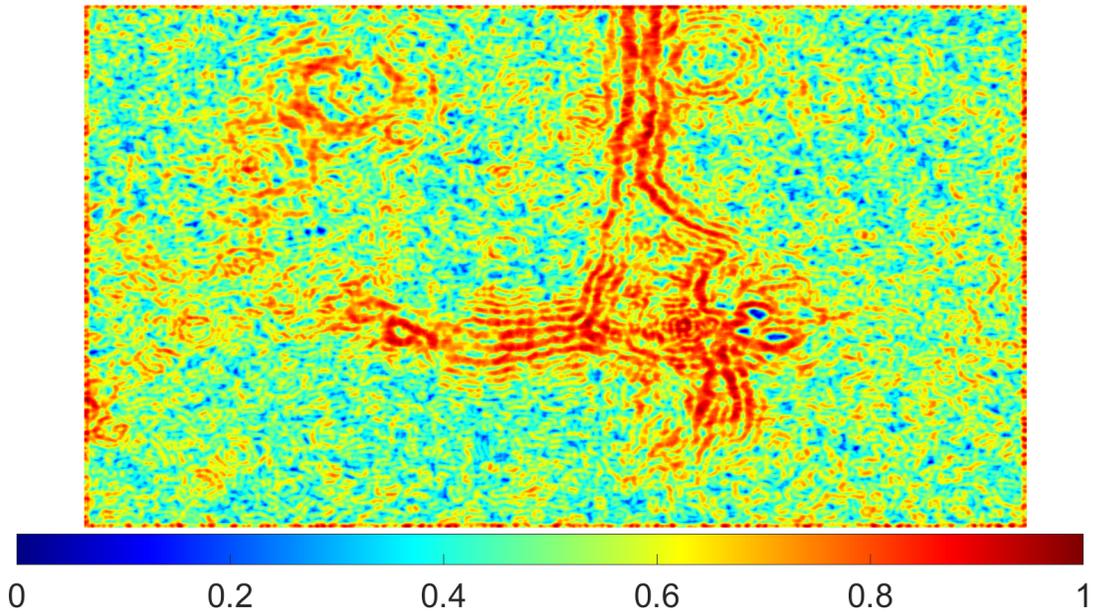


Figura 5.7: El mapa resultante del filtro de entropía sobre la Fig. 5.8a. La paleta de colores corresponde a los valores de entropía.

5.2.3. Umbral Otsu

El método de Otsu estima un umbral aproximado en la normalización entre $[0, 1]$ en la imagen ya filtrada, buscando la máxima separabilidad entre las dos distribuciones en la imagen: la región correspondiente al fondo y la correspondiente a la neurona. Luego, se aplica un proceso de binarización, usando el umbral para determinar si un píxel es parte de la neurona. El método de Otsu elige un umbral que minimiza la variación entre clases de los píxeles blancos y negros que pasan por el umbral. El umbral global d convierte una imagen en escala de grises en una imagen binaria. La fórmula para encontrar la varianza dentro de la clase en cualquier umbral t está dada por la ecuación 5.3, donde $\omega_{bg}(t)$ y $\delta_{bg}^2(t)$ representa la probabilidad de algunos píxeles para cada clase en el umbral t y δ^2 representa la varianza de los valores [55, 56].

$$\delta^2(t) = \omega_{bg}(t) \delta_{bg}^2(t) + \omega_{bg}(t) \delta_{bg}^2(t) \quad (5.3)$$

$$(A \bullet B) = (A \oplus B) \ominus B \quad (5.4)$$

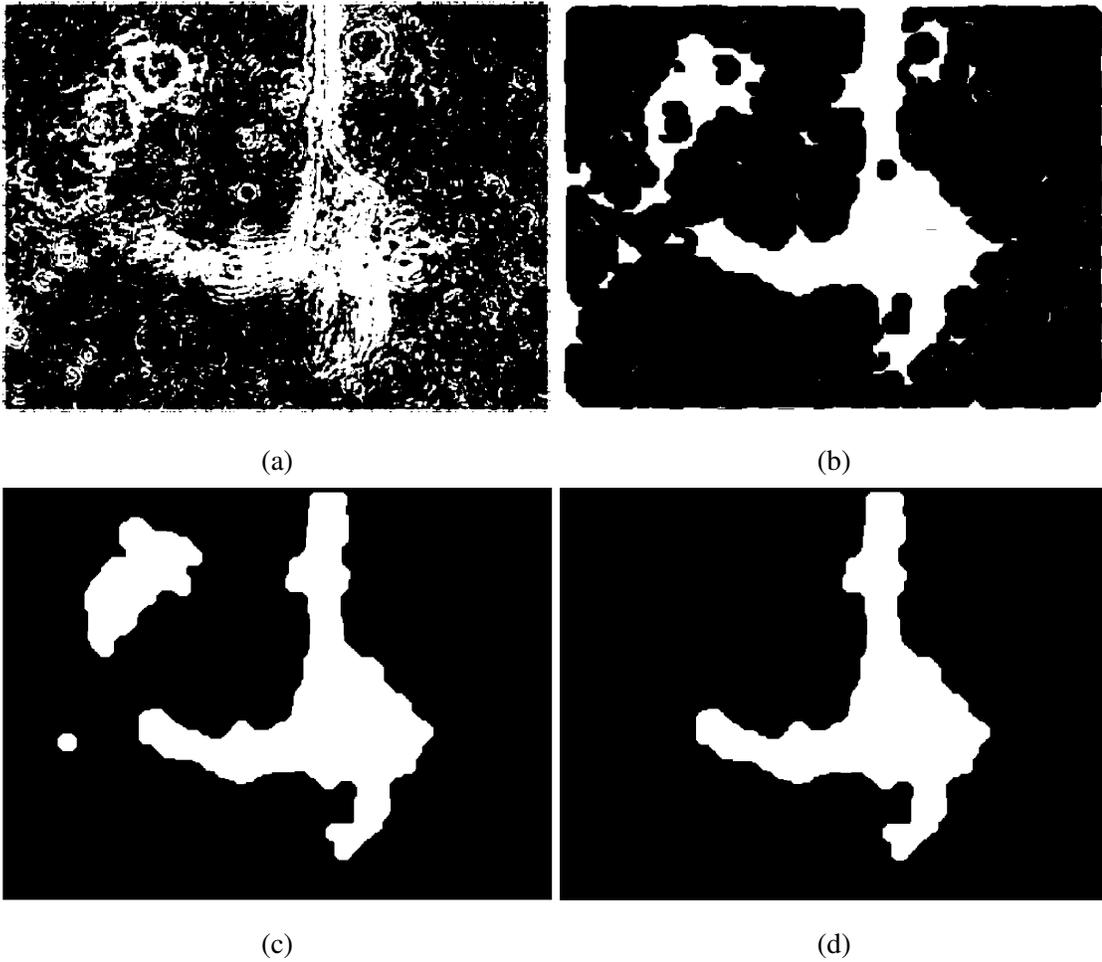


Figura 5.8: a) Resultado de aplicar el Método de Otsu, los píxeles de primer plano son blancos y los píxeles de fondo son negros. Posteriormente se aplicaron operaciones morfológicas, en b) erosión y c) cierre. Finalmente, el resultado es una máscara d) a la segmentación.

5.2.4. Morfología matemática

La morfología matemática es una técnica utilizada para analizar imágenes binarias o en escala de grises basada en dos operadores básicos: erosión Eq. 5.5 y dilatación Eq. 5.6 [57]. En una operación morfológica, el valor de cada píxel de la imagen de salida se basa en la comparación del píxel actual de la imagen de entrada con su entorno. El elemento estructurante λB puede tener diferentes formas: cuadrado, círculo y rectángulo, y su tamaño está definido por λ [58].

Se utilizó erosión para eliminar pequeños grupos de píxeles que quedaban flotando en la imagen y que no correspondían a la región de interés. El operador morfológico Erosion para imágenes binarias se define por 5.5, donde \cap representa la unión y la intersección, respectivamente; T representa la traslación de un conjunto A por el vector b , siendo A la imagen original.

$$A \ominus B = \bigcap_{b \in B} T_{-b}(A) \quad (5.5)$$

$$A \oplus B = \bigcup_{b \in B} T_b(A) \quad (5.6)$$

Entonces, el filtro de cierre se define en la ecuación 5.4 como una dilatación seguida de erosión sobre la misma imagen y utilizando el mismo elemento estructurante. Se utilizaba para cerrar aristas que quedan abiertas generadas por la erosión. La erosión se aplicó a la Fig. 5.8a para eliminar elementos pequeños como ruido y artefactos, como se ve en la Fig. 5.8b. Luego, una operación de cierre permite cerrar los bordes y algunas regiones que quedaron abiertas en el interior de los elementos (Fig. 5.8c). Después de este proceso, se observó que la neurona correspondía al elemento restante más grande en la mayoría de las imágenes. Así, se calculó el área de todos los objetos de la imagen, y se mantuvo el de mayor área. La imagen resultante

(Fig. 5.5f) se impuso como una máscara sobre la imagen original, restaurando los valores de ROI (Fig. 5.5g) a partir de los cuales se podían calcular las características cualitativas y cuantitativas.

5.3. Resultados preliminares y discusión

5.3.1. Resultados de la segmentación

Como se ha mencionado en secciones anteriores, el objetivo de la tesis esta limitado a Neuronas Piramidales de Corteza Prefrontal (PN-CPF). Sin embargo, la metodología propuesta para segmentación se probó con imágenes que contenían: PN-PFC, Neuronas Gigantes Colinérgicas (CGN), Neuronas Espinosas Medianas (MSN) y Neuronas Dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral (DN-VTA).

La figura 5.9a muestra dos ejemplos de PN-PFC en los que se observa que el método propuesto logró segmentar el soma (cuerpo principal) de la neurona y las dendritas fuertemente definidas correctamente. Además, la segmentación redujo el área de análisis cerca de los bordes de las neuronas, conservando información adicional para otros procesos. Por ejemplo, la recuperación de dendritas en regiones de baja definición podría ser necesaria para estimar algunas características/métricas relevantes en el análisis de neuronas. Además, se observó que el algoritmo podía segmentar la neurona a pesar de las diferencias en las posiciones o el número de dendritas.

En la Fig. 5.9b hay dos ejemplos de CGN donde se observa que el soma cubre un área amplia y las dendritas se segmentaron por completo, incluso aquellas que pasan a través de algunas partículas de ruido.

En MSN (Fig. 5.9c), se puede observar la similitud de valor entre el fondo y las dendritas. Sin embargo, la mayoría de las dendritas estaban correctamente

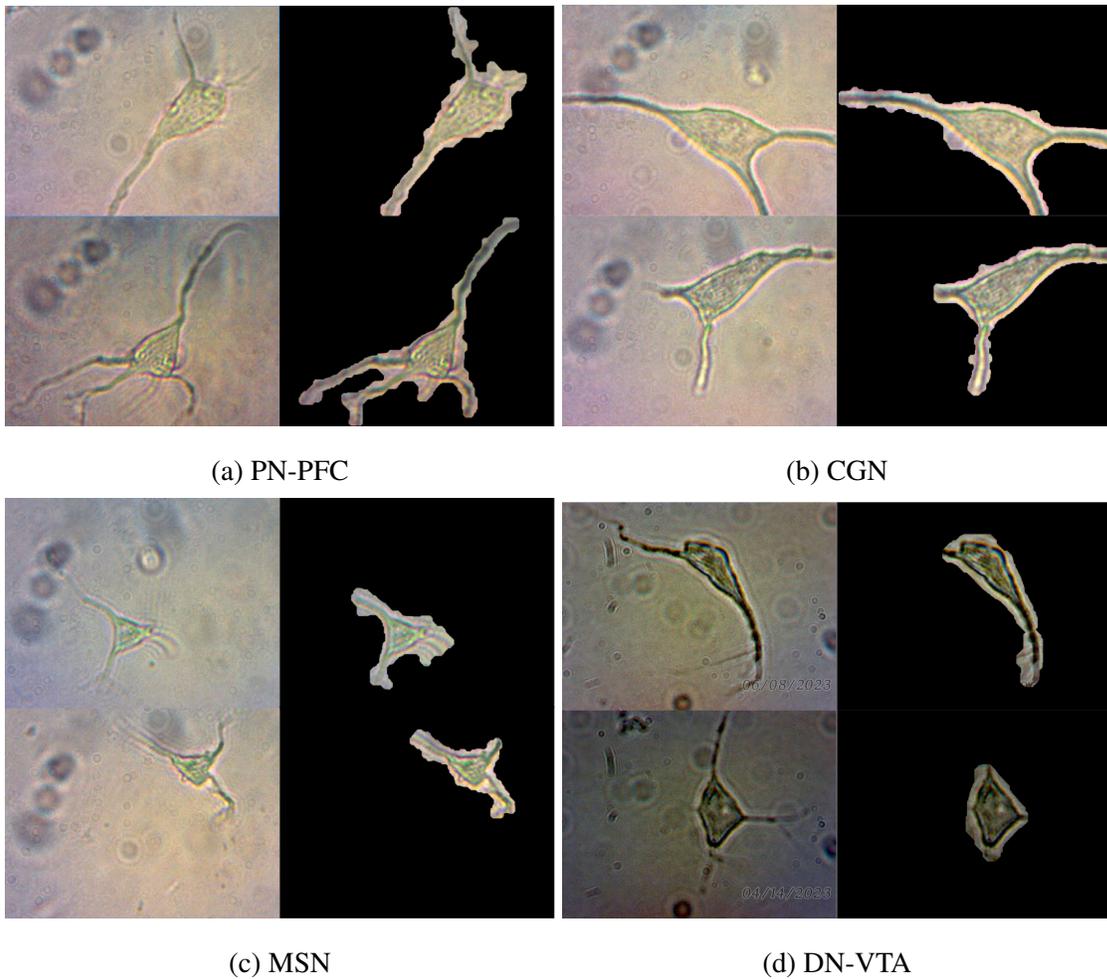


Figura 5.9: Segmentación de soma (cuerpo principal) y dendritas de diferentes tipos de neuronas mediante la metodología propuesta.

segmentadas.

En (Fig. 5.9d) se demostró que aunque presentaban dendritas remarcadas, el proceso las eliminó. Esto podría deberse a que algunas de sus dendritas no parecen tener un ancho uniforme, sino que tienen partes más delgadas. Dado que parte de la metodología implica erosiones morfológicas, las partes adelgazadas podrían desconectarse del resto de la dendrita, provocando su identificación como artefactos y siendo borradas.

5.3.2. Mediciones

A partir de la segmentación es posible obtener algunas mediciones. La medida del área de las neuronas es relevante en los estudios de electrofisiología porque se puede usar para estimar el tamaño de neuronas seleccionadas de un tamaño específico para el estudio, calcular la resistencia eléctrica de una neurona y comparar las propiedades eléctricas de neuronas de diferentes tamaños. Para obtener las medidas de las neuronas en unidades reales, se utilizó como referencia la imagen de un área grabada con un láser de alta precisión en un portaobjetos. La imagen se adquirió con el mismo aumento que las imágenes de la base de datos, es decir, 40x. La referencia corresponde a un área circular de 932 píxeles de diámetro que mide aproximadamente $70 \mu m$; entonces un píxel equivale aproximadamente a $0.076 \mu m$ por lado. Las medidas de las neuronas (Fig. 5.9) se pueden ver en detalle en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Medidas estimadas del área de las neuronas en Fig. 5.9.

Fig. 5.9	Tipo Neurona	Área en pixeles	Área en Micrómetros (μm)
(a) Superior	Piramidal de Corteza Prefrontal	143,422	10,760.49
(a) Inferior	Piramidal de Corteza Prefrontal	176,899	13,272.16
(b) Superior	Gigante Colinérgica	200,880	15,071.38
(b) Inferior	Gigante Colinérgica	155,105	11,637.03
(c) Superior	Espinosa Mediana	79,263	5,946.84
(c) Inferior	Espinosa Mediana	90,071	6,757.73
(d) Superior	Dopaminérgica del área tegmental ventral (VTA)	26,875	2,016.34
(d) Inferior	Dopaminérgica del área tegmental ventral (VTA)	23,313	1,749.09

5.3.3. Discusión

La metodología propuesta para segmentación mostró un desempeño adecuado en la segmentación de neuronas de diferentes tipos y bajo diversas condiciones de fondo. Algunas limitaciones actuales son que los extremos de las dendritas a veces se pierden cuando están tenues en la imagen; además, cuando una mancha de microscopio u otros desechos están cerca de alguna parte de la neurona, se incluyen erróneamente como parte de la neurona.

5.4. Productos

Los resultados preliminares fueron presentados en modalidad de cartel en el XIII Congreso Nacional y III Internacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud(CONITACS) Fig. 5.10.

Además, nos encontramos en la escritura de un artículo para reportar los resultados preliminares obtenidos hasta el momento (Fig. 5.11).



Figura 5.10: Constancia de participación en el congreso CONITACS 2023.

Segmentation and Characterization of Rat Neurons Using Computer Vision

E. Vazquez-Palacios, H. Peregrina-Barreto
*Instituto Nacional de Astrofísica,
Óptica y Electrónica (INAOE)*
Luis Enrique Erro No. 1,
San Andrés Cholula,
72840 Puebla, México
ere.palacios@inaoep.mx, hperegrina@inaoe.mx

J. Flores-Hernandez, S. Altamirano-Aguilar
*Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla (BUAP)*
Prol. 14 Sur 6301, Ciudad Universitaria,
Puebla, Puebla, 72570, Mexico
jorge.flores@correo.buap.mx,
stephany.altamirano@alumno.buap.mx

Abstract—Currently, the identification and selection of neurons from images obtained through a microscope are visually made, increasing the subjectivity of the process and human error. Computer vision techniques help automate the identification and selection of neurons with high precision while guaranteeing the application of constant criteria. However, several drawbacks related to microscope image quality must be addressed first to reach an accurate neuron identification. This work aimed to obtain qualitative and quantitative characteristics of neurons from inverse microscopic images. The proposed methodology allows separating the neuron from the background, despite the high noise generated by reflectances and distortion when observing the sample through the liquid solution and the petri dish. Neuron segmentation is a relevant task since, from it, an analysis of characteristics such as the number of dendrites, area, and capacitance can be performed. Obtained results showed that the proposed methodology could deal with neuron segmentation under different conditions.

Index Terms—neuron segmentation, inverted microscope, computer vision.

An alternative solution could be reached by addressing the limitations of visual analysis by computational means, helping to identify and understand the structure and function of the neurons. The utility of this approach is something that scientists have been clear about for many years. For example, Glaser in 1965 developed a semi-automatic system to analyze neuronal morphology. The system consists of an optical microscope, a television camera to digitize the images, and a computer to store and analyze them. Although neurons were identified manually, the system measured the size and shape of neurons [5]. Other ideas for Computer-aided neuron reconstruction began to emerge from this work, as in [6], where several configurations of computational analysis were tested to improve the properties visualization of neurons. Since neurons are the basic units of the nervous system, it is essential to study characteristics such as morphology to understand how they function in dendritic trees (sets) [7] and isolation. For this reason, computational tools are relevant to

Figura 5.11: Preparación de artículo para publicación de artículos en extenso.

Capítulo 6

Conclusiones y trabajo a futuro

6.1. Conclusiones

En este reporte, se presentan varias técnicas de procesamiento de imágenes que fueron exploradas y aplicadas con la finalidad de obtener un método de segmentación del área ROI. El método fue cambiando considerando los resultados en cada experimento, hasta encontrar una metodología funcional para la segmentación de la neurona. El cual, se ocupó del alto ruido generado por los medios a través de los cuales se capturó la imagen. Se probó con imágenes de diferentes tipos de neuronas y demostró ser capaz de segmentar adecuadamente las neuronas, a pesar de las diferencias de tamaño y nivel de contraste.

El algoritmo obtiene una segmentación más cercana a los bordes de las neuronas, lo que podría permitir un mayor procesamiento para la reconexión de las dendritas. Los resultados actuales son prometedores y se pueden utilizar para aproximar los datos estimados de la imagen, como el volumen de las neuronas. Deben abordarse dos limitaciones principales relacionadas con la pérdida de los extremos de las dendritas y la toma de partes de neuronas mal segmentadas.

6.2. Trabajo a futuro y cronograma

Para el trabajo a futuro se trabajará en los detalles de la neurona segmentada así como las siguientes secciones mencionadas en la Metodología general Fig. 4.1: extracción de características y evaluación de las características obtenidas con clasificadores automáticos. Además, se muestran los tiempos estimados en el siguiente cronograma Fig. 6.1, se encuentran señaladas las actividades realizadas hasta el momento con azul claro y con azul oscuro las que aún quedan por realizarse, hasta la fecha se ha cumplido en tiempo y forma lo estimado.

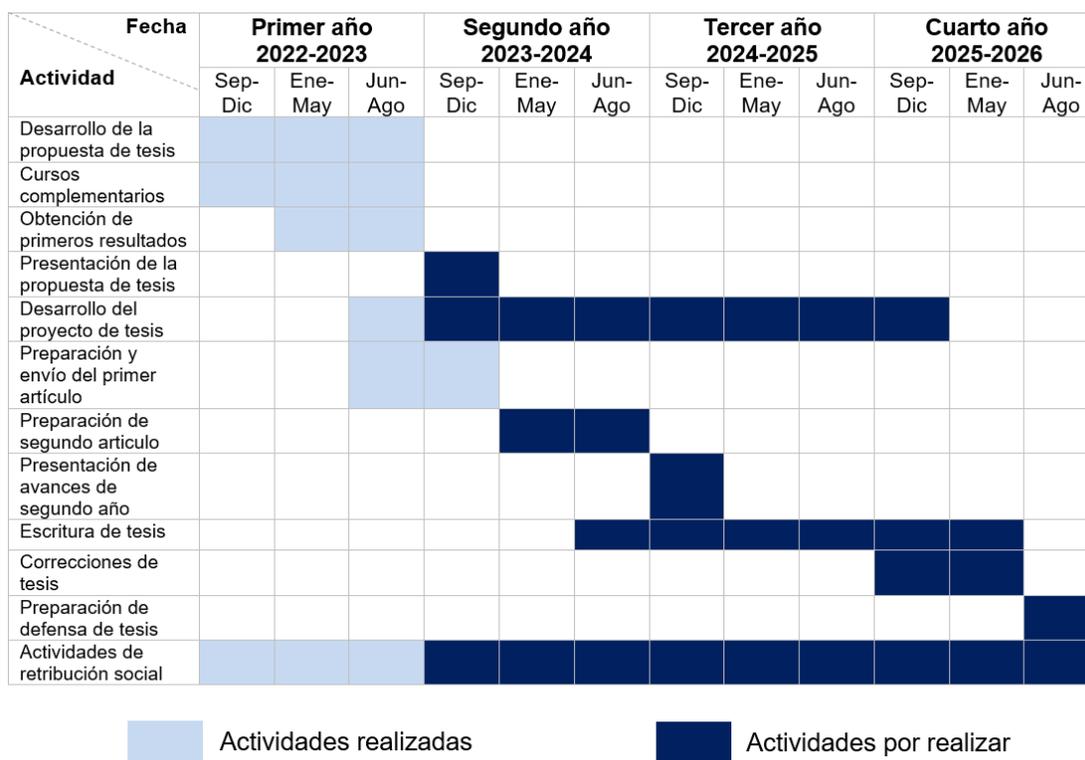


Figura 6.1: Cronograma de actividades

Bibliografía

- [1] Rashad Hussain, Hira Zubair, Sarah Pursell, and Muhammad Shahab. Neurodegenerative diseases: Regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain sciences*, 8(9):177, 2018.
- [2] Jing Ning, Shu-Yi Huang, Shi-Dong Chen, Ya-Ru Zhang, Yu-Yuan Huang, and Jin-Tai Yu. Investigating Casual Associations Among Gut Microbiota, Metabolites, and Neurodegenerative Diseases: A Mendelian Randomization Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, January 2022.
- [3] Frank Gibson, Paul Overton, Tom Smulders, Simon Schultz, Stephen Eglen, Colin Ingram, Stefano Panzeri, Phil Bream, Evelyne Sernagor, Mark Cunningham, et al. Minimum information about a neuroscience investigation (mini) electrophysiology. *Nature Precedings*, pages 1–1, 2008.
- [4] Robert FREEDMAN and Randal G. ROSS. Prenatal choline and the development of schizophrenia. *Shanghai Archives of Psychiatry*, April 2015.
- [5] E. M. Glaser and H. Van Der Loos. A Semi-Automatic Computer-Microscope for the Analysis of Neuronal Morphology. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1965.
- [6] Joseph J. Capowski and William L. R. Cruce. How to configure a computer-aided neuron reconstruction and graphics display system. *Computers and Biomedical Research*, 1979.

- [7] Jaap van Pelt and Harry B. M. Uylings. Modeling the natural variability in the shape of dendritic trees: Application to basal dendrites of small rat cortical layer 5 pyramidal neurons. *Neurocomputing*, 1999.
- [8] Giorgio A. Ascoli. Progress and perspectives in computational neuroanatomy. *The Anatomical Record*, 1999.
- [9] J. van Pelt, Arjen van Ooyen, and Harry B. M. Uylings. The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal structure and function. *Anatomy and Embryology*, 2001.
- [10] Erik Meijering and Gert van Cappellen. Quantitative Biological Image Analysis. In Spencer L. Shorte and Friedrich Frischknecht, editors, *Imaging Cellular and Molecular Biological Functions*, Principles and Practice. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.
- [11] Angel Merchan-Perez, José-Rodrigo Rodríguez, Lidia AlonsoNanclares, Andreas Schertel, and Javier DeFelipe. Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2009.
- [12] Felix Buggenthin, Carsten Marr, Michael Schwarzfischer, Philipp S Hoppe, Oliver Hilsenbeck, Timm Schroeder, and Fabian J Theis. An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy. *BMC Bioinformatics*, 2013.
- [13] Miroslav Radojević, Ihor Smal, and Erik Meijering. Fuzzy-Logic Based Detection and Characterization of Junctions and Terminations in Fluorescence Microscopy Images of Neurons. *Neuroinformatics*, April 2016.
- [14] William Meiniel, Jean-Christophe Olivo-Marin, and Elsa D. Angelini. Denoising of Microscopy Images: A Review of the State-of-the-Art, and a New Sparsity-Based Method. *IEEE Transactions on Image Processing*, August 2018.

- [15] Giorgio A Ascoli, Duncan E Donohue, and Maryam Halavi. Neuromorpho.org: a central resource for neuronal morphologies. *Journal of Neuroscience*, 27(35):9247–9251, 2007.
- [16] Tielin Zhang, Yi Zeng, Yue Zhang, Xinhe Zhang, Mengting Shi, Likai Tang, Duzhen Zhang, and Bo Xu. Neuron type classification in rat brain based on integrative convolutional and tree-based recurrent neural networks. *Scientific Reports*, 2021.
- [17] Xintong Li, Chen Li, Md Mamunur Rahaman, Hongzan Sun, Xiaoqi Li, Jian Wu, Yudong Yao, and Marcin Grzegorzec. A comprehensive review of computer-aided whole-slide image analysis: from datasets to feature extraction, segmentation, classification and detection approaches. *Artificial Intelligence Review*, 2022.
- [18] George McNamara, Michael Difilippantonio, Thomas Ried, and Frederick R. Bieber. Microscopy and Image Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, 2017.
- [19] Melanie M. Frigault, Judith Lacoste, Jody L. Swift, and Claire M. Brown. Live-cell microscopy – tips and tools. *Journal of Cell Science*, March 2009.
- [20] Duncan E. Donohue and Giorgio A. Ascoli. Automated reconstruction of neuronal morphology: an overview. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), June 2011.
- [21] Karel Svoboda. The Past, Present, and Future of Single Neuron Reconstruction. *Neuroinformatics*, 9(2-3), September 2011.
- [22] Ihor Smal, Wiro Niessen, and Erik Meijering. A new detection scheme for multiple object tracking in fluorescence microscopy by joint probabilistic data association filtering. In *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, May 2008. ISSN: 1945-8452.

- [23] Maryam Halavi, Kelly A. Hamilton, Ruchi Parekh, and Giorgio A. Ascoli. Digital reconstructions of neuronal morphology: three decades of research trends. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 2012.
- [24] Jacob R Glaser and Edmund M Glaser. Neuron imaging with neurolucida—a pc-based system for image combining microscopy. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 14(5):307–317, 1990.
- [25] Carolee Nguyen and Katherine L Thompson-Peer. Comparing automated morphology quantification software on dendrites of uninjured and injured drosophila neurons. *Neuroinformatics*, 19(4):703–717, 2021.
- [26] Ingrid Dudink, Tegan A White, Maryam Ardalan, Carina Mallard, Giulia Ballerin, Sarah J Creed, Yen Pham, Amy E Sutherland, Margie Castillo-Melendez, Beth J Allison, et al. An optimized and detailed step-by-step protocol for the analysis of neuronal morphology in golgi-stained fetal sheep brain. *Developmental neuroscience*, 44(4-5):344–362, 2022.
- [27] Allon Weiner. Step-by-step guide to post-acquisition correlation of confocal and fib/sem volumes using amira software. In *Methods in cell biology*, volume 162, pages 333–351. Elsevier, 2021.
- [28] Kai XU, Guoxian Pei, and Yuanzhi Zhang. Design of three-dimensional visualization for lateral flaps of legs based on the operational platform of amira software. *Medical Journal of Chinese People’s Liberation Army*, 2001.
- [29] Christina M Weaver, Patrick R Hof, Susan L Wearne, and W Brent Lindquist. Automated algorithms for multiscale morphometry of neuronal dendrites. *Neural computation*, 16(7):1353–1383, 2004.
- [30] Christian Tackenberg and Roland Brandt. Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid- β , wild-type tau, and r406w tau. *Journal of Neuroscience*, 29(46):14439–14450, 2009.

- [31] William R Kennedy and Gwen Wendelschafer-Crabb. Utility of skin biopsy in diabetic neuropathy. In *Seminars in neurology*, volume 16, pages 163–171. © 1996 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1996.
- [32] Jonathan Popko, Adelaide Fernandes, Dora Brites, and Lorene M Lanier. Automated analysis of neuronj tracing data. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*, 75(4):371–376, 2009.
- [33] Christine R Cremo, Joan M Neuron, and Ralph G Yount. Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. a comparison of vanadate trapping and sh1-sh2 crosslinking. *Biochemistry*, 29(13):3309–3319, 1990.
- [34] Paul Cottrell, Sohail Ahmed, Catherine James, James Hodson, Peter J McDonnell, Saaeha Rauz, and Geraint P Williams. Neuron j is a rapid and reliable open source tool for evaluating corneal nerve density in herpes simplex keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(11):7312–7320, 2014.
- [35] Philip Broser, Alexander Heusel, Daniel Jungblut, Gillian Queisser, Sebastian Reiter, Roland Schulte, Christine Voßen, and Gabriel Wittum. A2. 1, m8, t6: Neura: The neuron reconstruction algorithm. *G-CSC Report 2010*, page 19.
- [36] Yiwei Wu, Kuan Tao, Qi Chen, Yinsheng Tian, and Lixin Sun. A comprehensive analysis of the validity and reliability of the perception neuron studio for upper-body motion capture. *Sensors*, 22(18):6954, 2022.
- [37] Dara L Dickstein, Alfredo Rodriguez, Anne B Rocher, Susan L Wearne, Jennifer I Luebke, Christina M Weaver, and Patrick R Hof. P2-331: Neuronstudio: An automated quantitative software to assess changes in spine pathology in alzheimer models. *Alzheimer's & Dementia*, 6:S410–S410, 2010.
- [38] Melinda K Kutzing, Christopher G Langhammer, Vincent Luo, Hersh Lakdawala, and Bonnie L Firestein. Automated sholl analysis of digitized neuro-

- nal morphology at multiple scales. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45):e2354, 2010.
- [39] Alberto Santamaría-Pang, Paul Hernandez-Herrera, Manos Papadakis, Peter Saggau, and Ioannis A Kakadiaris. Automatic morphological reconstruction of neurons from multiphoton and confocal microscopy images using 3d tubular models. *Neuroinformatics*, 13:297–320, 2015.
- [40] Zakariyya Mughal et al. *Converting a Neuron-Morphology Reconstruction System: Open-Science Design and Implementation*. PhD thesis, 2016.
- [41] Kerry M. Brown, Duncan E. Donohue, Giampaolo D’Alessandro, and Giorgio A. Ascoli. A cross-platform freeware tool for digital reconstruction of neuronal arborizations from image stacks. *Neuroinformatics*, 3(4), 2005.
- [42] Hanchuan Peng, Alessandro Bria, Zhi Zhou, Giulio Iannello, and Fuhui Long. Extensible visualization and analysis for multidimensional images using vaa3d. *Nature protocols*, 9(1):193–208, 2014.
- [43] Alessandro Bria, Giulio Iannello, and Hanchuan Peng. An open-source vaa3d plugin for real-time 3d visualization of terabyte-sized volumetric images. In *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pages 520–523. IEEE, 2015.
- [44] Jiangshan Liang, Luchen Deng, Shize Chen, Yimin Wang, Zongcai Ruan, and Lingli Zhang. Vaa3d-x for cross-platform teravoxel-scale immersive exploration of multidimensional image data. *Bioinformatics*, 39(1):btac794, 2023.
- [45] Claire McQuin, Allen Goodman, Vasilij Chernyshev, Lee Kamensky, Beth A Cimini, Kyle W Karhohs, Minh Doan, Liya Ding, Susanne M Rafelski, Derek Thirstrup, et al. Cellprofiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS biology*, 16(7):e2005970, 2018.

- [46] Anne E Carpenter, Thouis R Jones, Michael R Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A Guertin, Joo Han Chang, Robert A Lindquist, Jason Moffat, et al. Cellprofiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*, 7:1–11, 2006.
- [47] Michael R Lamprecht, David M Sabatini, and Anne E Carpenter. Cellprofiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. *biotechniques*, 42(1):71–75, 2007.
- [48] Giorgio A Ascoli and Ruggero Scorcioni. Neuron and network modeling. *Neuro-anatomical Tract-Tracing 3: Molecules, Neurons, and Systems*, pages 604–630, 2006.
- [49] Jose Bargas, Angela Howe, James Eberwine, Y Cao, and D James Surmeier. Cellular and molecular characterization of ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *Journal of Neuroscience*, 14(11):6667–6686, 1994.
- [50] D. James Surmeier, Wen-Jie Song, and Zhen Yan. Coordinated Expression of Dopamine Receptors in Neostriatal Medium Spiny Neurons. *Journal of Neuroscience*, October 1996.
- [51] Jorge Flores-Hernández, Carlos Cepeda, Elizabeth Hernández-Echeagaray, Christopher R. Calvert, Eve S. Jokel, Allen A. Fienberg, Paul Greengard, and Michael S. Levine. Dopamine Enhancement of NMDA Currents in Dissociated Medium-Sized Striatal Neurons: Role of D1 Receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, December 2002.
- [52] Luis Gustavo Hernández Carballo. Modulación serotoninérgica de las corrientes activadas por glutamato en neuronas piramidales de las capas v – vi de corteza prefrontal de ratas expuestas a una hiperserotoninemia materna durante la gestación. October 2020. Accepted: 2020-12-16T17:08:20Z.

- [53] Estela Ortiz Rangel, Manuel Mejía-Lavalle, and Humberto Sossa. Filtrado de ruido gaussiano mediante redes neuronales pulso-acopladas. *Computación y Sistemas*, 21(2):381–395, 2017.
- [54] Alejandra Carolina Pinto Leal et al. Segmentación de imágenes por textura. 2006.
- [55] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [56] Otsu’s method for image thresholding explained and implemented – Muthukrishnan, March 2020.
- [57] D Hernandez-Contreras, Hayde Peregrina-Barreto, J Rangel-Magdalenó, J Ramirez-Cortés, F Renero-Carrillo, and G Avina-Cervantes. Evaluation of thermal patterns and distribution applied to the study of diabetic foot. In *2015 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings*, pages 482–487. IEEE, 2015.
- [58] Hayde Peregrina-Barreto, Ana M Herrera-Navarro, Luis A Morales-Hernández, and Iván R Terol-Villalobos. Morphological rational operator for contrast enhancement. *JOSA A*, 28(3):455–464, 2011.