

CONCATPIPELINE: UM TOOLBOX PARA ANÁLISE DE DATASETS DE IMAGEAMENTO DE CÁLCIO COM MINI MICROSCÓPIOS

Daniel Almeida Filho^{1,2}; Ludmila Anjos^{1,3}; Ammar Marvi²; Ying Cai²; Megha Sehgal²; Yang Shen²; Alcino J. Silva²

¹ Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA;

² Neurobiology, Psychiatry and Psychology Departments and Integrative Center for Learning and Memory, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

³ Graduanda em Engenharia Elétrica; Iniciação Científica PIBIC-CIMATEC/CNPq

contato: daniel.almeidaf@fieb.org.br

RESUMO

As técnicas utilizadas atualmente para análise dos dados registrados por imageamento de cálcio são ainda incipientes. Os registros por mini microscopia de fóton único têm baixa resolução espacial e alto nível de ruído, o que dificulta o aproveitamento da maior vantagem destes registros, que é a possibilidade de acompanhar a atividade neuronal através de múltiplos dias a meses. Objetivando aprimorar a análise desses dados, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um toolbox de análise de dados registrados por imageamento de cálcio em diferentes regiões cerebrais com o uso de mini microscópios (miniscopes) de fóton único. A elaboração do método de análise se dará através do estabelecimento de um *Ground Truth* de referência, otimização do Código e melhoria de usabilidade, testes de validação, qualidade e funcionalidade, comparação com outros métodos, preparação de figuras e escrita do artigo científico. Ao final do estudo, espera-se que o algoritmo aqui apresentado se torne padrão na análise de registros de imageamento de cálcio por mini microscópios.

PALAVRAS-CHAVE: Imageamento de Cálcio; Miniscopes; Processamento de imagem.

1. INTRODUÇÃO

Os dados registrados por imageamento de cálcio são atualmente o estado da arte no que se refere ao registro simultâneo de centenas de neurônios individuais em diferentes áreas cerebrais e o acompanhamento de sua atividade através de dias a meses em roedores em livre comportamento. Porém, as técnicas utilizadas atualmente para análise destes dados após gravados são ainda incipientes pois os registros por mini microscopia de fóton único têm baixa resolução espacial e alto nível de ruído. Poucas são também as avaliações sistemáticas sobre os diferentes métodos de acompanhamento de células através do tempo ou de múltiplas sessões, como por exemplo, avaliar se detectar células correspondentes em sessões independentes tem melhor performance do que concatenar as sessões e então detectar células.

Visando obter um método eficiente de registro simultâneo de centenas de neurônios individuais em diferentes áreas cerebrais e o acompanhamento de sua atividade através de dias a meses em roedores em livre comportamento, o presente trabalho objetiva, desenvolver um toolbox de análise de dados registrados por imageamento de cálcio em diferentes regiões cerebrais com o uso de mini microscópios (miniscopes) de fóton único. Assim sendo, haverá a comparação da eficiência de técnicas utilizadas atualmente para análise de dados registrados por imageamento de cálcio, e análise de dados brutos provindos de mini microscópios.

2. METODOLOGIA

Criação do *Ground Truth*: Nesta etapa, usaremos dados registrados em diferentes regiões cerebrais e usaremos a estratégia de consenso de registro entre 3 indivíduos classificadores, ou seja, considerar células reais (*ground truth*) aquelas que foram identificadas por todos os classificadores em cada sessão.

Otimização do Código e Melhoria de Usabilidade: Nesta etapa, revisitaremos o código já construído e disponível em <https://github.com/Almeida-FilhoDG/ConcatMiniscope>, para otimizar processos a fim de torná-los mais eficientes computacionalmente, sem perda de qualidade. Ao mesmo tempo, o código também será revisado para fazê-lo palatável à comunidade usuária. A grande maioria dos usuários do toolbox têm baixa expertise em programação. Para fazer com que o produto seja realmente usado em larga escala e torne-se referência neste campo de trabalho, é importante que ele possa servir às necessidades de usuários leigos.

Testes de Validação, Qualidade e Funcionalidade: Nesta etapa, o código será testado múltiplas vezes em diferentes registros advindos de diferentes espécies, registrados com diferentes equipamentos e

em diferentes regiões cerebrais. Verificar-se-á se o algoritmo é capaz de detectar células e seguir sua atividade através de múltiplas sessões em registros de diferentes tamanhos, formatos e qualidades (mais ou menos ruído e artefatos). Também será verificada a oscilação de parâmetros de qualidade e estabilidade (os mesmos resultados em diferentes rodadas de análise) de detecção para cada um dos registros.

Comparação com outros métodos: Nesta etapa, usaremos o *Ground Truth* comparando entre o método proposto utilizando concatenação de sessões contra os métodos de análise de sessões individuais e definição de correspondência entre células.

Preparação de Figuras e Escrita do Artigo Científico: Nesta etapa, produziremos as figuras ilustrativas dos resultados obtidos bem como a escrita do artigo científico de apresentação e comprovação da qualidade do presente sistema para a comunidade científica.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A detecção e extração automática de células e sua atividade a partir de registros de dois fótons ou um fóton de indicadores fluorescentes de cálcio é um desafio atual na neurociência.¹ Além disso, a análise dinâmica da plasticidade em redes neurais capazes de abrigar novas informações codificadas requer gravações de longo prazo em várias sessões de horas a semanas. Nesse cenário, a capacidade de rastrear a atividade de células específicas nessas diferentes sessões é crucial.² Algumas novas evidências sugerem que, em vez de extrair células de uma única sessão e alinhá-las para tentar combinar células entre sessões, a concatenação de sessões em um único vídeo de longa duração seria uma boa alternativa para melhorar a extração de células e rastrear sua atividade ao longo do tempo (Figura 1).

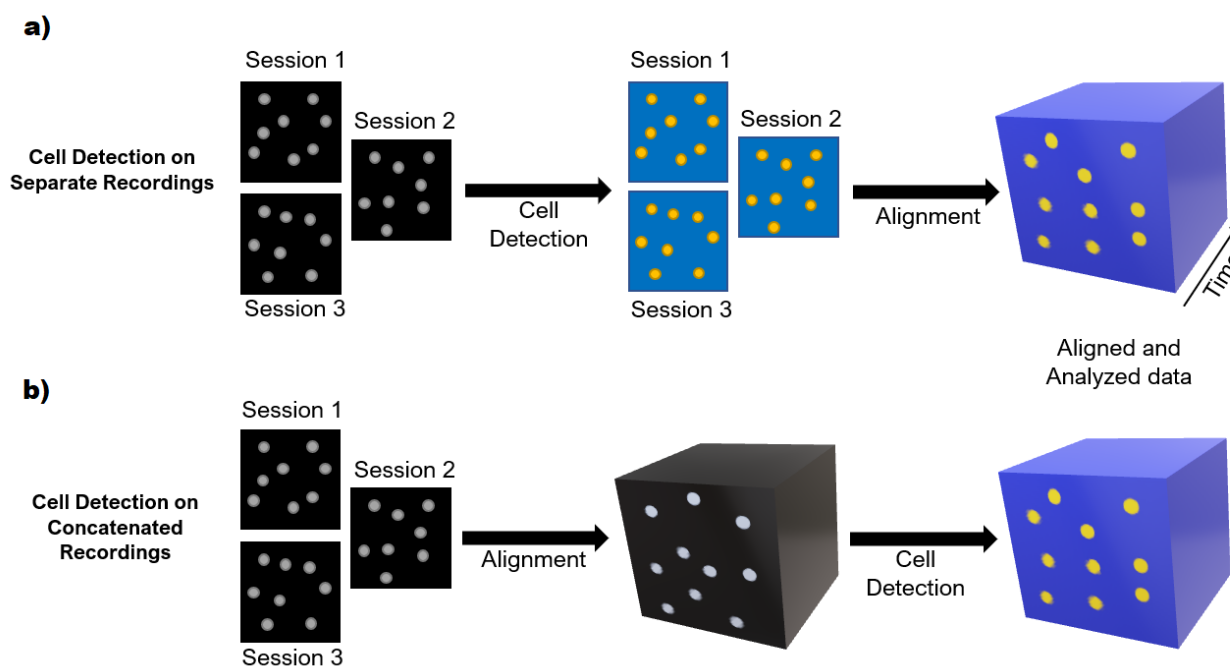


Figura 1. Comparação entre o método de detecção clássico (a) e o método de concatenação (b). a) As células são primeiro detectadas e depois alinhadas para identificar correspondência entre sessões diferentes. b) Os vídeos de sessões diferentes são primeiro concatenados em um único vídeo longo e as células são detectadas apenas uma vez por todo o vídeo.

Mais especificamente, a concatenação pode levar a maior quantidade e qualidade na extração de células,³ além de permitir o rastreamento das mesmas células em diferentes sessões, o que é crucial para a avaliação da atividade da rede e plasticidade relacionada a novas experiências comportamentais, aprendizado e memória.⁴ É importante ressaltar que recentemente foi demonstrado que algumas células podem ser detectadas em apenas um subconjunto das sessões gravadas, levando à interpretação de que essas células são silenciosas durante a sessão em que não foram detectadas.⁵ Isso é especialmente relevante para a análise de células compartilhadas entre a codificação de diferentes sessões, uma vez que essa quantificação é uma evidência importante para a interpretação do comportamento de ligação entre memórias através da exploração de diferentes contextos em curtos intervalos de tempo e para a hipótese de alocação neuronal.⁶

Outra questão importante é que diferentes artigos relataram o uso de diferentes métodos para concatenação de sessões, extração de células e projeção da atividade neuronal,^{3,4,5,7} o que dificulta a reprodutibilidade. Por todas essas razões, desenvolvemos um toolbox para a concatenação de sessões de imagens de cálcio de fóton único em um só vídeo e seu processamento desde a extração celular até a projeção da atividade neuronal. Nosso algoritmo é fortemente baseado no algoritmo NoRMCorre amplamente utilizado para correção de movimento e no algoritmo CNMF-E para extração de células.^{8,9} O código foi desenvolvido em Matlab® e está em desenvolvimento em repositório GitHub® (<https://github.com/Almeida-FilhoDG/ConcatMiniscope>), ainda necessitando de otimização de códigos, melhoria de usabilidade e testes sistemáticos de validação, qualidade e funcionalidade, além de comparação com outros métodos de análise.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espera-se que o algoritmo aqui apresentado se torne padrão na análise de registros de imageamento de cálcio por mini microscópios. O orientador do presente projeto é recém-advindo de um dos laboratórios da Universidade da Califórnia Los Angeles (UCLA) que desenvolveram a tecnologia de mini microscópios de fluorescência *open source*. A tecnologia deste equipamento está sendo transferida para o SENAI-CIMATEC como uma das possíveis plataformas de Interface Cérebro-Máquina do futuro a médio/longo prazo, mas como tecnologia acessível aos laboratórios de pesquisa do Brasil e América Latina a curto prazo. Será muito importante que o SENAI-CIMATEC seja também protagonista neste ramo tecnológico de futuro promissor.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ Stringer et al (2019). Computational processing of neural recordings from calcium imaging data This review comes from a themed issue on Machine Learning, Big Data, and Neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*, 55, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.11.005>
- ² Sheintuch et al (2017). Tracking the Same Neurons across Multiple Days in Ca²⁺ Imaging Data. *Cell Reports*, 21(4), 1102–1115. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.013>
- ³ Gonzalez et al (2019). Persistence of neuronal representations through time and damage in the hippocampus. *Science*, 365(6455), 821–825. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV9199>
- ⁴ Ghandour et al (2019). Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10683-2>
- ⁵ Kumar et al (2020). Sparse Activity of Hippocampal Adult-Born Neurons during REM Sleep Is Necessary for Memory Consolidation. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.008>
- ⁶ Sehgal et al (2018). Memory allocation mechanisms underlie memory linking across time. *Neurobiology of Learning and Memory*, 153, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.021>
- ⁷ Jimenez et al, (2018). Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*, 97(3), 670-683.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016>
- ⁸ Pnevmatikakis, E. A., & Giovannucci, A. (2017). NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods*, 291, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>
- ⁹ Zhou et al (2018). Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. *ELife*, 7, 1–37. <https://doi.org/10.7554/eLife.28728>