

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR



PROYECTO FIN DE CARRERA

Lourdes Taboada Pérez

Mayo 2015

DETECCIÓN DE EVENTOS EN IMAGEN DE ACTIVIDAD NEURONAL PARA SU USO EN TÉCNICAS DE ESTIMULACIÓN DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD

AUTOR: Lourdes Taboada Pérez

TUTOR: Pablo Varona

Grupo de Neurocomputación Biológica

Dpto. de Ingeniería Informática

Escuela Politécnica Superior

Universidad Autónoma de Madrid

Mayo 2015

Agradecimientos

Parecía imposible, pero finalmente hemos conseguido terminar el PFC. Me gustaría agradecer a todas las personas que me han apoyado y ayudado a conseguirlo.

En primer lugar a mi familia. Sin su apoyo y su paciencia estoy segura de que no hubiese conseguido terminarlo. Habéis tenido que esperar “un poco” más de lo que pensábamos, pero por fin tenemos aquí el tan ansiado PFC. A mis padres y mi hermana, ¡gracias!

Especialmente gracias a ti, “Pom”, por ser mi gran apoyo, por ayudarme y estar siempre a mi lado

A Pablo, mi tutor, y toda la gente del laboratorio del GNB que me han ayudado siempre que lo he necesitado, gracias.

A los amigos, compañeros y profesores de la carrera que se han preocupado por que este proyecto llegase a su fin algún día (María, Jorge, Laura...). Aunque parezca imposible, ese día ha llegado. ¡Gracias!

A mis compañeros y jefes de la oficina, que llevan ya años queriendo verme siendo ingeniera. Especialmente a Paco, por animarme tanto y dedicarme gran parte de su valioso tiempo, ¡gracias!

A todos los que de una forma u otra me habéis apoyado ¡¡muchas gracias!!

Índice

1	Introducción	- 9 -
1.1.	Resumen.....	- 9 -
1.2.	Motivación	- 9 -
1.1	Objetivos	- 12 -
1.2	Organización de la memoria	- 12 -
2	Estado del arte	- 13 -
2.1	Imágenes médicas.....	- 13 -
2.1.1	La resonancia magnética.....	- 14 -
2.1.2	Tomografía axial computarizada (TAC)	- 16 -
2.1.3	Magnetoencefalografía.....	- 17 -
2.1.4	Técnicas de registro de imagen <i>in vitro</i>	- 18 -
2.2	Estimulación en ciclo cerrado. Biofeedback.....	- 19 -
2.2.1	Concepto	- 20 -
2.2.2	Interfaces cerebro-máquina.....	- 20 -
2.2.3	Biofeedback en preparaciones <i>in vitro</i>	- 22 -
2.3	Procesamiento de imágenes	- 26 -
2.3.1	Concepto	- 26 -
2.3.2	Procesamiento de imágenes online	- 26 -
2.4	Estudios previos de imagen de calcio neuronal	- 28 -
2.4.1	Introducción. Neurotransmisores.....	- 28 -
2.4.2	La importancia del calcio para las neuronas	- 29 -
2.4.3	Estudios previos sobre la relación calcio-voltaje	- 30 -
3	Diseño del proyecto	- 32 -
3.1	Proyecto global.....	- 32 -
3.1.1	Objetivos del proyecto global	- 32 -
3.1.2	Áreas de estudio del proyecto global.....	- 32 -
3.1.3	Concepto de Observador y Controlador Dinámico en tiempo real.....	- 34 -
3.1.4	Representación esquemática del funcionamiento del Observador Dinámico en Tiempo Real.....	- 37 -
3.2	Proyecto a partir de señales neuronales obtenidas <i>in vitro</i>	- 37 -

3.2.1	Identificación de los bloques del RTDOC para tratamiento de imágenes de calcio. ...	38 -
3.2.2	Características del RTDOC para el tratamiento de imágenes de calcio.	38 -
3.3	Medios utilizados	42 -
3.3.1	Microscopio de fluorescencia	42 -
3.3.2	Cámara CCD.....	43 -
3.3.3	Software: Neuroplex	43 -
3.3.4	Software: Matlab.....	45 -
3.3.5	Medios utilizados para la estimulación dependiente de los eventos.	46 -
4	Desarrollo y resultados del proyecto	46 -
4.1	Obtención de imágenes	47 -
4.1.1	Experimentos realizados para la obtención de imágenes.....	47 -
4.2	Implementación de los algoritmos y resultados	56 -
4.2.1	Obtención de la señal de concentración de calcio.....	56 -
4.2.2	Algoritmos de detección de eventos en la señal de calcio	61 -
4.2.3	Algoritmo detección del onset de calcio.....	74 -
4.2.4	Elección de la región de interés	81 -
4.3	Interacción con la muestra bajo estudio.....	82 -
4.3.1	Experimento para la validación de los algoritmos: Iluminación entre eventos consecutivos detectados en la señal de calcio y en la señal de potencial.	84 -
4.3.2	Diagrama bloques señales de entrada y salida	84 -
4.3.3	Práctica de control del shutter de la cámara	85 -
5	Conclusiones y trabajo futuro	88 -
6	Bibliografía	90 -

Ilustraciones

<i>Ilustración 1 Señal de calcio (trazo superior) obtenido con técnicas de imagen de fluorescencia y potencial de membrana (trazo inferior, obtenido con un registro intracelular en el laboratorio del GNB). Ambas señales se han registrado de forma simultánea en una preparación in vitro de un circuito generador central de patrones de Carcinus maenas.</i>	- 10 -
<i>Ilustración 2 Esquema RTDOC simplificado. Etapas de procesamiento de señales biológicas, detección de eventos en dichas señales y generación de estímulos o acciones en función de los eventos detectados. Todas las etapas forman un bucle cerrado.</i>	- 11 -
<i>Ilustración 3 Equipo de Resonancia Magnética</i>	- 15 -
<i>Ilustración 4 Equipo de TAC</i>	- 16 -
<i>Ilustración 5 TAC craneal</i>	- 17 -
<i>Ilustración 6 Técnicas de imagen de varias neuronas en muestras in vitro para el estudio de la toma de decisiones (Briggman et al., 2005)</i>	- 19 -
<i>Ilustración 7 Biofeedback en preparaciones in vitro. (Chamorro et al., 2012).</i>	- 23 -
<i>Ilustración 8 Biofeedback en preparaciones in vitro. Ejemplo 1: microinyección dependiente de la actividad detectada (Chamorro et al., 2012).</i>	- 24 -
<i>Ilustración 9 Biofeedback en preparaciones in vitro. Ejemplo 2: estimulación dependiente de la actividad detectada con estímulos mecánicos (Chamorro et al., 2012).</i>	- 24 -
<i>Ilustración 10 Esquema bucle cerrado que resume la estructura de este PFC. Adaptación del esquema de (Chamorro et al., 2012) para los objetivos del PFC.</i>	- 25 -
<i>Ilustración 11 Registro simultáneo de la imagen de fluorescencia del calcio y el voltaje de membrana de la interneurona HN (Ramaswamy et al., 2007).</i>	- 31 -
<i>Ilustración 12 Correlación de distintos parámetros del calcio y voltaje.</i>	- 31 -
<i>Ilustración 13 Tareas proyecto global</i>	- 33 -
<i>Ilustración 14 Esquema general del RTDOC</i>	- 37 -
<i>Ilustración 15 Adquisición de la señal de voltaje en Neuroplex</i>	- 40 -
<i>Ilustración 16 Señales de calcio y voltaje simultáneas</i>	- 41 -
<i>Ilustración 17 Microscopio fluorescencia</i>	- 43 -
<i>Ilustración 18 Cámara CCD</i>	- 43 -
<i>Ilustración 19 Conexiones cámara CCD y Neuroplex</i>	- 44 -
<i>Ilustración 20 Interfaz Neuroplex. Se puede observar la oscilación de calcio a la izquierda en la zona de interés señalada a la derecha.</i>	- 45 -
<i>Ilustración 21 Interfaz Matlab</i>	- 45 -
<i>Ilustración 22 Microscopio de electrofisiología del laboratorio</i>	- 48 -
<i>Ilustración 23 Fotos del ganglio estomatogástrico del cangrejo Carcinus Maenas</i>	- 48 -
<i>Ilustración 24 Ganglio con electrodo insertado, buscando actividad en distintas neuronas</i>	- 49 -
<i>Ilustración 25 Señal de calcio (rojo) y potencial de membrana (azul) simultáneas, con distinta escala temporal.</i>	- 49 -
<i>Ilustración 26 Microscopio de fluorescencia y cámara CCD del laboratorio.</i>	- 50 -
<i>Ilustración 27 Imagen de fluorescencia 1</i>	- 51 -
<i>Ilustración 28 Imagen de fluorescencia 2</i>	- 51 -
<i>Ilustración 29 Electrodo para la inyección del tinte</i>	- 51 -

<i>Ilustración 30 Imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia y la cámara CCD. Podemos ver el electrodo que inyectamos lleno de tinte. A la izquierda un soma de neurona en el que ya se ha inyectado el tinte.</i>	- 52 -
<i>Ilustración 31 Neuroplex. Características que se eligen para las imágenes que vamos a obtener con la cámara CCD</i>	- 53 -
<i>Ilustración 32 Neuroplex. Señal de calcio en la región de interés.</i>	- 54 -
<i>Ilustración 33 Neuroplex con señal de calcio filtrada. Filtro Butterworth.</i>	- 54 -
<i>Ilustración 34 Neuroplex. Señal de potencial de membrana.</i>	- 55 -
<i>Ilustración 35 Neuroplex. Potencial de membrana y señal de calcio en la región de interés simultáneos.</i>	- 55 -
<i>Ilustración 36 Señal de calcio (parte superior) y de potencial de membrana de una neurona (parte inferior). Contenido de la señal de calcio: 1000 capturas, contenido de la señal de potencial: 32000 puntos.</i>	- 57 -
<i>Ilustración 37 Esquema señales de entrada a los algoritmos implementados.</i>	- 58 -
<i>Ilustración 38 Esquema señales de entrada de ficheros de datos</i>	- 59 -
<i>Ilustración 39 Secuencia 1. Imágenes analizadas: 3.000</i>	- 60 -
<i>Ilustración 40 Secuencia 2. Imágenes analizadas: 720</i>	- 60 -
<i>Ilustración 41 Secuencia 3. Imágenes analizadas: 720</i>	- 61 -
<i>Ilustración 42 Ejemplo señal de concentración de calcio. Señal ruidosa.</i>	- 62 -
<i>Ilustración 43 Ejemplo señal de concentración de calcio. Señal poco ruidosa. Podemos apreciar los picos máximos de las oscilaciones fácilmente.</i>	- 63 -
<i>Ilustración 44 Señal de calcio en la Región de Interés sin filtrar (izquierda) y con un filtro Butterworth (derecha).</i>	- 63 -
<i>Ilustración 45 Detección de máximos locales con ventana tamaño 5 puntos. Señal ruidosa.</i>	- 64 -
<i>Ilustración 46 Detección de máximos locales con ventana tamaño 5 puntos. Señal poco ruidosa.</i>	- 64 -
<i>Ilustración 47 Secuencia 1. Imágenes analizadas: 3000</i>	- 65 -
<i>Ilustración 48 Secuencia 2. Imágenes analizadas: 720</i>	- 66 -
<i>Ilustración 49 Secuencia 3. Imágenes analizadas: 720</i>	- 66 -
<i>Ilustración 50 Secuencia 4. Imágenes analizadas: 1000</i>	- 67 -
<i>Ilustración 51 Detección máximos locales. Secuencia de 720 imágenes. Algoritmo Relación Ca-V. Nota: el eje horizontal representa el número de imagen en la figura superior, en la inferior se muestra la escala del potencial (1:32)</i>	- 68 -
<i>Ilustración 52 Esquema algoritmo detección máximos en la señal de calcio a partir de la relación calcio-potencial.</i>	- 70 -
<i>Ilustración 53 Señal de potencial con zonas de pequeñas oscilaciones.</i>	- 71 -
<i>Ilustración 54 Algoritmo detección eventos. Señal de calcio y potencial. Ejemplo que ilustra el caso en que el algoritmo no detecta el primer máximo en potencial.</i>	- 71 -
<i>Ilustración 55 Secuencia 1. Imágenes analizadas: 720</i>	- 72 -
<i>Ilustración 56 Secuencia 2. Imágenes analizadas: 3000</i>	- 73 -
<i>Ilustración 57 Secuencia 4. Imágenes analizadas: 720</i>	- 74 -
<i>Ilustración 58 Esquema del algoritmo detección onset en la señal de calcio implementado</i>	- 75 -
<i>Ilustración 59 Detección onset en la señal de calcio</i>	- 76 -
<i>Ilustración 60 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas: 720. Captura de 125 imágenes/s.</i>	- 77 -
<i>Ilustración 61 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas: 720. Captura de 125 imágenes/s.</i>	- 77 -

<i>Ilustración 62 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas:720. Captura de 40 imágenes/s.</i>	<i>_____</i>	<i>- 78 -</i>
<i>Ilustración 63 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.</i>	<i>_____</i>	<i>- 79 -</i>
<i>Ilustración 64 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.</i>	<i>_____</i>	<i>- 79 -</i>
<i>Ilustración 65 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 32 puntos de V/ punto de Ca</i>	<i>_____</i>	<i>- 80 -</i>
<i>Ilustración 66 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.</i>	<i>_____</i>	<i>- 80 -</i>
<i>Ilustración 67 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 720. 32 puntos de V/ punto de Ca.</i>	<i>_____</i>	<i>- 81 -</i>
<i>Ilustración 68 Imagen neurona. Elección manual de la región de interés</i>	<i>_____</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Ilustración 69 Detección de eventos. RTBiomanager. Stimulator</i>	<i>_____</i>	<i>- 83 -</i>
<i>Ilustración 70 Diagrama de bloques bucle cerrado para la detección de eventos en la señal de calcio minimizando el tiempo de iluminación de la muestra a través de la estimulación dependiente</i>	<i>_____</i>	<i>- 85 -</i>
<i>Ilustración 71 Osciloscopio y tarjeta de datos del laboratorio del GNB</i>	<i>_____</i>	<i>- 86 -</i>
<i>Ilustración 72 Tarjeta de datos conectada al shutter de la cámara</i>	<i>_____</i>	<i>- 86 -</i>
<i>Ilustración 73 RTBiomanager: estimulación dependiente de los eventos detectados.</i>	<i>_____</i>	<i>- 87 -</i>
<i>Ilustración 74 Muestra iluminada</i>	<i>_____</i>	<i>- 87 -</i>

1 Introducción

1.1. Resumen

Este Proyecto Final de Carrera se sitúa dentro de las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo de Neurocomputación Biológica (GNB) de la Escuela Politécnica Superior de la UAM. Los experimentos y estudios previos realizados por el GNB han servido como base y punto de partida para realizarlo.

En este proyecto se desarrollarán algoritmos para detectar eventos significativos en la actividad de neuronas individuales empleando técnicas de tratamiento de imagen. Se pretende que estos algoritmos sirvan para continuar con la investigación del GNB en estudios futuros de estimulación del sistema nervioso dependiente de la actividad registrada en tiempo real.

Se estudiarán dos tipos de señales neuronales correspondientes a registros *in vitro*: la concentración de calcio en la neurona, y el potencial de su membrana. Estas dos señales se registran simultáneamente. El primer tipo de señal se obtiene a partir del tratamiento de imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia y el segundo a partir de registros intracelulares con electrodos en experimentos realizados en el propio laboratorio del GNB. Se desarrollarán algoritmos para tratarlas adecuadamente (en escala temporal, y en amplitud de la señal), y se extraerá información tanto de cada una de las señales por separado, como de la relación entre ellas. Se detectarán en estas señales eventos significativos susceptibles de ser identificados en tiempo real y se estudiará el empleo de esta detección en técnicas de estimulación dependiente de la actividad registrada.

Se describirá una nueva tecnología desarrollada por el GNB, el Observador/Controlador Dinámico en Tiempo Real (Real Time Dynamical Observer and Controller, RTDOC), en la que se basa el diseño y la idea de este PFC. Esta tecnología implementa protocolos de estimulación de ciclo-cerrado en las neuronas, para lo cual es necesario desarrollar técnicas de detección de eventos de bajo coste computacional. Además permitirá trabajar con las distintas escalas temporales presentes en las señales bajo estudio, ya que, según veremos más adelante, las señales de calcio tienen una dinámica más lenta que las señales de voltaje registradas en las neuronas de las preparaciones *in vitro*.

Para finalizar, se realizarán pruebas de los algoritmos implementados con múltiples secuencias de imágenes y registros intracelulares de neuronas, se realizará un proceso de control de la iluminación de la preparación en función de los eventos detectados por dichos algoritmos y se discutirán futuras aplicaciones para sistemas RTDOC en tiempo real.

1.2. Motivación

Tradicionalmente las señales biológicas se estudian *offline*, es decir, primero se obtiene el registro completo (típicamente una serie temporal larga) de una o varias señales y a continuación se procede a su tratamiento. Sin embargo, un

tratamiento en tiempo real de este tipo de señales presenta una serie de ventajas frente al tratamiento *offline*, sobre todo en el contexto de las técnicas de estimulación dependientes de actividad en ciclo cerrado, cada vez más emergentes en biomedicina (Destexhe and Bal, 2009; Rolston et al., 2010; Chamorro et al., 2012; Fernandez-Vargas et al., 2013; Mohseni and Ghovanloo, 2012; Ruiz et al., 2014). La interacción en tiempo real permite descubrir dinámicas no observadas en los paradigmas de estimulación en lazo abierto y diseñar protocolos de control de actividad eficaces (Chamorro et al., 2012).

En este proyecto se pretende tratar señales de concentración de calcio y potencial de membrana de las neuronas simulando un procesamiento en tiempo real. Para la implementación de los algoritmos se parte de un estado sin información previa de la señal específica que se tratará, y sólo se trabajará con datos de la señal del momento actual y pasado, actualizando los parámetros de las señales continuamente a medida que se cargan imágenes de la secuencia o los registros electrofisiológicos. Al ejecutar los algoritmos implementados de esta manera sobre las señales, podremos detectar eventos en ellas y, como consecuencia, generar comandos para enviar estímulos o controlar las condiciones de registro de la preparación.

Mediante la implementación de estos ciclos-cerrados en tiempo real podemos controlar dispositivos como microinyectores, microelectrodos o dispositivos de iluminación que actúen sobre la misma muestra bajo estudio. Conseguimos con esto una interacción entre la neurona estudiada y el ordenador donde se ejecutan los algoritmos.

Se implementarán algoritmos para tratar las señales biológicas de concentración de calcio y potencial de membrana registradas simultáneamente en la preparación *in vitro* sujeta a estudio. Como se ha mencionado, este tratamiento se realizará en este proyecto *offline*, pero los resultados serán directamente aplicables a sistemas en tiempo real. Un ejemplo de las señales empleadas se muestra en la Ilustración 1.

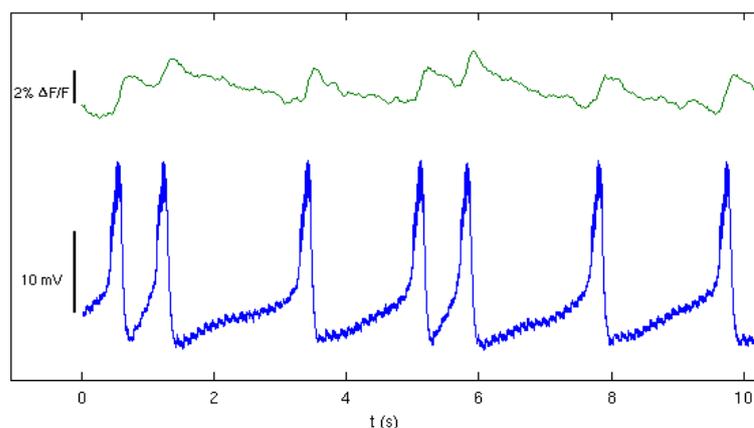


Ilustración 1 Señal de calcio (trazo superior) obtenido con técnicas de imagen de fluorescencia y potencial de membrana (trazo inferior, obtenido con un registro intracelular

en el laboratorio del GNB). Ambas señales se han registrado de forma simultánea en una preparación *in vitro* de un circuito generador central de patrones de *Carcinus maenas*.

Los experimentos que se realizan para obtener las imágenes utilizan invertebrados cuyo sistema nervioso es fácilmente accesible, sus neuronas son resistentes a los procesos a los que se someten en los experimentos y se pueden mantener en condiciones estables durante horas, algo imprescindible para el estudio de la dinámica neuronal transitoria (Marder and Bucher, 2001; Selverston and Moulins, 1987; Rabinovich et al., 2006).

A partir de la información obtenida de las señales de calcio y del potencial de membrana, se actuará sobre el sistema una vez detectado un evento significativo. Esta acción debe realizarse en el instante en que el evento es detectado, simulando tiempo real. El ciclo cerrado estímulo-respuesta que se obtiene es esencial para la implementación de la tecnología mencionada anteriormente, el RTDOC (*Real Time Dynamical Observer and Controller*).

A continuación se representa en la Ilustración 2 la estructura de una estimulación dependiente de actividad susceptible de ser implementada con la tecnología de RTDOC, donde pueden verse las etapas del bucle cerrado estímulo-respuesta que en apartados posteriores se explica con detalle.

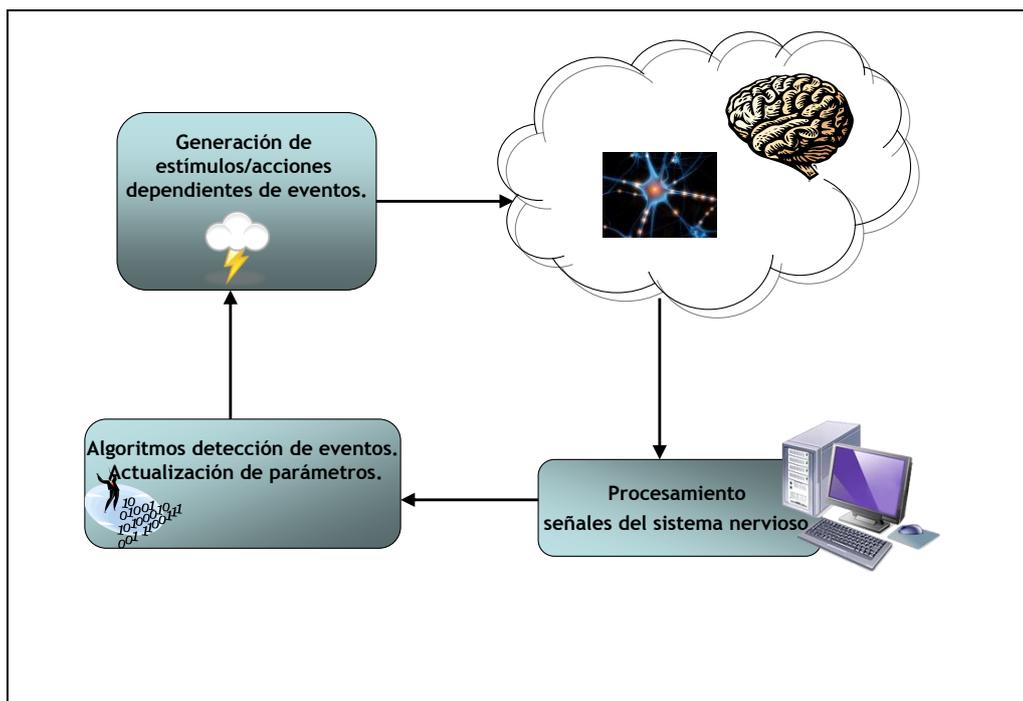


Ilustración 2 Esquema RTDOC simplificado. Etapas de procesamiento de señales biológicas, detección de eventos en dichas señales y generación de estímulos o acciones en función de los eventos detectados. Todas las etapas forman un bucle cerrado.

En conclusión, el desarrollo de técnicas de estimulación dependientes de la actividad neuronal en tiempo real es necesario para revelar y hacer uso de procesos dinámicos que no se observan con técnicas clásicas de estimulación en bucle abierto. Se pretende con ello, desarrollar los protocolos de estimulación por

detección de eventos en señales de imagen y de potencial de membrana que puedan ser aplicables a sistemas en tiempo real.

1.1 Objetivos

La investigación básica en neurociencia, así como el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del sistema nervioso pueden mejorarse mediante nuevas técnicas de estimulación dependiente de la actividad neuronal registrada en tiempo real (Yarom, 1991; Szucs et al., 2000; van Boxtel and Gruzelier, 2014; Destexhe and Bal, 2009; Rolston et al., 2010; Chamorro et al., 2012; Fernandez-Vargas et al., 2013; Mohseni and Ghovanloo, 2012; Ruiz et al., 2014).

El principal objetivo del proyecto es la implementación de algoritmos que puedan ser empleados para la detección de eventos en tiempo real registrados con técnicas de imagen de calcio en neuronas individuales, y su validación para crear una estimulación en función de la detección de estos eventos. El registro y/o la estimulación en ciclo cerrado puede requerir el control de microinyectores, microelectrodos y, como es en el caso del trabajo que se realiza en este PFC, de dispositivos de iluminación.

A continuación se enumeran los objetivos específicos de este PFC:

- Estudio del estado del arte en tratamiento de imágenes biomédicas, y en concreto de las de imagen de calcio *in vitro*.
- Estudio de la importancia del calcio, y procesos biológicos en los que interviene.
- Estudio de la adquisición de secuencias de imágenes de neuronas y del potencial de membrana mediante el programa Neuroplex.
- Implementación de los algoritmos de detección de eventos en señales del sistema nervioso en Matlab.
- Estimulación dependiente de los eventos detectados con los algoritmos anteriores.
- Experimento de validación de la estimulación dependiente de los eventos detectados: control de la fuente de luz en microscopía de fluorescencia.
- Redacción de la memoria y presentación.

1.2 Organización de la memoria

Tras este primer capítulo de introducción, el segundo capítulo incluye una visión del estado del arte. En este apartado, se describen brevemente distintas técnicas de imagen en el campo de la medicina y la biología, y se explica la importancia de las señales neuronales con las que se trabajará y las relaciones entre ellas.

En el capítulo 3 se describe el diseño del proyecto. En primer lugar se detalla la idea general del proyecto global desarrollado por el GNB en el que se ha desarrollado este PFC. Posteriormente se describe en profundidad la adaptación necesaria del proyecto al diseño de este trabajo, que presenta la particularidad de utilizar tratamiento de imágenes de calcio y señales de voltaje de registros de neuronas individuales *in vitro*.

En el cuarto capítulo se describen los experimentos realizados en el laboratorio para la obtención de imágenes, así como los algoritmos implementados a partir de ellas y el proceso de estimulación dependiente de los eventos detectados por estos algoritmos. También en este capítulo se exponen las pruebas realizadas de los algoritmos con varias secuencias de imágenes, se describe el proceso de actuación dependiente de actividad realizado y los resultados obtenidos.

El quinto y último capítulo incluye las conclusiones extraídas y la descripción del trabajo futuro.

2 Estado del arte

En el primer apartado de este capítulo se describen tres tipos de imágenes médicas: la resonancia magnética, la tomografía axial computarizada, y la magnetoencefalografía (técnicas donde puede tener un gran impacto la estimulación dependiente de actividad en ciclos cerrados), así como las técnicas de imagen en preparaciones *in vitro* realizadas en estudios previos.

A continuación se describe el concepto de *biofeedback*, y sus aplicaciones en el campo de la medicina y en investigación básica. Este concepto es muy importante para el desarrollo de este proyecto, ya que, como se verá más adelante, denota los procesos y sistemas de interacción bidireccional entre un sistema biológico y una máquina.

Se incluye además un apartado sobre el procesamiento de imágenes, explicando el concepto y sus aplicaciones médicas. Por último, se detalla el estado del arte en procesamiento de imágenes médicas online, en concreto se incluye un apartado sobre la Resonancia Magnética Funcional en tiempo real, que está muy relacionado con el capítulo sobre biofeedback y neurofeedback.

Para finalizar este capítulo se incluye un apartado en el que se refleja la importancia de la señal de calcio en registros de neuronas individuales, y la relación entre la señal de calcio de una neurona y la de voltaje de su membrana haciendo referencia a varios estudios realizados.

2.1 Imágenes médicas

El procesamiento de imágenes biomédicas ha experimentado una gran expansión durante las últimas décadas, y es objeto de investigación de distintos campos como pueden ser la física, bioingeniería, o la medicina. La diagnosis con métodos basados en imágenes se ha convertido en una parte muy importante de la rutina clínica (Geoff Dougherty, 2011).

A continuación se van a describir brevemente tres técnicas de imagen empleadas en medicina: La Resonancia Magnética, la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Magnetoencefalografía.

2.1.1 La resonancia magnética.

2.1.1.1 Introducción

La Resonancia Magnética es una técnica de diagnóstico que produce imágenes de estructuras internas de un cuerpo utilizando un campo magnético intenso, ondas de radio frecuencia (RF) y un ordenador.

En este apartado explicaremos los fundamentos físicos de esta técnica. En las secciones posteriores se exponen varios estudios y aplicaciones de esta técnica de imagen.

2.1.1.2 Funcionamiento

Los átomos constan de un núcleo rodeados de una densidad electrónica. Estos electrones realizan dos movimientos, el movimiento alrededor del núcleo (orbital) y sobre sí mismo (spin). Los protones, partículas del núcleo, también realizan este movimiento de giro sobre sí mismos (spin), generando un momento magnético.

Los átomos que no tienen momento magnético nulo, por ejemplo el átomo de hidrógeno, al ser sometido a un campo magnético potente, pueden absorber energía en forma de RF y posteriormente liberarla también en forma de RF. Esta energía puede ser captada por una antena receptora. Este fenómeno se conoce como resonancia nuclear magnética y la frecuencia a la que ocurre, frecuencia de resonancia.

Los átomos de hidrógeno (con solo un protón) son muy abundantes en el organismo humano (70% de agua), siendo por lo tanto los átomos elegidos para la aplicación del fenómeno anterior en el cuerpo humano. Si no hay ningún campo magnético externo, los átomos de hidrógeno se orientan de forma aleatoria, y el momento magnético total es nulo. En el momento en que se aplica un campo magnético externo, el momento magnético de los átomos se alinea con él, y se crea entonces un momento magnético total con la misma dirección que la del campo magnético externo. En esta orientación los átomos se encuentran en estado de baja energía. La frecuencia de giro de los protones en este estado es proporcional al valor del campo magnético externo.

Si se aplica un pulso de RF, que tenga la misma frecuencia de giro que los protones, se provoca una excitación y estos se orientarán en la dirección contraria, la de alta energía. Al dejar de aplicar la RF, los protones vuelven ubicarse en la dirección de baja energía, liberando energía en la transición. Este proceso se denomina resonancia. La frecuencia que permite estas transiciones de nivel energético es la frecuencia de resonancia.

Para generar imágenes de resonancia se recogen las ondas de RF procedentes de la estimulación de la materia sometida a un campo magnético. La energía liberada por los protones al volver al estado de baja energía es captada por un receptor y analizada en un ordenador.

Para poder localizar la zona de la que provienen determinadas ondas de RF, se aplica lo que se conoce como gradiente de campo magnético. Es decir, sobre el campo magnético externo se aplica otro campo más débil que varía según la posición de forma controlada (en un extremo es máximo y se va atenuando hasta llegar al otro extremo de la muestra). Dado que la frecuencia de resonancia es proporcional al campo magnético aplicado, las distintas partes de la muestra tendrán frecuencias de resonancia distintas. Por lo tanto una frecuencia de resonancia se puede asociar a una posición concreta.

El equipo de resonancia magnética consta de tres componentes principales:

- Un imán principal: El imán principal es permanente, genera un fuerte campo estático, homogéneo y uniforme, para la polarización de los spines del cuerpo.
- Un sistema que emite Radio Frecuencia: El sistema de radiofrecuencia es el responsable de la generación y transmisión, por medio de una bobina transmisora (antena), de la energía de RF utilizada para excitar los protones.
- Un sistema de adquisición de datos: Es el encargado de medir las señales provenientes de los protones y digitalizarlas para su procesamiento posterior. Se utiliza una bobina receptora para detectar los voltajes inducidos por los protones después del pulso de RF. Normalmente la bobina transmisora sirve también como receptora.
- Bobinas de gradiente electromagnético: permiten localizar la zona concreta de dónde llega cada señal RF.

La Ilustración 3 muestra un equipo típico de Resonancia Magnética:



Ilustración 3 Equipo de Resonancia Magnética

La Resonancia Magnética no utiliza radiaciones ionizantes, lo que reduce los riesgos de mutaciones o cáncer, permite cortes con resolución espacial alta (0,5 mm o 1 mm) e imágenes muy detalladas permitiendo observar detalles anatómicos no apreciables con otro tipo de estudio. Para más información sobre el funcionamiento de la RMN se puede consultar (Pohmann, 2011).

2.1.2 Tomografía axial computarizada (TAC)

La Tomografía Axial Computarizada o escáner TAC es una técnica de imagen empleada en medicina para hacer diagnósticos, que utiliza radiación X para obtener cortes o secciones de objetos anatómicos.



Ilustración 4 Equipo de TAC

En lugar de obtener una sola imagen como las radiografías, en esta técnica la fuente de rayos X y los detectores de radiación realizan movimientos de rotación alrededor del cuerpo, obteniendo así varias imágenes. La imagen tomográfica final se obtiene aplicando algoritmos de reconstrucción sobre las señales recibidas en los detectores.

2.1.2.1 Funcionamiento

La fuente de rayos X emite un haz que incide sobre la zona que se estudia. La radiación que no es absorbida por esta zona es recogida por los detectores. El proceso se repite variando el ángulo de orientación de la fuente y los detectores respecto a la zona objeto de estudio, hasta que dan una vuelta completa alrededor de ella. Todas las señales que se van recibiendo son registradas y se obtiene la imagen tomográfica completa. Llegados a este punto, se desplaza el cuerpo bajo estudio (una distancia del orden de mm) y se realiza la misma operación en esta nueva zona obteniendo una segunda imagen tomográfica.

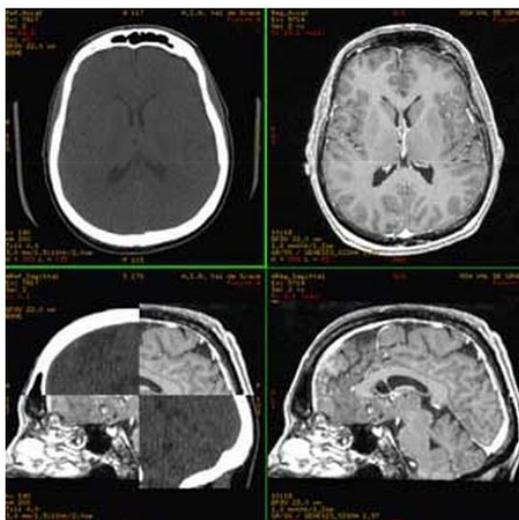


Ilustración 5 TAC craneal

A partir de todas las imágenes obtenidas, mediante algoritmos de reconstrucción se obtiene una imagen bidimensional (o tridimensionales, aunque son menos utilizadas) que permite ver secciones de la zona estudiada desde cualquier ángulo.

Actualmente el TAC es una exploración de rutina para diagnosticar varios tipos de enfermedades. Por ejemplo, es muy útil para el estudio de la detección y extensión del cáncer en la zona craneana (ver Ilustración 5)

Entre las ventajas del TAC podemos decir que es una prueba rápida de realizar, que ofrece imágenes nítidas que aún no se han conseguido con la resonancia magnética, por ejemplo para la visualización de ganglios y huesos. Entre sus inconvenientes destaca que se reciben dosis de radiación ionizante, que a veces no son despreciables.

2.1.3 Magnetoencefalografía

La magnetoencefalografía (MEG) es una técnica de imagen no invasiva que mediante la captación de campos magnéticos, permite registrar la actividad funcional cerebral.

Esta técnica es útil para la investigación de las relaciones entre la estructura cerebral y sus funciones, empleando un magnetómetro que permite captar los campos magnéticos generados por los potenciales postsinápticos y registra la actividad cerebral uniforme y localizada que se genera por la activación sincrónica de millones de neuronas de una zona del cerebro.

El objetivo de esta técnica es la obtención de mapas funcionales cerebrales con gran resolución temporal que permiten localizar dónde hay actividad en espacios del cerebro con un margen de centímetros o incluso de milímetros cúbicos.

Una de sus principales ventajas es que su señal no se degrada al pasar por los diferentes tejidos y por tanto puede medir en tiempo real (milisegundos) y de forma directa las señales neuronales.

El funcionamiento del MEG se basa en el registro de los campos magnéticos creados por la existencia de pequeñas corriente intra y extra neuronales generadas en la sinapsis (ver definición de sinapsis en el capítulo 2.4).

Si comparamos la MEG con las otras dos técnicas expuestas (Resonancia Magnética y TAC) que también obtienen imágenes de la estructura cerebral, podemos decir que estas dos tienen mayor resolución espacial, pero la MEG cuenta con mejor resolución temporal.

2.1.4 Técnicas de registro de imagen *in vitro*

En investigación básica en neurociencia se utilizan a menudo imágenes de muestras *in vitro* de neuronas para el estudio de distintos aspectos del procesamiento de información en el sistema nervioso (Stetter et al., 2012; Briggman et al., 2005; Ramaswamy et al., 2007; Bouchelouche, 1993) A continuación se expondrán brevemente algunos ejemplos de estas técnicas de imagen extraídos de artículos que han sido consultados para el desarrollo de este PFC.

En el artículo (Stetter et al., 2012) se estudia un modelo para la reconstrucción de la actividad neuronal que utiliza imágenes de fluorescencia de calcio en cultivos de neuronas *in vitro*.

Otro estudio realizado con técnicas de imagen (Briggman et al., 2005), tiene como objetivo estudiar el proceso de toma de decisiones. Para ello se utilizan muestras de un sistema nervioso sencillo, y se le somete a estímulos externos. El trabajo desarrollado analiza las decisiones tomadas (entre dos posibles opciones excluyentes entre ellas) por el sistema, y la probabilidad, de cada una de ellas. Las muestras se tiñen para monitorizar el proceso con un tinte sensible al voltaje.

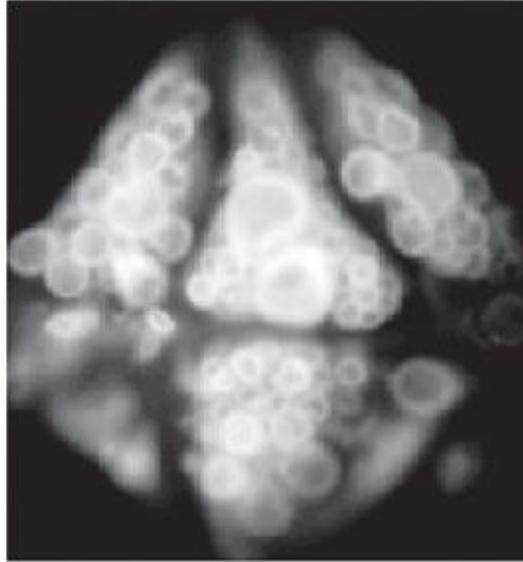


Ilustración 6 Técnicas de imagen de varias neuronas en muestras *in vitro* para el estudio de la toma de decisiones (Briggman et al., 2005)

La intensidad de estas imágenes depende de las variaciones de potencial en las neuronas. A partir de ellas se obtienen señales de variación del estado de la muestra bajo estudio dependiendo de la toma de decisiones que debe realizar.

2.2 Estimulación en ciclo cerrado. Biofeedback

El concepto de *biofeedback* es uno de los más importantes durante el desarrollo de este proyecto. Encontramos numerosos artículos que se centran en el concepto y las aplicaciones del biofeedback, entre ellos: (Prinsloo et al., 2014; Siepmann et al., 2014; Bergstrom et al., 2014; Peira et al., 2014; Klimov et al., 2014; Steel et al., 2014; Micoulaud-Franchi et al., 2014)

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, una de las principales motivaciones del proyecto global del GNB en el que se enmarca este PFC, es desarrollar protocolos de estimulación aplicables a sistemas en tiempo real. El objetivo de esto es poder interactuar con el sujeto o la muestra bajo estudio en un bucle cerrado estímulo-respuesta, esto es lo que conocemos como *biofeedback*.

En este capítulo, primero se explicará el concepto de *biofeedback* y se detallarán algunas de sus aplicaciones en el campo de la medicina. A continuación se expondrán estudios y experimentos realizados por el GNB con técnicas de *biofeedback* en preparaciones *in vitro*. Esta segunda parte, la que trata de preparaciones *in vitro*, es la más significativa para este PFC ya que las imágenes con las que trabajaremos son de este tipo y han sido registradas en sistemas biológicos sencillos (preparaciones *in vitro* de muestras del sistema nervioso de cangrejos).

2.2.1 Concepto

En su acepción más general y utilizada, *Biofeedback* se define como el proceso que permite a un individuo aprender a cambiar su estado fisiológico a través de estímulos externos. Se emplean instrumentos precisos que miden señales que el individuo emite como puede ser el ritmo cardíaco, temperatura de la piel, actividad muscular, señales cerebrales. A partir de la información obtenida, estos instrumentos devuelven de forma rápida y precisa información al individuo en forma de un estímulo sensorial. La respuesta provoca en él los cambios biológicos y fisiológicos deseados (cambios en ritmo cardíaco, presión arterial, conductancia de la piel, velocidad del pulso). El fin más habitual de este proceso es que el individuo aprenda a modificar su estado fisiológico y no tenga la necesidad de usar siempre el instrumento.

Como ya he mencionado, la técnica de biofeedback se puede emplear también en circuitos neuronales de preparaciones *in vitro* (Chamorro et al., 2012). La idea es establecer un bucle cerrado estímulo-respuesta con una muestra del sistema nervioso, de forma que el sistema se adapta a un estímulo que tiene en cuenta el estado del sistema en todo momento. La información obtenida permite avanzar en el estudio de las propiedades computacionales de la membrana de las células del sistema nervioso y de las sinapsis entre las neuronas.

2.2.2 Interfaces cerebro-máquina.

Dentro de los sistemas en tiempo real, a continuación se describirá en qué consisten y qué aplicaciones existen en el contexto de los interfaces cerebro-máquina.

La idea detrás de las interfaces cerebro- máquina tradicionales es transformar señales emitidas por el cerebro en acciones motoras. Los sistemas con interfaz cerebro-máquina reciben en tiempo real señales electrofisiológicas de un individuo. Estas señales son interpretadas y registradas como señales eléctricas, magnéticas, térmicas o químicas. Finalmente, cuando las señales son interpretadas por el sistema, éste debe emitir una orden que será ejecutada por una máquina o un ordenador.

El objetivo principal de estos sistemas en el campo de la medicina es permitir a personas con discapacidad motora grave llevar a cabo tareas motoras voluntarias. Un ejemplo de esto es el movimiento de prótesis robóticas o que una persona tetrapléjica pueda, con señales de su sistema nervioso, llevar el control de una silla de ruedas eléctrica, deletrear un texto, etc.

Clasificación de sistemas interfaz cerebro-máquina

Existen varios criterios para clasificar estos sistemas (Nicolas-Alonso and Gomez-Gil, 2012; Wolpaw et al., 2002):

- Clasificación **según la señal electrofisiológica** que utilice: Se dividen en sistemas dependientes e independientes. Los **dependientes** utilizan por

ejemplo la actividad de la mirada del individuo. Estos sistemas tienen como finalidad conocer dónde está el foco de atención de la mirada y no requieren entrenamiento previo. Para ello, se muestran en una pantalla varios botones o letras que parpadean a diferentes frecuencias, superiores a 4 Hz, de forma que el usuario debe mantener fija la mirada en uno de ellos para seleccionar el botón deseado. Los **independientes** no dependen de señales generadas indirectamente, sino de señales cerebrales generadas de forma directa.

- Clasificación según **la tarea cognitiva o mental**: se clasifican en **activos y pasivos**.

En los sistemas activos el individuo emite la señal fisiológica de forma voluntaria. Esta señal se registra en el electroencefalograma y se compara con patrones ya conocidos que se pueden detectar y medir. Para utilizar este tipo de sistemas el individuo debe aprender a emitir la señal cerebral de forma que se maximice su reconocimiento. Como ejemplo de este tipo de sistema, el individuo se imagina el movimiento de su extremidad, creando así actividad en la corteza motora, lo que hace que la señal del electroencefalograma cambie, se detecte y se asocie con el patrón ya aprendido para este movimiento. Los sistemas activos son **asíncronos** ya que el usuario puede decidir cuándo quiere que se emitan señales.

Los sistemas pasivos utilizan potenciales evocados, que son potenciales que se generan en el cerebro por la recepción de estímulos externos (visuales, auditivos...). El funcionamiento de estos sistemas es el siguiente: el usuario se concentra en una opción concreta, a continuación el sistema le va mostrando todas las opciones. Cuando la opción mostrada es la deseada por el individuo, éste emite un potencial evocado indicando al sistema que esa era la opción en la que estaba concentrado. Se trata de interfaces **síncronas**, ya que es el sistema el que presenta las opciones y el usuario sólo puede elegir cuando se le muestra la deseada.

2.2.2.1 Aplicaciones actuales. Ejemplos.

Como se puede intuir, las interfaces cerebro máquina son aplicables y útiles en múltiples entornos.

En el campo de la medicina, la técnica del *biofeedback* es utilizada en el tratamiento de trastornos cardiovasculares (Siepmann et al., 2014; Peira et al., 2014), respiratorios (Steel et al., 2014), neuromusculares, gastrointestinales (Hirakawa et al., 2013), circulatorios y en general en las enfermedades psicosomáticas y en el tratamiento del estrés.

Como ya hemos mencionado este tipo de sistemas permiten a personas con disfunciones motoras realizar movimientos. En el campo de la psicología, son varios los trastornos que pueden tratarse con *biofeedback*: fobias, neurosis, depresión, ansiedad, angustias, insomnio (Schoenberg and David, 2014; Teufel et al., 2013; Wang et al., 2013).

Varios artículos se centran en el estudio del biofeedback aplicado a la neurociencia, el llamado neurofeedback (van Boxtel and Gruzelier, 2014). El déficit de atención es objeto de estudio a través del neurofeedback (Maurizio et al., 2014), además se han publicado varios artículos para tratar el insomnio y mejorar la memoria con métodos basados en neurofeedback (Schabus et al., 2014; Reiner et al., 2014).

Como ya se ha mencionado, los métodos de biofeedback siguen un esquema de bucle cerrado entre el individuo y la máquina. (Potter et al., 2014) defiende el estudio del sistema nervioso en esquema de bucle cerrado frente a los estudios tradicionales offline. El estudio online ha sido posible gracias a los avances en los sistemas de procesamiento de señales, en los microprocesadores, y en el software especializado. Recientemente se han desarrollado múltiples aplicaciones del bucle cerrado en neurociencia (Salam et al., 2012; Stahl et al., 2012; Gollisch and Herz, 2012). En particular, encontramos varios estudios que se centran en el bucle cerrado aplicado con "neurotecnología avanzada" (Mohseni and Ghovanloo, 2012). En cuanto a aplicaciones médicas concretas, (Salam et al., 2012) presenta un dispositivo implantable para obtener datos de electroencefalografía intracerebrales, que detecta en tiempo real brotes epilépticos y es capaz, mediante un inyector, de introducir una sustancia que los inhiba. (Farajidavar et al., 2012) proponen y desarrollan un programa de reconocimiento automático de señales generadas ante estímulos que causan dolor, y libera estímulos eléctricos que lo alivian. (Lynch and Popovic, 2012) proponen métodos para mejorar el rendimiento de algoritmos en bucle cerrado en la estimulación funcional eléctrica, por ejemplo simulando la extensión contra la gravedad de una rodilla mediante estímulos eléctricos.

2.2.3 Biofeedback en preparaciones *in vitro*.

Varios estudios de neurociencia han empleado con éxito técnicas de bucle cerrado estímulo-respuesta con preparaciones *in vitro* de muestras de sistemas nerviosos sencillos (Nowotny and Varona, 2014; Destexhe and Bal, 2009). Entre ellos, para el estudio del estado del arte se pueden destacar los siguientes (Muniz et al., 2008; Chamorro et al., 2012). A partir de estos estudios se ha conseguido extraer información de la membrana de las neuronas y los procesos de la sinapsis entre ellas, que no era posible conocer con otras técnicas en bucle abierto.

Los procesos neuronales son altamente no lineales, además sólo es posible obtener una serie limitada de parámetros observables del funcionamiento de las neuronas, como pueden ser el potencial de la membrana, la concentración de calcio o nivel de oxígeno en la sangre. Esto hace muy difícil el estudio de la dinámica neuronal con técnicas clásicas en bucle abierto.

La estimulación dependiente de la actividad registrada permite caracterizar la dinámica neuronal a partir de los parámetros observables, controlar el funcionamiento de la neurona con los estímulos aplicados en ella, e incluso generar aprendizaje inducido en las neuronas.

En el esquema de la Ilustración 7 se refleja cuál es el proceso general de bucle cerrado estímulo-respuesta aplicado en las neuronas bajo estudio:

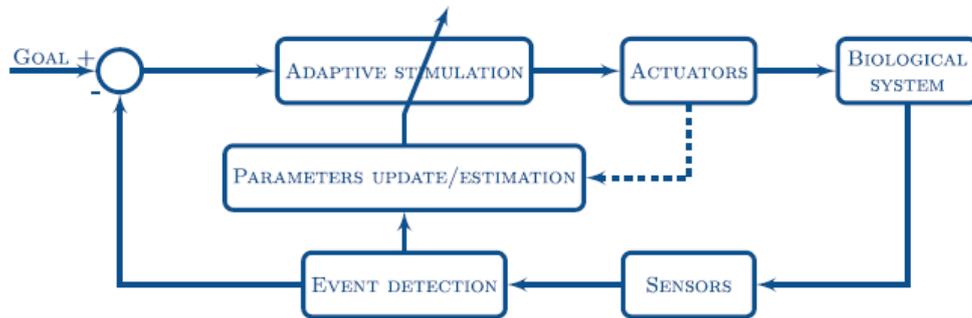


Ilustración 7 Biofeedback en preparaciones *in vitro*. (Chamorro et al., 2012).

La actividad de la muestra del sistema nervioso se monitoriza con una serie de sensores (microelectrodos, cámaras) que permitan detectar eventos en las señales (por ejemplo picos de actividad, o aumento en la deriva de la señal). El algoritmo de detección de eventos controla el protocolo de la emisión de estímulos a través de los actuadores.

Para que la idea de esta tecnología *online* sea eficaz es imprescindible que la detección de eventos se haga en tiempo real, con el menor retardo posible. Como ya se ha mencionado en la introducción de este PFC, los procesos celulares son no estacionarios, por lo tanto habrá que diseñar e implementar métodos de detección de eventos que puedan tratar con este tipo de señales, interactuando con el sistema biológico continuamente.

La salida de la detección de eventos y la estimulación se usan para actualizar los parámetros que describen el estado interno del sistema biológico y que pueden utilizarse para construir un modelo que dirija la interacción.

Una vez identificadas las distintas partes del bucle cerrado con el que trabajaremos, a continuación expongo un par de ejemplos ilustrativos que utilizan distintos tipos de estímulos sobre las neuronas (inyección de sustancias químicas, o estímulos mecánicos) de este tipo de bucle cerrado con preparaciones *in vitro*.

Ejemplo 1: Microinyección dependiente de la actividad detectada, con el objetivo de controlar picos de actividad de neuronas. La Ilustración 8 muestra este ejemplo.

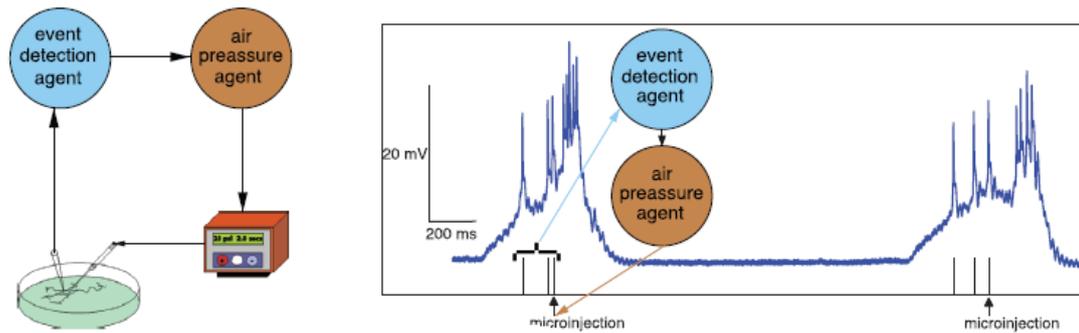


Ilustración 8 Biofeedback en preparaciones in vitro. Ejemplo 1: microinyección dependiente de la actividad detectada (Chamorro et al., 2012).

Vemos que el potencial de la membrana de la neurona es monitorizado con algoritmos de detección de eventos en tiempo real en bucle cerrado. Un microinyector se activará si un evento es detectado (por ejemplo la ocurrencia de un número determinado de disparos), inyectando entonces en la neurona, en este ejemplo en concreto, sustancias químicas que inhiben la señal de potencial durante un período de tiempo.

Ejemplo 2: A continuación se expone otro ejemplo de estimulación dependiente de la actividad detectada, pero esta vez utilizando estímulos mecánicos. El experimento realizado por el GNB utiliza muestras del sistema nervioso del *Clione limacina*, un molusco que nada con movimientos rítmicos de sus dos “alas” y la cola, con la cabeza orientada hacia arriba. Esta orientación vertical se consigue mediante la información que proporcionan dos órganos gravimétricos que emiten señales que influyen en el movimiento de las “alas” y la cola, y por lo tanto del movimiento del animal, permitiéndole así mantener la posición vertical.

Los estudios realizados utilizan como hemos dicho estímulos mecánicos, esto es, de forma externa modificamos la posición del órgano gravimétrico del molusco inclinándolo distintos ángulos. Dependiendo de la inclinación, el sistema nervioso emite señales a las aletas y la cola que compensan esta inclinación.

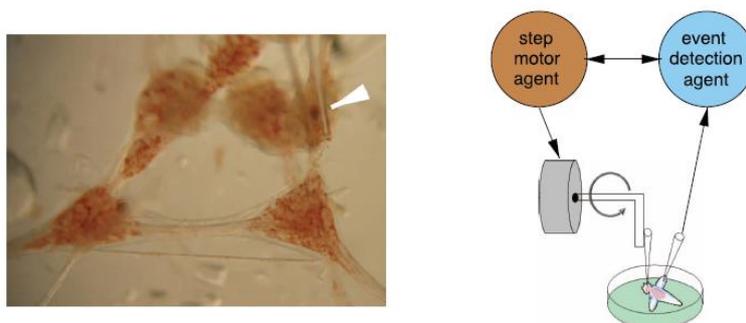


Ilustración 9 Biofeedback en preparaciones in vitro. Ejemplo 2: estimulación dependiente de la actividad detectada con estímulos mecánicos (Chamorro et al., 2012).

En la Ilustración 9, vemos a la izquierda la muestra del sistema nervioso del *Clione limacina*, con una pipeta insertada que contiene el órgano que lo orienta

según la gravedad. Esta pipeta se va girando a distintos ángulos con el motor, el algoritmo en tiempo real de detección de eventos detecta cambios en la actividad eléctrica de los nervios que controlan los músculos, lo que se utiliza para cambiar de dirección el movimiento del motor y buscar automáticamente ángulos que producen actividad.

Estos experimentos son dos ejemplos ilustrativos de la detección de eventos de señales biológicas y estimulación de la preparación en tiempo real en bucle cerrado. El abanico de aplicaciones en la investigación en neurociencia se puede ampliar utilizando distintos tipos de estímulos, y formas de monitorizar y detectar eventos para controlar, generar comportamientos, y caracterizar la dinámica de las neuronas.

Esta tecnología nos facilita el estudio del sistema nervioso, nos permite estudiar dinámicas neuronales no observables con protocolos clásicos gracias a las continuas actualizaciones de los parámetros con los que trabajamos y nos proporciona la posibilidad de tener un mayor control sobre el sistema biológico en condiciones naturales y patológicas.

Para finalizar con este capítulo, se particulariza en la Ilustración 10 el esquema de bucle cerrado para el tipo de estímulos y detecciones de eventos que se utilizarán en el desarrollo de este PFC, y que se detallarán en el capítulo 4.3

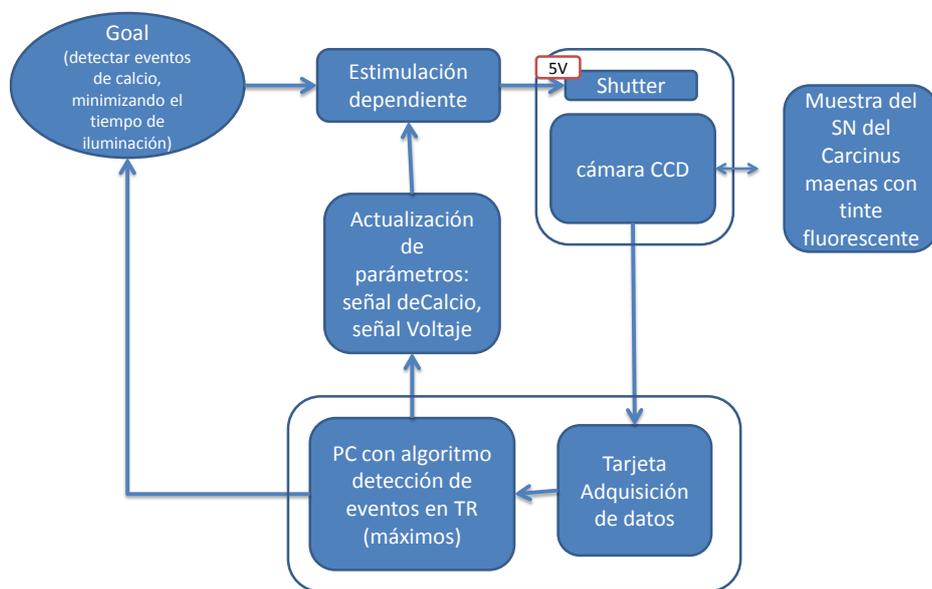


Ilustración 10 Esquema bucle cerrado que resume la estructura de este PFC. Adaptación del esquema de (Chamorro et al., 2012) para los objetivos del PFC.

2.3 Procesamiento de imágenes

2.3.1 Concepto

El procesamiento de imágenes incluye todo tipo de tratamiento de señales en el que la entrada sea una imagen (fotografía, *frame* de un vídeo, etc.). La salida del procesamiento de imágenes puede ser una imagen o, como va a ocurrir en el desarrollo de este proyecto, un conjunto de parámetros relacionados y obtenidos a partir de la imagen de entrada.

2.3.2 Procesamiento de imágenes online

En la última década ha crecido considerablemente el número de publicaciones, y grupos de investigación dentro del campo del procesamiento de imágenes en tiempo real, en concreto nos centraremos en el estudio de la Resonancia Magnética funcional en tiempo real (RT-fMRI) ya que ofrece ventajas frente a otros métodos de imágenes neuronales no invasivos como el EEG, por su buena resolución espacial o la cobertura del cerebro completo.

En el año 2012 tuvo lugar en Suiza una conferencia con el propósito de dar una visión del progreso realizado hasta ese momento y los aspectos en los que trabajar en el futuro dentro del estudio de la RT-fMRI. El artículo (Sulzer et al., 2013) es un completo resumen de los puntos tratados en esta conferencia, y de algunos estudios posteriores a ella.

La Resonancia Magnética Nuclear funcional, mide el nivel de oxígeno en la sangre dentro del cerebro (señal BOLD, “*blood oxygenation level dependant*”). La fMRI en tiempo real fue publicada y definida por primera vez en (Cox et al., 1995) como un proceso que utiliza la información funcional de Resonancia Magnética Nuclear en el que el análisis y el procesamiento de imágenes se hacen al mismo tiempo que la adquisición de datos. La fMRI en tiempo real se emplea actualmente como guía en operaciones quirúrgicas, en interfaces cerebro-máquina y en protocolos de neurofeedback.

Nos encontramos con numerosos estudios que se centran en la RT-fMRI como herramienta para neurofeedback para mejorar el control del sistema motor, entre ellos (Berman et al., 2012; Chiew et al., 2012; Bray et al., 2007; deCharms et al., 2004). Los objetivos de los estudios de neurofeedback pueden ser desde demostrar efectos en el comportamiento provocados por el aprendizaje inducido a partir de los datos obtenidos en la fMRI (Shibata et al., 2011) hasta realizar diagnósticos en pacientes.

Dependiendo de la respuesta que se espera por parte del paciente se estudiará una u otra parte del cerebro. Por ejemplo, si se desea disminuir el tiempo de reacción del sujeto frente a estímulos se debe estimular una zona diferente a si se desea regular la percepción del dolor. Es necesario por lo tanto, conocer cuál es la región de interés que controla el comportamiento esperado y centrar el estudio en dicha zona del cerebro.

Varios estudios trabajan con la señal BOLD de una región de interés, sin embargo otros muchos estudios trabajan con señales más complejas que se obtienen de analizar varias zonas del cerebro simultáneamente. Algunos de ellos se centran en la actividad diferencial en dos zonas del cerebro (Chiew et al., 2012), otros estudian la interconectividad de varias zonas del cerebro (Ruiz et al., 2013). El sujeto bajo estudio debe entrenarse para provocar actividad en la zona del cerebro deseada. El entrenamiento puede durar varios días hasta que el sujeto es capaz de controlar la actividad de la ROI del cerebro, en ausencia de feedback y en entornos diferentes.

2.3.2.1 fMRI en tiempo real en interfaces cerebro-máquina

Las interfaces cerebro máquina (*Brain-Computer-Interface*, BCI) que utilizan la fMRI en tiempo real para interactuar con el sujeto son objeto de varios estudios de los últimos años. La interfaz cerebro-máquina mide la actividad del sistema nervioso central y la convierte en una respuesta que restaura o mejora la respuesta del cerebro por sí solo. La respuesta generada por parte del individuo puede, a su vez ser una señal de entrada al sistema para volver a generar un estímulo que se ajuste al estado del individuo en cada momento. Obtenemos de esta forma las interfaces cerebro-máquina con neurofeedback. Como ya se ha mencionado, debido a una mejor resolución espacial, el estudio de la RMI presenta ventajas frente a otras técnicas de imagen. El proceso de investigación generalmente comienza registrando los datos de las fMRI de varios sujetos realizando una tarea, estos datos se analizan en primer lugar offline.

El empleo de técnicas de imagen dentro del neurofeedback se comienza a estudiar en los años 60 con el EEG. En estos estudios se demuestra que los comportamientos de auto-regulación aprendidos con estas técnicas pueden llevar a generar cambios de comportamiento en el individuo y por los tanto pueden ser utilizadas con fines terapéuticos en individuos con desórdenes psiquiátricos y neuronales (Birbaumer, 2006; Kotchoubey et al., 2001). El diseño de un sistema de interfaz cerebro-máquina con RT-fMRI consiste en un bucle cerrado que extrae información de la señal BOLD en tiempo real. Las imágenes de la MRI se reconstruyen y se corrigen de posibles distorsiones, a continuación se procesan y se obtienen las señales de los datos y el análisis estadístico. Las señales obtenidas en las ROI elegidas se muestran al sujeto en un video en tiempo real. El feedback que recibe el usuario puede actualizarse continuamente o de forma intermitente. El tiempo que transcurre hasta que el usuario recibe feedback depende del tiempo de adquisición y procesamiento de las imágenes. Actualmente las técnicas de RT-fMRI son capaces de dar feedback en cada repetición del EPI (echo-planar imaging, es la técnica de adquisición de imágenes que se emplea para obtener las imágenes de la resonancia magnética (Poustchi-Amin et al., 2001; Bandettini et al., 1992)) que podría llegar a ser de 1,5 segundos; sin embargo la señal BOLD no es una señal eléctrica, sino que depende del flujo de la sangre y por lo tanto tendrá un retardo adicional de varios segundos. La señal de BOLD actualizada a partir del feedback que recibe el

sujeto comenzará a presentar respuesta al estímulo alrededor de 6 segundos después.

2.3.2.2 La señal de neurofeedback

Una vez obtenidos y analizados los datos, el sistema debe lanzar un estímulo al cerebro. Varios estudios se han centrado en asegurar que esta señal se genere a partir de la señal BOLD lo menos contaminada posible por interferencias que pueden afectar como movimientos del ojo o de cabeza (Cox and Jesmanowicz, 1999; Kj et al.), la respiración o el latido del corazón (Hu et al., 1995). Muchos de estos estudios se centran en corregir este tipo de ruido, por ejemplo, un método de anular la interferencia de la respiración se estudia en el artículo (Caria et al., 2007), donde se trabaja con la señal diferencial de BOLD en dos partes diferentes del cerebro, contando con que el efecto será similar en ambas partes y por lo tanto se pueda anular.

En los estudios realizados se instruye a los participantes para minimizar los movimientos de cabeza, la respiración irregular, etc. Se les da unas pautas para la autorregulación y se les entrena durante un tiempo variable y un número de sesiones variable dependiendo del objetivo a alcanzar y del individuo, tanto en sesiones offline como online. La señal que recibe el individuo como feedback puede ser visual, sonora, la medida de la temperatura, etc. Algunos estudios añaden además un estímulo frente al cual los sujetos deben autorregular su actividad cerebral, por ejemplo frente al dolor (deCharms et al., 2005).

2.3.2.3 Futuras mejoras en RT-fMRI

La Resonancia Magnética funcional en tiempo real tendrá múltiples aplicaciones en pacientes con desórdenes neurológicos y psiquiátricos. Actualmente solamente se está comenzando a estudiar posibles aplicaciones pero el camino que queda por recorrer es largo. En el artículo (Wald, 2012) se enumeran varias mejoras a futuro de esta herramienta:

- Aumento de la resolución espacial:

Se han realizado estudios que demuestran que cuanto más resolución haya en el plano perpendicular a las imágenes, es decir, cuanto más finas sean las capas tomadas, se mejora la calidad de la imagen.

- Reducción de interferencias en las imágenes de la RMI por señales como respiración o pulso.
- Compensación de posibles movimientos durante la adquisición de imágenes.
- Empleo de campos magnéticos mayores: supone mejorar la especificidad de localización de la actividad neuronal.

2.4 Estudios previos de imagen de calcio neuronal

2.4.1 Introducción. Neurotransmisores.

A continuación se presenta información obtenida de estudios anteriores a este proyecto (Ramaswamy et al., 2007) que explican el porqué de la elección de las

señales con las que trabajaremos (calcio y potencial de membrana), parámetros que las relacionan y la importancia que tienen para los sistemas biológicos.

Se describirá además la importancia del ion Ca^{2+} , sus funciones y procesos celulares en los que está involucrado. Como se podrá observar, este apartado cuenta con gran cantidad de definiciones y contenido relacionado con la medicina, biología y con los procesos biológicos que se llevan a cabo a nivel celular.

2.4.1.1 Definición de sinapsis

La sinapsis es el proceso mediante el cual se transmite un impulso nervioso de una neurona a otra. La neurona emisora es la neurona pre-sináptica, y la receptora es la neurona post-sináptica. El espacio entre dichas neuronas es el espacio sináptico.

2.4.1.2 Neurotransmisores

El grupo de sustancias químicas cuya descarga, a partir de vesículas existentes en la neurona que envía un impulso (neurona pre-sináptica), hacia el espacio sináptico (espacio que separa la neurona emisora y la receptora), produce un cambio en el potencial de acción de la neurona receptora (neurona post-sináptica) se conocen como neurotransmisores.

Estos compuestos químicos se liberan en la superficie pre-sináptica y se ligan a los correspondientes receptores de la superficie post-sináptica. La liberación de transmisores es dependiente del ion Ca^{+2} . Cuando en la neurona pre-sináptica llega un impulso nervioso y abre los canales de Ca^{+2} . El Ca^{+2} entra y el neurotransmisor es vertido en el espacio sináptico.

2.4.2 La importancia del calcio para las neuronas

Como se ha mencionado en el apartado anterior, en una sinapsis interviene siempre una célula pre-sináptica y otra post-sináptica. A la pre-sináptica le llega un impulso nervioso y abre los canales de calcio. El calcio entra y el neurotransmisor es vertido en el espacio sináptico.

El ion Ca^{2+} actúa como moderador de la actividad eléctrica de la neurona (Berridge, 1998). Es conocido por ser el “ion director”.

Funciones del ion Ca^{2+} :

- controla la excitabilidad y plasticidad de la neurona.
- controla la liberación de neurotransmisores y la dinámica intracelular en muchos tipos de neuronas. El calcio es uno de los neuromoduladores más importantes.

Definiremos neuromodulador como la sustancia generada dentro de la neurona, producto del metabolismo de la misma, que presinápticamente, modula la síntesis y/o liberación de un neurotransmisor; y postsinápticamente, modifica la unión del ligando a su receptor.

Debido a la importancia del calcio en la actividad neuronal, las neuronas tienen numerosas fuentes y vías de desecho de calcio para mantener esta molécula muy activa. Las fuentes de calcio incluyen canales de calcio dependientes de voltaje y almacenes intracelulares, las vías de desecho de esta molécula incluyen buffers y bombas en la membrana celular (Choi et al., 2010).

La manera de mover los iones del calcio de un lugar a otro para aumentar o disminuir su concentración, es la difusión. Este fenómeno tiende a disminuir la concentración de calcio cerca de la fuente del mismo, y a aumentarla si nos alejamos de ella.

Estudios realizados demuestran que la concentración de calcio está relacionada con la actividad eléctrica de las neuronas a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de la siguiente manera: En respuesta a la depolarización, los canales de calcio se abren y el calcio fluye a través de ellos. La entrada de calcio depende de la diferencia de potencial entre la membrana y el potencial de “driving”, y del número de canales de calcio existentes en la zona bajo estudio (Berridge, 1998).

2.4.3 Estudios previos sobre la relación calcio-voltaje

2.4.3.1 Estudios de interacción de señales de calcio y potencial de membrana

La interacción entre las señales de calcio de dinámica lenta y el voltaje de dinámica rápida de las neuronas aumenta la capacidad de procesamiento de estas.

Trabajos previos a este proyecto realizados por el GNB (Ramaswamy et al., 2007) se centraron en realizar un estudio estadístico de la correlación entre estas dos variables a partir de registros del voltaje y calcio obtenidos simultáneamente en las neuronas bajo estudio. Se obtuvo un amplio repertorio de escalas de tiempo, y de parámetros correlados e incorrelados de ambas señales. El objetivo de estos estudios era servir como base para futuros modelos de trabajo.

Los experimentos realizados utilizan un análisis estadístico a partir de varios registros largos de calcio y voltaje simultáneos en neuronas motoras e interneuronas de circuitos generadores centrales de patrones. El análisis revela varias escalas de tiempo, y determina qué parámetros describen mejor la correlación entre el calcio y el voltaje.

La Ilustración 11 muestra simultáneamente el voltaje y la concentración de calcio en una región de interés definida en la neurona. A simple vista se puede observar una correspondencia entre las ráfagas de picos de voltaje y los cambios en el calcio.

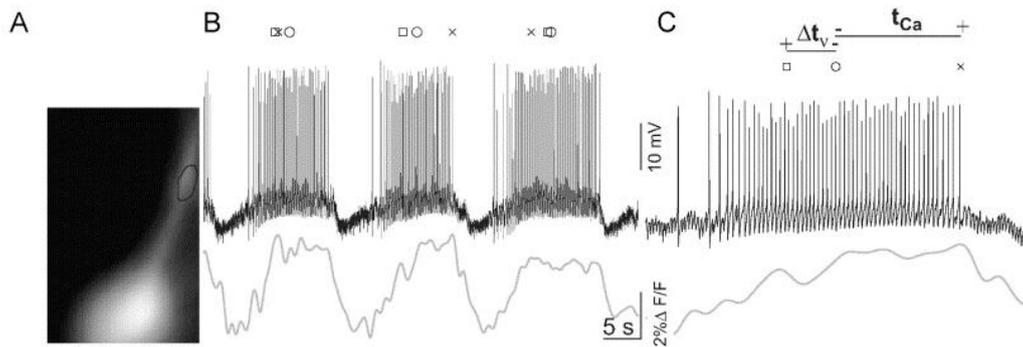


Ilustración 11 Registro simultáneo de la imagen de fluorescencia del calcio y el voltaje de membrana de la interneurona HN (Ramaswamy et al., 2007).

- (A) Muestra un *frame* de la secuencia de imágenes de calcio y la región de interés en que queremos trabajar.
- (B) Potencial de membrana (figura superior) y señal del calcio (imagen inferior).
- (C) Vista agrandada de los picos de (B). Las líneas de la parte superior indican los intervalos de tiempo que se usan en el análisis. Δt_{Ca} es la diferencia de tiempo entre el máximo en el calcio y el pico medio de la ráfaga de pulsos elegida. Δt_v es la diferencia en tiempo entre que aparece la frecuencia máxima y el pico medio de la ráfaga de pulsos elegida.

Este estudio busca cuáles son los parámetros que mejor describen la correlación entre calcio y voltaje a partir de una gran cantidad de comparaciones estadísticas, algunos de estos parámetros se muestran en la siguiente figura.

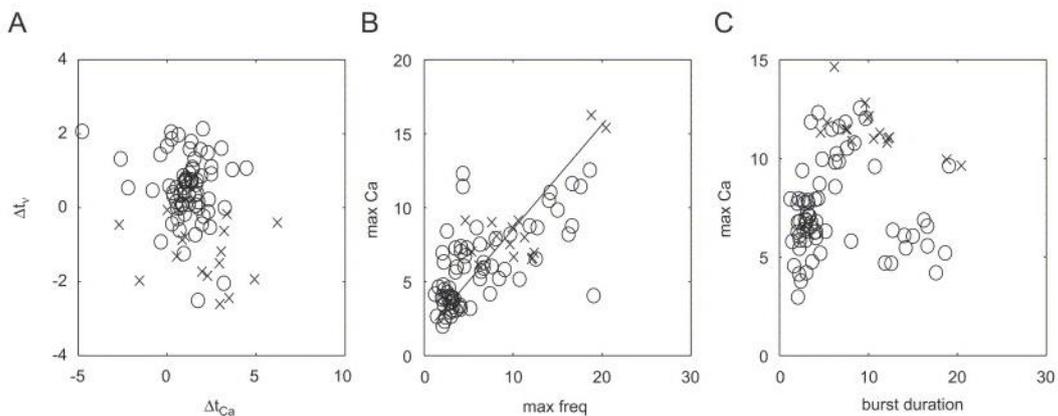


Ilustración 12 Correlación de distintos parámetros del calcio y voltaje.

En primer lugar, en la figura A vemos que el tiempo correspondiente a un máximo del calcio dentro de cada ráfaga, Δt_{Ca} , medido desde la mitad de la ráfaga, no está correlacionado con el tiempo en que se registra a mayor frecuencia, Δt_v , también medido desde el pico de la mitad de la ráfaga.

Sin embargo el máximo del calcio sí está correlacionado con el pico máximo en frecuencia (figura B).

Por último, vemos que la duración de la ráfaga de pulsos no está correlacionada con el máximo en la señal del calcio.

3 Diseño del proyecto

3.1 Proyecto global

3.1.1 Objetivos del proyecto global

El trabajo realizado para este PFC está incluido dentro de un proyecto global creado y desarrollado por el Grupo de Neurocomputación Biológica de la UAM. El objetivo principal de este proyecto es estudiar el sistema nervioso desde el punto de vista de su funcionalidad: el procesamiento de la información.

Se generan modelos de neuronas, redes y sistemas neuronales a partir de los datos experimentales obtenidos en el laboratorio. Estos modelos se usan para simular escenarios del sistema nervioso que no son realizables en las pruebas del laboratorio, ya que en el ordenador se pueden controlar todas las variables involucradas en el modelo empleado sin ninguna limitación. Estos modelos generan hipótesis que nos sugieren nuevos experimentos realizables en el laboratorio, ampliando así las vías de investigación.

Los resultados de la aplicación de estos modelos tienen como objetivo contribuir a la comprensión del funcionamiento del sistema nervioso, analizando los fenómenos de adquisición, codificación y procesamiento de la información. También pueden ser empleados para el estudio de enfermedades del sistema nervioso y para la elaboración de nuevas aplicaciones dentro del campo de la inteligencia artificial, robótica y bioingeniería.

3.1.2 Áreas de estudio del proyecto global

El desarrollo del proyecto global está dividido en varias tareas distintas, reflejadas en el esquema de la figura siguiente, y detalladas a continuación.

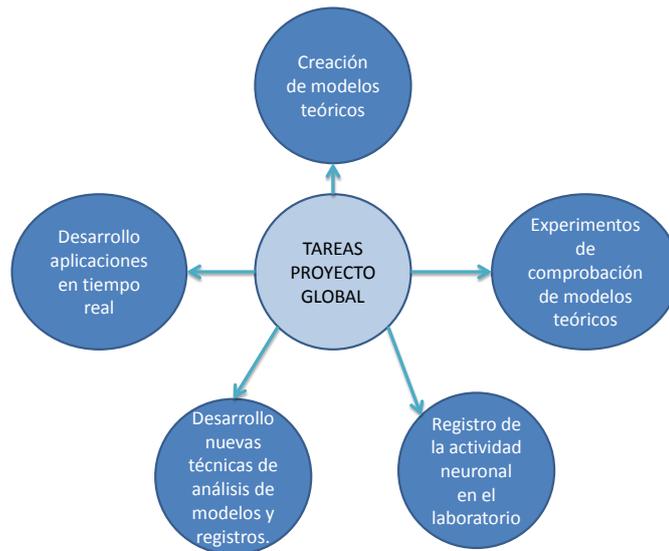


Ilustración 13 Tareas proyecto global

Creación de modelos teóricos para el estudio de la actividad neuronal transitoria: Tradicionalmente se han descrito los fenómenos de procesamiento neuronal con formalismos teóricos que consideran la actividad de las neuronas en estado estacionario o periódico. Las ventajas de estos modelos son su simplicidad y la existencia de modelos matemáticos bien establecidos que los describen.

Experimentos recientes demuestran, sin embargo, la existencia de dinámicas neuronales deterministas que no requieren llegar a estados estables. Esta teoría que trabaja con sistemas dinámicos no lineales ha proporcionado recientemente un nuevo formalismo teórico para describir la dinámica neuronal transitoria que puede estar involucrada en muchos tipos de procesamiento en el sistema nervioso, como son la codificación sensorial, la ejecución motora, la coordinación de información y la toma de decisiones (Rabinovich and Varona, 2011; Rabinovich et al., 2012).

El modelo matemático de los sistemas dinámicos mencionados consiste en una secuencia de estados metaestables sucesivos. El resultado es una actividad secuencial que se puede describir como un proceso de competición sin ganador. El análisis matemático de la dinámica de competición sin ganador permite establecer las condiciones para la generación de dinámicas transitorias robustas, reproducibles, sensibles a estímulos de entrada, y que sirve para explicar procesos de toma de decisiones. Por otro lado, es importante destacar que este modelo ha permitido ver cómo la interacción de diferentes dinámicas puede reflejar propiedades de la historia previa de la actividad.

Experimentos para el estudio de la dinámica neuronal transitoria: El trabajo teórico se desarrolla de forma conjunta con el estudio experimental de sistemas biológicos sencillos adecuados para realizar largos registros electrofisiológicos, para emplear técnicas de imagen de calcio que reflejan la dinámica intracelular

lenta y para implementar protocolos de estimulación dependiente de actividad registrada.

Estos sistemas son ideales para desarrollar la tecnología de observador dinámico que todavía no se ha detallado, pero que se describirá en apartados posteriores y que permite que modelos y neuronas vivas interactúen bidireccionalmente para extraer características esenciales de la dinámica transitoria y esclarecer su funcionalidad.

Desarrollo de nuevas técnicas de análisis: Este proyecto propone el uso de métodos de aprendizaje automático para obtener parámetros que permitan predecir la actividad neuronal transitoria y detectar eventos significativos en los sistemas neuronales bajo estudio. Para ello hay que tener en cuenta la dificultad que presentan, que radica en que tienen un elevado número de parámetros, varias escalas temporales simultáneas, presencia de ruido, información incompleta, etc. El GNB estudia métodos de alineamiento temporal de eventos característicos de neuronas distintas y de alineamiento de señales que combinen dinámicas rápidas y lentas.

Otra característica esencial en el estudio de la dinámica transitoria es el concepto de causalidad entre eventos de señales neuronales. Las medidas de causalidad contribuyen a identificar eventos que tienen un significado funcional en este tipo de señales, mejorando el modelo de predicción de las series temporales.

Flujo de la información en el proyecto global: Por una parte, se realizan experimentos en el laboratorio con muestras de sistemas biológicos sencillos. Los resultados obtenidos en estos experimentos se registran y analizan. A partir de estos registros de señales biológicas y de estudios teóricos ya realizados se crean modelos de procesamiento de información del sistema nervioso.

Por otra parte, a partir de los modelos obtenidos se realizan nuevos experimentos de comprobación y se desarrollan nuevas hipótesis y técnicas de análisis.

Al margen de estas tareas experimentales, de obtención de datos, comprobación y creación de modelos, una parte esencial del proyecto desarrollado por el GNB es el tratamiento de la información en tiempo real. Se han diseñado para ello nuevos protocolos que utilizan tecnología de software de tiempo real. Estos protocolos garantizan el cumplimiento de las restricciones temporales cuando se emplea una estimulación que depende de la actividad registrada en cada momento. Se desarrolla así el RTDOC (*Real Time Dynamical Observer and Controller*), que será detallado a continuación, aplicándolo al estudio de señales con técnicas de tratamiento de imagen en tiempo real.

3.1.3 Concepto de Observador y Controlador Dinámico en tiempo real.

El RTDOC se crea por el GNB y sus colaboradores internacionales como una tecnología que pretende interactuar con un sistema biológico bajo estudio de

forma automática en un bucle cerrado estímulo-respuesta. Observa, manipula, hace pruebas y controla el funcionamiento de sistemas biológicos en tiempo real.

Al contrario que las técnicas tradicionales de observación e interacción con sistemas biológicos basadas en metodologías sin retroalimentación y análisis *offline*, el RTDOC trabaja en tiempo real interactuando con el sistema en bucle cerrado. Automáticamente se detectan eventos en la señal deseada, en relación al objetivo dado al RTDOC, y se actualiza continuamente su representación interna para la identificación y control de los elementos significativos.

Esta tecnología fue diseñada con el objetivo de controlar el funcionamiento de sistemas biológicos complejos como el sistema nervioso, detectar patologías, controlar y monitorizar las células de interés o desarrollar interfaces cerebro-máquina. Para esto, se deben establecer una serie de protocolos en tiempo real para la interacción con los sistemas biológicos que permita monitorizarlos de forma efectiva.

Los principales problemas que nos encontramos al trabajar con señales de sistemas biológicos son:

- No linealidad de las señales: Las señales procedentes de sistemas biológicos, por ejemplo del sistema nervioso, son altamente no lineales.
- No estacionariedad: Presentan comportamiento no estacionario por lo que el sistema en tiempo real debe monitorizar la señal continuamente para identificar y actualizar los parámetros relevantes. También debe permitir monitorizar el estado interno del sistema continuamente para interactuar con él de forma eficiente en tiempo real.
- Variedad de escalas temporales: existe una gran variedad de señales, y una gran variedad de escalas temporales. Así el RTDOC debe ser capaz de trabajar tanto con señales de variación lenta como la señal de calcio, y de variación rápida como la señal de potencial de membrana.
- Estado interno no es directamente observable: Generalmente no podemos observar directamente el estado interno del sistema por lo que se desarrollan algoritmos para conocerlo a través de una serie de propiedades que sí sean observables. Se debe estudiar el efecto que tienen las señales que estudiamos sobre el estado del sistema, y actuar sobre las propiedades observables para controlar el estado del sistema biológico.

El RTDOC debe, por tanto, ser capaz de interactuar continuamente con un sistema biológico que es altamente no lineal, no estacionario y cuyo estado interno es sólo parcialmente observable. Además debe ser capaz de trabajar en varias escalas temporales.

Con la información que registra procedente del sistema biológico debe actualizar los parámetros que describen el sistema, a continuación detectar eventos significativos en las señales y por último actuar sobre las variables observables

del sistema en función de estos eventos, controlando así el estado y el comportamiento de la muestra bajo estudio.

El bucle cerrado procesa por un lado la información que se recibe, que se registra y actualiza continuamente de la muestra bajo estudio, y por otro lado gestiona los estímulos que se lanzan al sistema biológico en función de los parámetros obtenidos de la información registrada.

En el esquema del RTDOC se diferencian dos bloques internos:

- El explorador de estímulos: bloque del RTDOC que selecciona una entrada adecuada al sistema biológico para estimular su actividad. Esta elección de estímulos es esencial sobre todo si las señales internas del sistema biológico bajo estudio no son observables en los experimentos. Este bloque debe interactuar en tiempo real con el sistema bajo estudio para estudiar los aspectos no lineales y no estacionarios de las señales provenientes de él.
- La representación interna: bloque del RTDOC que nos proporciona una descripción de las características de las entradas y salidas del sistema. Este bloque se actualiza continuamente a partir de los errores que se van detectando entre las predicciones del RTDOC y la actividad observada. De esta forma se puede obtener de forma sintetizada el estado actual del sistema cuando trabajamos con señales no estacionarias.

El RTDOC opera en dos modos distintos que se usan de forma secuencial para monitorizar los comportamientos no estacionarios del sistema bajo estudio.

- Modo observación: El RTDOC en este modo de trabajo construye una representación del sistema biológico a partir de la interacción que se establece con él en tiempo real. Esta representación es utilizada para tareas de identificación.
- Modo control: Se pretende tener control sobre el sistema bajo estudio a través de los estímulos que llegan a él y que modifican su estado.

Los objetivos del proyecto global en cuanto al RTDOC se pueden resumir en:

- El desarrollo del concepto de RTDOC.
- Demostrar su utilidad en sistemas biológicos concretos y en biomedicina.
- Generalizar el empleo de esta tecnología para extraer información de sistemas biológicos, controlar estados patológicos y desarrollar nuevas interfaces.

3.1.4 Representación esquemática del funcionamiento del Observador Dinámico en Tiempo Real.

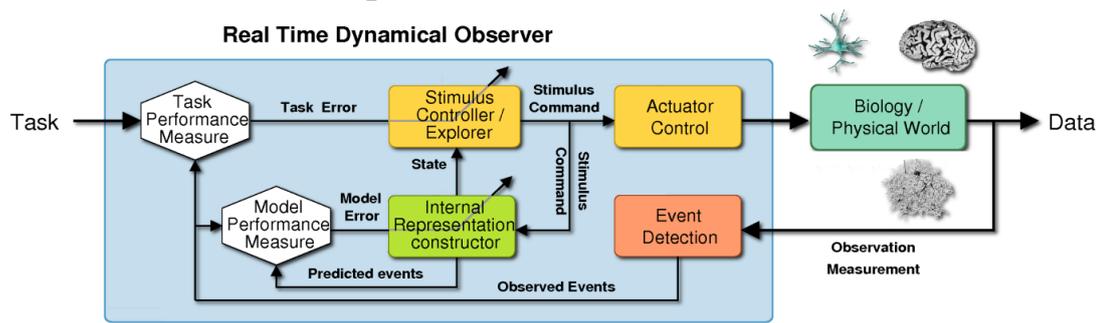


Ilustración 14 Esquema general del RTDOC

El esquema de la Ilustración 14 describe el funcionamiento del RTDOC. En él se puede apreciar el bucle cerrado que se establece entre el RTDOC y el sistema biológico. Para describir el funcionamiento comenzaremos por las señales registradas provenientes del sistema biológico, por ejemplo señales de un sistema nervioso que interese estudiar, que se procesan online. Estas señales se registran y se detectan los eventos significativos en las dinámicas bajo estudio. Estos eventos se utilizan para generar la representación actual del estado del sistema biológico. Se compara la información obtenida con la representación interna del RTDOC en tiempo real. El resultado de la comparación se utiliza para ajustar y actualizar la representación interna en el RTDOC y el controlador de estímulos. Las continuas actualizaciones hacen que tanto el estado interno como el controlador de estímulos sean cada vez más precisos.

En paralelo, el explorador de estímulos controla los estímulos que llegan al sistema nervioso de la muestra bajo estudio. El bloque constructor de la representación interna también recibe información de los estímulos empleados de forma que se puedan elaborar predicciones del comportamiento del sistema en el siguiente ciclo.

En el esquema anterior también se reflejan los dos modos de trabajo ya mencionados: El de observación, que construye y actualiza la representación interna que resulta de la interacción bidireccional con el sistema biológico. En este caso la representación interna se utiliza para identificar eventos significativos de la dinámica transitoria. Y el modo de control, que especifica una tarea a realizar sobre la muestra para modificar su estado, por ejemplo mantener la actividad de la neurona en un rango determinado (Muniz et al., 2009; Chamorro et al., 2012, 2009).

3.2 Proyecto a partir de señales neuronales obtenidas *in vitro*

En este capítulo se describirá el diseño de este PFC que se basa en el concepto ya definido RTDOC. Se detallarán las partes de la estructura del RTDOC particularizándolo para el uso de las señales con las que se trabaja (señales de calcio y potencial de las neuronas), los eventos que nos interesa detectar en ellas y los estímulos que se generan a partir de estos eventos concretos.

Se simulará el tiempo real para la implementación de los algoritmos de detección y estimulación dependiente de la actividad registrada.

3.2.1 Identificación de los bloques del RTDOC para tratamiento de imágenes de calcio.

Como ya se ha mencionado, este proyecto se incluye dentro de la validación del concepto del RTDOC (*Real Time Dynamical Observer and Controller*). Obtendremos imágenes de neuronas de sistemas biológicos sencillos, extraeremos las señales de calcio y potencial de membrana simultáneamente, y con la información obtenida (modo observación del RTDOC) detectaremos eventos significativos. A partir de estos eventos, y del estado anterior actuaremos sobre la muestra controlando el dispositivo de iluminación (modo Control).

Para la validación de los algoritmos de detección y control en la tarea de ciclo cerrado, se realiza un experimento con iluminadores que se activan con señales que generamos en función de los eventos detectados.

La información que se recibe en nuestro caso serán las imágenes de neuronas de las muestras del sistema nervioso del cangrejo *Carcinus Maenas* tomadas en el laboratorio (estos experimentos se detallan en el apartado Experimentos realizados para la obtención de imágenes). A partir del tratamiento de estas imágenes se generan las señales de calcio y voltaje que son registradas y procesadas para la detección de eventos significativos.

A partir de los eventos detectados (por ejemplo los máximos locales de la señal), se puede realizar una actualización de la representación del estado interno del RTDOC (por ejemplo los parámetros que definen la actividad monitorizada), la cual debe realizarse de forma continua para implementar la tarea que realiza el observador.

En paralelo a esto, y en función de la información obtenida, se lanzarán estímulos adecuados que modifican el estado del sistema de control. Las sucesivas señales que lleguen provenientes del sistema biológico se utilizarán de nuevo para actualizar la representación del estado interno.

Por último es importante señalar que, aunque en este proyecto se trabaja con neuronas aisladas de sistemas biológicos sencillos que facilitan el trabajo, este concepto de RTDOC se puede aplicar a sistemas biológicos más complejos.

3.2.2 Características del RTDOC para el tratamiento de imágenes de calcio.

A continuación se detallan las características del esquema de RTDOC, aplicándolo a las señales utilizadas en este PFC. Se comenzará por concretar qué información se recibe del sistema biológico en el caso concreto de este proyecto, se describen las señales de entrada y salida de los distintos bloques, así como las variables internas utilizadas en la implementación de los algoritmos de detección de eventos y para la continua actualización de los parámetros que estudiaremos (por ejemplo el valor medio del voltaje o el calcio en cada momento).

3.2.2.1 Información registrada del sistema biológico

En este proyecto se trabaja con un setup de electrofisiología e imagen disponible en el laboratorio 208 de la Escuela Politécnica de la Universidad Autónoma de Madrid. Este setup está compuesto por un microscopio de fluorescencia al que se ha acoplado una cámara CCD, capaz de registrar cambios de fluorescencia en neuronas sometidas a un tinte sensible a la concentración de calcio (Arroyo et al., 2013).

El sistema biológico sencillo con el que se interactúa es el circuito generador central de patrones del ganglio estomatogástrico del cangrejo *Carcinus Maenas*. Con la cámara CCD y el microscopio de fluorescencia se capturan imágenes de dicha muestra durante un tiempo de algunos minutos (ver capítulo Obtención de imágenes). Estas imágenes de fluorescencia se registran mediante el software Neuroplex de la empresa RedShirtImaging.

El formato de las imágenes obtenidas con la cámara es “.tif”, se registran así con el software específico Neuroplex especificado en el Apéndice A y se trabajará en este mismo formato al implementar los algoritmos en Matlab.

Como información adicional se extraen del programa Neuroplex los archivos de datos de concentración de calcio registrados. Estos datos se utilizarán posteriormente para comparar la variación de calcio con la obtenida con los algoritmos implementados utilizando las imágenes.

3.2.2.2 Características de las señales de calcio y voltaje

Las señales con las que trabajamos, se obtienen a partir del tratamiento de la señal de voltaje obtenida del amplificador intracelular y de las imágenes capturadas. Estas señales, el voltaje y la señal de calcio, se caracterizan a continuación.

Señal de calcio

La señal de calcio de una neurona es una serie temporal de sucesivos valores que corresponden al nivel de fluorescencia que reflejan los estados de concentración de este ion en dicha neurona. Esta señal se obtiene a partir del tratamiento de las imágenes de fluorescencia obtenidas.

Como se ha mencionado anteriormente, las neuronas se tiñen con un tinte fluorescente sensible a la concentración de calcio (Ramaswamy et al., 2007). Una variación de intensidad de las imágenes de estas neuronas teñidas corresponde por tanto a una variación en la señal de calcio.

En el desarrollo de este proyecto trabajaré con dos señales de calcio:

- Señal de calcio obtenida en la etapa “Adquisición de imágenes”: esta señal se obtiene de forma simultánea a la realización de los experimentos, con el software ya mencionado, Neuroplex. Obtenemos un fichero de texto con los valores de la señal de calcio obtenida, y posteriormente los compararemos con la señal de calcio que obtendremos en Matlab a partir

del tratamiento de las secuencias de imágenes con los algoritmos implementados.

- Señal de calcio obtenida en Matlab: en Matlab obtendremos la señal de calcio offline a partir del tratamiento de las imágenes de las neuronas teñidas.

Señal de voltaje

De forma simultánea al registro de concentración de calcio, también se adquiere el potencial de membrana de la neurona mediante microelectrodos conectados a un amplificador.

El voltaje de la membrana se obtiene con el programa de electrofisiología Neuroplex. Aunque el uso de este programa está descrito en el apartado 3.3, se incluye a continuación la Ilustración 15 que muestra la imagen de la neurona a la derecha, y la señal de voltaje registrada a la izquierda.

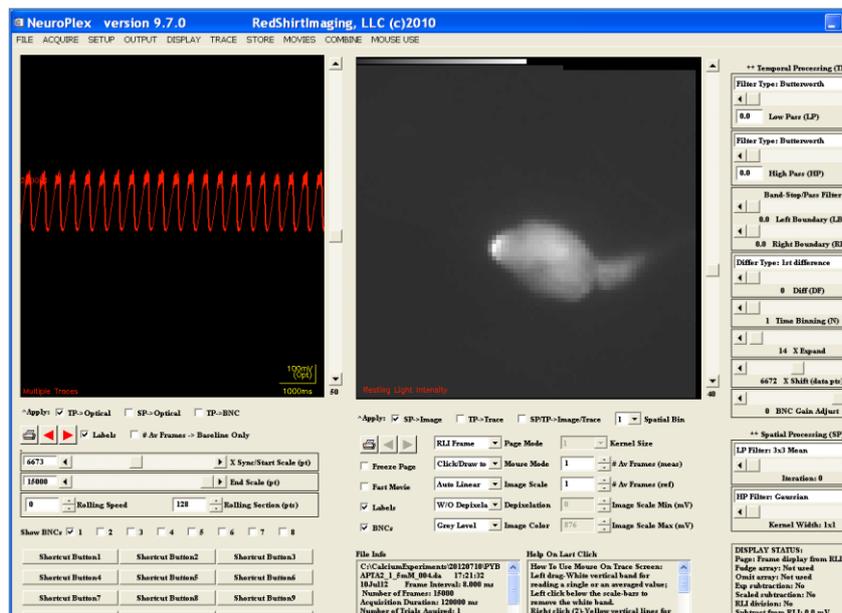


Ilustración 15 Adquisición de la señal de voltaje en Neuroplex

Los datos de voltaje se guardan en un fichero de texto que emplearemos para implementar los algoritmos en Matlab.

Relación entre las señales de calcio y voltaje

La Ilustración 16 muestra una señal de calcio y una de voltaje tomadas simultáneamente durante 10 segundos.

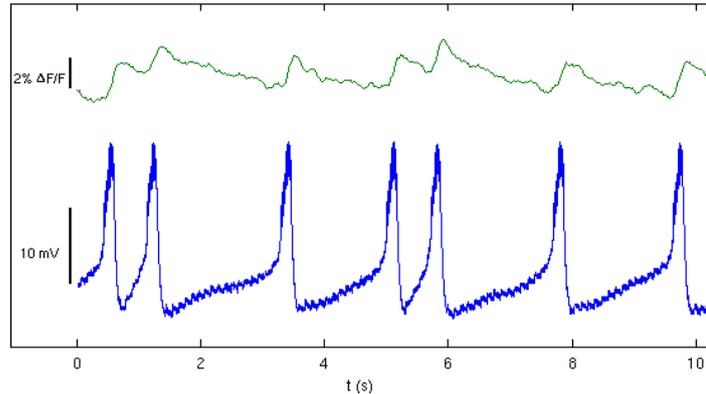


Ilustración 16 Señales de calcio y voltaje simultáneas

La escala temporal de ambas señales es distinta: la señal de calcio tiene variación lenta, mientras que el voltaje es de variación rápida, la frecuencia de muestreo durante la adquisición de estas señales también es distinta. En concreto, para la implementación de los algoritmos en este proyecto la relación entre las escalas es de 1 a 32 ó de 1 a 8. Es decir, en una muestra de calcio hay 32 u 8 muestras de voltaje registradas.

3.2.2.3 Variables internas

Además de las señales con las que trabajamos es importante conocer otras variables necesarias para la implementación de los algoritmos de detección de eventos.

Frecuencia, duración de la secuencia, número de imágenes empleadas

El tiempo de captura de cada imagen varía según la secuencia con la que trabajamos. Varios experimentos utilizan 25 ms de intervalo de muestreo de la imagen de calcio para cada captura, otros 8 ms. Por lo tanto, la frecuencia de captura será 40 imágenes por segundo o 125 imágenes por segundo, dependiendo de la serie bajo estudio.

La duración de las secuencias varía entre 700 y 10.000 imágenes. La duración de dichas secuencias depende de la capacidad de almacenamiento en memoria del software y del tiempo que la neurona bajo estudio soporte las condiciones a la que está sometida durante los experimentos y siga presentando actividad.

Los algoritmos implementados permiten elegir la longitud de la secuencia a estudiar, en qué imagen comenzar y en cuál dejar de registrar. Esto permite aislar ciertos eventos, como máximos locales y estudiarlos con más detalle.

Región de interés.

En cada prueba que se realiza en este PFC se elige la región de interés dentro de la imagen con la que estemos trabajando.

La elección de ROI se puede hacer de forma manual o automática:

-Manual: El algoritmo toma sólo la zona que el usuario selecciona con el cursor sobre la imagen, es decir, la zona de mayor intensidad. El programa Neuroplex utiliza este tipo de selección manual. Ver Ilustración 68.

- Automática: Se establece un umbral de intensidad de los píxeles. Esta intensidad se corresponde con una concentración de calcio determinada. El programa obtendrá la señal de calcio tomando sólo las zonas de la imagen con intensidades superiores a dicho umbral.

La elección de la ROI se ha realizado de forma automática en las pruebas con Matlab, de forma que las zonas que presentan mayor variación a lo largo del tiempo del experimento quedasen seleccionadas (ver capítulo 0).

Escalas calcio y voltaje

Como se ha mencionado anteriormente, la variación de la señal de calcio y la del potencial no son iguales. El calcio es de variación lenta, mientras que el potencial varía a mayor velocidad. Esta diferencia en las frecuencias de las señales hace que para el desarrollo de los algoritmos tengamos que adaptar las escalas temporales de ambas señales, para poder así extraer información de la relación entre ambas en el mismo instante.

Ventanas de tamaño fijo para detección de eventos

Para el diseño y la implementación de los algoritmos de detección de eventos se emplean ventanas de tamaño fijo que recorren las señales de interés. También detallaremos cómo son y cómo utilizamos estas ventanas en el Capítulo Algoritmos de detección de eventos en la señal de calcio.

3.3 Medios utilizados

3.3.1 Microscopio de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia empleado para la obtención de imágenes de concentración de calcio es el modelo *Olympus BX51WI*, disponible en el laboratorio.



Ilustración 17 Microscopio fluorescencia

El *Olympus BX51 WI* es un microscopio de electrofisiología que puede trabajar con imágenes de fluorescencia. Es un microscopio estable y apto para experimentos de larga duración.

3.3.2 Cámara CCD

La cámara CCD utilizada está disponible en el laboratorio del GNB (Cámara *Neuro CCD-SMQ*), y es ideal para trabajar con bajos niveles de intensidad de luz. Es utilizada para estudiar señales obtenidas a partir de las imágenes. Se usa para obtener imágenes de células aisladas teñidas, o de preparaciones de tejidos.

La codificación de la señal obtenida de la cámara CCD está especificada en el Apéndice A.



Ilustración 18 Cámara CCD

3.3.3 Software: Neuroplex

El programa *Neuroplex* se instala en el PC conectado a la cámara CCD-SMQ de la siguiente forma (Ilustración 19):

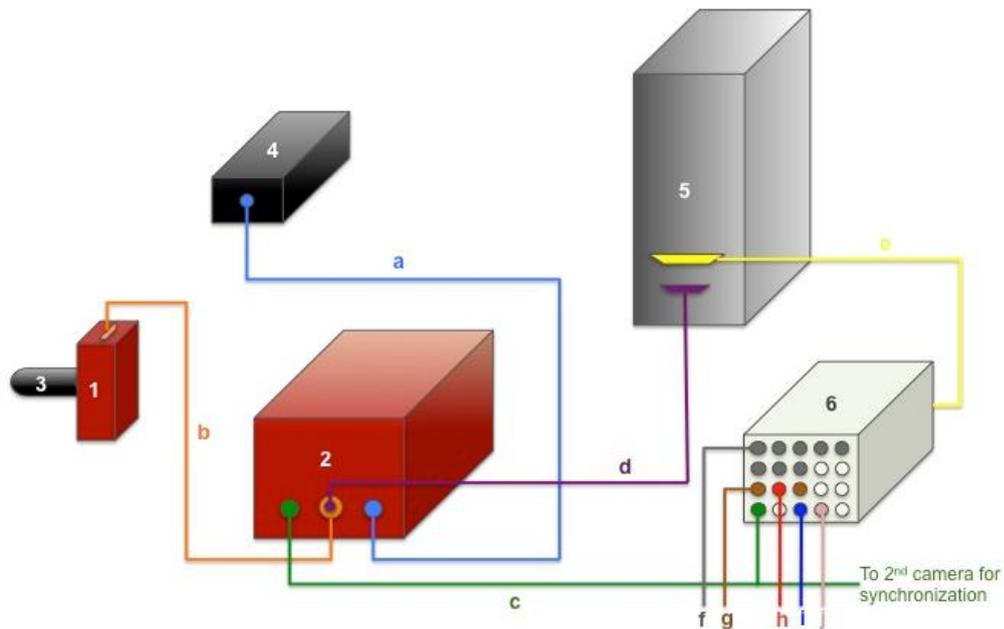


Ilustración 19 Conexiones cámara CCD y Neuroplex

- (1) Cámara CCD que obtiene los *frames* que vamos a estudiar. La velocidad de adquisición de imágenes máxima es 2 KHz con imágenes de 80x80.
- (2) Controlador de la cámara: está conectado a la cámara y a la Tarjeta de Adquisición de Datos del PC.
- (3) Acoplador óptico: adapta la imagen obtenida con el microscopio al tamaño y formato adecuado para la cámara CCD.
- (4) Fuente de alimentación de la cámara.
- (5) Ordenador con tarjeta de adquisición de datos.
- (6) Panel de control: es el centro de conexiones para el estudio de varias señales simultáneamente.

Esta aplicación permite registrar la información de las imágenes que se capturan con la cámara CCD. La interfaz (Ilustración 20) muestra dos ventanas, la imagen de la derecha muestra una captura de la neurona bajo estudio, en ella se puede seleccionar la región donde queremos trabajar (1). La gráfica de la derecha representa los datos registrados, en nuestro caso la sucesión temporal de niveles de intensidad, o lo que es lo mismo, de niveles de la señal de concentración de calcio.

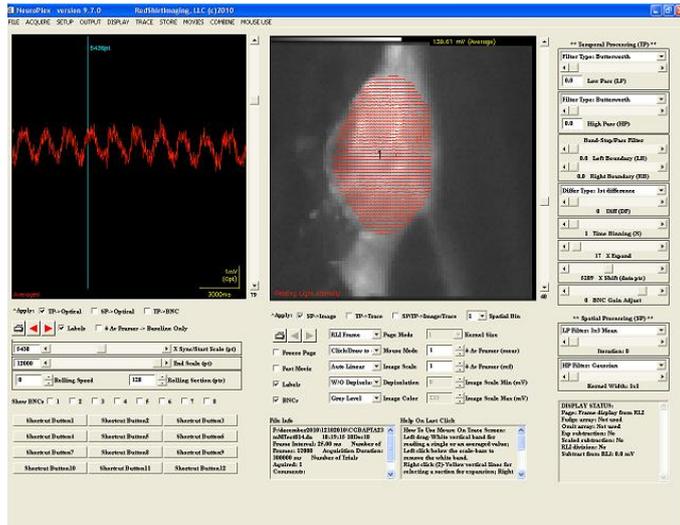


Ilustración 20 Interfaz Neuroplex. Se puede observar la oscilación de calcio a la izquierda en la zona de interés señalada a la derecha.

Neuroplex también permite representar la señal de variación de potencial, hacer filtrados, elegir el tamaño de la imagen, etc.

La entrada a esta aplicación es un fichero de datos con la estructura definida en el Apéndice A, las salidas que utilizamos pueden ser una secuencia de imágenes o un fichero de texto con los valores de las señales deseadas.

3.3.4 Software: Matlab

MATLAB (abreviatura de *Matrix Laboratory*, "laboratorio de matrices") es un software matemático que ofrece un entorno de desarrollo con un lenguaje de programación propio.

Los algoritmos de este PFC se han implementado en *Matlab*. Permite la manipulación de imágenes, y la obtención de parámetros de interés a partir de ellas.

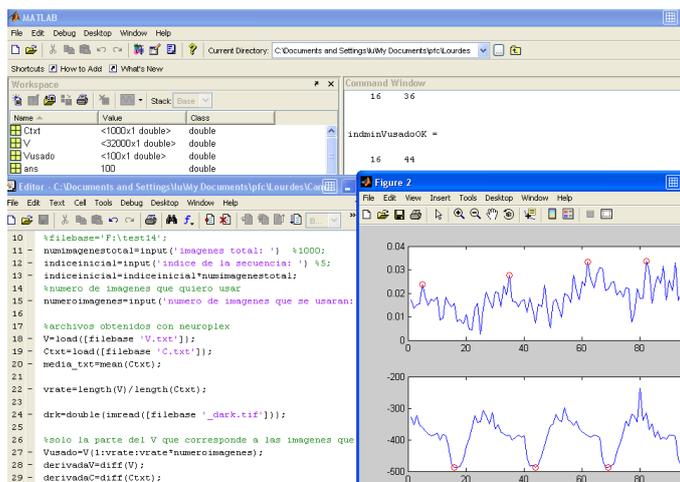


Ilustración 21 Interfaz Matlab

3.3.5 Medios utilizados para la estimulación dependiente de los eventos.

- La herramienta *RTBiomanager* se utiliza en este PFC para generar estímulos a partir de los eventos detectados por los algoritmos.
- Tarjeta de adquisición de datos: permite enviar la señal de estímulo por un canal de salida, además puede recibir la señal de calcio o potencial de las neuronas.
- Controlador del *shutter* y *shutter* de la cámara CCD.

4 Desarrollo y resultados del proyecto

En este capítulo se describe la etapa del desarrollo y los resultados obtenidos en cada una de sus 4 fases:

- En primer lugar se detalla el proceso de la captura de imágenes de fluorescencia de neuronas con los equipos disponibles en el laboratorio del GNB. Se generan secuencias de imágenes de longitud variable. Estas imágenes son tratadas y se generan las señales de la evolución de la concentración de calcio en las neuronas bajo estudio. Simultáneamente se registra el potencial de membrana que proporciona la señal amplificada del electrodo a través de una tarjeta de adquisición de datos. El primer apartado de este capítulo describe cómo es el proceso de obtención de las señales.

Se describirán las características de la señal del calcio y del potencial de membrana. Las señales biomédicas empleadas en el desarrollo de este proyecto presentan ruido, y una deriva que condicionará la manera de implementar los algoritmos de fases posteriores.

Por otro lado, las dos señales tienen escalas temporales diferentes. Dado su distinto origen y que la variación de concentración de calcio es de variación lenta, y el potencial de membrana es de variación rápida, las frecuencias de muestreo son diferentes. Como se verá en este capítulo, será necesario adaptar las escalas temporales para poder trabajar con ellas simultáneamente. Se mostrarán varios ejemplos de las secuencias de imágenes empleadas durante el desarrollo de este proyecto.

- A continuación se detallan los algoritmos implementados, que utilizan las señales de la fase anterior. Estos algoritmos tienen como objetivo la detección de eventos en las señales de calcio.

Se detallará el proceso que se ha seguido en el desarrollo del proyecto. Se comienza describiendo un algoritmo que únicamente trabaja con la señal de calcio y se muestran las ventajas y carencias que tiene.

A continuación se detallan los algoritmos desarrollados que emplean ambas señales, tanto el calcio como el potencial de membrana, y la relación conocida entre ellos para la detección de eventos. Los algoritmos

obtenidos son más precisos y mejoran considerablemente los resultados del primero.

- Por último se detalla el proceso de estimulación dependiente de los eventos detectados. Para completar el ciclo cerrado que se ha descrito en apartado 3 de este documento se implementa un algoritmo que genera señales en función de los eventos que se detectan con los algoritmos.

En este capítulo además se expondrán los medios y programas utilizados para las tareas desarrolladas.

4.1 Obtención de imágenes

4.1.1 Experimentos realizados para la obtención de imágenes

4.1.1.1 Introducción

En este apartado se va a detallar en qué consisten, qué medios se utilizan y qué dificultades aparecen al realizar los experimentos en el laboratorio del Grupo de Neurocomputación Biológica de la UAM, que dan como resultado los registros de voltaje y las secuencias de imágenes que se procesarán más tarde con los algoritmos desarrollados en este PFC.

A continuación describiré el proceso del experimento que se realiza para la obtención de imágenes de las neuronas que nos interesa estudiar.

4.1.1.2 Preparación

Los experimentos de obtención de imágenes para el desarrollo de este PFC se han realizado en el laboratorio del GNB en la UAM. Se han utilizado muestras del sistema nervioso de sistemas biológicos sencillos que más tarde detallaré. Esta etapa ha resultado muy interesante ya que sirve para entender a nivel biológico qué ocurre en pasos posteriores en las secuencias de imágenes que se procesan.

La preparación del experimento comienza con la extracción de una muestra del sistema nervioso del cangrejo *Carcinus Maenas*, y a partir de ella se obtiene una preparación *in vitro*.

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, se utiliza además un tinte fluorescente que se inyectará en los somas de las neuronas bajo estudio para su observación y la captura de imágenes, el Oregon Green 488 Bapta-2. La acción de este tinte es un indicador de la concentración de calcio. Se inyecta en las neuronas para registrar su fluorescencia y medir la concentración de calcio que hay en ella.

4.1.1.3 Ejecución

Para el desarrollo del proceso se comienza con la extracción de una muestra del sistema nervioso del *Carcinus maenas* y se obtiene una preparación *in vitro*. A continuación se registran las señales del potencial de membrana y de calcio de cada una de las neuronas presentes en la muestra. Esto se consigue insertando un electrodo en cada uno de los somas de las neuronas con la ayuda de un

microscopio y observando cómo varía la señal obtenida mediante un software que registra la actividad en tiempo real a partir de la señal procedente del amplificador.

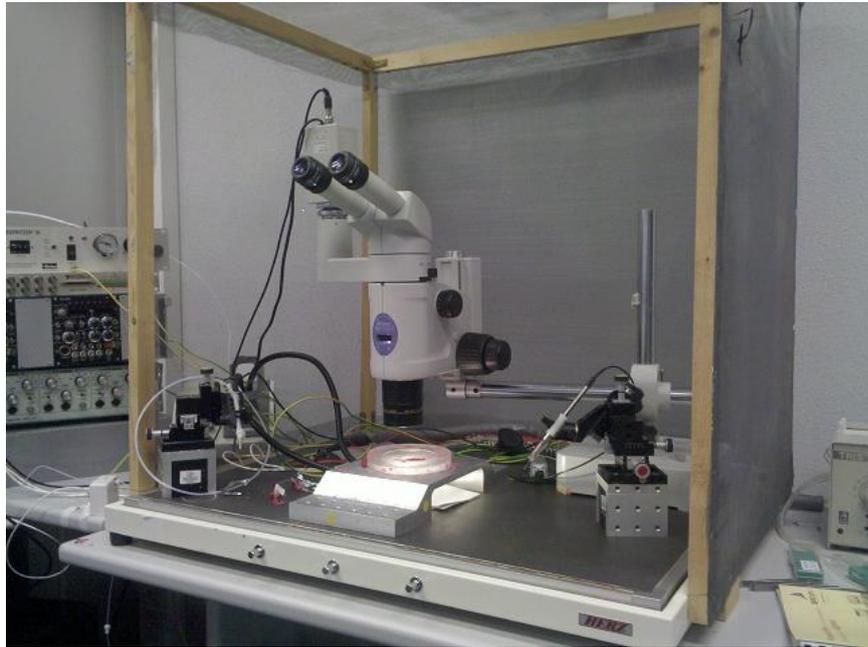


Ilustración 22 Microscopio de electrofisiología del laboratorio

Algunas de las imágenes con las que se trabaja para introducir los electrodos en esta primera etapa se muestran en la Ilustración 23.

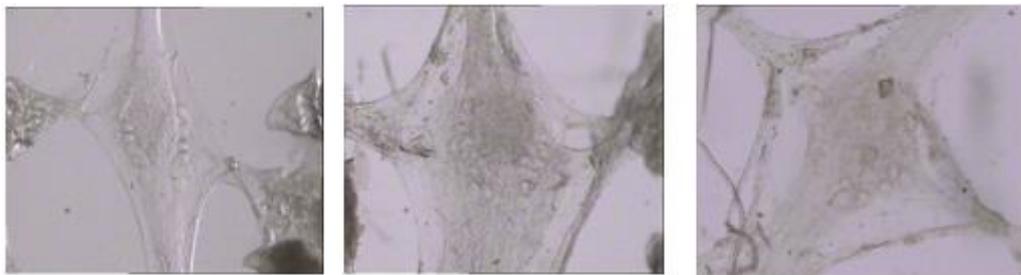


Ilustración 23 Fotos del ganglio estomatogástrico del cangrejo Carcinus Maenas

En las imágenes anteriores se pueden apreciar los somas de las neuronas (círculos pequeños). Un electrodo se inserta en estos somas buscando las neuronas que presentan actividad. En caso de detección de actividad, se identifica la neurona y en pasos posteriores se le inyectará el tinte que se utiliza para el registro del calcio en dicha neurona con un microscopio de fluorescencia (ver Ilustración 24).

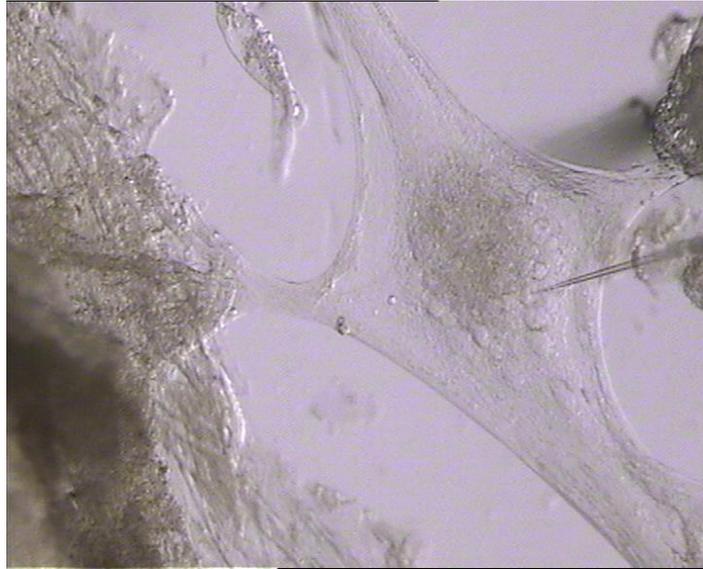


Ilustración 24 Ganglio con electrodo insertado, buscando actividad en distintas neuronas

Con este equipo, como ya he mencionado, se buscan las neuronas con actividad eléctrica y se identifican. Se dan por válidas para el estudio en los siguientes pasos aquellas neuronas que presenten una señal de voltaje y calcio robustas después de la inyección del tinte como la que se muestra en la Ilustración 25.

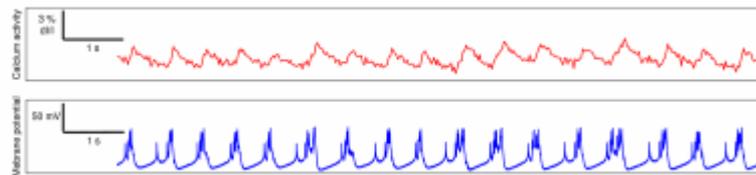


Ilustración 25 Señal de calcio (rojo) y potencial de membrana (azul) simultáneas, con distinta escala temporal.

Cuando se encuentra una neurona que presente este tipo de actividad se registra la señal detectada durante períodos de entre 3 y 5 minutos.

La obtención de imágenes se realiza con el microscopio de fluorescencia y una cámara CCD acoplada a él como se ilustra en la siguiente figura.

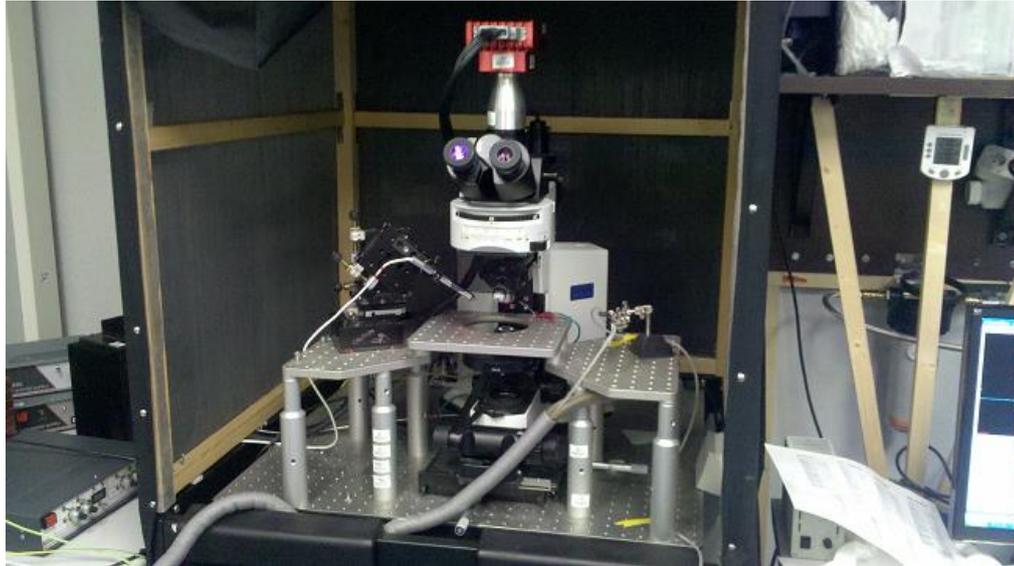


Ilustración 26 Microscopio de fluorescencia y cámara CCD del laboratorio.

El microscopio de la Ilustración 26 es capaz de detectar los cambios en la fluorescencia de la muestra bajo estudio y esta fluorescencia depende de la concentración de calcio en la neurona en cada momento; un aumento en la intensidad de la imagen de fluorescencia corresponde a un aumento en la concentración de calcio dentro de ella.

A los somas de las neuronas identificadas como válidas en la etapa anterior se les inyecta el tinte fluorescente sensible a la presencia de calcio mencionado anteriormente, el Oregon Green 488 Bapta-2, aplicando una corriente de 1 a 10 nA durante 10-20 minutos, a través de un electrodo. Una vez introducido el tinte en la neurona, podemos registrar las imágenes obtenidas, sabiendo que la variación de intensidad de cada una de las imágenes se debe a una variación en la concentración de calcio. Obtenemos entonces la serie temporal de la concentración de calcio en la neurona bajo estudio.

A continuación se muestran un par de imágenes de fluorescencia en neuronas como ejemplo, obtenidas en uno de los experimentos realizados en el laboratorio. En ellas se ve perfectamente el tinte fluorescente inyectado en la neurona.



Ilustración 27 Imagen de fluorescencia 1



Ilustración 28 Imagen de fluorescencia 2

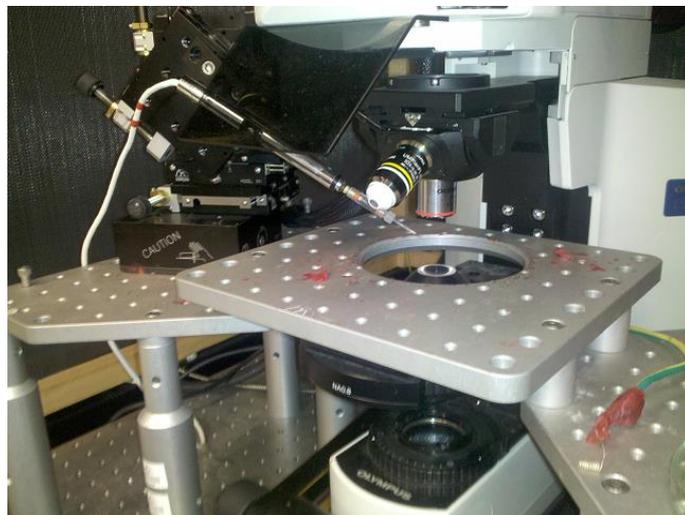


Ilustración 29 Electrodo para la inyección del tinte

La etapa de inyección del tinte es un punto crítico para el experimento ya que se puede dañar la neurona y dejar de tener actividad en ella. Esto es debido a que el tinte utilizado, en presencia de luz, es tóxico para la neurona. También afecta el haber insertado electrodos más de una vez en la misma neurona. Varias neuronas que en principio eran válidas, después de este paso dejan de serlo.



Ilustración 30 Imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia y la cámara CCD. Podemos ver el electrodo que inyectamos lleno de tinte. A la izquierda un soma de neurona en el que ya se ha inyectado el tinte.

Las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia y la cámara CCD son registradas en el PC conectado a este equipo con el software Neuroplex (ver capítulo 3.3). El software de la cámara permite elegir una serie de parámetros de las imágenes que se irán registrando, por ejemplo el tamaño, importantes para poder trabajar con ellas al implementar los algoritmos que más tarde se describirán.

En la Ilustración 31 podemos observar varias de estas características que elegimos al registrar las imágenes. Vemos que las imágenes que trataremos serán de 80x80 píxeles, y que en este ejemplo concreto se tomarán 40 imágenes por segundo, esta frecuencia es suficiente para obtener la señal del calcio ya que es de variación lenta.

El voltaje sin embargo es una señal de variación más rápida, por lo que se registrarán 32 muestras de potencial por cada una de calcio. Podemos ver además que se comienza a registrar a partir de la muestra número 100 para evitar fluctuaciones iniciales.

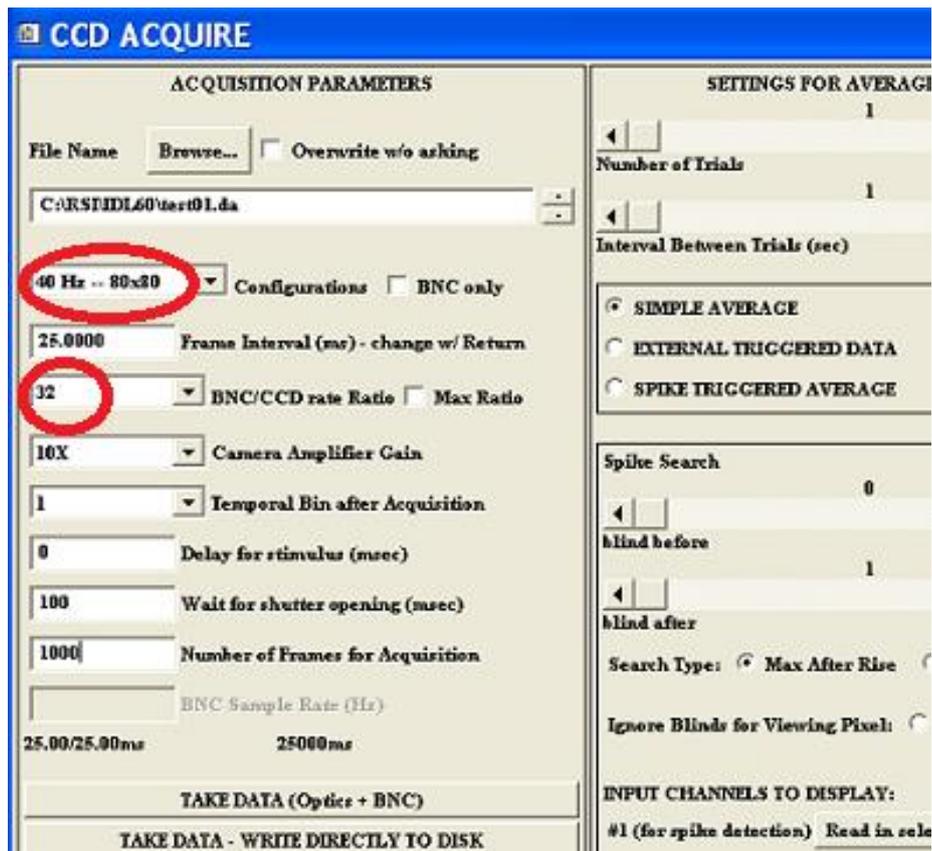


Ilustración 31 Neuroplex. Características que se eligen para las imágenes que vamos a obtener con la cámara CCD

A continuación se muestra una imagen obtenida con Neuroplex .

- En la parte de la derecha se puede ver la neurona bajo estudio. En ella se puede ver marcada la región de interés. Elegimos de forma manual la región de interés (1) en la que queremos obtener la señal de calcio. Los píxeles dentro de esta región serán los que se utilizarán en la ejecución de los algoritmos, los píxeles que queden fuera de la región de interés no se tendrán en cuenta en la obtención de la señal.
- A la izquierda se muestra la señal de calcio obtenida. Cada uno de los puntos de la señal se obtiene haciendo la media de la intensidad de los píxeles que están dentro de la región de interés en cada una de las imágenes de la secuencia.

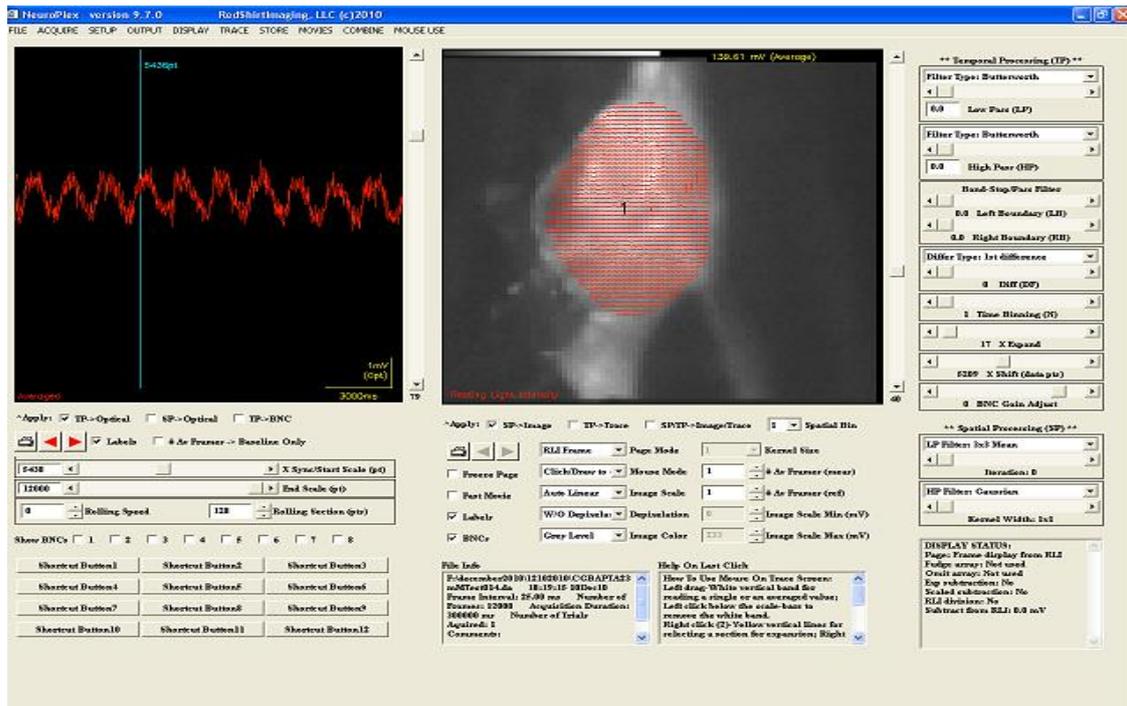


Ilustración 32 Neuroplex. Señal de calcio en la región de interés.

Esta señal se puede filtrar, de forma que nos sea más fácil detectar máximos en las oscilaciones, ráfagas de máximos, etc. Neuroplex permite utilizar distintos tipos de filtro (Gaussiano, binomial o filtro de Butterworth entre otros). Ver Ilustración 33.

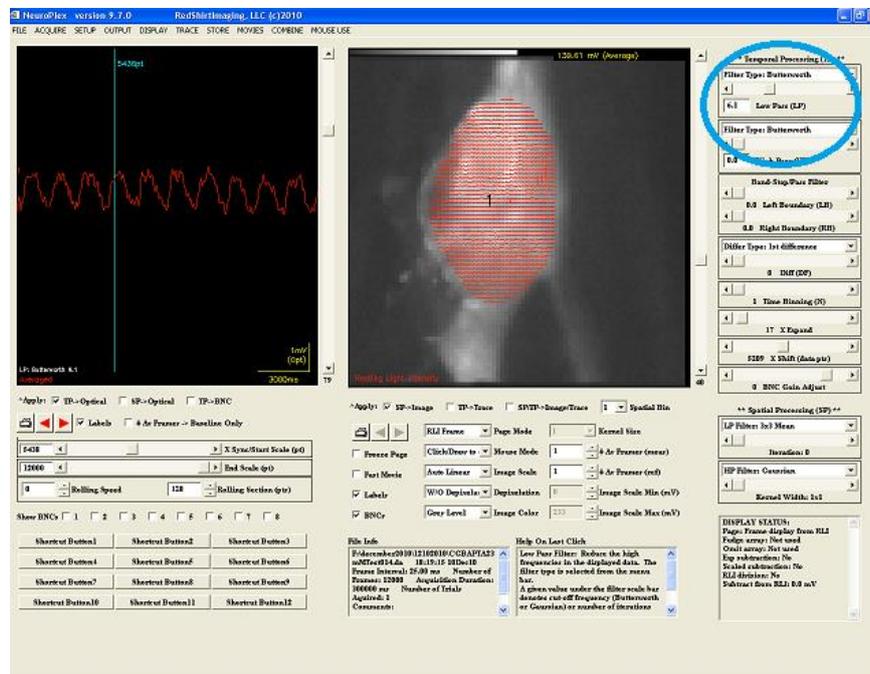


Ilustración 33 Neuroplex con señal de calcio filtrada. Filtro Butterworth.

Como se puede observar en la figura anterior, las escalas de amplitud de ambas señales son distintas. Las señales se guardan en dos ficheros de datos que más tarde se utilizarán para validar los algoritmos implementados.

Una vez terminado el registro de imágenes en el PC, finaliza la primera parte del proceso y comenzamos con el tratamiento de estas imágenes.

4.2 Implementación de los algoritmos y resultados

Los algoritmos que se van a describir en este capítulo han sido implementados en Matlab (ver capítulo 3.3). Dichos algoritmos reciben como entrada el registro del potencial de membrana y las imágenes capturadas en la etapa anterior. Las imágenes y las señales son tratadas y se obtiene como salida de los algoritmos a partir de ellas los parámetros de interés con los que trabajaremos para implementar el ciclo cerrado.

Los objetivos de los algoritmos implementados son:

- Detectar eventos de interés en las señales neuronales registradas en tiempo real.
- Adaptar las escalas temporales de las señales para poder trabajar con ellas de forma simultánea y así mejorar los resultados.
- Conseguir algoritmos de detección de eventos robustos frente a la deriva de las señales.
- Emplear estos algoritmos para la construcción de un ciclo-cerrado capaz de controlar la iluminación de la preparación en función de la actividad. Como se explicará en detalle en el capítulo 4.3, con estos algoritmos se pretende reducir el tiempo en que las neuronas son iluminadas.

A continuación se detalla el trabajo realizado en esta etapa.

4.2.1 Obtención de la señal de concentración de calcio

4.2.1.1 Preprocesamiento de la señal de calcio a partir de las imágenes

Todos los algoritmos implementados en este proyecto comienzan con la obtención de la señal de concentración de calcio en la neurona bajo estudio a partir de las imágenes de la etapa anterior (ver capítulo 4.1).

Los algoritmos implementados reciben como entrada las imágenes de fluorescencia obtenidas en la etapa anterior. Todas ellas tienen el formato especificado en el Apéndice A. Todas son de 80x80 píxeles.

En primer lugar, se elige la región de interés (ROI, *Region of interest*) dentro de la imagen completa. Esta elección se puede hacer de forma manual seleccionando con el cursor las zonas que se quiere estudiar, o automática tomando sólo los píxeles que superen un umbral de intensidad establecido (ver 0).

Los píxeles que quedan dentro de la ROI serán utilizados para calcular la media de intensidad. Este valor se registra para cada una de las imágenes de la

secuencia, obteniendo así la serie temporal de la señal de calcio, con la que trabajaremos.

Simultáneamente al registro de la señal de calcio, el algoritmo carga la señal de potencial registrada en el fichero de datos en la etapa de obtención de imágenes.

4.2.1.2 Relación de escalas temporales en las señales de Calcio y potencial

Es importante tener en cuenta que la señal de calcio es de variación lenta, y la de potencial de membrana es de variación rápida. Debido a esto y a las limitaciones de la cámara para obtener registros de calidad a alta frecuencia, la frecuencia de muestreo en la etapa de adquisición de datos de ambas es diferente. Para realizar la detección simultánea de eventos en estas señales es necesario tener esto en cuenta y parametrizar el software de análisis de acuerdo a las frecuencias de muestreo.

La Ilustración 36 muestra un ejemplo de señales simultáneas, en las que la relación de escala temporal es de 1:32. Es decir, por cada valor de la señal de calcio se registran 32 de potencial. En cada secuencia de imágenes este parámetro puede variar. En concreto, en las pruebas realizadas en este proyecto la relación es de 1:32 o de 1:8.

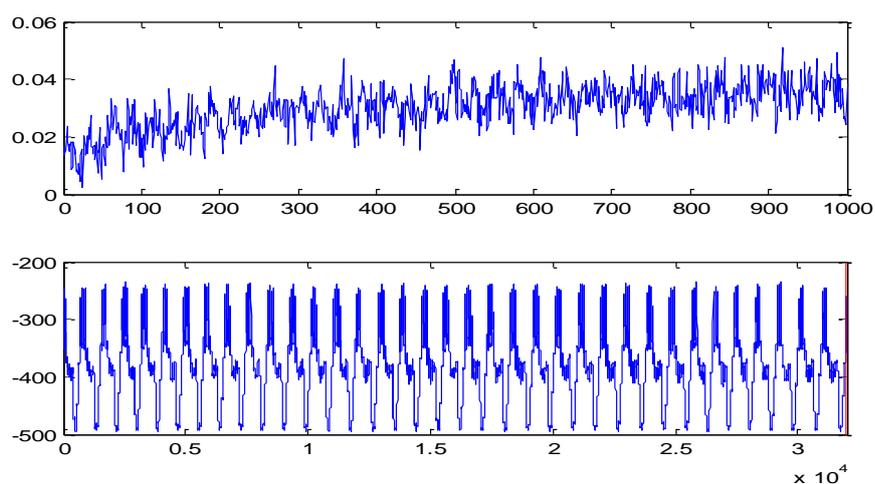


Ilustración 36 Señal de calcio (parte superior) y de potencial de membrana de una neurona (parte inferior). Contenido de la señal de calcio: 1000 capturas, contenido de la señal de potencial: 32000 puntos.

El diagrama de la Ilustración 37 resume esta primera parte. En él se muestran las entradas en la etapa de preprocesamiento: secuencias de N imágenes del mismo tamaño capturadas en la etapa anterior, un fichero de datos de la señal de calcio obtenido en Neuroplex en la etapa anterior (ver 3.3) para cada una de dichas imágenes y un fichero de datos con los valores de la señal de potencial de membrana durante toda la secuencia.

Como muestra el esquema, el resumen del proceso de preprocesamiento de las señales se puede describir de la siguiente manera:

- En primer lugar las imágenes son tratadas: se elige la región de interés de forma automática dentro de las imágenes, se calcula la media de los píxeles incluidos dentro de ella y se obtiene finalmente cada uno de los puntos de la señal de variación de calcio en el tiempo.
- En paralelo al punto anterior, el algoritmo implementado va capturando, para cada imagen, el valor de la señal de calcio en la región de interés elegida de forma manual y se va guardando en un fichero de datos por el programa Neuroplex.

Estos dos primeros puntos generan dos señales de calcio que se representan en la parte derecha de la Ilustración 37. Nótese la diferencia en la escala de estas dos señales. La señal azul de Matlab está normalizada, mientras que la verde representa los valores que se obtienen desde Neuroplex directamente.

- Por su parte, la señal de potencial durante toda la secuencia se extrae directamente del fichero de datos generado en Neuroplex.

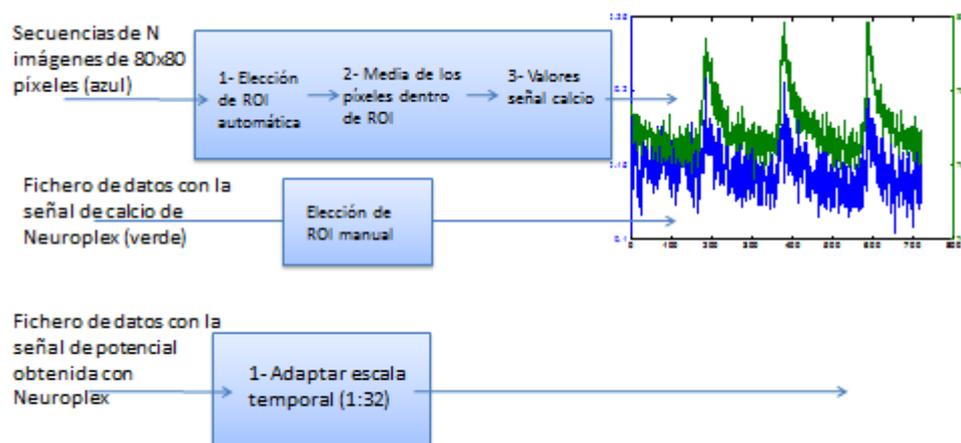


Ilustración 37 Esquema señales de entrada a los algoritmos implementados.

4.2.1.3 Preprocesamiento de la señal de calcio a partir de un fichero de datos

Como variante a este proceso de obtención de la señal, se podría utilizar como entrada a los algoritmos posteriores la señal del fichero de datos obtenida directamente de la cámara CCD. La ventaja de esta implementación es el ahorro del tiempo de carga de todas las imágenes de la secuencia en Matlab. Siguiendo el esquema del apartado anterior, con este algoritmo nos ahorramos la línea de flujo de la parte superior de la Ilustración 37 y se utilizan las señales de calcio y potencial directamente del fichero de datos generado en por la cámara. Este método puede no ser adecuado para algunas neuronas donde las oscilaciones de calcio pueden estar restringidas en zonas específicas.

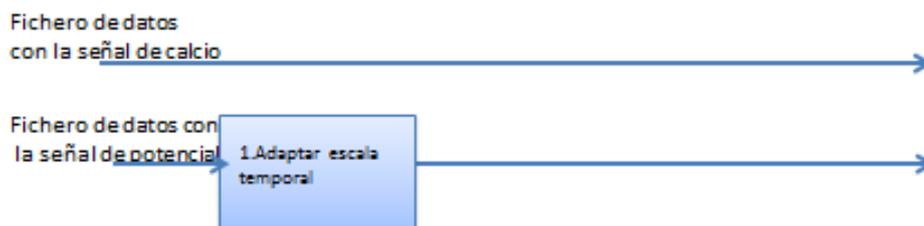


Ilustración 38 Esquema señales de entrada de ficheros de datos

4.2.1.4 Pruebas y resultados

En este apartado se muestran algunas de las figuras obtenidas al representar los datos de la concentración de calcio en cada imagen obtenidos de las dos maneras definidas en el apartado anterior:

- Señal de calcio obtenida directamente con el fichero de datos generado por la cámara (señal de color verde)
- Señal de concentración de calcio obtenida a partir del procesamiento de las imágenes. Estas señales se obtienen una vez elegido la ROI, y obtenida la media de los valores de intensidad de todos los píxeles dentro de ella (señal color azul).

Lo interesante de estas figuras es que podemos observar que en ambos casos la variación es la misma, los eventos de interés (máximos y mínimos) tienen lugar en el mismo instante de tiempo en ambas señales. Por lo tanto podremos tomar la señal obtenida al procesar las imágenes como válida, y la usaremos como señal de entrada en los algoritmos de detección de eventos detallados en los apartados 4.2.2, 4.2.3 y 0.

En las siguientes figuras (Ilustración 39, Ilustración 40, Ilustración 41) la señal “Calcio ROI” (azul) denota la señal obtenida a partir del algoritmo implementado con las imágenes capturadas durante la etapa de preprocesamiento de señales, y “calcio.txt” (verde) corresponde a la señal obtenida directamente en un fichero de datos.

La primera secuencia de 3000 imágenes presenta una variación de deriva, que los algoritmos implementados para la detección de eventos deben soportar. Se puede observar que la señal obtenida a partir del tratamiento de imágenes presenta las mismas variaciones que la señal de datos con un offset vertical y menor amplitud.

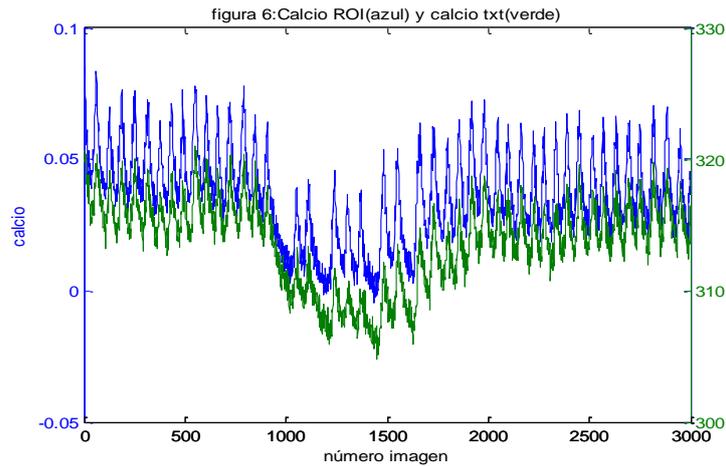


Ilustración 39 Secuencia 1. Imágenes analizadas: 3.000

La Ilustración 40 representa la señal de calcio de una secuencia de 720 imágenes. Se puede observar que ambas señales presentan tres máximos locales en los mismos instantes.

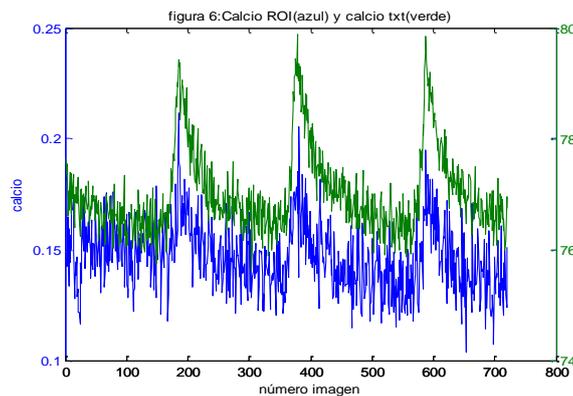


Ilustración 40 Secuencia 2. Imágenes analizadas:720

En un estudio offline la elección manual puede resultar muy precisa, sin embargo las pruebas realizadas muestran que la elección automática de la ROI es adecuada en la mayor parte de los casos.

En muchos casos la señal de calcio obtenida con el algoritmo de la elección de la región de interés de forma automática presenta los eventos locales más pronunciados con respecto al *baseline* de la señal, permitiendo localizarlos de forma automática más fácilmente. Un ejemplo se muestra en la Ilustración 41.

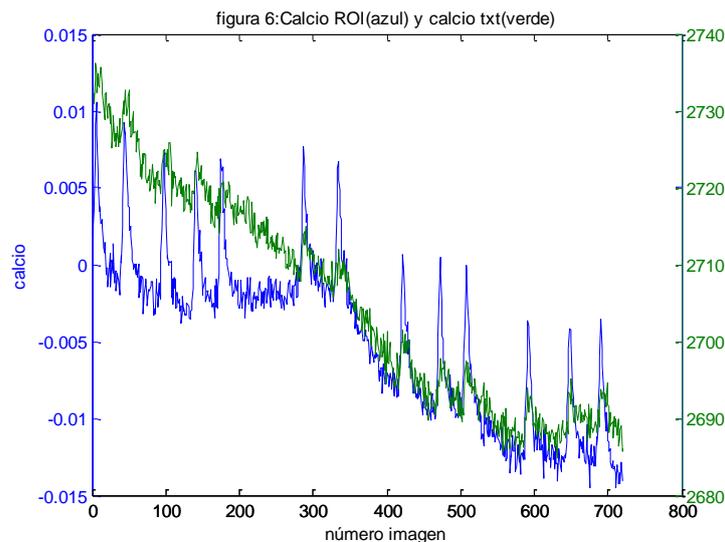


Ilustración 41 Secuencia 3. Imágenes analizadas: 720

Es importante destacar que las señales de calcio y potencial con las que trabajamos presentan una deriva. La Ilustración 41 es un claro ejemplo. En la implementación de los algoritmos de detección de eventos ha sido imprescindible tenerlo en cuenta para evitar perder eventos detectados.

Se puede observar que la señal de variación de calcio presenta variaciones mayores en los puntos de eventos de interés que la señal del fichero de datos original. Este hecho se debe a la buena elección de la ROI. Es importante elegir los píxeles que formarán la región de interés para obtener señales con variaciones lo más notables posible, de forma que la detección de eventos sea más fácil de implementar.

La obtención de la región de interés se ha realizado para la mayor parte de las pruebas realizadas de forma automática. Los píxeles que superan un valor que ha sido obtenido de forma empírica después de varias pruebas son los que consideramos para generar la señal de calcio.

A partir de la especificación del formato de las imágenes (ver Apéndice A) es posible en Matlab seleccionar una región de interés y analizarla sin necesidad del software Neuroplex.

4.2.2 Algoritmos de detección de eventos en la señal de calcio

El objetivo de esta etapa es localizar los picos de máximos locales en las oscilaciones de la señal de calcio. Estos máximos locales reflejan la actividad de cada ráfaga del potencial de membrana. Si observamos las imágenes del apartado anterior podemos apreciar las variaciones rápidas debidas al ruido de la señal de calcio que dificultarán la tarea. Este hecho se solucionaría con un filtro paso bajo, sin embargo, en este proyecto se ha optado por buscar otra solución que no conlleve aplicar filtros con coste computacional a la señal para así poder

trabajar con el menor retardo posible. El algoritmo implementado calcula la media de los píxeles de la ROI en cada imagen de la secuencia.

A continuación se describen los algoritmos de detección de estos eventos que se han implementado, utilizando ventanas deslizantes de tamaño fijo:

- En el primero la ventana deslizante se aplica sobre la señal de calcio obtenida a partir de las imágenes.
- El segundo algoritmo se ha desarrollado basándose en la relación calcio-potencial (ver capítulo 2.4.3 del estado del arte), en él la ventana de tamaño fijo recorre la señal de potencial.
- Por último, se implementa un algoritmo de ventana deslizante que detecta las zonas de *onset* de la señal de calcio, teniendo en cuenta también la relación calcio-potencial de membrana.

El uso de ventanas de tamaño adecuado permite detectar los puntos de eventos en una señal con muchos picos, como es la señal de calcio, sin tener que aplicar un filtro. Los algoritmos se han probado con las secuencias de imágenes disponibles y se obtienen los resultados de acierto de cada uno de ellos.

A continuación, como se detallará más adelante en el capítulo 4.3, los algoritmos serán utilizados para el proceso de estimulación o actuación dependiente de la actividad registrada. Esta parte del desarrollo del proyecto supone finalizar con el bucle cerrado estímulo-respuesta que se ha mencionado anteriormente.

4.2.2.1 Algoritmo de detección 1 - Ventana deslizante de tamaño fijo sobre la señal de calcio.

Si observamos las señales de calcio vemos que presentan lóbulos de distintas longitudes. A continuación se muestra un ejemplo de una señal de calcio ruidosa (Ilustración 42) y otra poco ruidosa (Ilustración 43).

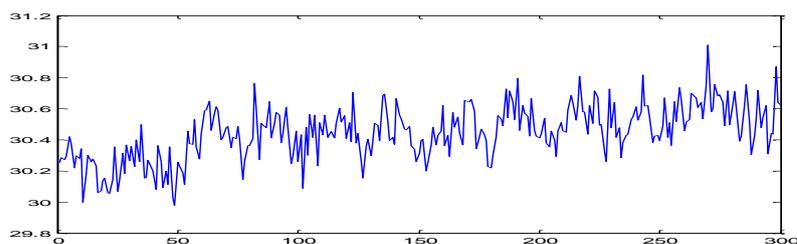


Ilustración 42 Ejemplo señal de concentración de calcio. Señal ruidosa.

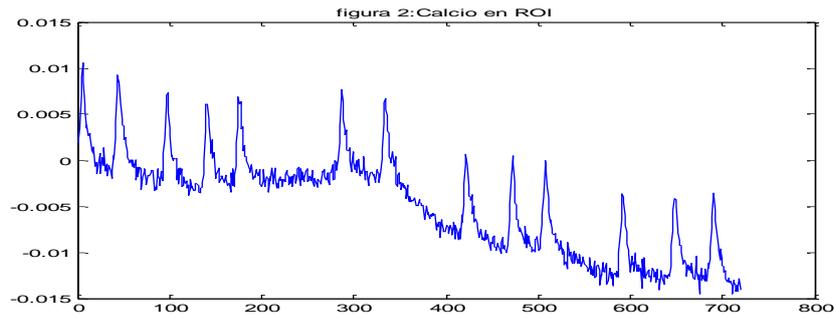


Ilustración 43 Ejemplo señal de concentración de calcio. Señal poco ruidosa. Podemos apreciar los picos máximos de las oscilaciones fácilmente.

Como ya se ha mencionado, en principio en la realización de este PFC, se optó por filtrar la señal de calcio, para que desapareciesen los picos intermedios y fuese más sencillo detectar máximos locales calculando la derivada de la señal en cada punto. Sin embargo, esto suponía un retardo en la ejecución del algoritmo que dificulta la construcción del ciclo-cerrado y se descartó.

En la Ilustración 44, se muestra un ejemplo de la señal de calcio filtrada.

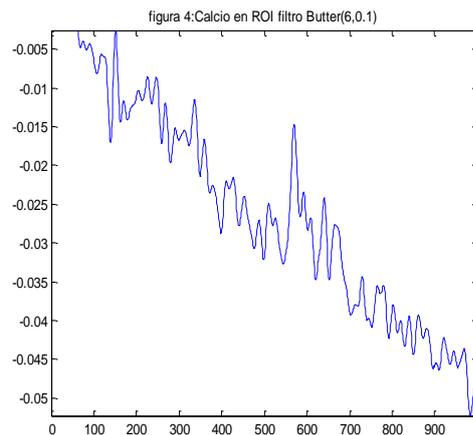
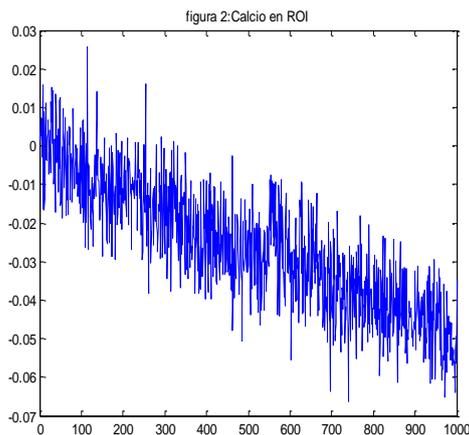


Ilustración 44 Señal de calcio en la Región de Interés sin filtrar (izquierda) y con un filtro Butterworth (derecha).

Continuando con el algoritmo que nos ocupa, el primer punto a decidir ha sido la longitud óptima de ventana para que el tiempo de ejecución no aumente mucho, y a la vez debe ser lo suficientemente larga como para desprestigiar los picos intermedios que no queremos detectar, el ruido.

Para elegir el tamaño óptimo de la ventana se ha hecho un barrido con varios valores y se ha elegido una ventana de 5 puntos por ser el que generaba mejores resultados en las pruebas. Estas ventanas recorren la señal de calcio según se va generando a partir de las imágenes. Tomamos los últimos puntos de la señal que estén dentro de la ventana, buscamos el máximo y el algoritmo lo almacena. A continuación la ventana se desliza 1 punto y se vuelve a calcular el máximo en la

nueva ventana. Si este valor se repite cuatro veces siguiendo el mismo procedimiento lo tomamos como máximo local válido.

La Ilustración 45 muestra la señal de calcio de una secuencia de 300 imágenes. Los picos detectados se marcan con un círculo rojo. Vemos que se pierden algunos eventos.

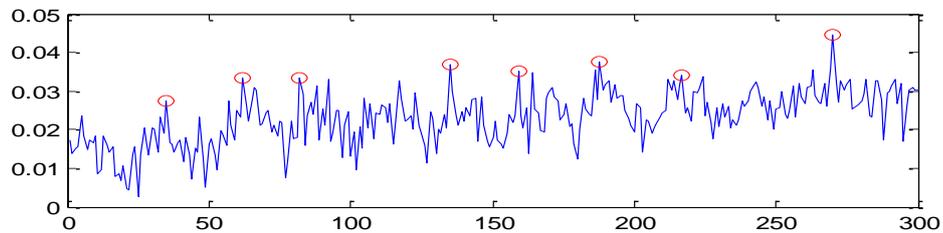


Ilustración 45 Detección de máximos locales con ventana tamaño 5 puntos. Señal ruidosa.

Si por el contrario, la señal de calcio es poco ruidosa los eventos se detectan correctamente (ver Ilustración 46). En las zonas donde se repiten valores muy próximos durante capturas seguidas, el algoritmo detecta falsos positivos. Se identifican como máximos en calcio puntos que no deberían.

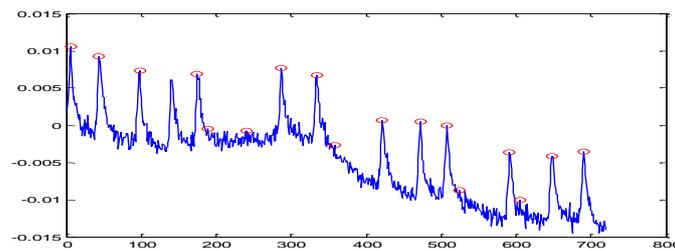


Ilustración 46 Detección de máximos locales con ventana tamaño 5 puntos. Señal poco ruidosa.

La motivación del desarrollo de este algoritmo de detección de eventos en la señal de calcio es la dificultad que supone trabajar sobre este tipo de señales ruidosas. Si a esto le añadimos el hecho de que la ejecución debe ser aplicables a sistemas en tiempo real, sin información previa de cómo va a ser la señal, la tarea de caracterizar este tipo de señales no resulta fácil.

4.2.2.2 Pruebas y resultados

En este apartado se muestran algunas de las figuras obtenidas al ejecutar el algoritmo de detección de eventos en la señal de calcio explicado, con una ventana deslizante de 5 muestras en los registros obtenidos en varios experimentos con neuronas que presentan distintas frecuencias de oscilación y formas de onda.

Podemos observar los eventos que detecta el algoritmo con la ventana deslizante. Además de las figuras Ilustración 45, Ilustración 46 que se han incluido como ejemplos en el apartado anterior, en las figuras (Ilustración 47, Ilustración 48,

Ilustración 49, Ilustración 50) se representa la señal de calcio con los eventos detectados en la parte superior, y la señal de potencial de membrana en la parte inferior. Se ha adaptado la escala temporal de ambas señales de forma que, al representarlas el eje temporal sea el mismo en ambas. Los eventos detectados en la señal de concentración de calcio se han marcado con círculos verdes en la misma señal.

En la Ilustración 47 se representa la secuencia de imágenes 1. En ella se marcan los máximos locales que se detectan al ejecutar el algoritmo. Podemos observar que el algoritmo de detección funciona aceptablemente bien, aunque se detectan varios eventos no deseados, falsos positivos.

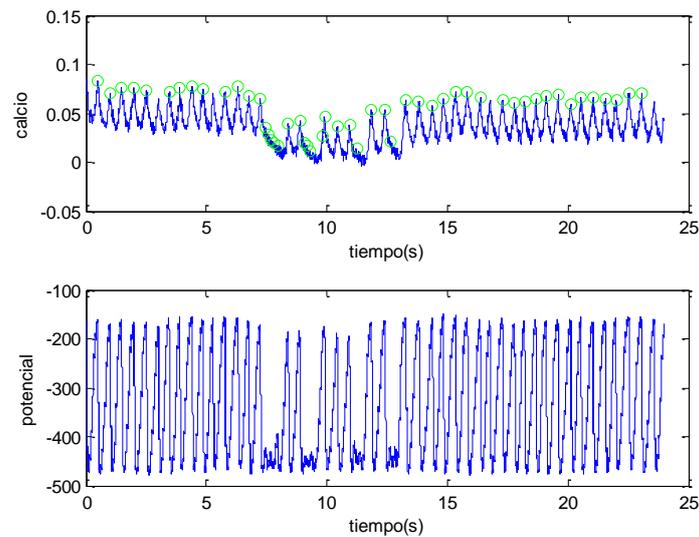


Ilustración 47 Secuencia 1. Imágenes analizadas: 3000

La siguiente figura muestra las señales obtenidas de la secuencia de imágenes 2. Se puede observar que se detectan los picos máximos de forma correcta, sin embargo seguimos detectando falsos positivos.

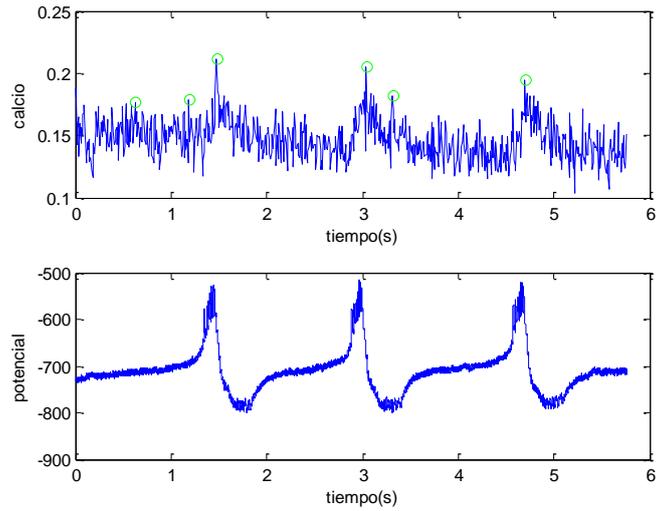


Ilustración 48 Secuencia 2. Imágenes analizadas:720

A continuación, la Ilustración 49 representa una señal de calcio poco ruidosa. En ella se detectan los máximos locales de forma correcta, pero también nos encontramos con varios falsos positivos.

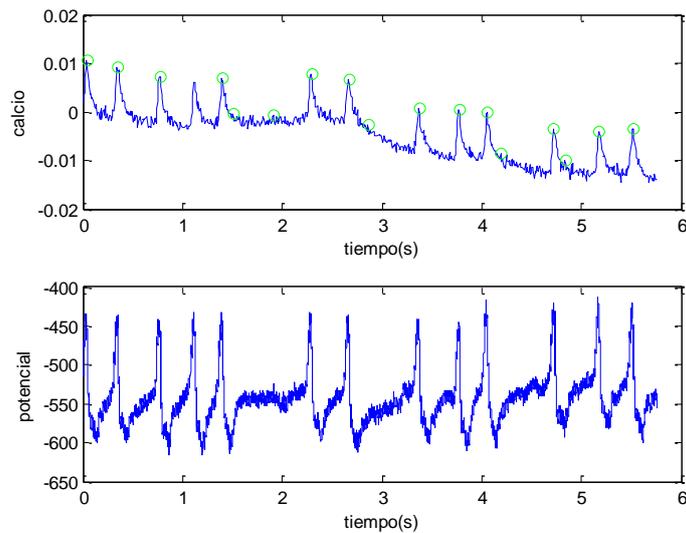


Ilustración 49 Secuencia 3. Imágenes analizadas:720

La secuencia de imágenes 4 se representa en la Ilustración 50. La señal de calcio de esta secuencia está constantemente oscilando periódicamente. En este tipo de señales el algoritmo funciona y detecta únicamente los eventos de interés.

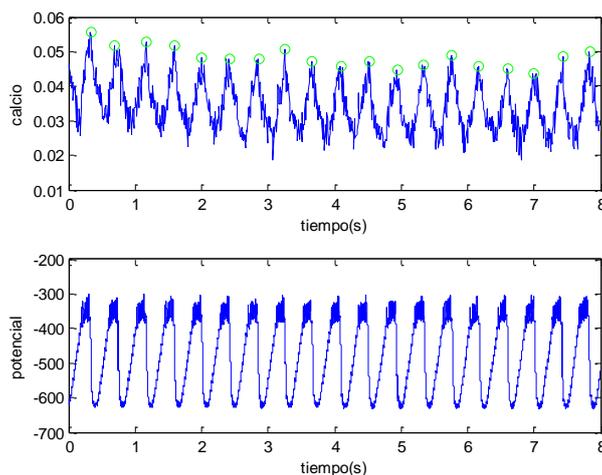


Ilustración 50 Secuencia 4. Imágenes analizadas: 1000

Las figuras anteriores son ejemplos de los resultados obtenidos con este primer algoritmo simple. En ellas se puede observar que el algoritmo detecta los máximos de la señal de calcio (marcados con círculos verdes), sin embargo en varias de las señales se identifican falsos positivos. Surge la necesidad de implementar otro algoritmo de detección que evite este problema. Para ello utilizaremos la señal de potencial de membrana que tenemos registrada en un fichero de datos, y que sabemos que se captura de manera simultánea a la de calcio.

4.2.2.3 Algoritmo 2 - Detección de eventos a partir de la relación calcio-voltaje

A partir del estudio del estado del arte (ver capítulo 2.4.3), podemos saber que la señal de calcio y la de potencial de membrana están relacionadas en el tiempo. Se puede observar en las figuras presentadas hasta ahora en este documento que para cada pulso de potencial debe haber un máximo local en la señal de calcio.

El algoritmo descrito en este apartado se basa en la relación temporal calcio – potencial y tiene como objetivo detectar eventos en la señal de calcio. Para ello recorreremos la señal de voltaje y detectamos eventos en ella, una vez detectado un evento, pasaremos a buscar el evento relacionado en la otra señal, la de calcio.

Inicialmente este algoritmo se diseñó para detectar solamente los máximos locales de la señal de voltaje, y a continuación se buscaba el máximo correspondiente en la señal de calcio adaptando las escalas temporales de ambas señales. Con él se obtuvo buenos resultados para señales de potencial como el que muestra la Ilustración 51. Se trata de señales con poco ruido, y sencillas de tratar.

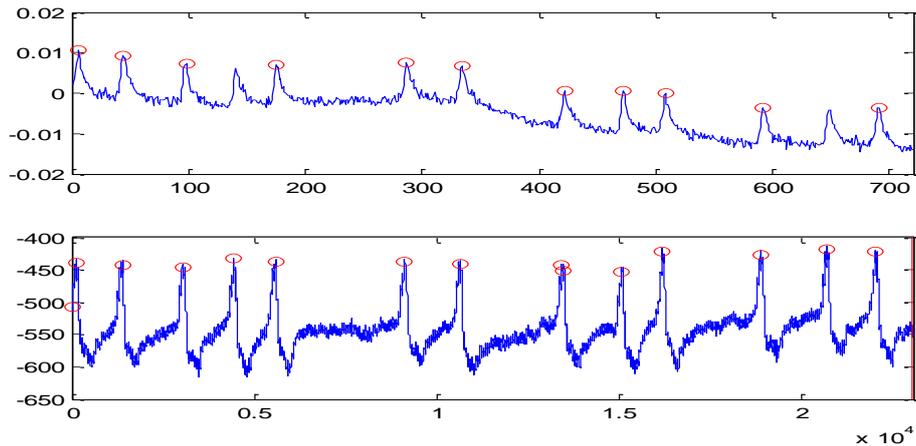


Ilustración 51 Detección máximos locales. Secuencia de 720 imágenes. Algoritmo Relación Ca-V. Nota: el eje horizontal representa el número de imagen en la figura superior, en la inferior se muestra la escala del potencial (1:32)

Sin embargo, en muchos casos de prueba detectaba falsos eventos en la señal de potencial obteniendo así máximos locales en la señal de calcio que no correspondían. La mejora desarrollada para solucionar este problema es detectar solamente los máximos de voltaje que vayan seguidos de un mínimo local.

Funcionamiento del algoritmo

El algoritmo utiliza ventanas de tamaño fijo de duración 2 capturas de imágenes. Si la frecuencia de captura de imágenes es 125 por segundo, la ventana tiene una duración temporal de $8\text{ms} \times 2 = 16\text{ ms}$, en los casos en que la frecuencia de captura es 40 imágenes por segundo la duración será de $25\text{ms} \times 2 = 50\text{ ms}$.

Mediante un sistema de banderas se alterna la búsqueda de un mínimo y un máximo, de esta forma no se detecta falsos eventos. Por ejemplo, si un mínimo se repite varias veces seguidas el algoritmo solo detectará el primero, y a continuación buscará un máximo.

Cuando se inserta un nuevo valor en el vector de máximos de potencial (V), automáticamente se busca el máximo de la señal de calcio entre los últimos dos índices de máximo en V consecutivos. Para ello debemos adaptar la escala temporal de ambas señales (por ejemplo 32 puntos de potencial por cada imagen).

Para identificar un punto del voltaje como mínimo o máximo debe superar un valor umbral que se va calculando a medida que se va cargando la señal de potencial.

Cálculo de umbrales

A medida que se va cargando la señal de potencial, se calcula la media y la desviación típica de los puntos anteriores de esta señal. El algoritmo considera

mínimo o máximo al valor que sea menor o mayor respectivamente que un umbral.

El cálculo del umbral ha supuesto un problema debido a la variedad de señales de voltaje con las que se ha trabajado. Para establecer los umbrales se tiene en cuenta la media y la desviación típica de todos los puntos anteriores al actual. Además, se debe calcular la desviación de los últimos puntos (lo hacemos con los 128 puntos anteriores al actual) para que el algoritmo funcione también en aquellos casos en que la señal de voltaje varíe durante toda la serie temporal excepto en pequeños tramos en los que sólo presenta pequeñas variaciones (se muestra un ejemplo en la Ilustración 53).

La elección del umbral se realiza por lo tanto, en función de las variables “media de la señal de potencial anterior”, “desviación típica de potencial anterior” y “desviación típica de los últimos 128 puntos del potencial” y mediante un sistema de banderas que permite que sólo se busque un umbral mínimo o máximo de forma alterna.

Nos hemos encontrado con señales de potencial muy variadas, por lo que el algoritmo diferencia varios casos posibles en función de la desviación típica de la señal. En cada uno de ellos el umbral se calcula a partir de las variables mencionadas de una manera distinta.

La elección de los valores de desviación típica que distinguen cada uno de los casos se ha realizado de forma empírica. Se ha probado el funcionamiento del algoritmo variando los valores y se decidió utilizar estos finalmente, por conseguir llegar a los mejores resultados con la mayoría de las secuencias estudiadas. Los valores utilizados en el algoritmo están indicados en la Ilustración 52.

Para cada uno de los casos, se compara el valor del voltaje con el umbral definido, para comprobar si es o no un mínimo local. Si detectamos un mínimo local, la bandera de buscar umbral cambia, y deja de buscar otro; pasamos a buscar un máximo.

La Ilustración 52 muestra de forma esquemática este algoritmo completo.

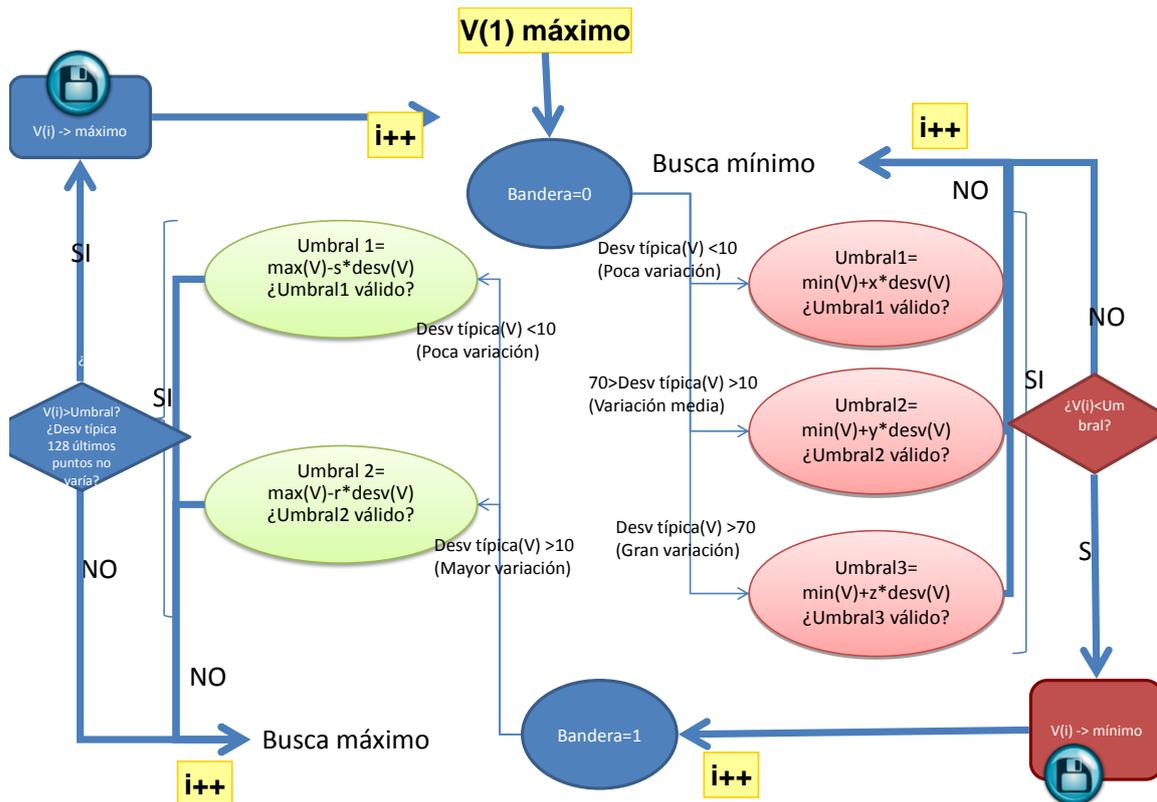


Ilustración 52 Esquema algoritmo detección máximos en la señal de calcio a partir de la relación calcio-potencial.

Otro posible caso de uso que nos encontramos al ejecutar este algoritmo es sobre señales de voltaje con alta desviación típica y que presentan zonas de variaciones menores. En este tipo de señales es importante tener en cuenta la variable “desviación típica de los últimos 128 puntos” para que la desviación de la señal completa no varíe demasiado alterando los umbrales. Un ejemplo se muestra en la Ilustración 53, entre los puntos 5.000 y 10.000. En este caso, al encontrarnos entre los puntos 5.000 y 10.000 la desviación típica de la señal completa disminuye con respecto a los valores anteriores. Si no utilizásemos la desviación de sólo los últimos puntos para detectar que nos encontramos en una zona de pequeña variación dentro de una señal de desviación típica alta para elegir casos de elección de umbral diferente, como la desviación de la señal completa habrá disminuido, el umbral del mínimo que debe detectar alrededor del 9000 sería demasiado pequeño y este mínimo no se detectaría.

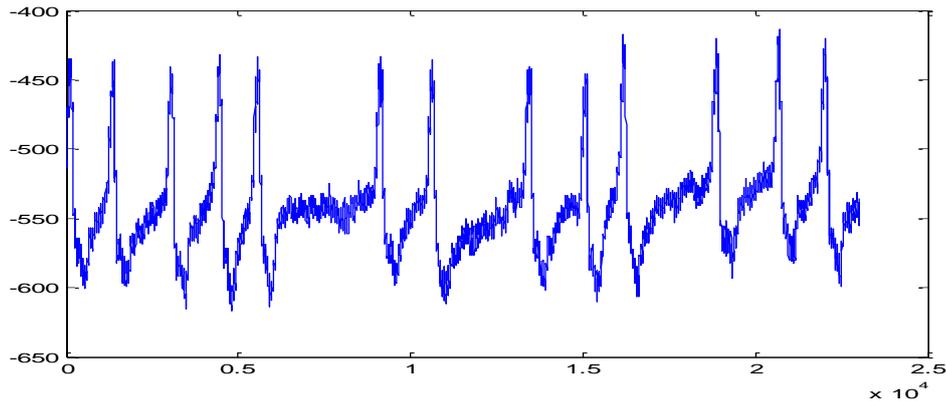


Ilustración 53 Señal de potencial con zonas de pequeñas oscilaciones.

Como se puede intuir, durante los primeros valores de potencial la media y desviación obtenidas no son fiables ya que se realizan con muy pocos puntos.

El primer valor de potencial se marca como máximo de forma forzada por el algoritmo, de forma que se comience buscando un mínimo. Esto no supone ningún problema ya que, si la señal comienza disminuyendo, se detectará el primer mínimo y se continúa sin problemas. Si la señal comienza aumentando y el primer pico es un máximo, el algoritmo no lo detectará, seguirá hasta que encuentra el mínimo, y a continuación el siguiente máximo. Una vez que el vector de máximos de V tiene dos valores, $V(1)$ y el último mencionado, se podrá buscar el evento en la señal de calcio entre estos dos índices. Para que quede claro este caso, se ilustra con la siguiente figura. Podemos ver que no se pierde ningún máximo de calcio aunque no se detecte el primero de voltaje.

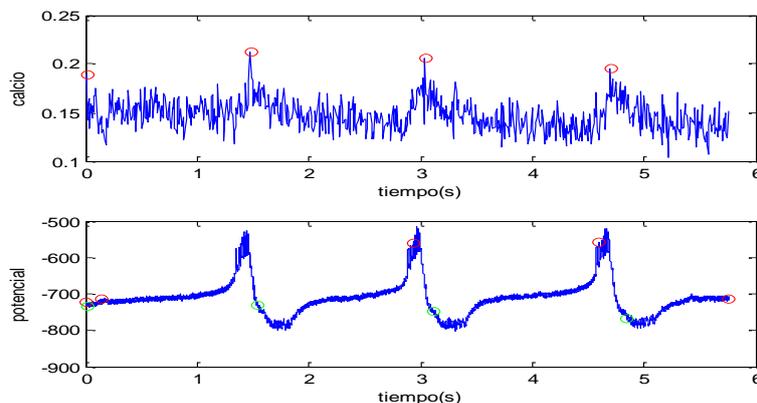


Ilustración 54 Algoritmo detección eventos. Señal de calcio y potencial. Ejemplo que ilustra el caso en que el algoritmo no detecta el primer máximo en potencial.

A medida que se obtiene un nuevo índice de máximo en V , el algoritmo busca un máximo en calcio, por lo que el retardo de este algoritmo depende de la separación de los máximos en la señal de potencial.

En pasos posteriores aplicaremos este algoritmo para actuar sobre la muestra, o en concreto sobre los LED iluminadores en función de los eventos detectados. La

detección de eventos en el voltaje anteriores a un evento en la señal de calcio, que es lo que nos interesa obtener finalmente, nos va a permitir mejorar en futuros experimentos el estado de las neuronas teñidas durante tiempos de mayor duración ya que podremos reducir el tiempo en que la muestra está expuesta a la luz de la cámara CCD (ver capítulo 4.3).

4.2.2.4 Pruebas y resultados

En las figuras que se muestran en este apartado (Ilustración 54, Ilustración 55, Ilustración 56, Ilustración 57) se representa la señal de calcio en la parte superior y la señal de potencial de membrana en la inferior.

Se ha adaptado la escala temporal de ambas señales, por lo que las figuras las representan de forma simultánea en el tiempo. En ellas se puede apreciar que ambas señales están relacionadas. Si la señal de voltaje presenta un evento (por ejemplo un máximo local), en la de calcio ocurre lo mismo.

En las siguientes figuras se marca con círculos rojos los máximos locales de ambas señales, obtenidos con el algoritmo y con círculos verdes los mínimos de la señal de potencial detectados por el algoritmo.

En la Ilustración 55 se puede apreciar que el algoritmo es robusto frente a señales de calcio con una deriva notable.

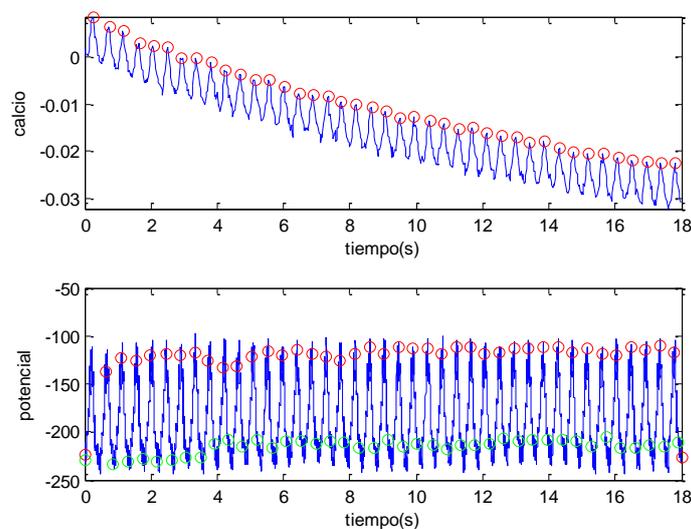


Ilustración 55 Secuencia 1. Imágenes analizadas:720

La Ilustración 56 presenta variación de deriva durante la secuencia. Alrededor del segundo 10, la pendiente disminuye para volver a aumentar más tarde. Podemos observar que el algoritmo sigue detectando los picos en esta zona a pesar de los cambios de deriva.

Los primeros puntos de las señales generan falsos positivos. Como se ha comentado, se fuerza a iniciar la secuencia con un máximo, y los primeros cálculos se hacen con pocos puntos para calcular las variables de forma fiable.

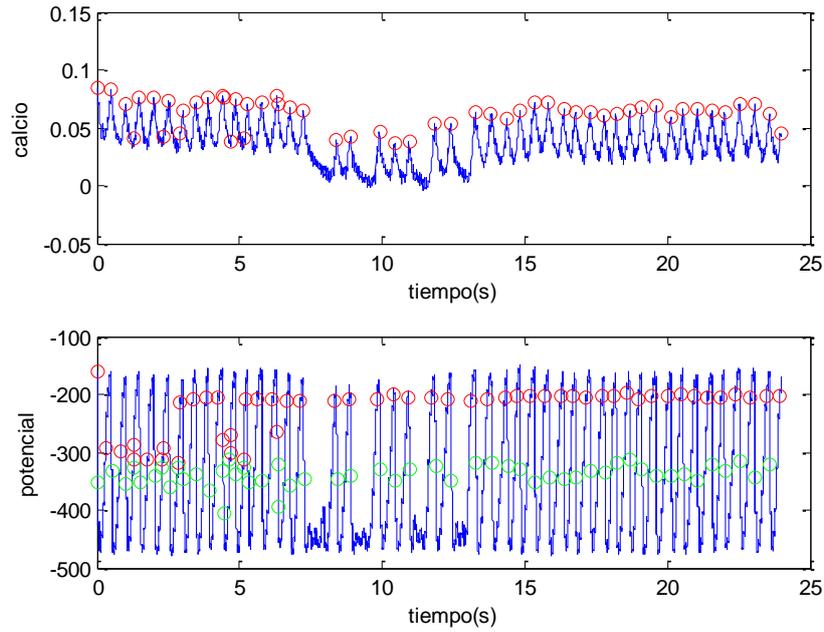


Ilustración 56 Secuencia 2. Imágenes analizadas:3000

La Ilustración 54 presenta una señal de calcio con mucho ruido. Se puede apreciar cómo el algoritmo implementado detecta los eventos significativos, alrededor de los segundos 1,5, 3 y 4,5, inmediatamente después de haber detectado un pico en la señal de potencial.

La Ilustración 57 muestra una señal de calcio con poco ruido. El algoritmo detecta todos los máximos locales de la señal de calcio. Podemos observar que los eventos en la señal de potencial no se detectan exactamente en el instante del máximo/mínimo, sin embargo, esto no afecta a la detección de los máximos en el calcio.

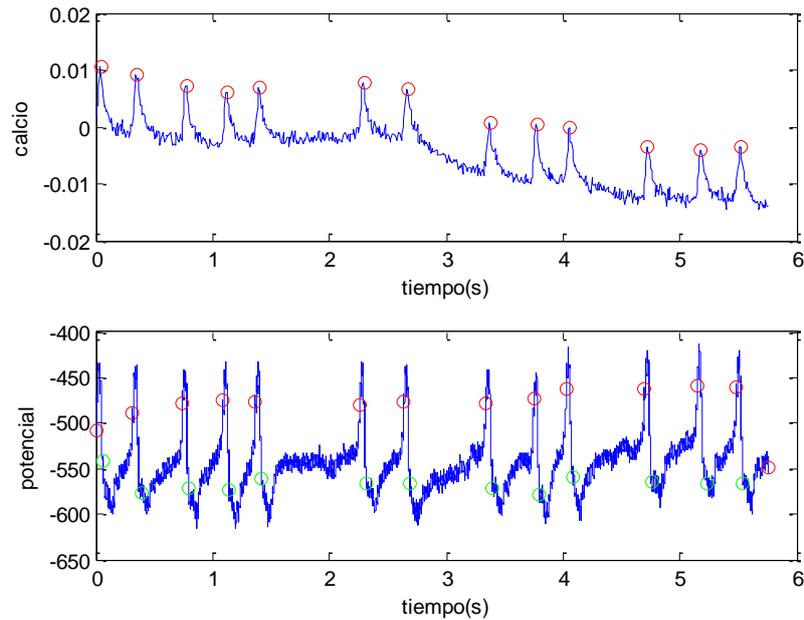


Ilustración 57 Secuencia 4. Imágenes analizadas:720

En las figuras podemos observar que este algoritmo es robusto frente a la deriva de las señales.

La elección de los umbrales en algunos de los casos hace que los eventos no se detecten en el instante del cambio de pendiente. Una posible mejora a este algoritmo podría ser introducir un número mayor de casos de cálculo de umbrales en función de la variación de la señal.

4.2.3 Algoritmo detección del onset de calcio.

4.2.3.1 Algoritmo 3 - Detección del onset con ventana deslizante en la señal de calcio

Se desarrolla un algoritmo similar al descrito en el apartado 4.2.2.3, pero en este caso se recorre la señal de calcio. El objetivo de este algoritmo es detectar los mínimos y máximos consecutivos de la señal de calcio con el fin de identificar las zonas de *onset*.

Como se explicará en apartados posteriores, puede ser interesante obtener las zonas de onset de la señal de calcio para iluminar la neurona solamente en dichos eventos. El algoritmo permite activar y desactivar el iluminador reduciendo el tiempo de exposición a la luz de la neurona teñida bajo estudio.

El funcionamiento del algoritmo se describe a continuación:

Mediante una ventana de tamaño fijo que depende de la frecuencia de la captura de imágenes ($5 \cdot \text{tiempo captura de imagen}$) se recorre la señal de calcio y se detectan de forma alterna un pico máximo y un pico mínimo. Para conseguir esta

alternancia se utiliza una bandera que habilita la búsqueda de uno u otro evento.

A continuación, con los eventos ya detectados, se calcula la diferencia entre el valor del último máximo y el del mínimo. Se calcula el máximo de todas las restas anteriores y la actual y se comprueba si la actual es mayor que el 80% de la resta máxima.

En caso de cumplir esta condición se dan por válidos los valores mínimo y máximo de la señal de calcio. El siguiente esquema de la Ilustración 58 resume el algoritmo.

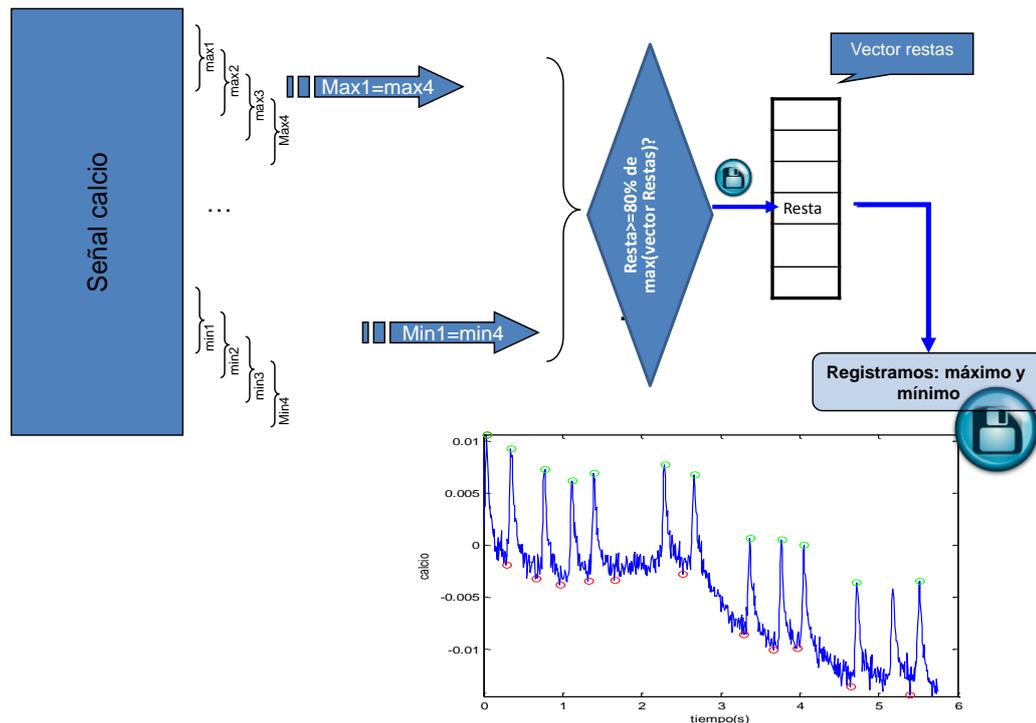


Ilustración 58 Esquema del algoritmo detección onset en la señal de calcio implementado

Ilustramos este algoritmo con la siguiente detección sobre una señal de 720 muestras con una frecuencia de captura de imágenes de 125 imágenes por segundo. Ver Ilustración 59.

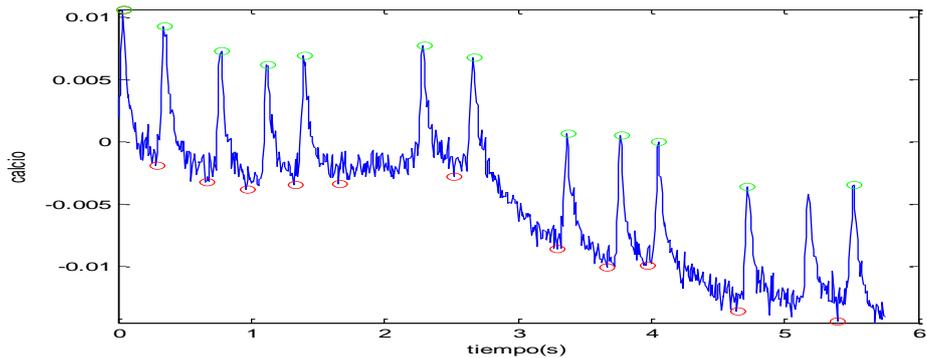


Ilustración 59 Detección onset en la señal de calcio

El algoritmo implementado se empleará en la etapa de control de la iluminación dependiente de los eventos detectados (capítulo 4.3), en la que nos interesará conocer en qué momento comienza el *onset* de la señal, para iluminar en ese instante la neurona. En concreto, en el experimento de validación que realizamos en este proyecto, al detectar un mínimo en la señal de calcio activaremos el *shutter* que controla el iluminador de la muestra y lo desactivaremos al detectar el máximo. Iluminamos así la neurona solamente durante el tiempo de *onset* y reducimos considerablemente el tiempo de exposición a la luz. Esto resulta beneficioso ya que el tinte que se inyecta previamente a la neurona resulta tóxico para ella si está expuesto a la luz durante un tiempo prolongado.

4.2.3.2 Pruebas y resultados

En este apartado se muestran las figuras obtenidas al ejecutar el algoritmo descrito en el capítulo 4.2.3.1 Algoritmo detección del onset de calcio.

La parte superior de las figuras muestra la señal de calcio con los eventos detectados. La parte inferior de las figuras muestra una señal que puede tener valor 0V o 5V. Tendrá valor 5V entre un mínimo y un máximo detectados en la señal de calcio, el resto del tiempo tendrá valor 0V. Esta señal será la que se enviará al iluminador de la muestra bajo estudio. Si la señal tiene valor 5V la luz se enciende, y cuando pasa a 0, se apaga. Ver capítulo 4.3.

Se puede observar que se reduce el tiempo de iluminación, ya que, en lugar de permanecer encendido el iluminador durante toda la secuencia, presenta instantes en los que la neurona teñida no está iluminada. Sin embargo, se aprecia que en algunos casos se pierde iluminación de la muestra durante los instantes de onset de calcio.

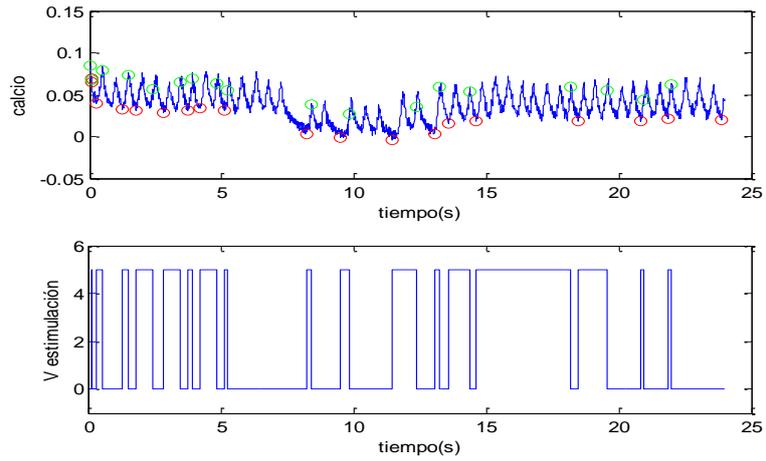


Ilustración 60 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas: 720. Captura de 125 imágenes/s.

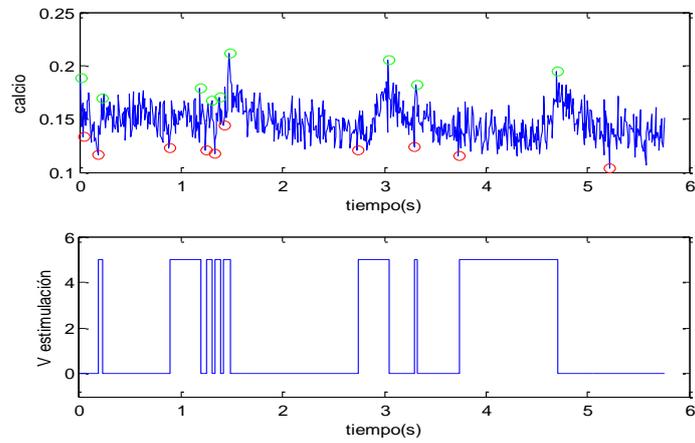


Ilustración 61 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas: 720. Captura de 125 imágenes/s.

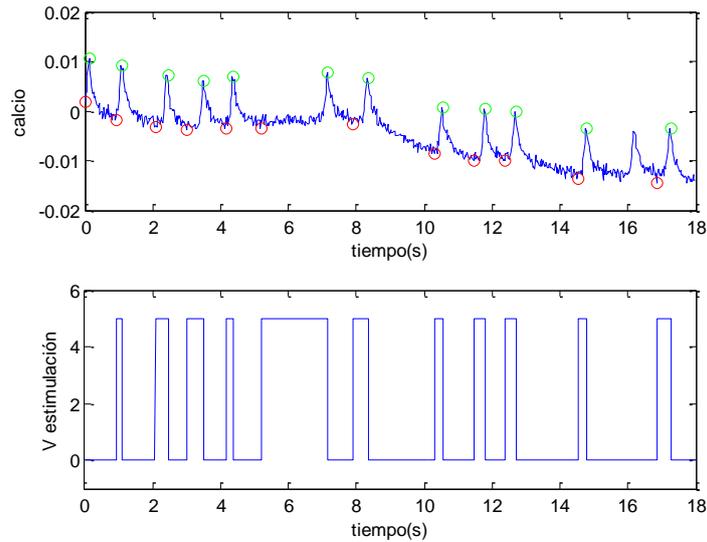


Ilustración 62 Detección del onset calcio. Imágenes analizadas:720. Captura de 40 imágenes/s.

4.2.3.3 Algoritmo 4 - Detección del onset a partir de la relación calcio – voltaje

En el apartado 4.2.2.3 de este documento se describe el algoritmo de detección de eventos en la señal del potencial de membrana. Además se puede apreciar la relación entre la señal de calcio y la de potencial.

Dado que ya conocemos la relación entre ambas señales, utilizaremos el algoritmo implementado para detectar las zonas de onset del calcio.

Los eventos detectados en la señal de potencial activan/desactivan la señal enviada al shutter del iluminador de la cámara. En concreto, un mínimo en la señal de potencial lo activa y al detectar el siguiente máximo se desactiva. Podremos observar que de esta forma la muestra es iluminada en las zonas de onset del calcio.

4.2.3.4 Pruebas y resultados

El algoritmo descrito en el apartado anterior se ha utilizado para iluminar la muestra de las neuronas. Como ya se ha explicado se emplea la señal de voltaje para detectar eventos y se activa la señal que se envía al shutter del iluminador para detectar las zonas de onset de la señal del calcio.

En las siguientes figuras se representa en la parte superior la señal de calcio, y en la parte inferior la señal de 0 o 5 V que se genera a partir de este algoritmo.

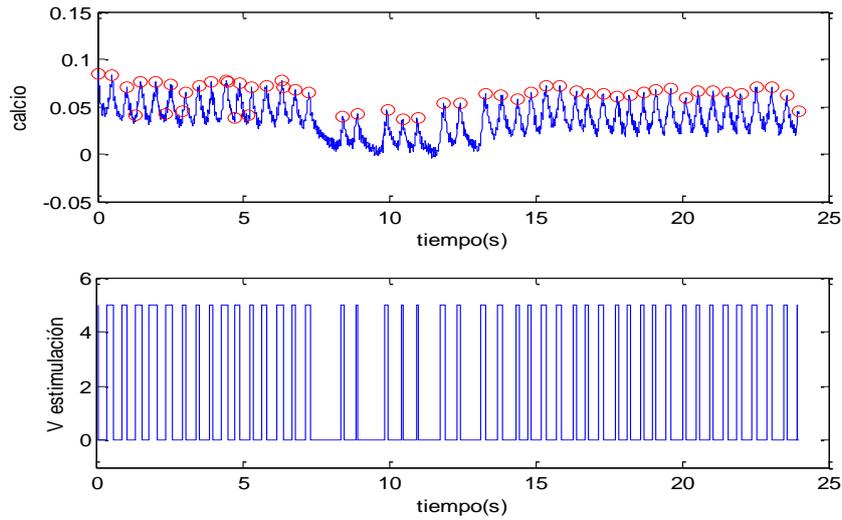


Ilustración 63 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.

La siguiente Ilustración 64 es un ejemplo de secuencia con picos máximos separados un par de segundos. En estos casos el algoritmo permite reducir considerablemente el tiempo de iluminación.

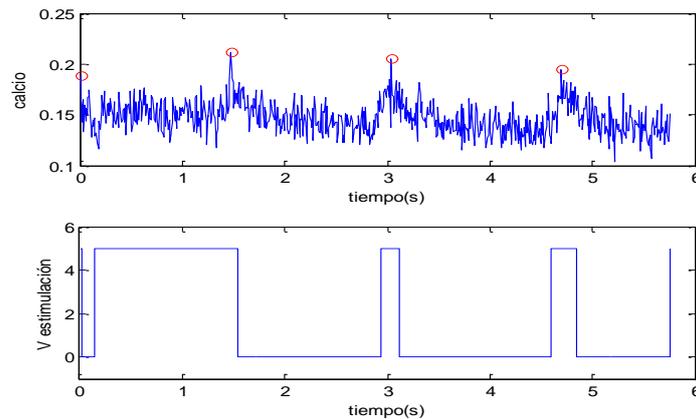


Ilustración 64 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.

En señales poco ruidosas (Ilustración 63, Ilustración 65) la iluminación se reduce considerablemente centrándose en los instantes de onset.

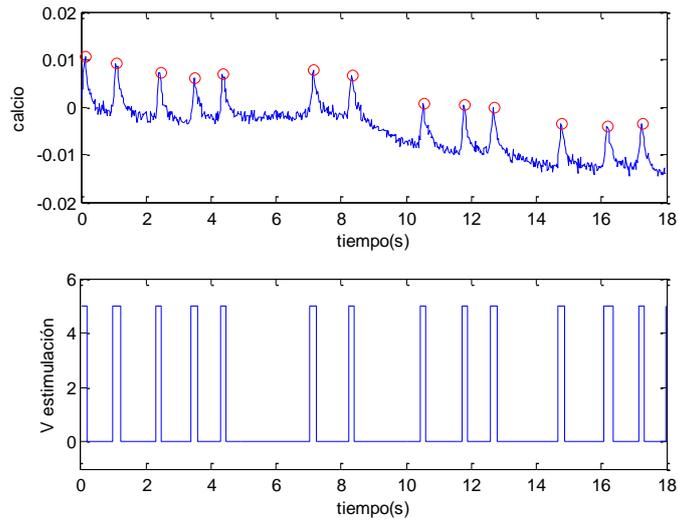


Ilustración 65 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 32 puntos de V/ punto de Ca

En las señales que oscilan constantemente, el tiempo de iluminación también se reduce como muestran la Ilustración 66 y la Ilustración 67.

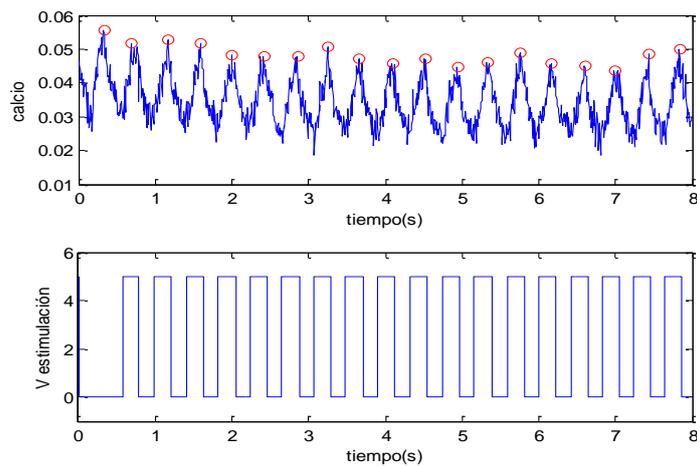


Ilustración 66 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 3000. 8 puntos de V/ punto de Ca.

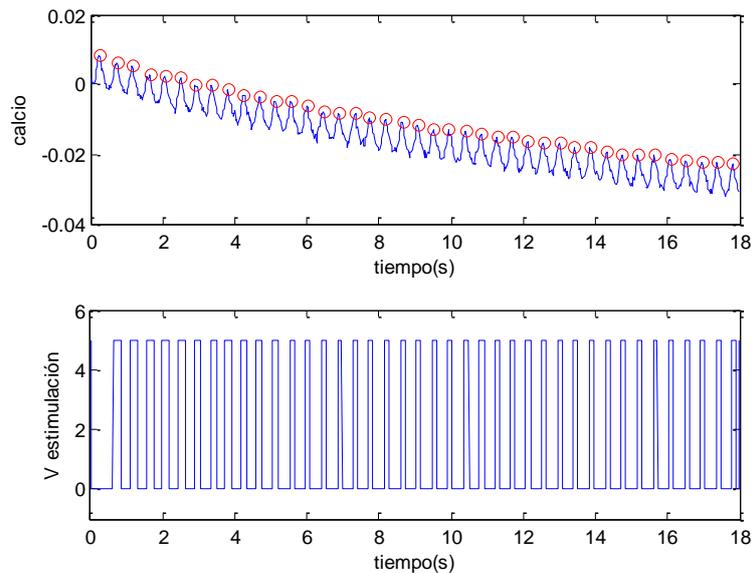


Ilustración 67 Detección del onset a partir de relación Ca-V. Imágenes analizadas: 720. 32 puntos de V/ punto de Ca.

Como se puede apreciar en las figuras anteriores el tiempo de exposición a la luz se reduce con respecto al anterior algoritmo, y cumple el objetivo de iluminar durante la zona de onset de calcio.

Se puede concluir a partir de todos los resultados obtenidos que el algoritmo que mejor funciona en la mayoría de las pruebas es el que combina información de las dos señales, calcio y potencial de membrana. Con este algoritmo conseguimos además reducir el tiempo de exposición a la luz de la neurona bajo estudio controlando el iluminador de la cámara.

4.2.4 Elección de la región de interés

En cada una de las imágenes de las secuencias con las que trabajamos se elige la zona de mayor intensidad, es decir, la zona en la que hay mayor concentración de calcio, de forma que se aprecien con mayor claridad las variaciones de concentración de este ion en la secuencia. Los algoritmos trabajarán únicamente sobre los píxeles de la región de interés. La elección de esta zona de la imagen se puede realizar de forma manual, o automática como se explica a continuación.

La Ilustración 68 muestra un ejemplo de una imagen de una de las secuencias empleadas en las pruebas de los algoritmos. En ella se puede ver el soma de la neurona seleccionado con el cursor de forma manual.

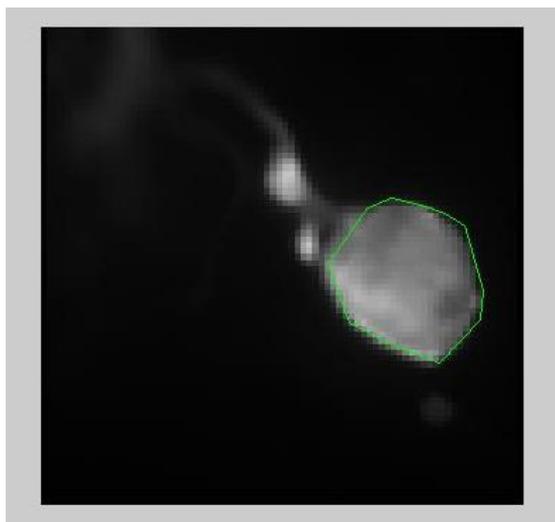


Ilustración 68 Imagen neurona. Elección manual de la región de interés

4.2.4.1 Elección de la región de interés manual

Este tipo de detección de la región de interés se ha empleado en imágenes como la ilustración 68, en las que se puede identificar fácilmente la zona de mayor intensidad por los colores de los píxeles. En ellas se puede observar claramente la forma del soma de la neurona, y seleccionarlo con el cursor. Los algoritmos se aplicarán sobre los píxeles dentro de la región elegida en cada una de las imágenes de las secuencias con las que se trabaja.

4.2.4.2 Elección de la región de interés automática

Otras imágenes con las que hemos trabajado no tienen tan claramente diferenciada y aislada la parte en la que la concentración de calcio, es decir, la fluorescencia varía con el tiempo, por lo que hemos establecido un umbral de intensidad a partir del cual, los píxeles entran en la ROI.

El umbral ha sido elegido después de varias pruebas con varias secuencias de imagen, de forma que las señales resultantes tengan la forma deseada, es decir, la forma que más se asemeje a la señal real obtenida en *Neuroplex* (ver capítulo 3.3).

4.3 Interacción con la muestra bajo estudio

Como se ha mencionado, el esquema de funcionamiento de los algoritmos descritos debe ser aplicable a sistemas en tiempo real, estableciendo un bucle cerrado de control en función de los eventos detectados. Para ello, creamos protocolos de control dependientes de la actividad detectada por los algoritmos descritos en los apartados 4.2.3.1 y 4.2.3.3.

Por otra parte, como ya se ha mencionado también en el apartado que describe los experimentos de captura de imágenes (capítulo 4.1), a las muestras que utilizamos se les inyecta un tinte fluorescente. Este tinte resulta tóxico para la neurona en presencia de luz. Es interesante por lo tanto que la luz de la cámara que toma las imágenes esté encendida el menor tiempo posible, para así

conseguir alargar la vida útil de las neuronas que estudiamos. En este capítulo se describe cómo se han utilizado los algoritmos implementados para conseguir reducir el tiempo de exposición a la luz. En particular, se describirá el experimento en el que se prueba el algoritmo de estimulación dependiente en un entorno en tiempo real.

El ordenador utilizado para realizar el experimento, está conectado a una tarjeta de adquisición de datos con dos canales de salida, 0 y 1. Conectaremos el canal 0 de salida al controlador del *shutter* (controla la cantidad de tiempo que el CCD está recibiendo luz) de la cámara CCD de forma que podamos enviarle pulsos de 5V cuando se quiera activar para iluminar la muestra.

La aplicación con la que se realiza el proceso de estimulación dependiente de los eventos detectados es el *RTBiomanager* (Muniz et al., 2009). A continuación se muestra la interfaz del estimulador que utilizamos en una de las pruebas realizadas. Podemos ver algunos parámetros de interés que se han debido tener en cuenta para la correcta estimulación en el tiempo adecuado:

- la frecuencia del tratamiento de los datos: 10 KHz. Debemos por tanto adaptar la señal de estimulación generada a esta escala de tiempo.

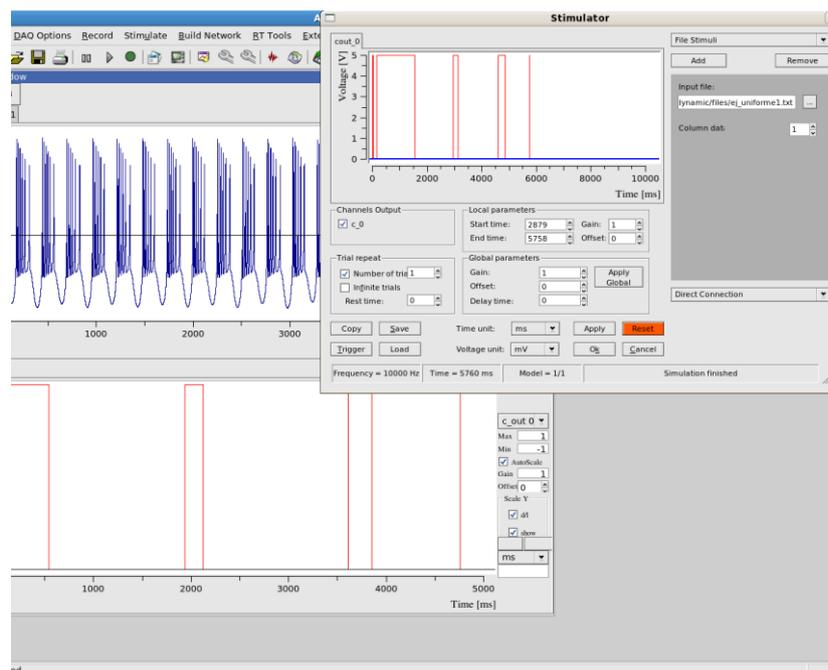


Ilustración 69 Detección de eventos. RTBiomanager. Stimulator

El proceso de estimulación o actuación dependiente que realizamos se describe a continuación.

4.3.1 Experimento para la validación de los algoritmos: Iluminación entre eventos consecutivos detectados en la señal de calcio y en la señal de potencial.

La señal de calcio obtenida a partir de las imágenes se va registrando, así como la señal de potencial de la neurona. A partir de estas dos señales, utilizaremos los algoritmos implementados (ver 4.2.3.1 y 4.2.3.3) para detectar el instante en que se debe comenzar y detener la iluminación de la neurona, reduciendo el tiempo de exposición a la luz, dependiendo de la actividad que nos interese estudiar.

A partir del algoritmo de detección de eventos basado en la relación calcio-potencial (capítulo 4.2.2.3), podemos enviar la señal para iluminar y solamente cuando sabemos que va a aparecer un evento en la señal de calcio. De esta manera, cada vez que detectamos un evento con nuestro algoritmo en la señal de potencial (un máximo en la señal de potencial) se lanza un pulso de 5 V al controlador del *shutter* de la cámara CCD y se abre el *shutter* de la cámara que ilumina las neuronas. Sabemos que a continuación de un máximo en el potencial, debe aparecer un máximo en el calcio, por lo que lo dejamos abierto un tiempo durante el cual la luz está encendida y registramos la señal de calcio de la muestra durante este periodo de tiempo. Una vez transcurrido el tiempo, la luz se apaga. De esta manera, reducimos el tiempo en que la muestra teñida se encuentra expuesta a la luz. El algoritmo sigue ejecutándose hasta que finaliza la captura de las imágenes.

Para simular el tiempo real se introduce la señal de calcio en la aplicación RTBiomanager. Esta aplicación envía la señal de 5V al shutter de la cámara con precisión temporal de ms.

También es interesante registrar las zonas de *onset* de la señal de calcio. A partir del algoritmo de detección de *onset* descrito (capítulo 4.2.3.1), podemos controlar la iluminación, comenzando a iluminar la neurona cuando se detecta un mínimo y cerrando el *shutter* al llegar al siguiente máximo. A continuación se muestra un ejemplo del control de la iluminación, utilizando este algoritmo.

Con la ejecución de este apartado conseguimos reducir el tiempo de exposición a la luz de las neuronas y cerramos el bucle de control que nos interesa para aplicaciones de estudio de la actividad neuronal.

4.3.2 Diagrama bloques señales de entrada y salida

El siguiente esquema (Ilustración 70) representa el bucle cerrado de control de la iluminación del sistema biológico, en función de los eventos detectados en su actividad que resume todo lo implementado en este proyecto.

En el esquema se aprecia el bucle cerrado particularizado al caso específico de los algoritmos y experimentos realizados en este proyecto.

Por un lado se muestra el control de iluminación que llega a la muestra bajo estudio.

A medida que se capturan imágenes los algoritmos se ejecutan y obtienen los eventos de interés de las señales obtenidas a partir de dichas imágenes. De esta manera se actualiza el estado de las variables.

Al actualizar las variables se genera una actualización en el estado de la iluminación, por ejemplo los umbrales calculados en el esquema de la Ilustración 52, consiguiendo así el objetivo deseado. De esta manera conseguimos cerrar el bucle entre el sistema y la muestra bajo estudio.

Un ejemplo del control de la iluminación se muestra en los siguientes vídeos.

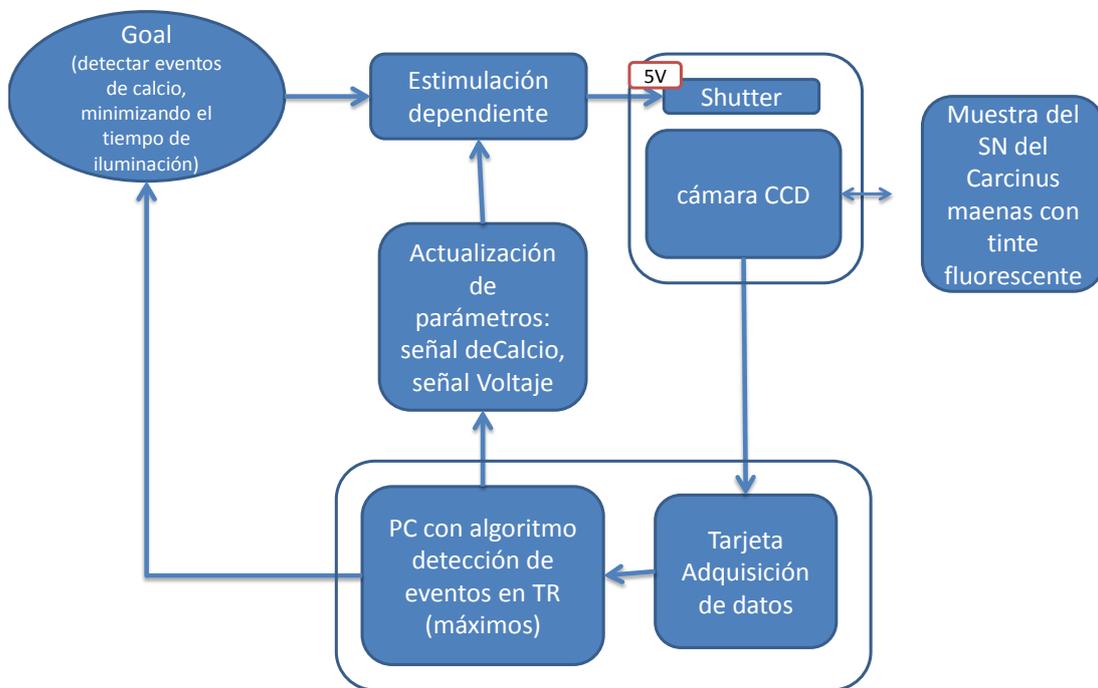


Ilustración 70 Diagrama de bloques bucle cerrado para la detección de eventos en la señal de calcio minimizando el tiempo de iluminación de la muestra a través de la estimulación dependiente

4.3.3 Práctica de control del shutter de la cámara

A continuación se describen las pruebas que se han realizado para activar el *shutter* de la cámara a partir de los eventos detectados. Comprobamos que la salida del *RTBiomanager* es de 5V, para ello ha sido necesario calibrarla.



Ilustración 71 Osciloscopio y tarjeta de datos del laboratorio del GNB

A continuación conectamos la salida 0 de la tarjeta de datos, a la que llega la señal del *RTBiomanager*, al controlador del *shutter* que se encuentra en el modo “controlado por una señal externa”.

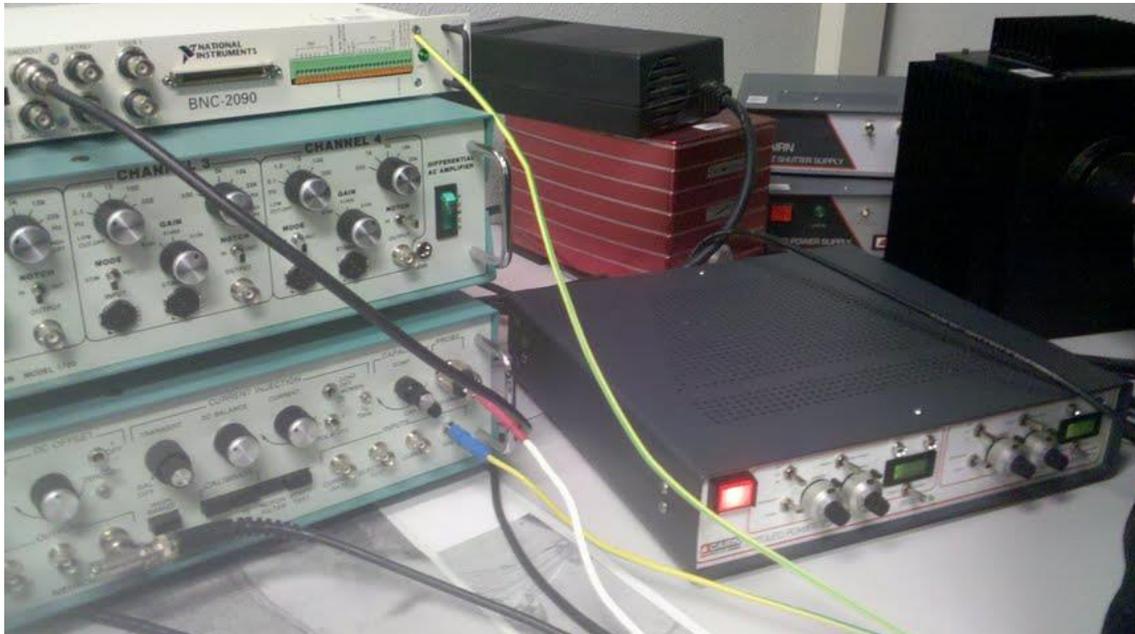


Ilustración 72 Tarjeta de datos conectada al shutter de la cámara

Al entrar 5V al dispositivo, éste abre el *shutter* y la luz que ilumina la muestra se enciende. A continuación se muestra un ejemplo de señal que utilizaremos para la validación de la estimulación por detección de eventos. Estas señales de valor 5 ó 0 se generan a partir de los algoritmos desarrollados.

En concreto la señal de la imagen anterior corresponde a la ejecución del algoritmo de detección de eventos en la señal de potencial de membrana.

Generamos la señal de potencial de estimulación ($V_{estimulación}$) de la figura Ilustración 63 en un fichero de texto y lo cargamos en la herramienta Stimulator del *RTBiomanager*.

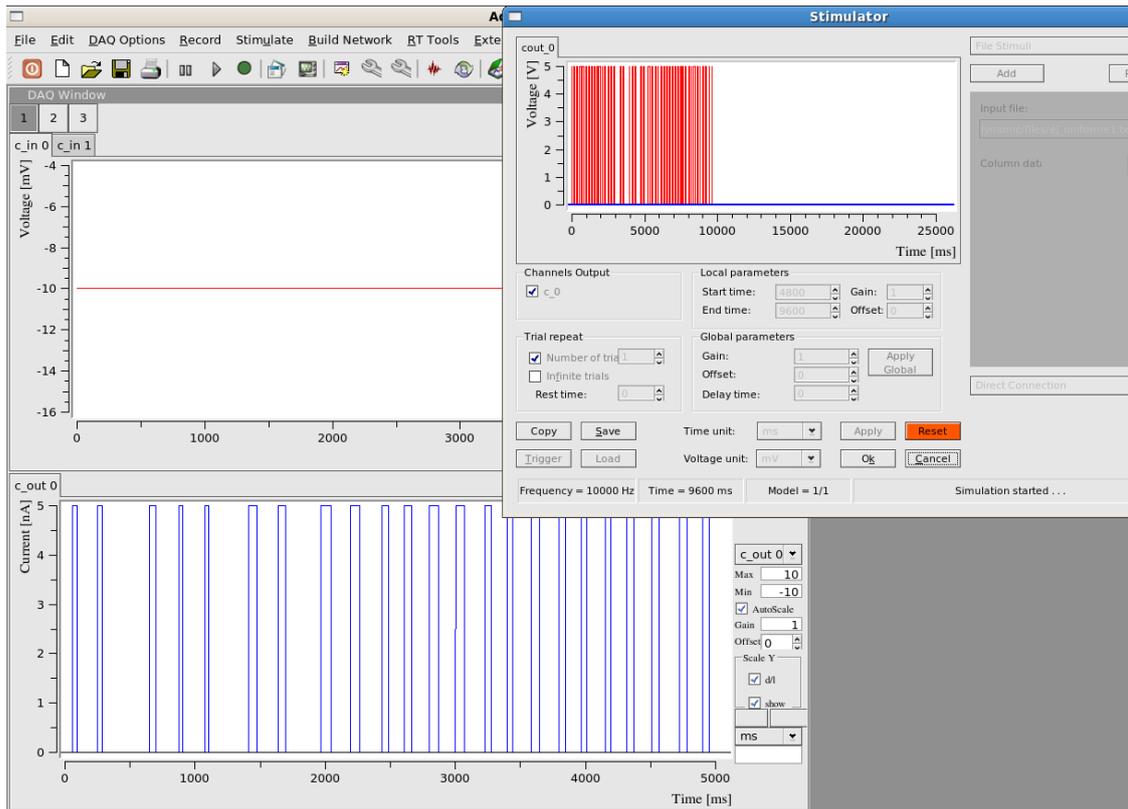


Ilustración 73 RTBiomanager: estimulación dependiente de los eventos detectados.

Podemos ver la alternancia de la luz encendida y apagada.



Ilustración 74 Muestra iluminada

El tiempo que la luz está encendida está determinado por la duración de la señal a 5V que hemos obtenido con los algoritmos ya descritos. Durante este tiempo se capturarán imágenes, los datos de éstas se reciben y se sigue ejecutando el algoritmo con ellas.

La práctica de control del *shutter* de la cámara se ha grabado en vídeo. Algunas de las pruebas se pueden ver en los siguientes enlaces:

- Vídeo que muestra los equipos utilizados para la prueba disponibles en el laboratorio: <https://youtu.be/3Oj1SUBurp0>
- Vídeo de control de la iluminación correspondiente a la señal de la Ilustración 64: <https://youtu.be/mbW0n1hTNN8>

- Vídeo de control de la iluminación correspondiente a la señal de la Ilustración 65: <https://youtu.be/htWAUBLGQF8>

En los vídeos se puede observar la activación del *shutter* y la iluminación en las zonas de 5V de las señales generadas por el algoritmo.

5 Conclusiones y trabajo futuro

Este proyecto ha requerido un estudio del estado del arte en un amplio abanico de especialidades como la neurociencia, la biología, el tratamiento de imágenes médicas offline y en tiempo real, etc.

La obtención de las imágenes de neuronas se ha llevado a cabo en el laboratorio del GNB y el tratamiento de las mismas con los algoritmos implementados. Estos algoritmos son capaces de trabajar con señales reales del sistema nervioso, altamente no lineales y con escalas temporales diferentes y permiten detectar eventos significativos en ellas. Son algoritmos sencillos ya que deben poder emplearse en detecciones en tiempo real.

Los algoritmos de detección de eventos implementados son robustos frente a la deriva de las señales, y permiten registrar distintos eventos de interés que serán empleados en la estimulación de la muestra bajo estudio.

Los algoritmos implementados además permiten trabajar con señales de variación lenta y rápida simultáneamente. Se ha aprovechado la relación entre distintas señales biológicas (señal de calcio y potencial de membrana) para la detección de eventos de forma simultánea en ambas señales.

Los resultados obtenidos demuestran que los algoritmos detectan el 80% o 90% de los eventos de las señales. Se trata de un porcentaje aceptable dado que no es crítico detectar todos los eventos de la señal. En algunos tipos de señales se puede llegar al 100%. Es importante recalcar la gran variabilidad en las características de las señales en los distintos registros *in vitro*.

En el desarrollo del proyecto se ha completado además el bucle cerrado de control en función de la actividad registrada que se establecía como principal objetivo al inicio de este documento. Se ha conseguido un algoritmo de control de la iluminación de las neuronas en función de la actividad registrada que permite activar/desactivar el LED que actúa sobre el propio sistema biológico bajo estudio. Con esto se han realizado experimentos de validación de los algoritmos en los equipos disponibles en el laboratorio del GNB.

Como ya se ha mencionado, el objetivo de este estudio es el avance en la detección de eventos significativos en señales biológicas obtenidas *in vitro* para su uso en protocolos de observación y control dinámicos. Se pretende que este PFC sirva como base para futuros estudios que trabajen con sistemas biológicos en tiempo real, en bucle cerrado estímulo-respuesta.

Sería interesante introducir mejoras futuras que continúen con la línea de trabajo desarrollada:

- Mejorar la etapa de realización de experimentos: la dificultad a la hora de obtener neuronas válidas para experimentos de captura de imágenes de fluorescencia de larga duración limita el posible trabajo a realizar.
- Hacer los algoritmos más sofisticados, que contemplen todo tipo de oscilaciones en las señales de calcio y potencial incorporando filtros de bajo coste computacional.
- Generar algoritmos que calculen automáticamente los parámetros que diferencian los casos de cálculo de umbrales, y se adapten de esa forma a la actividad de cada neurona registrada.
- Se podría además mejorar la toma de decisiones basadas en eventos simultáneos en las dos señales para hacerlos más robustos.
- Validar estos algoritmos con otro tipo de control sobre la preparación más allá de los iluminadores, por ejemplo, mediante inyectores introducir en la neurona sustancias en función de los eventos detectados.
- Integrar los algoritmos en el entorno de tiempo real.
- La aplicación de los algoritmos desarrollados se puede generalizar a otras señales biológicas de interés en las que se desee detectar eventos en tiempo real para su uso en ciclos cerrados.

6 Bibliografía

- Arroyo, D., Chamorro, P., Amigó, J. M., Rodríguez, F. B., and Varona, P. (2013). Event detection, multimodality and non-stationarity: Ordinal patterns, a tool to rule them all? *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 222, 457–472. doi:10.1140/epjst/e2013-01852-9.
- Bandettini, P. A., Wong, E. C., Hinks, R. S., Tikofsky, R. S., and Hyde, J. S. (1992). Time course EPI of human brain function during task activation. *Magn. Reson. Med.* 25, 390–397. doi:10.1002/mrm.1910250220.
- Bergstrom, I., Seinfeld, S., Arroyo-Palacios, J., Slater, M., and Sanchez-Vives, M. V (2014). Using music as a signal for biofeedback. *Int. J. Psychophysiol.* 93, 140–9. doi:10.1016/j.ijpsycho.2013.04.013.
- Berman, B. D., Horovitz, S. G., Venkataraman, G., and Hallett, M. (2012). Self-modulation of primary motor cortex activity with motor and motor imagery tasks using real-time fMRI-based neurofeedback. *Neuroimage* 59, 917–25. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.035.
- Berridge, M. J. M. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 21, 13–26. doi:10.1016/S0896-6273(00)80510-3.
- Birbaumer, N. (2006). Breaking the silence: brain-computer interfaces (BCI) for communication and motor control. *Psychophysiology* 43, 517–32. doi:10.1111/j.1469-8986.2006.00456.x.
- Bouchelouche, P. N. (1993). Dynamic, real time imaging of ion activities in single living cells using fluorescence video microscopy and image analysis. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 214, 27–39.
- Van Boxtel, G. J. M., and Gruzelier, J. H. (2014). Neurofeedback: introduction to the special issue. *Biol. Psychol.* 95, 1–3. doi:10.1016/j.biopsycho.2013.11.011.
- Bray, S., Shimojo, S., and O'Doherty, J. P. (2007). Direct Instrumental Conditioning of Neural Activity Using Functional Magnetic Resonance Imaging-Derived Reward Feedback. *J. Neurosci.* 27, 7498–7507. doi:10.1523/JNEUROSCI.2118-07.2007.
- Briggman, K. L., Abarbanel, H. D. I., and Kristan, W. B. (2005). Optical imaging of neuronal populations during decision-making. *Science (80-)*. 307, 896–901. doi:10.1126/science.1103736.
- Caria, A., Veit, R., Sitaram, R., Lotze, M., Weiskopf, N., Grodd, W., and Birbaumer, N. (2007). Regulation of anterior insular cortex activity using real-time fMRI. *Neuroimage* 35, 1238–46. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.01.018.
- Chamorro, P., Levi, R., Rodriguez, F. B., Pinto, R. D., and Varona, P. (2009). Real-time activity-dependent drug microinjection. *BMC Neurosci.* 10, P296.

- Chamorro, P., Muñiz, C., Levi, R., Arroyo, D., Rodríguez, F. B., and Varona, P. (2012). Generalization of the dynamic clamp concept in neurophysiology and behavior. *PLoS One* 7, e40887. doi:10.1371/journal.pone.0040887.
- Chiew, M., LaConte, S. M., and Graham, S. J. (2012). Investigation of fMRI neurofeedback of differential primary motor cortex activity using kinesthetic motor imagery. *Neuroimage* 61, 21–31. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.02.053.
- Choi, S., Yu, E., Kim, D., Urbano, F. J., Makarenko, V., Shin, H.-S., and Llinás, R. R. (2010). Subthreshold membrane potential oscillations in inferior olive neurons are dynamically regulated by P/Q- and T-type calcium channels: a study in mutant mice. *J Physiol* 588, 3031–3043. doi:10.1113/jphysiol.2009.184705.
- Climov, D., Lysy, C., Berteau, S., Dutrannois, J., Dereppe, H., Brohet, C., and Melin, J. (2014). Biofeedback on heart rate variability in cardiac rehabilitation: practical feasibility and psycho-physiological effects. *Acta Cardiol.* 69, 299–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029875> [Accessed April 6, 2015].
- Cox, R. W., and Jesmanowicz, A. (1999). Real-time 3D image registration for functional MRI. *Magn. Reson. Med.* 42, 1014–1018. doi:10.1002/(SICI)1522-2594(199912)42:6<1014::AID-MRM4>3.0.CO;2-F.
- Cox, R. W., Jesmanowicz, A., and Hyde, J. S. (1995). Real-Time Functional Magnetic Resonance Imaging. *Magn. Reson. Med.* 33, 230–236. doi:10.1002/mrm.1910330213.
- deCharms, R. C., Christoff, K., Glover, G. H., Pauly, J. M., Whitfield, S., and Gabrieli, J. D. . (2004). Learned regulation of spatially localized brain activation using real-time fMRI. *Neuroimage* 21, 436–443. doi:10.1016/j.neuroimage.2003.08.041.
- deCharms, R. C., Maeda, F., Glover, G. H., Ludlow, D., Pauly, J. M., Soneji, D., Gabrieli, J. D. E., and Mackey, S. C. (2005). Control over brain activation and pain learned by using real-time functional MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 102 , 18626–18631. doi:10.1073/pnas.0505210102.
- Destexhe, A., and Bal, T. eds. (2009). *Dynamic-Clamp: From Principles to Applications*. Springer, New York.
- Farajidavar, A., Hagains, C. E., Peng, Y. B., and Chiao, J. (2012). A Closed Loop Feedback System for Automatic Detection and Inhibition of Mechano-Nociceptive Neural Activity. *Neural Syst. Rehabil. Eng. IEEE Trans.* 20, 478–487. doi:10.1109/TNSRE.2012.2197220.
- Fernandez-Vargas, J., Pfaff, H. U., Rodríguez, F. B., and Varona, P. (2013). Assisted closed-loop optimization of SSVEP-BCI efficiency. *Front. Neural Circuits* 7, Article 27. doi:10.3389/fncir.2013.00027.
- Geoff Dougherty (2011). *Medical image processing. Techniques and applications*.

- Gollisch, T., and Herz, A. V. M. (2012). The iso-response method: Measuring neuronal stimulus integration with closed-loop experiments. *Front. Neural Circuits* 6. doi:10.3389/fncir.2012.00104.
- Hirakawa, T., Suzuki, S., Kato, K., Gotoh, M., and Yoshikawa, Y. (2013). Randomized controlled trial of pelvic floor muscle training with or without biofeedback for urinary incontinence. *Int. Urogynecol. J.* 24, 1347–1354. doi:10.1007/s00192-012-2012-8.
- Hu, X., Le, T. H., Parrish, T., and Erhard, P. (1995). Retrospective estimation and correction of physiological fluctuation in functional MRI. *Magn. Reson. Med.* 34, 201–212. doi:10.1002/mrm.1910340211.
- Kj, F., Williams, S., Howard, R., Rsj, F., and Turner, R. Movement-related effects in fMRI time-series. 1–28.
- Kotchoubey, B., Strehl, U., Uhlmann, C., Holzapfel, S., König, M., Fröscher, W., Blankenhorn, V., and Birbaumer, N. (2001). Modification of Slow Cortical Potentials in Patients with Refractory Epilepsy: A Controlled Outcome Study. *Epilepsia* 42, 406–416. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.22200.x.
- Lynch, C. L., and Popovic, M. R. (2012). A Comparison of Closed-Loop Control Algorithms for Regulating Electrically Stimulated Knee Movements in Individuals With Spinal Cord Injury. *Neural Syst. Rehabil. Eng. IEEE Trans.* 20, 539–548. doi:10.1109/TNSRE.2012.2185065.
- Marder, E., and Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Curr. Biol.* 11, R986–R996.
- Maurizio, S., Liechti, M. D., Heinrich, H., Jäncke, L., Steinhausen, H.-C., Walitza, S., Brandeis, D., and Drechsler, R. (2014). Comparing tomographic EEG neurofeedback and EMG biofeedback in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychol.* 95, 31–44. doi:10.1016/j.biopsycho.2013.10.008.
- Micoulaud-Franchi, J. A., Lanteaume, L., Pallanca, O., Vion-Dury, J., and Bartolomei, F. (2014). [Biofeedback and drug-resistant epilepsy: back to an earlier treatment?]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 170, 187–96. doi:10.1016/j.neurol.2013.10.011.
- Mohseni, P., and Ghovanloo, M. (2012). Guest Editorial Closing the Loop via Advanced Neurotechnologies. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 20, 407–409. doi:10.1109/TNSRE.2012.2206152.
- Muniz, C., Levi, R., Benkrid, M., Rodriguez, F. B., and Varona, P. (2008). Real-time control of stepper motors for mechano-sensory stimulation. *J. Neurosci. Methods* 172, 105–111. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.04.017.
- Muniz, C., Rodriguez, F. B., and Varona, P. (2009). Biomanager: a software platform to expand the applications of real-time technology in neuroscience. *BMC Neurosci.* 10, P49.

- Nicolas-Alonso, L. F., and Gomez-Gil, J. (2012). Brain computer interfaces, a review. *Sensors (Basel)*. 12, 1211–79. doi:10.3390/s120201211.
- Nowotny, T., and Varona, P. (2014). “Dynamic Clamp Technique,” in *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, eds. D. Jaeger and R. Jung (Springer New York), 1–4. doi:10.1007/978-1-4614-7320-6_126-2.
- Peira, N., Fredrikson, M., and Pourtois, G. (2014). Controlling the emotional heart: heart rate biofeedback improves cardiac control during emotional reactions. *Int. J. Psychophysiol.* 91, 225–31. doi:10.1016/j.ijpsycho.2013.12.008.
- Pohmann, R. (2011). “Physical Basics of NMR,” in *In vivo NMR Imaging SE - 1 Methods in Molecular Biology.*, eds. L. Schröder and C. Faber (Humana Press), 3–21. doi:10.1007/978-1-61779-219-9_1.
- Potter, S. M., El Hady, A., and Fetz, E. E. (2014). Closed-Loop Neuroscience and Neuroengineering . *Front. Neural Circuits* 8 . Available at: http://www.frontiersin.org/Journal/FullText.aspx?s=740&name=neural_circuits&ART_DOI=10.3389/fncir.2014.00115.
- Poustchi-Amin, M., Mirowitz, S. A., Brown, J. J., McKinstry, R. C., and Li, T. (2001). Principles and Applications of Echo-planar Imaging: A Review for the General Radiologist. *RadioGraphics* 21, 767–779. doi:10.1148/radiographics.21.3.g01ma23767.
- Prinsloo, G. E., Rauch, H. G. L., and Derman, W. E. (2014). A Brief Review and Clinical Application of Heart Rate Variability Biofeedback in Sports, Exercise, and Rehabilitation Medicine. *Phys. Sportsmed.* 42, 88–99. doi:10.3810/psm.2014.05.2061.
- Rabinovich, M. I., Friston, K., and Varona, P. eds. (2012). *Principles of brain dynamics: global state interactions*. MIT Press, Cambridge (MA).
- Rabinovich, M. I., and Varona, P. (2011). Robust transient dynamics and brain functions. *Front. Comput. Neurosci.* 5, 24. doi:10.3389/fncom.2011.00024.
- Rabinovich, M. I., Varona, P., Selverston, A. I., and Abarbanel, H. D. I. (2006). Dynamical principles in neuroscience. *Rev. Mod. Phys.* 78, 1213–1265. doi:10.1103/RevModPhys.78.1213.
- Ramaswamy, S., Baroni, F., Varona, P., and de Polavieja, G. G. (2007). Time-scales in the interplay between calcium and voltage dynamics. *Neurocomputing* 70, 1949–1953. doi:10.1016/j.neucom.2006.10.122.
- Reiner, M., Rozengurt, R., and Barnea, A. (2014). Better than sleep: theta neurofeedback training accelerates memory consolidation. *Biol. Psychol.* 95, 45–53. doi:10.1016/j.biopsycho.2013.10.010.
- Rolston, J. D., Gross, R. E., and Potter, S. M. (2010). Closed-loop, open-source electrophysiology. *Front. Neurosci.* 4, 1–8.

- Ruiz, S., Buyukturkoglu, K., Rana, M., Birbaumer, N., and Sitaram, R. (2014). Real-time fMRI brain computer interfaces: self-regulation of single brain regions to networks. *Biol. Psychol.* 95, 4–20. doi:10.1016/j.biopsycho.2013.04.010.
- Ruiz, S., Lee, S., Soekadar, S. R., Caria, A., Veit, R., Kircher, T., Birbaumer, N., and Sitaram, R. (2013). Acquired self-control of insula cortex modulates emotion recognition and brain network connectivity in schizophrenia. *Hum. Brain Mapp.* 34, 200–212. doi:10.1002/hbm.21427.
- Salam, M. T., Mirzaei, M., Ly, M. S., Nguyen, D. K., and Sawan, M. (2012). An Implantable Closedloop Asynchronous Drug Delivery System for the Treatment of Refractory Epilepsy. *Neural Syst. Rehabil. Eng. IEEE Trans.* 20, 432–442. doi:10.1109/TNSRE.2012.2189020.
- Schabus, M., Heib, D. P. J., Lechinger, J., Griessenberger, H., Klimesch, W., Pawlizki, A., Kunz, A. B., Sterman, B. M., and Hoedlmoser, K. (2014). Enhancing sleep quality and memory in insomnia using instrumental sensorimotor rhythm conditioning. *Biol. Psychol.* 95, 126–34. doi:10.1016/j.biopsycho.2013.02.020.
- Schoenberg, P. L. A., and David, A. S. (2014). Biofeedback for psychiatric disorders: a systematic review. *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* 39, 109–35. doi:10.1007/s10484-014-9246-9.
- Selverston, A. I., and Moulins, M. eds. (1987). *The Crustacean Stomatogastric System: a Model for the Study of Central Nervous System*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo.
- Shibata, K., Watanabe, T., Sasaki, Y., and Kawato, M. (2011). Perceptual Learning Incepted by Decoded fMRI Neurofeedback Without Stimulus Presentation. *Sci.* 334, 1413–1415. doi:10.1126/science.1212003.
- Siepmann, M., Hennig, U.-D., Siepmann, T., Nitzsche, K., Mück-Weymann, M., Petrowski, K., and Weidner, K. (2014). The effects of heart rate variability biofeedback in patients with preterm labour. *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* 39, 27–35. doi:10.1007/s10484-013-9238-1.
- Stahl, A., Schellewald, C., Stavadahl, O., Aamo, O. M., Adde, L., and Kirkerod, H. (2012). An Optical Flow-Based Method to Predict Infantile Cerebral Palsy. *Neural Syst. Rehabil. Eng. IEEE Trans.* 20, 605–614. doi:10.1109/TNSRE.2012.2195030.
- Steel, H., Pollock, S., Lee, D., Keall, P., and Kim, T. (2014). The internal-external respiratory motion correlation is unaffected by audiovisual biofeedback. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* 37, 97–102. doi:10.1007/s13246-014-0247-z.
- Stetter, O., Battaglia, D., Soriano, J., and Geisel, T. (2012). Model-free reconstruction of excitatory neuronal connectivity from calcium imaging signals. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002653. doi:10.1371/journal.pcbi.1002653.

- Sulzer, J., Haller, S., Scharnowski, F., Weiskopf, N., Birbaumer, N., Blefari, M. L., Bruehl, A. B., Cohen, L. G., DeCharms, R. C., Gassert, R., et al. (2013). Real-time fMRI neurofeedback: progress and challenges. *Neuroimage* 76, 386–399. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.03.033.
- Szucs, A., Varona, P., Volkovskii, A. R., Abarbanel, H. D., Rabinovich, M. I., and Selverston, A. I. (2000). Interacting biological and electronic neurons generate realistic oscillatory rhythms. *Neuroreport* 11, 563–569.
- Teufel, M., Stephan, K., Kowalski, A., Käsberger, S., Enck, P., Zipfel, S., and Giel, K. E. (2013). Impact of biofeedback on self-efficacy and stress reduction in obesity: a randomized controlled pilot study. *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* 38, 177–84. doi:10.1007/s10484-013-9223-8.
- Wald, L. L. (2012). The future of acquisition speed, coverage, sensitivity, and resolution. *Neuroimage* 62, 1221–9. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.02.077.
- Wang, S., Zhao, Y., Chen, S., Lin, G., Sun, P., and Wang, T. (2013). EEG biofeedback improves attentional bias in high trait anxiety individuals. *BMC Neurosci.* 14, 115. doi:10.1186/1471-2202-14-115.
- Wolpaw, J. R., Birbaumer, N., McFarland, D. J., Pfurtscheller, G., and Vaughan, T. M. (2002). Brain–computer interfaces for communication and control. *Clin. Neurophysiol.* 113, 767–791. doi:10.1016/S1388-2457(02)00057-3.
- Yarom, Y. (1991). Rhythmogenesis in a hybrid system--interconnecting an olivary neuron to an analog network of coupled oscillators. *Neuroscience* 44, 263–275.

Apéndice A

El formato de las imágenes obtenidas con la cámara CCD y el software Neuroplex está especificado en: <http://www.redshirtimaging.com/support/dfo.html>.

Los datos obtenidos siguen la siguiente estructura:

- Cabecera de 5120 Bytes, cada dato de la cabecera será un entero de 16 bits. Siendo:
 - Número de frames: dato 5.
 - Número de columnas: dato 385.
 - Número de filas: dato 386.
 - Intervalo de frame: dato 389.
 - Ratio de adquisición de señal eléctrica sobre óptica: dato 392.
 - RLIs (Resting Light Intensities): Al final del fichero se guarda un frame de offset capturado en la oscuridad, antes de la apertura del shutter de la cámara. En Neuroplex el valor RLI se obtiene promediando los frames 6° al 11°, y restando el offset.
 - Mapa de píxeles de cada frame:
 - Para las cámaras CCD las imágenes son de 80x80 píxeles. Se colocan los valores de todos los píxeles secuencialmente fila por fila.
- Conjunto de valores de las señales

Después de la cabecera, se colocan los M valores de cada pixel, donde M=6400 píxeles de la imagen completa.

Point 1, Point 2, ... Point N, (Pixel 1)

Point 1, Point 2, ... Point N, (Pixel 2)

...

...

...

Point 1, Point 2, ... Point N, (Pixel M)

A continuación se incluyen las 8 señales BNC.

En este PFC solamente se ha usado una de ellas, con los datos del voltaje que llega amplificado desde el electrodo. El ratio, como se ha indicado en este documento es de 32 u 8 valores de voltaje por cada frame.

Point 1, Point 2, ... Point N*BNC_ratio, (BNC 1)

...

...

Point 1, Point 2, ... Point N*BNC_ratio, (BNC 8)

PRESUPUESTO

1) Ejecución Material

- Compra de ordenador personal (Software incluido)..... 2.000 €
- Tarjeta de adquisición de datos 2.156 €
- Cámara CCD y software Neuroplex..... 30.000 €
- Amplificador 5.000 €
- Microscopio de fluorescencia 20.000 €
- Cangrejos 30 €
- Total de ejecución material 59.186 €

2) Gastos generales

- 16 % sobre Ejecución Material..... 9.469 €

3) Beneficio Industrial

- 6 % sobre Ejecución Material..... 3.551 €

4) Material fungible

- Gastos de impresión 60 €
- Encuadernación 200 €

5) Subtotal del presupuesto

- Subtotal Presupuesto 72.467 €

6) I.V.A. aplicable

- 21% Subtotal Presupuesto..... 15.218 €

7) Total presupuesto

- Total Presupuesto 87.685€

Madrid, Mayo 2015

El Ingeniero Jefe de Proyecto

Fdo.: Lourdes Taboada Pérez

Ingeniero de Telecomunicación

PLIEGO DE CONDICIONES

Este documento contiene las condiciones legales que guiarán la realización, en este proyecto, de un Sistema de detección de eventos en señales neuronales y control de actuadores. En lo que sigue, se supondrá que el proyecto ha sido encargado por una empresa cliente a una empresa consultora con la finalidad de realizar dicho sistema. Dicha empresa ha debido desarrollar una línea de investigación con objeto de elaborar el proyecto. Esta línea de investigación, junto con el posterior desarrollo de los programas está amparada por las condiciones particulares del siguiente pliego.

Supuesto que la utilización industrial de los métodos recogidos en el presente proyecto ha sido decidida por parte de la empresa cliente o de otras, la obra a realizar se regulará por las siguientes:

Condiciones generales

1. La modalidad de contratación será el concurso. La adjudicación se hará, por tanto, a la proposición más favorable sin atender exclusivamente al valor económico, dependiendo de las mayores garantías ofrecidas. La empresa que somete el proyecto a concurso se reserva el derecho a declararlo desierto.

2. El montaje y mecanización completa de los equipos que intervengan será realizado totalmente por la empresa licitadora.

3. En la oferta, se hará constar el precio total por el que se compromete a realizar la obra y el tanto por ciento de baja que supone este precio en relación con un importe límite si este se hubiera fijado.

4. La obra se realizará bajo la dirección técnica de un Ingeniero Superior de Telecomunicación, auxiliado por el número de Ingenieros Técnicos y Programadores que se estime preciso para el desarrollo de la misma.

5. Aparte del Ingeniero Director, el contratista tendrá derecho a contratar al resto del personal, pudiendo ceder esta prerrogativa a favor del Ingeniero Director, quien no estará obligado a aceptarla.

6. El contratista tiene derecho a sacar copias a su costa de los planos, pliego de condiciones y presupuestos. El Ingeniero autor del proyecto autorizará con su firma las copias solicitadas por el contratista después de confrontarlas.

7. Se abonará al contratista la obra que realmente ejecute con sujeción al proyecto que sirvió de base para la contratación, a las modificaciones autorizadas por la superioridad o a las órdenes que con arreglo a sus facultades le hayan comunicado por escrito al Ingeniero Director de obras siempre que dicha obra se haya ajustado a los preceptos de los pliegos de condiciones, con arreglo a los cuales, se harán las modificaciones y la valoración de las diversas unidades sin que el importe total pueda exceder de los presupuestos aprobados. Por consiguiente, el número de unidades que se

consignan en el proyecto o en el presupuesto, no podrá servirle de fundamento para entablar reclamaciones de ninguna clase, salvo en los casos de rescisión.

8. Tanto en las certificaciones de obras como en la liquidación final, se abonarán los trabajos realizados por el contratista a los precios de ejecución material que figuran en el presupuesto para cada unidad de la obra.

9. Si excepcionalmente se hubiera ejecutado algún trabajo que no se ajustase a las condiciones de la contrata pero que sin embargo es admisible a juicio del Ingeniero Director de obras, se dará conocimiento a la Dirección, proponiendo a la vez la rebaja de precios que el Ingeniero estime justa y si la Dirección resolviera aceptar la obra, quedará el contratista obligado a conformarse con la rebaja acordada.

10. Cuando se juzgue necesario emplear materiales o ejecutar obras que no figuren en el presupuesto de la contrata, se evaluará su importe a los precios asignados a otras obras o materiales análogos si los hubiere y cuando no, se discutirán entre el Ingeniero Director y el contratista, sometiéndolos a la aprobación de la Dirección. Los nuevos precios convenidos por uno u otro procedimiento, se sujetarán siempre al establecido en el punto anterior.

11. Cuando el contratista, con autorización del Ingeniero Director de obras, emplee materiales de calidad más elevada o de mayores dimensiones de lo estipulado en el proyecto, o sustituya una clase de fabricación por otra que tenga asignado mayor precio o ejecute con mayores dimensiones cualquier otra parte de las obras, o en general, introduzca en ellas cualquier modificación que sea beneficiosa a juicio del Ingeniero Director de obras, no tendrá derecho sin embargo, sino a lo que le correspondería si hubiera realizado la obra con estricta sujeción a lo proyectado y contratado.

12. Las cantidades calculadas para obras accesorias, aunque figuren por partidaalzada en el presupuesto final (general), no serán abonadas sino a los precios de la contrata, según las condiciones de la misma y los proyectos particulares que para ellas se formen, o en su defecto, por lo que resulte de su medición final.

13. El contratista queda obligado a abonar al Ingeniero autor del proyecto y director de obras así como a los Ingenieros Técnicos, el importe de sus respectivos honorarios facultativos por formación del proyecto, dirección técnica y administración en su caso, con arreglo a las tarifas y honorarios vigentes.

14. Concluida la ejecución de la obra, será reconocida por el Ingeniero Director que a tal efecto designe la empresa.

15. La garantía definitiva será del 4% del presupuesto y la provisional del 2%.

16. La forma de pago será por certificaciones mensuales de la obra ejecutada, de acuerdo con los precios del presupuesto, deducida la baja si la hubiera.

17. La fecha de comienzo de las obras será a partir de los 15 días naturales del replanteo oficial de las mismas y la definitiva, al año de haber ejecutado la provisional, procediéndose si no existe reclamación alguna, a la reclamación de la fianza.

18. Si el contratista al efectuar el replanteo, observase algún error en el proyecto, deberá comunicarlo en el plazo de quince días al Ingeniero Director de obras, pues transcurrido ese plazo será responsable de la exactitud del proyecto.

19. El contratista está obligado a designar una persona responsable que se entenderá con el Ingeniero Director de obras, o con el delegado que éste designe, para todo relacionado con ella. Al ser el Ingeniero Director de obras el que interpreta el proyecto, el contratista deberá consultarle cualquier duda que surja en su realización.

20. Durante la realización de la obra, se girarán visitas de inspección por personal facultativo de la empresa cliente, para hacer las comprobaciones que se crean oportunas. Es obligación del contratista, la conservación de la obra ya ejecutada hasta la recepción de la misma, por lo que el deterioro parcial o total de ella, aunque sea por agentes atmosféricos u otras causas, deberá ser reparado o reconstruido por su cuenta.

21. El contratista, deberá realizar la obra en el plazo mencionado a partir de la fecha del contrato, incurriendo en multa, por retraso de la ejecución siempre que éste no sea debido a causas de fuerza mayor. A la terminación de la obra, se hará una recepción provisional previo reconocimiento y examen por la dirección técnica, el depositario de efectos, el interventor y el jefe de servicio o un representante, estampando su conformidad el contratista.

22. Hecha la recepción provisional, se certificará al contratista el resto de la obra, reservándose la administración el importe de los gastos de conservación de la misma hasta su recepción definitiva y la fianza durante el tiempo señalado como plazo de garantía. La recepción definitiva se hará en las mismas condiciones que la provisional, extendiéndose el acta correspondiente. El Director Técnico propondrá a la Junta Económica la devolución de la fianza al contratista de acuerdo con las condiciones económicas legales establecidas.

23. Las tarifas para la determinación de honorarios, reguladas por orden de la Presidencia del Gobierno el 19 de Octubre de 1961, se aplicarán sobre el denominado en la actualidad "Presupuesto de Ejecución de Contrata" y anteriormente llamado "Presupuesto de Ejecución Material" que hoy designa otro concepto.

Condiciones particulares

La empresa consultora, que ha desarrollado el presente proyecto, lo entregará a la empresa cliente bajo las condiciones generales ya formuladas, debiendo añadirse las siguientes condiciones particulares:

1. La propiedad intelectual de los procesos descritos y analizados en el presente trabajo, pertenece por entero a la empresa consultora representada por el Ingeniero Director del Proyecto.

2. La empresa consultora se reserva el derecho a la utilización total o parcial de los resultados de la investigación realizada para desarrollar el siguiente proyecto, bien para su publicación o bien para su uso en trabajos o proyectos posteriores, para la misma empresa cliente o para otra.

3. Cualquier tipo de reproducción aparte de las reseñadas en las condiciones generales, bien sea para uso particular de la empresa cliente, o para cualquier otra aplicación, contará con autorización expresa y por escrito del Ingeniero Director del Proyecto, que actuará en representación de la empresa consultora.

4. En la autorización se ha de hacer constar la aplicación a que se destinan sus reproducciones así como su cantidad.

5. En todas las reproducciones se indicará su procedencia, explicitando el nombre del proyecto, nombre del Ingeniero Director y de la empresa consultora.

6. Si el proyecto pasa la etapa de desarrollo, cualquier modificación que se realice sobre él, deberá ser notificada al Ingeniero Director del Proyecto y a criterio de éste, la empresa consultora decidirá aceptar o no la modificación propuesta.

7. Si la modificación se acepta, la empresa consultora se hará responsable al mismo nivel que el proyecto inicial del que resulta el añadirla.

8. Si la modificación no es aceptada, por el contrario, la empresa consultora declinará toda responsabilidad que se derive de la aplicación o influencia de la misma.

9. Si la empresa cliente decide desarrollar industrialmente uno o varios productos en los que resulte parcial o totalmente aplicable el estudio de este proyecto, deberá comunicarlo a la empresa consultora.

10. La empresa consultora no se responsabiliza de los efectos laterales que se puedan producir en el momento en que se utilice la herramienta objeto del presente proyecto para la realización de otras aplicaciones.

11. La empresa consultora tendrá prioridad respecto a otras en la elaboración de los proyectos auxiliares que fuese necesario desarrollar para

dicha aplicación industrial, siempre que no haga explícita renuncia a este hecho. En este caso, deberá autorizar expresamente los proyectos presentados por otros.

12. El Ingeniero Director del presente proyecto, será el responsable de la dirección de la aplicación industrial siempre que la empresa consultora lo estime oportuno. En caso contrario, la persona designada deberá contar con la autorización del mismo, quien delegará en él las responsabilidades que ostente.