



Máster en Bioinformática

**Análisis de la adhesión y morfología
celular en respuesta a tratamientos para
distrofias musculares**

Autor: Andrés Gortaire

Tutor: Dr. Juan Gonzalez Valdivieso

Curso 2023-24

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a mis amigos y familiares, quienes han sido un pilar fundamental en todos los proyectos que he emprendido a lo largo de mi vida. Agradezco de manera especial a mi tutor, Juan, por su apoyo constante y por ofrecer siempre soluciones oportunas a los desafíos encontrados. Este trabajo se realizó en un contexto de grandes dificultades en el país en el que resido, lo que limitó considerablemente su avance. Gracias al apoyo y la comprensión de todos, fue posible llevarlo a cabo hasta su finalización.

Índice.

1. Introducción.....	5
2. Hipótesis y objetivos.....	10
2.1. Objetivo primario.....	11
2.2. Objetivos secundarios.....	11
3. Materiales y métodos.....	11
3.1. Proceso manual de segmentación.....	12
3.2. Automatización del proceso.....	13
3.3. Trainable Weka Segmentation.....	13
3.4. Labkit.....	15
3.5. Cellpose.....	16
4. Resultados.....	19
5. Discusión.....	35
5.1. Segmentación manual.....	36
5.2. Script de automatización.....	38
5.3. Trainable Weka Segmentation.....	38
5.4. Labkit.....	40
5.5. Cellpose.....	41
5.6. Cyto3.....	42
5.7. Tissuenet_cp3.....	44
6. Conclusiones.....	45
6.1. Perspectivas futuras.....	47
7. Bibliografía.....	48
8. Anexos.....	50
9. Declaración de uso de IA.....	50

Resumen

Este estudio evaluó técnicas de segmentación de células musculares en imágenes de microscopía obtenidas a partir de hidrogeles 3D. Se analizaron imágenes de dos canales de fluorescencia para fibras de actina y vinculina en células expuestas a tratamiento con borato y en condiciones de control, utilizando FIJI y CellPose. Se emplearon métodos de segmentación manual, scripts de automatización y herramientas de aprendizaje automático, incluyendo los plugins Trainable Weka Segmentation (TWS) y Labkit en FIJI, así como los modelos Cyto3 y Tissuenet_cp3 de CellPose. Los resultados revelaron que, aunque CellPose fue útil en la segmentación y separación de núcleos, no resultó efectivo para las imágenes de este estudio. En cambio, los plugins TWS y Labkit demostraron una precisión superior en la segmentación. La segmentación manual destacó por su simplicidad, pero con un alto consumo de tiempo. Este estudio subraya la importancia de seleccionar cuidadosamente la técnica de segmentación de acuerdo a la complejidad de las imágenes y las estructuras a analizar.

Abstract

This study evaluated segmentation techniques for muscle cells in microscopy images obtained from 3D hydrogels. Images from two fluorescence channels for actin and vinculin fibers were analyzed in cells exposed to borate treatment and under control conditions, using FIJI and CellPose. Manual segmentation methods, automation scripts, and machine learning tools were employed, including the Trainable Weka Segmentation (TWS) and Labkit plugins in FIJI, as well as the Cyto3 and Tissuenet_cp3 models in CellPose. The results showed that, while CellPose was useful for nucleus segmentation and separation, it was not effective for the images in this study. In contrast, the TWS and Labkit plugins demonstrated superior precision in segmentation. Manual segmentation stood out for its simplicity but required substantial time. This study highlights the importance of carefully selecting the segmentation technique according to the complexity of the images and the structures to be analyzed.

Palabras clave:

Segmentación, actina, vinculina, Fiji, Cellpose, Trainable weka segmentation, Labkit

1. Introducción

El músculo esquelético, constituye el tejido más extenso en los seres humanos, resulta esencial para el movimiento y la postura (Encarnacion-Rivera et al., 2019). El sistema muscular humano abarca más de 600 músculos esqueléticos, que tienen la capacidad de producir diferentes fuerzas contráctiles gracias a las variaciones en la composición de sus fibras musculares (Encarnacion-Rivera et al., 2019). Cuando este tejido es perjudicado por patologías como las distrofias musculares o sucesos que causan un daño severo a este tejido, ocurre el proceso de regeneración.

La regeneración muscular es esencial para que el músculo esquelético se recupere de lesiones y mantenga su función. Este proceso repite muchos aspectos de la formación muscular embrionaria y es crucial para el equilibrio del músculo esquelético en adultos. Después del desarrollo, el músculo conserva la capacidad de regenerarse cuando recibe los estímulos adecuados, activando las células madre musculares, conocidas como células satélite, y otras células precursoras (Musarò, 2014).

Evidencia significativa sugiere que, aunque las células madre representan un determinante importante para la regeneración de tejidos, un entorno adecuado es necesario para garantizar y lograr resultados funcionales (Ciriza et al., 2021).

En algunas ocasiones no siempre se puede recuperar todo el daño producido en el tejido muscular, especialmente en enfermedades como las distrofias musculares, que son trastornos miogénicos hereditarios caracterizados por el desgaste muscular progresivo y la debilidad de distribución y severidad variables (Flanigan, 1999). Estas pueden clasificarse en varios grupos, incluidas las formas congénitas, según la distribución predominante de la debilidad muscular. Entre ellas se encuentran Duchenne y Becker; Emery-Dreifuss; distal; facioescapulohumeral; oculofaríngea; y cintura escapular, que es el grupo más diverso (Flanigan, 1999). En varias distrofias, el corazón puede verse gravemente afectado, a veces sin una debilidad muscular clínicamente significativa.

En pacientes con distrofias musculares, el proceso regenerativo del tejido muscular es ineficiente. A medida que las fibras musculares sufren daño repetido, el tejido es reemplazado progresivamente por tejido conectivo y adiposo, lo que exacerba la pérdida funcional (Flanigan, 1999). A pesar de que la incidencia de las distrofias

musculares es reducida, afectando aproximadamente a 300 nacimientos por millón en el caso de Duchenne y 25 por millón en el caso de la distrofia muscular congénita (Guerra-Torres et al., 2019). No solo estas enfermedades afectan la regeneración muscular, sino también el envejecimiento, posiblemente debido a una disminución en el número y la función de las células satélite o a un entorno regenerativo desfavorable (Flanigan, 1999; Ciriza et al., 2021).

Además de las distrofias musculares, el tejido muscular puede sufrir daños significativos debido a traumatismos mecánicos, como accidentes o heridas profundas. Estos eventos provocan un desgarramiento inmediato de las fibras musculares, seguido por una respuesta inflamatoria y un intento de regeneración que, si es insuficiente, puede llevar a una cicatrización fibrosa y a la pérdida permanente de la función (Musarò, 2014).

Generalmente, el proceso de regeneración se lleva a cabo en un breve período (21 días en ratones jóvenes adultos) gracias a una significativa interacción entre células endoteliales, fibro-adipogénicas y miogénicas, que coordinan la angiogénesis, la formación y remodelación del tejido conectivo, y la miogénesis (Ciriza et al., 2021).

Junto con la degeneración muscular, ya sea en términos de distrofias musculares o daños por traumas, los tratamientos actuales buscan restaurar la adhesión celular y la morfología del músculo, ya que son fundamentales para una regeneración efectiva.

Se están explorando estrategias para mejorar la regeneración muscular en poblaciones envejecidas y en poblaciones afectadas por distrofias y daños musculares, incluyendo el uso de intervenciones terapéuticas para aumentar la actividad de las células madre (Encarnacion-Rivera et al., 2019).

En el caso de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la condición más común y mortal que provoca la pérdida de neuronas motoras y la parálisis del músculo esquelético, se ha demostrado en modelos de ratones que el transportador de boro NaBC1 (codificado por el gen SLC4A11), tras su activación, se colocaliza con integrinas y receptores de factores de crecimiento. Esto crea un grupo funcional que mejora sinérgicamente los mecanismos de comunicación, acelerando la reparación muscular. Este proceso se

implementa mediante hidrogeles que permiten administrar tratamientos específicos, mejorando así el proceso y el tiempo de regeneración (Rodríguez-Romano et al., 2023).

Por esto, es importante estudiar el funcionamiento y los procesos normales de regeneración para comprender mejor diferentes enfermedades del músculo, como las distrofias musculares, o en el caso de accidentes que dañan gravemente el tejido muscular. Comprender la base de la regeneración muscular puede proporcionar información sobre posibles estrategias terapéuticas para enfermedades y lesiones relacionadas con los músculos (Musarò, 2014).

La bioinformática es una disciplina que combina la biología y la informática para analizar y comprender la información biológica utilizando herramientas y software especializados. En el campo de la investigación biológica, el análisis de imágenes es una técnica fundamental para estudiar diferentes aspectos de los organismos vivos, como el tejido muscular (Luscombe et al., 2001).

el uso del análisis de imágenes biológicas es importante en la comprensión de la estructura y función del tejido muscular. El tejido muscular es un componente crítico del cuerpo humano y de muchos organismos. Por lo tanto, se requiere un mejor entendimiento para comprender el desarrollo de enfermedades musculares, envejecimiento y regeneración interna. Por esta razón, los análisis permiten a los investigadores estudiar y analizar las diferentes características del tejido muscular, como la longitud de las fibras musculares, el número de células y el crecimiento del núcleo.

El análisis del tamaño y tipo de fibras en preparaciones histológicas de músculo es una técnica valiosa para cuantificar indicadores clave de la función muscular y evaluar las respuestas a diversos estímulos o factores de estrés. No obstante, este análisis suele realizarse manualmente, lo que resulta laborioso y consume mucho tiempo (Vargas et al., 2019). Para abordar este desafío, varios grupos han desarrollado software que automatiza el análisis de la histología muscular (Encarnacion-Rivera et al., 2019). Por ejemplo, en 2014 se presentó SMASH, que introdujo el análisis automático de la histología muscular utilizando un algoritmo de watershed para la segmentación, aunque aún requiere intervenciones manuales. En contraste, MyoVision y Muscle J, lanzados en

2018, fueron los primeros programas en ofrecer un análisis completamente automatizado de la histología muscular, eliminando la necesidad de intervención manual y mejorando significativamente la eficiencia y precisión del análisis (Encarnacion-Rivera et al., 2019).

Los métodos tradicionales de segmentación se han basado en transformaciones matemáticas relativamente simples de imágenes basadas en información limitada sobre píxeles individuales, y los programas específicos para músculos mencionados anteriormente no son una excepción (Encarnacion-Rivera et al., 2019).

En el futuro, se anticipa un enfoque más centrado en el aprendizaje automático y aprendizaje profundo, con algoritmos diseñados para gestionar los vastos datos histopatológicos archivados digitalmente. Estos nuevos métodos de minería de datos ofrecen la ventaja de utilizar el reconocimiento de patrones a partir de imágenes mínimamente procesadas para realizar la segmentación (Sirinukunwattana et al., 2016). Además, el aprendizaje automático permite diferenciar entre píxeles que, aunque parezcan similares a simple vista, en realidad pertenecen a distintas características de la imagen (Sirinukunwattana et al., 2016). Este avance no solo mejora la precisión del análisis, sino que también optimiza el tiempo y los recursos necesarios para procesar grandes volúmenes de datos histológicos. Un ejemplo destacado del éxito en la implementación del aprendizaje profundo, que podría aplicarse en estudios de tejido muscular, es su uso en la detección y clasificación de núcleos celulares en imágenes histopatológicas de tejido canceroso teñido con hematoxilina y eosina (Sirinukunwattana et al., 2016). Esta tarea es particularmente desafiante debido a la heterogeneidad celular presente en las muestras. En este contexto, se ha implementado una Red Neuronal Convolutiva Espacialmente Restringida para la detección cualitativa de núcleos en tejido canceroso (Sirinukunwattana et al., 2016).

Tradicionalmente, este trabajo ha sido realizado por expertos humanos debido a la complejidad del problema. El aprendizaje profundo ha permitido clasificar las imágenes de manera más eficiente y automática, facilitando el proceso y reduciendo significativamente el tiempo de trabajo necesario (Encarnacion-Rivera et al., 2019). Este avance no solo mejora la precisión del análisis, sino que también optimiza los recursos

y el tiempo dedicados a procesar grandes volúmenes de datos histológicos (Sirinukunwattana et al., 2016).

En la última década, las herramientas basadas en aprendizaje han avanzado un paso más: se han desarrollado métodos versátiles y confiables para facilitar el análisis de imágenes histológicas, con aplicaciones para prácticamente cualquier muestra procesada histoquímicamente (Encarnacion-Rivera et al., 2019).

En la actualidad la importancia del análisis de imágenes biológicas se ha vuelto muy importante en el contexto de desarrollar nuevos tratamientos y observar cómo estos afectan la regeneración del tejido muscular, para este proceso de investigación se ha seleccionado 2 software bioinformáticos, centrándonos en dos herramientas: FIJI y Cellpose.

FIJI corre en ImageJ, creado por Wayne Rasband en los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU, es una herramienta que se puede instalar fácilmente en diversas plataformas y cuenta con una interfaz de usuario intuitiva (Schindelin et al., 2012). Está diseñada principalmente para investigadores con conocimientos básicos de informática. Sin embargo, su capacidad de expansión mediante plugins, que son componentes de software adicionales que se pueden instalar para añadir nuevas funcionalidades, también la hace atractiva para aquellos con experiencia en desarrollo de software (Schindelin et al., 2012). Con el tiempo, se ha creado una amplia gama de plugins para ImageJ, cubriendo casi todas las áreas del análisis de imágenes biológicas, lo que la convierte en una herramienta muy versátil y poderosa para la investigación científica.

Fiji es totalmente compatible con ImageJ y lo mejora con funciones adicionales esenciales. Este proyecto se desarrolló para facilitar la instalación y el mantenimiento de TrakEM2, uno de los plugins más avanzados de ImageJ (Schindelin et al., 2012). TrakEM2 ofrece soluciones completas para la gestión, registro, segmentación y anotación de grandes volúmenes de datos de microscopía electrónica, lo que lo convierte en una herramienta indispensable para los investigadores que trabajan con este tipo de imágenes (Schindelin et al., 2012). Además, Fiji incluye una serie de plugins preinstalados que amplían aún más sus capacidades, haciendo que el análisis de imágenes sea más accesible y eficiente para los usuarios.

Fiji actualiza la arquitectura subyacente de ImageJ y permite a los investigadores centrarse en el desarrollo de soluciones innovadoras y de vanguardia para el análisis de imágenes biológicas. Fiji introduce potentes bibliotecas de software para la transferencia rápida de nuevos algoritmos a herramientas prácticas de análisis de imágenes (Schindelin et al., 2012). Los algoritmos clave que ofrece Fiji pueden ser utilizados mediante diversos lenguajes de scripting, conocidos por los bioinformáticos, lo que facilita la creación de prototipos de nuevas soluciones para el análisis de imágenes biológicas.

Cellpose es una herramienta de segmentación que utiliza aprendizaje profundo, inicialmente creada para identificar células y sus componentes. Este programa ha sido adaptado para segmentar fibras musculares esqueléticas teñidas y otras aplicaciones biológicas, demostrando eficacia en pruebas detalladas y precisas (Stringer et al., 2021). Cellpose opera mediante la generación y predicción de mapas topográficos a través de una red neuronal, determinando si un píxel pertenece a una región de interés (ROI) (Stringer et al., 2021). Mediante el seguimiento de gradientes, todos los píxeles de una célula específica pueden ser identificados desde un punto central, permitiendo definir y enmascarar la forma de la célula. Además, la red neuronal del programa elimina los píxeles que están fuera de los límites de la ROI, asegurando una segmentación precisa y clara (Saad et al., 2023).

En este estudio se compararán diferentes técnicas de segmentación y detección de células musculares procedentes de hidrogeles tratados con borato y grupos control, utilizando los programas Fiji con sus plugins y CellPose con sus modelos preentrenados. El objetivo es determinar qué técnica permite cuantificar y determinar las características celulares de manera más eficiente y precisa.

2. Hipótesis y Objetivos

Se propone que la combinación de los programas bioinformáticos FIJI y CellPose mejorará los actuales procedimientos de análisis de imágenes de células musculares cultivadas en hidrogeles 3D, facilitando una identificación y cuantificación más exacta y eficaz de las propiedades celulares. La automatización del análisis a través de estos instrumentos disminuirá considerablemente el tiempo de procesamiento y ofrecerá

resultados cuantitativos de gran confiabilidad, con una mayor precisión en la identificación de cambios celulares entre tratamientos experimentales, como el tratamiento con borato, y controles, en contraposición a los procedimientos convencionales de microscopía manual.

2.1. Objetivo primario

Analizar los protocolos actuales para segmentación de diferentes tipos celulares, tales como la eficacia, precisión y diferencias entre tipos de imágenes, de células musculares cultivadas sobre hidrogeles 3D utilizando el software FIJI y Cellpose como herramienta de segmentación.

2.2. Objetivos secundarios

- Evaluar la eficacia del software FIJI y la herramienta Cellpose en la identificación de características celulares de muestras de células musculares cultivadas sobre hidrogeles.
- evaluar la capacidad y el tiempo requerido de estas herramientas para segmentar automáticamente las células.
- Comparar los resultados obtenidos en cuanto a eficacia y precisión de las características celulares mediante las diferentes técnicas usadas en FIJI y Cellpose.

3. Materiales y métodos

En el presente estudio, se utilizó un conjunto de 10 imágenes procedentes de microscopio de fluorescencia de tejido muscular de ratones, enfocadas con el objetivo de 20x, en procesos de regeneración y crecimiento en hidrogeles, 5 expuestos a tratamiento con borato y 5 grupo control, obtenidas en el laboratorio. Se usaron las imágenes del canal verde que muestra las fibras de actina, las cuales son las más difíciles de segmentar y medir, lo que permite observar qué técnica es la que mejor se adapta a estas condiciones, y el canal rojo que muestra la vinculina, una proteína del citoesqueleto más sencilla de segmentar. Estas imágenes presentan una alta calidad, con una resolución de 8 bits, 1002 píxeles y una densidad de 5 píxeles por pulgada (ppp).

Para el análisis de las imágenes y la identificación de las fibras de actina, vinculina y núcleos celulares, se empleó el software FIJI. Este software es ampliamente reconocido en el ámbito de la investigación científica y proporciona una plataforma versátil para el análisis y procesamiento de imágenes.

Dentro del programa Fiji, al ser un programa de código abierto, es posible modificar y crear plugins que permiten optimizar tareas específicas. En este caso, también se evaluaron plugins que permiten automatizar el proceso de segmentación y medición de células, como Trainable Weka Segmentation y Labkit.

3.1. Proceso manual de segmentación

Al realizar las mediciones de forma manual se requiere aplicar filtros para mejorar y facilitar la identificación de estructuras, permitiendo obtener mediciones más fiables y precisas para un posterior análisis cualitativo.

El proceso de segmentación manual empieza con el mejoramiento del contraste utilizando la función “enhance contrast” con un 0.35% de píxeles saturados, encontrada en el apartado “process”, para mejorar la visualización de las estructuras objetivo. Luego, se aplica la función “threshold”, encontrada en el apartado “image” y “adjust”, que convierte imágenes en escala de grises a imágenes binarias. Esto se logra estableciendo un valor umbral que separa los píxeles en dos grupos: aquellos por encima del umbral (que se convierten en blancos) y aquellos por debajo del umbral (que se convierten en negros). De esta manera, se separan las estructuras objetivo del fondo de la imagen.

Finalmente, se utiliza la función “subtract background”, encontrada en el apartado “process”, que permite descartar cualquier píxel del fondo que la función “threshold” haya tomado por error, usando un Rolling ball radius de 25 píxeles. Se activan las funciones “light background”, “create background” y “disable smoothing”. De esta manera, se eliminan las partículas del fondo completamente, mejorando y unificando los bordes de las células para permitir mediciones más limpias y exactas. Después de realizar esto, se debe hacer un “threshold” final y realizar una separación de las células

o zonas a medir y proceder a usar la función de measure o de analizar las partículas para obtener mediciones.

3.2 Automatización del proceso

Para automatizar este proceso y ahorrar tiempo, se creó un script que permite realizar automáticamente estos pasos. El script debe ser modificado de acuerdo a lo que se quiera separar y medir, además de que se deben supervisar los pasos realizados. El script está escrito en lenguaje macro de ImageJ (Figura 1).

```
// 1. Mejorar contraste
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.35");

// 2. Threshold para separar estructuras
setAutoThreshold("Default dark");
run("Threshold...", "dark background");

// 3. Subtract Background
run("Subtract Background...", "rolling=50 light background create disable");

// 4. Threshold
setAutoThreshold("Default dark");
run("Threshold...", "dark background");
```

Figura 1. Script empleado para la automatización del proceso de segmentación en el software Fiji escrito en lenguaje macro de imageJ.

3.3. Trainable Weka Segmentation

El software de Fiji permite la integración de plugins externos que se desarrollan para facilitar tareas específicas. En este caso, usamos el plugin integrado en Fiji de Trainable Weka Segmentation en su versión 3.3.4, que combina algoritmos de aprendizaje automático para permitir segmentaciones basadas en píxeles. El plugin no necesita ser

descargado por separado de Fiji, ya que viene integrado. Se encuentra en el apartado de “Plugins” en la sección de “Segmentation”.

Al utilizar un algoritmo de aprendizaje automático, se debe entrenar el modelo con imágenes similares a las que se requieren segmentar. Para esto, se abre la imagen con el plugin que estamos trabajando y, en el apartado de “labels”, tendremos dos clases para marcar. En este caso, la clase uno será las fibras de actina en las imágenes del canal verde y la vinculina en las imágenes del canal rojo. La clase dos corresponderá al fondo de la imagen en todas las ocasiones. Se debe señalar manualmente cada clase para entrenar el modelo. Se realizaron 5 labels para entrenar el modelo en clase uno y clase dos (Figura 2).

Procedemos a usar la opción “Train Classifier”, en la cual se entrena el modelo con las clases seleccionadas manualmente y se procede a segmentar la imagen. De esta manera, usando la opción “Create Result”, podemos obtener la imagen segmentada, y con la opción “Save Classifier”, podemos guardar el modelo entrenado para usar con todas las imágenes que se desean segmentar.

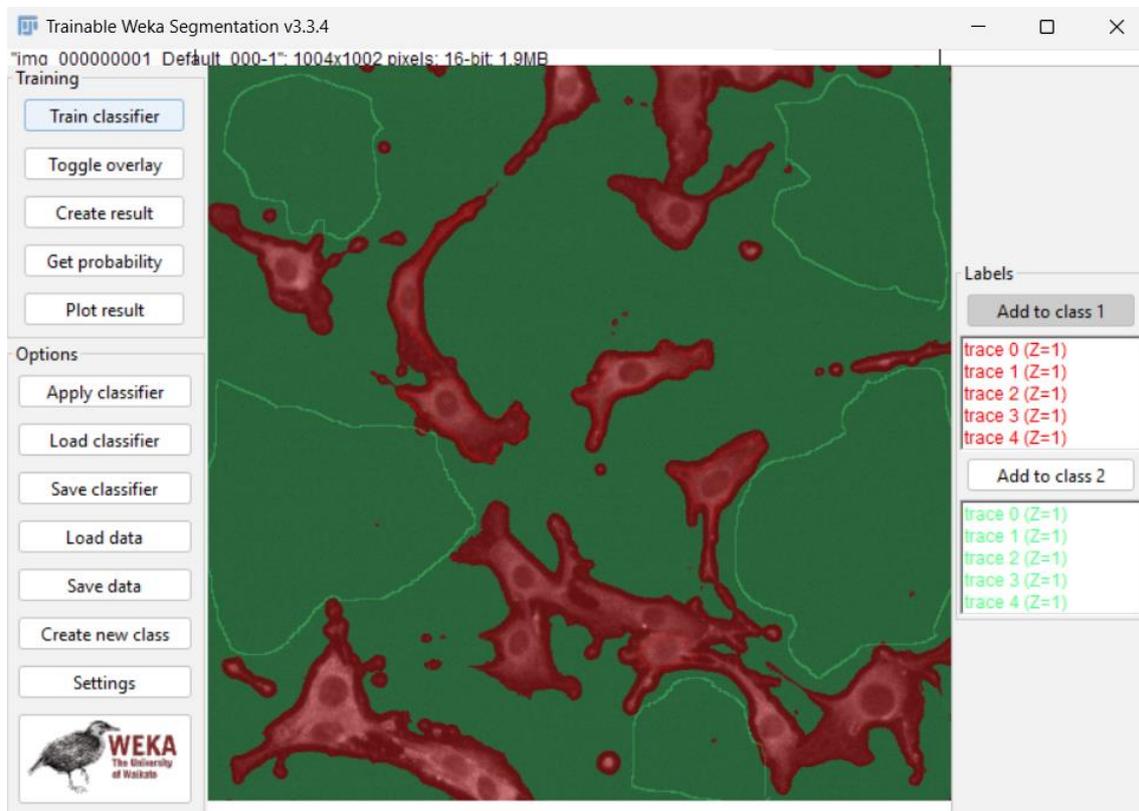


Figura 2. Interfaz de Trainable Weka Segmentation, en la que se observa la segmentación de una imagen de células musculares en el canal rojo de vinculina mediante el algoritmo de aprendizaje automático.

3.4. Labkit

Al igual que Trainable Weka Segmentation, Labkit es un plugin integrado directamente en Fiji, por lo cual no debemos descargarlo ni instalarlo por separado como ocurre con otros plugins. Labkit es un plugin para la segmentación de datos de imágenes de microscopía. Ofrece rutinas de segmentación de imágenes manuales y automatizadas fáciles de usar que se pueden aplicar rápidamente a imágenes de uno o varios canales. En este caso, usamos la segmentación automática. Primero, procedemos a abrir la imagen que vamos a segmentar en Fiji para luego ir a la sección de “plugins”, donde seleccionaremos la opción de “Labkit”. Dentro de esta opción, utilizaremos “Open Current Image with Labkit”, que nos desplegará una ventana con la interfaz de Labkit y la imagen que seleccionamos (Figura 3).

Dentro de la interfaz, podemos mejorar el contraste de la imagen si lo requerimos mediante la opción “Autocontrast” ubicada en la sección de “Image”. En la sección de “Labeling”, tendremos dos opciones: “Background” en color azul y “Foreground” en color rojo. En este caso, usamos el color azul para el fondo de la imagen y el color rojo para las fibras de actina en las imágenes del canal verde y la vinculina en las imágenes del canal rojo. Seleccionamos la opción de “lápiz” con cualquiera de los dos colores y procedemos a marcar manualmente las zonas correspondientes.

En la barra lateral de Labkit, bajo el encabezado “Segmentation”, hay un botón llamado “Labkit Pixel Classifier” donde encontraremos una entrada llamada “Train Classifier”. Usar esta opción permite entrenar el clasificador. Después de un momento, veremos la segmentación automática de la imagen. Desde el menú de Labkit, también se puede guardar el clasificador que se entrenó para poder usarlo con más imágenes. Además, desde el menú principal de Labkit, podemos seleccionar la opción de “Segmentation” y “Show Segmentation Result in ImageJ” para exportar la segmentación a Fiji, donde podremos realizar mediciones con la imagen ya segmentada.

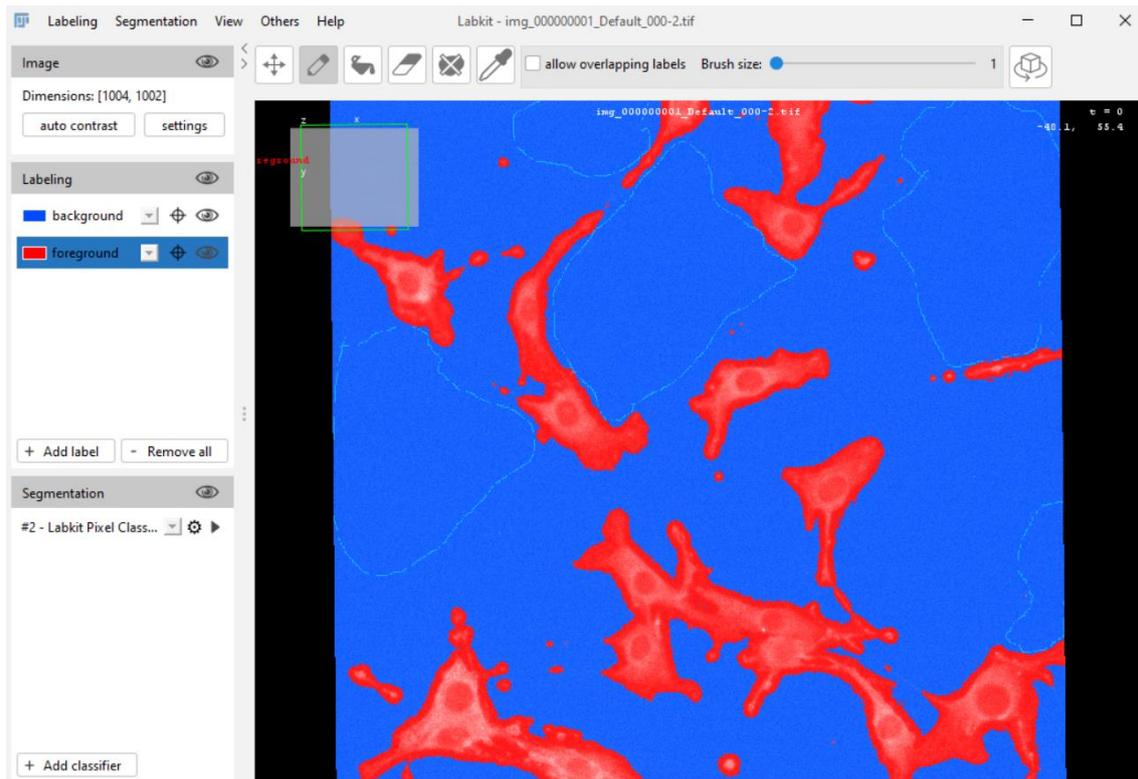


Figura 3. Interfaz de Labkit, en la que se observa la segmentación de una imagen de células musculares en el canal rojo de vinculina mediante una clasificación de píxeles basada en random forest.

3.5 Cellpose.

Cellpose es un algoritmo generalista basado en aprendizaje profundo para la segmentación celular. Es un software diferente de Fiji. Al requerir de Python para funcionar, lo recomendable es usar Conda para la instalación de Cellpose con la versión 3.8 de Python, apropiada para funcionar de manera más fluida

En este caso al usar el sistema operativo de Windows 11 usamos los siguientes comandos, también son compatibles con Mac y Linux:

1. Creamos un nuevo entorno.
 - `conda create -n cellpose python=3.8`
 - `conda activate cellpose`
2. Instalamos cellpose en el entorno.
 - `pip install cellpose`
3. Activar el programa

- conda cellpose

Cellpose cuenta con varios modelos preentrenados para utilizar de acuerdo a las necesidades y el tipo de estructuras que se desee segmentar. En este caso, se analizaron los modelos Cyto3 y Tissuenet_cp3 para observar cuáles son más eficientes en el proceso de segmentación, tanto de las imágenes del canal verde para las fibras de actina como de las imágenes del canal rojo para la vinculina. Los modelos preentrenados existentes son los siguientes:

- Cyto 3
- Nuclei
- Tissuenet_cp3
- Livecell_cp3
- Yest_phc_cp3
- Yest_BF_cp3
- Bact_phase_cp3
- Bact_fluor_cp3
- Deepbacs_cp3

Al iniciar la interfaz de Cellpose, podremos abrir las imágenes que queremos segmentar mediante la opción de “File” y “Load Image”, donde escogeremos la imagen o imágenes a segmentar. También se puede arrastrar la imagen hacia la interfaz y se abrirá igualmente. En el apartado de “Views”, encontraremos una opción llamada “Auto-Adjust Saturation”. Al activarla, la imagen se volverá más clara automáticamente (Figura 4).

En la sección de “Image Restoration”, tenemos varios modos que permiten mejorar aún más la imagen a segmentar. En este caso, usamos la opción “Denoise” tanto para las imágenes del canal verde como las del canal rojo, lo que permite quitar el ruido de la imagen y nos permite separar el fondo de las células de manera más clara y eficiente.

Luego, en la sección de “segmentation”, usamos la opción de “calibrate”, que se utiliza para ajustar automáticamente el tamaño de las células en las imágenes que se está

segmentando. Este proceso de calibración ayuda a Cellpose a determinar el diámetro promedio de las células en las imágenes, lo que mejora la precisión de la segmentación.

En la misma sección de “segmentation”, tenemos la opción de correr el modelo generalista principal, que es Cyto3. Al presionarlo, obtendremos la imagen segmentada. En la sección de “other models”, podremos seleccionar entre los otros modelos de segmentación preentrenados, en este caso, Tissuenet_cp3 e ir corriendo cada uno de ellos por separado.

Una vez realizada la segmentación, procedemos a guardar los resultados en la opción “file” y “save mask as PNG/TIF”. Este formato nos permite guardar las máscaras de segmentación generadas en formatos de imagen PNG o TIF para pasar las imágenes a Fiji y proceder con la medición de las estructuras con las que se desea trabajar.

Es importante destacar que, en todos los casos de segmentación, se deberían excluir los núcleos celulares que se encuentran en el borde de la imagen. Esto se debe a la potencial falta de exactitud en sus mediciones, ya que su totalidad no se encuentra en la imagen y podrían distorsionar los resultados. De este modo, se garantiza un análisis más riguroso y preciso de los datos.

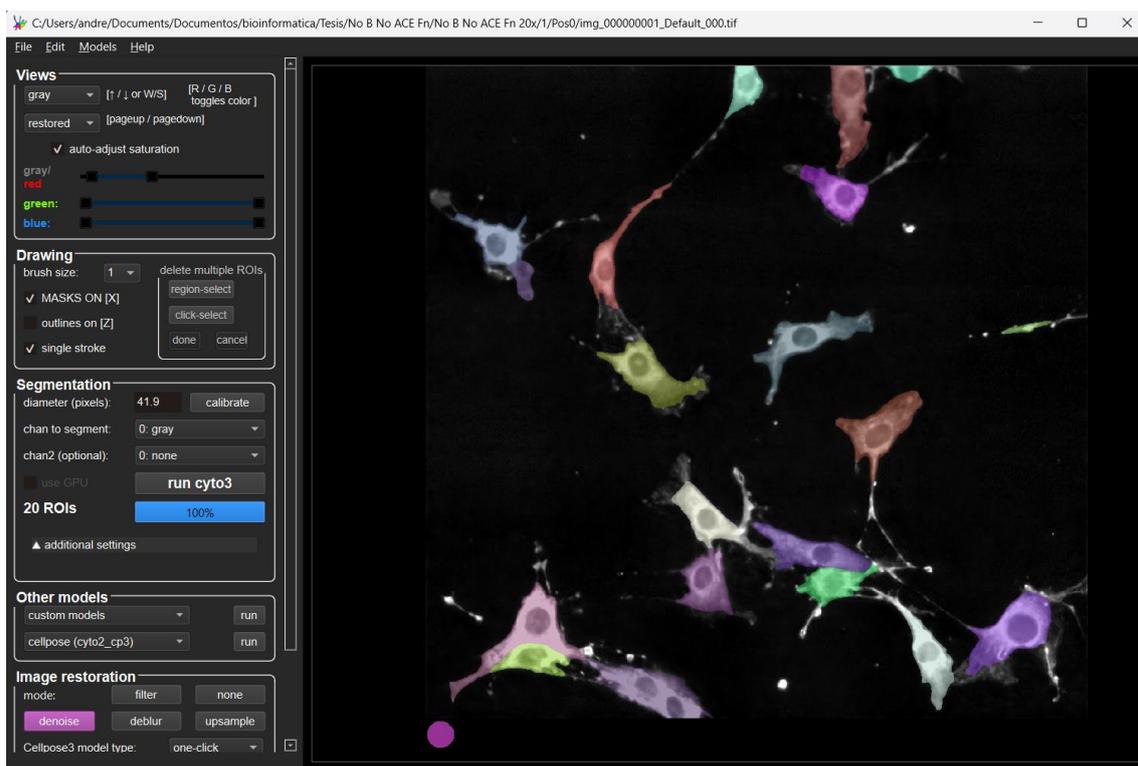


Figura 4. Interfaz de Cellpose en la que se observa la segmentación de una imagen de células musculares en el canal rojo de vinculina. Cellpose clasifica imágenes mediante redes neuronales convolucionales.

4. Resultados

Aquí comparamos las diferentes técnicas de segmentación obtenidas mediante el software Fiji y cellpose en células musculares provenientes de ratones cultivadas en hidrogeles, las pruebas se llevaron a cabo tanto en imágenes de canal verde donde se observa las fibras de actina como en imágenes del canal rojo donde se observa la vinculina. Ambas bajo dos tratamientos experimentales (control y tratamiento con borato). Todas las imágenes son de un aumento 20x.

Se evaluaron parámetros como precisión en la segmentación, diferencias visuales entre tratamientos, eficacia en las técnicas de segmentación y comparación entre los 2 tipos de imágenes segmentadas de vinculina y fibras de actina (Tabla1).

En las Figuras 5 y 6 se muestra la técnica de segmentación manual, la cual puede ser optimizada mediante el script proporcionado. En la Figura 1 se presenta la segmentación para las fibras de actina. Al compararla con la segmentación de vinculina en la Figura 6, podemos observar que la técnica produce resultados similares para ambos tipos de imágenes. De manera similar, en ambos tratamientos (tanto el control como el borato) se obtienen resultados de segmentación comparables, siendo utilizable en ambos casos para la posterior identificación, separación y medición de estructuras como núcleos o fibras celulares. Aunque esta técnica proporciona una segmentación no muy precisa, es sencilla de realizar y requiere poco post-procesado, lo cual es conveniente para efectuar mediciones. Además, reduce significativamente los ROIs (regiones de interés) incorrectos, facilitándonos la medición de las regiones que necesitamos evaluar.

Esta técnica es adecuada para casos en los que no se requiere mucha precisión y cuando no es necesario segmentar un gran número de imágenes, ya que cada imagen debe ser supervisada individualmente. Dependiendo de la imagen, algunos parámetros funcionarán mejor que otros, lo que implica que la técnica consuma mucho tiempo y no sea viable para grandes cantidades de imágenes.

En las Figuras 7 y 8, se presentan las segmentaciones generadas por el plugin Trainable Weka Segmentation. En la Figura 7, se muestran las imágenes del canal verde de las fibras de actina y, en la Figura 8, las imágenes del canal rojo de vinculina. Esta técnica de segmentación utiliza algoritmos de aprendizaje automático. El entrenamiento del modelo es intuitivo y permite automatizar el proceso más rápido que la segmentación manual, además de manejar una mayor cantidad de datos. Sin embargo, a pesar de ser más rápida, suele demorar más que otras técnicas como Labkit (Figuras 9 y 10).

En cuanto a la segmentación de las fibras de actina en la Figura 7, es más precisa que la segmentación manual, pues perfila con mayor exactitud los bordes de las estructuras en el tratamiento control. En el tratamiento con borato (B), debido a la mayor concentración de células en una misma área, como se muestra en la Figura 7 1B, tiende a abarcar más zonas de las necesarias. A pesar de esto, sigue siendo bastante exacta y mediante un postprocesado y la separación de estructuras se pueden corregir estos errores, logrando mediciones mucho más precisas.

En cuanto a la segmentación en las imágenes de vinculina, tiende a ser más precisa que en las imágenes de fibras de actina. A pesar de tener el mismo problema de unir y abarcar más zonas de las necesarias en el tratamiento con borato (Figura 8 1B), debido a la cercanía de las células en este tratamiento, produce una segmentación definida y separa mejor las estructuras que en las fibras de actina.

En las Figuras 9 y 10 se presenta la segmentación mediante el plugin Labkit de Fiji, la principal característica de este plugin es que trabaja mediante un algoritmo basado en random forest lo que mejora la precisión y velocidad de la segmentación. De las técnicas usadas en el software Fiji, Labkit resultó ser la más eficaz en tiempo, permitiendo segmentar imágenes rápidamente, además tiene una función que permite usar la GPU integrada en las computadoras y aumentar todavía más la velocidad de segmentación, convirtiendo a esta técnica la más apropiada si se requiere segmentar un gran volumen de imágenes. El entrenamiento del modelo es intuitivo al igual que en la técnica trainable weka segmentation, una vez entrenado el modelo se puede aplicar a todas las imágenes que se requiera.

En cuanto al proceso de segmentación de fibras de actina (Figura 9), el modelo es muy preciso, permitiendo segmentar las estructuras con mucha mayor exactitud que las otras dos técnicas. Tanto en el control como en el tratamiento, se produce una correcta segmentación, lo que facilita el postprocesado, la separación y la medición de las estructuras necesarias, obteniendo así resultados más eficientes.

En la segmentación de imágenes de vinculina, la precisión se reduce, como se puede observar en la Figura 10. Aunque sigue proporcionando un resultado utilizable y preciso, tanto en el tratamiento de control como en el tratamiento con borato, la precisión es considerablemente menor en comparación con la segmentación de fibras de actina (Figura 9). En el caso del tratamiento con borato, debido a la mayor proximidad de las células, el modelo tiende a abarcar más zonas de las necesarias, lo que podría causar errores en las mediciones. Este error se reduce en el tratamiento de control, donde las células están más separadas. Además, en algunos casos, el borde de las imágenes genera segmentaciones en áreas donde no hay estructuras visibles.

El software de cellpose viene incorporado con varios modelos pre entrenados para usar de acuerdo al tipo de células o tejidos que se desee segmentar, en este caso usamos los dos 2 modelos pre entrenados más adecuados para el tipo de imágenes a segmentar, el modelo cyto3 (Figura 11 y 12) super-generalista diseñado para segmentar una amplia variedad de células y estructuras celulares y el modelo Tissuenet_cp3 (Figura 13 y 14) que está diseñado específicamente para segmentar tejidos complejos.

En cuanto a la segmentación de las imágenes del canal verde de vinculina (Figura 11), se observa que el modelo cyto3 super-generalista no realiza un trabajo adecuado de segmentación. No reconoce las células ni las fibras, lo que resulta en una segmentación deficiente. Este problema se agrava en el caso del tratamiento con borato, donde las células están más unidas, y el modelo segmenta de manera aún más ineficaz que en el tratamiento control, generando zonas incompletas o erróneas. En general, no reconoce la mayoría de las estructuras en las imágenes. Por lo tanto, este modelo no es adecuado para usar con imágenes de fibras de actina.

En la Figura 12 se puede observar que el modelo cyto3 super-generalista segmenta de manera más eficiente las imágenes del canal rojo de vinculina, reconociendo núcleos celulares con precisión y separando células unidas de manera exacta (una función que no se presenta de forma automática en el software Fiji). Este modelo demostró ser eficiente en la segmentación de imágenes de vinculina donde el núcleo es fácilmente visible, tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con borato. Aunque en el tratamiento con borato la segmentación fue más complicada debido a la mayor densidad celular, el modelo presentó una segmentación moderadamente correcta y una separación eficiente de las células unidas. Sin embargo, no se puede considerar un modelo adecuado a pesar de estas ventajas, ya que en muchos casos no segmenta todas las células en la imagen o no las toma en su totalidad, como se puede observar en la Figura 12.

En la Figura 13 se observa la segmentación producida por el modelo Tissuenet_cp3 de Cellpose en las fibras de actina. Este modelo está diseñado para segmentar tejidos complejos; sin embargo, en el caso de las imágenes utilizadas para el estudio, no produjo una segmentación correcta. De todos los modelos probados, este fue el que tuvo el rendimiento más deficiente. No fue capaz de reconocer estructuras en la mayoría de las imágenes de fibras de actina y, en muchos casos, no logró producir segmentación alguna.

En la Figura 14 se observa la segmentación realizada por el modelo Tissuenet_cp3 en las imágenes del canal rojo de vinculina. Aunque el modelo muestra una mejora en comparación con las imágenes de fibras de actina, principalmente en la identificación y segmentación de núcleos celulares, es particularmente efectivo en separar individualmente los núcleos celulares en el tratamiento de control, con mucha más eficacia que en el tratamiento con borato, donde no reconoce todos los núcleos debido a la mayor densidad celular. Sin embargo, es capaz de distinguir y segmentar correctamente núcleos celulares que están próximos entre sí. A pesar de esto, el modelo solo segmenta núcleos celulares y no reconoce otras estructuras como la vinculina y las fibras de actina, que son los principales objetivos de identificación.

Tabla 1. Comparación cualitativa de técnicas de segmentación de imágenes celulares en diferentes tratamientos y tipos de imágenes. La tabla muestra las diferencias observadas entre técnicas de segmentación aplicadas a dos tipos de imágenes (fibras de actina y vinculina) bajo condiciones de control y tratamiento a borato.

Técnica de segmentación	Tratamiento	Tipo de imagen	Eficacia de la técnica	Comparación entre imágenes
Manual	Control	Fibras de actina	Segmentación sencilla, no muy precisa, mucho tiempo, muchos pasos poco postprocesado volumen bajo de imagenes	Segmentación similar simple
		vinculina	Segmentación sencilla, no muy precisa, mucho tiempo, muchos pasos poco postprocesado volumen bajo de imagenes	Segmentación similar simple
	Borato	Fibras de actina	Segmentación sencilla, no muy precisa, mucho tiempo, muchos pasos poco postprocesado volumen bajo de imagenes	Segmentación similar simple
		vinculina	Segmentación sencilla, no muy precisa, mucho tiempo, muchos pasos poco postprocesado volumen bajo de imagenes	Segmentación similar simple
Trainable Weka Segmentation	Control	Fibras de actina	Segmentación precisa, poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen intermedio de imágenes	Segmentada con mayor facilidad
		vinculina	Segmentación precisa, poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen intermedio de imágenes	Segmentada con mayor facilidad
	Borato	Fibras de actina	Segmentación no muy precisa, poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen intermedio de imágenes	Segmentada con mayor dificultad
		vinculina	Segmentación precisa, poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen intermedio de imágenes	Segmentada con mayor facilidad
Control	Fibras de actina	Segmentación muy precisa, muy poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentada con mucha facilidad	
	vinculina	Segmentación precisa, muy poco tiempo, pocos pasos,	Segmentada con facilidad	

Labkit			mayor postprocesado, volumen alto de imágenes.	
	Borato	Fibras de actina	Segmentación muy precisa, muy poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentada con mucha facilidad
		vinculina	Segmentación poco precisa, muy poco tiempo, pocos pasos, mayor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentada con dificultad
Cyto3	Control	Fibras de actina	Segmentación muy poco precisa, muy poco tiempo, pocos pasos, menor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Dificultad en la segmentación, se reconocen zonas incompletas o no se reconoce zonas.
		Vinculina	Segmentación precisión moderada, muy poco tiempo, pocos pasos, menor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con más facilidad, reconoce estructuras más completas, separa células, pero no la totalidad de las mismas.
	Borato	Fibras de actina	Segmentación muy poco precisa, muy poco tiempo, pocos pasos, menor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Dificultad en la segmentación, se reconocen zonas incompletas y erróneas.
		Vinculina	Segmentación con precisión moderada, pocos pasos, menor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con más dificultad, reconoce estructuras complejas, separa células, pero no la totalidad de las mismas.
Tissuenet_cp3	Control	Fibras de actina	Segmentación muy poco precisa, pocos pasos, menor postprocesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con mucha dificultad, no reconoce estructuras.
		Vinculina	Segmentación poco precisa, pocos pasos, menor post procesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con más facilidad, reconoce núcleos con facilidad, pero no demás estructuras.
	Borato	Fibras de actina	Segmentación muy poco precisa, pocos pasos, menor post procesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con mucha dificultad, no reconoce estructuras.
		Vinculina	Segmentación poco precisa, pocos pasos, menor post procesado, volumen alto de imágenes.	Segmentación con más facilidad, reconoce núcleos, pero no todos, no demás estructuras.

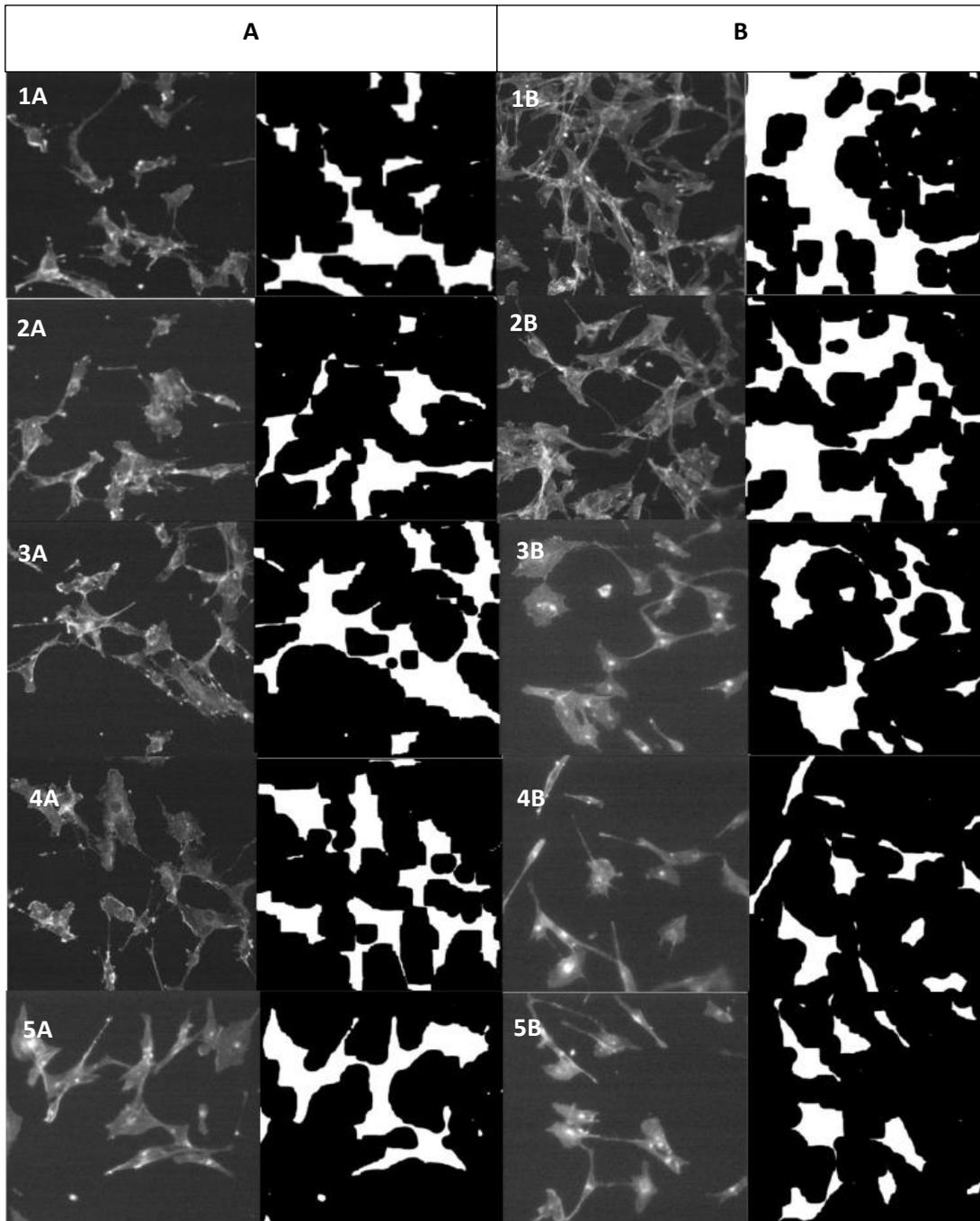


Figura 5. Segmentación manual mediante fiji en imágenes procedentes del canal verde para fibras de actina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

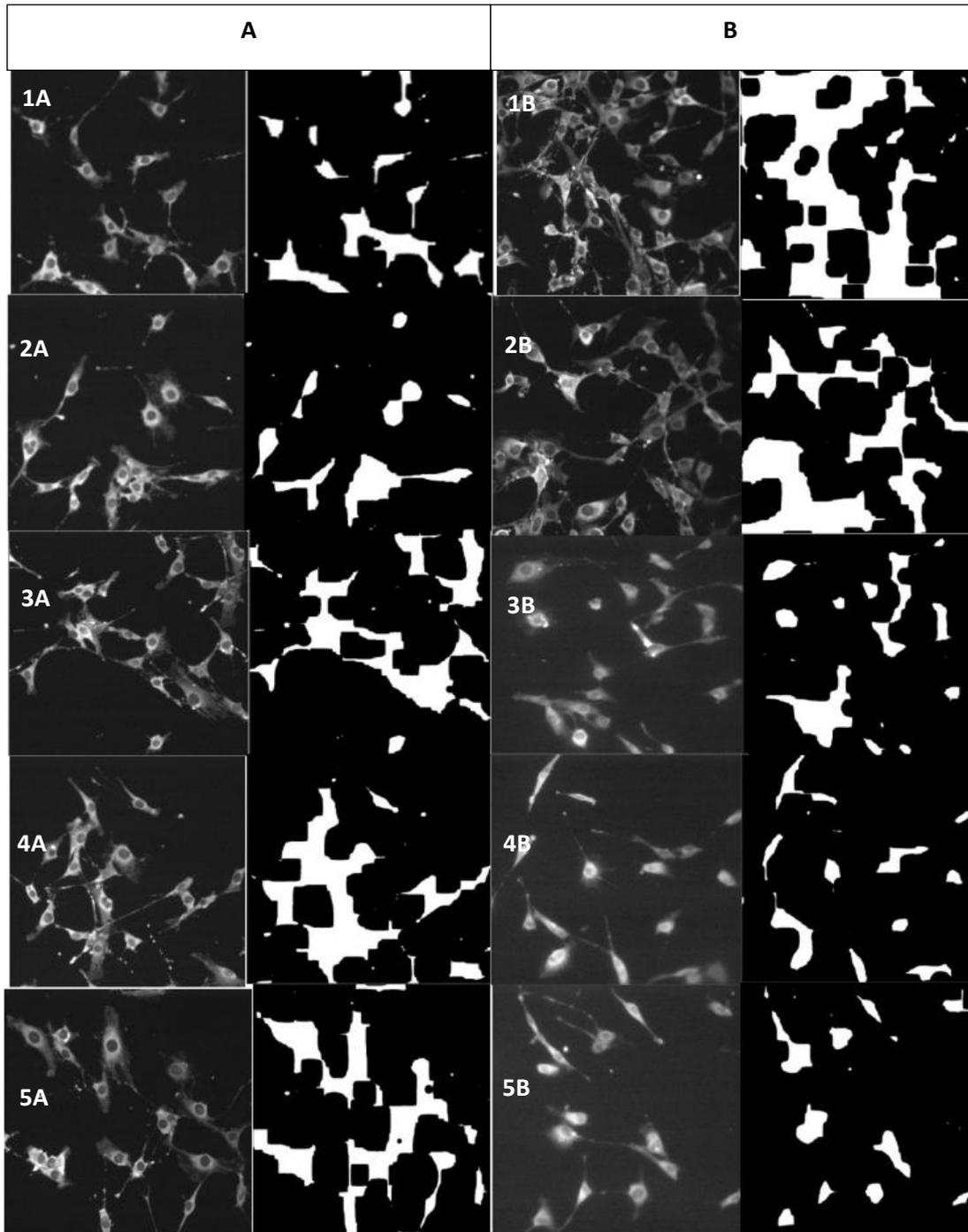


Figura 6. Segmentación manual mediante fiji en imágenes procedentes del canal rojo para vinculina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

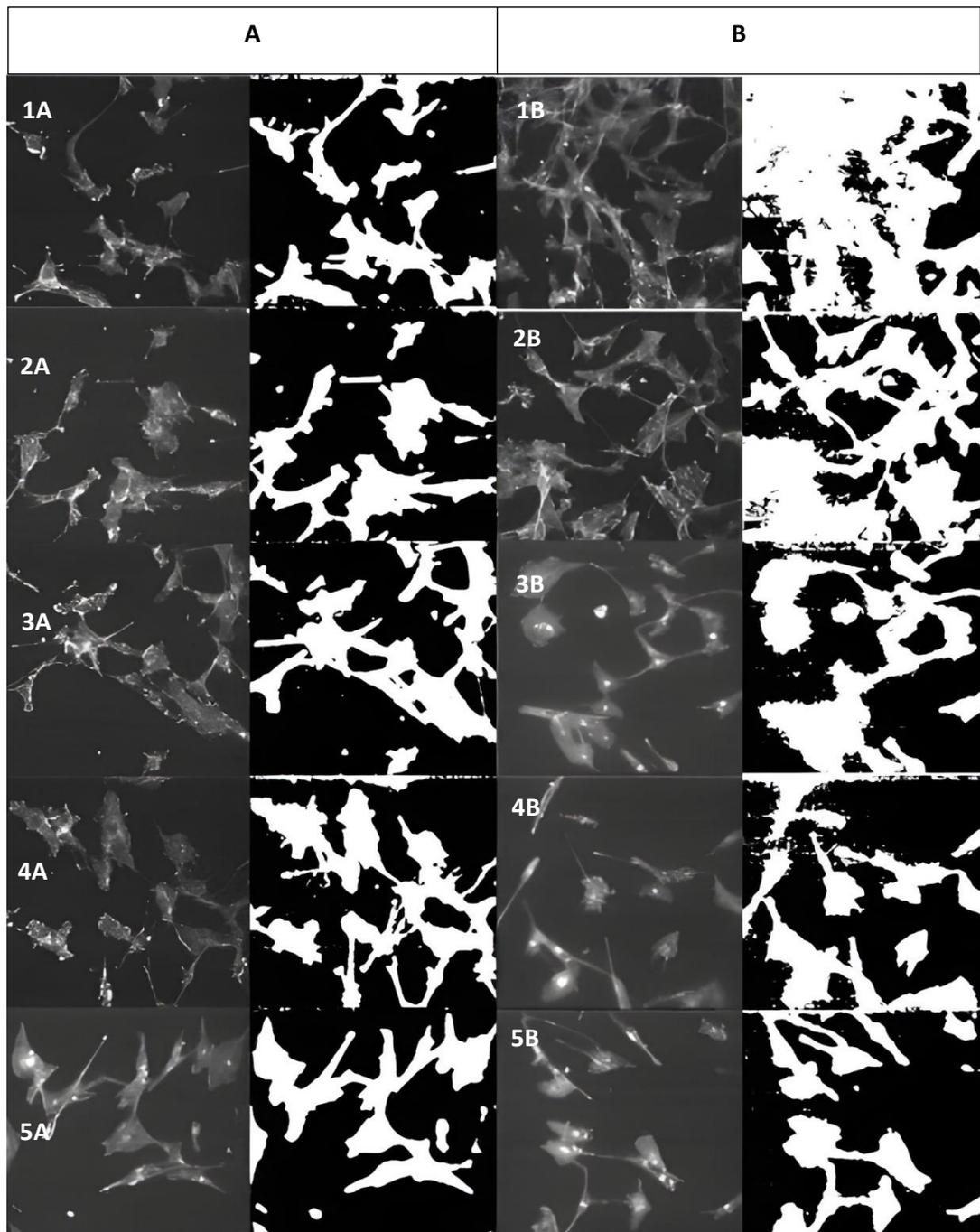


Figura 7. Segmentación por medio de Trainable Weka Segmentation en imágenes procedentes del canal verde para fibras de actina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

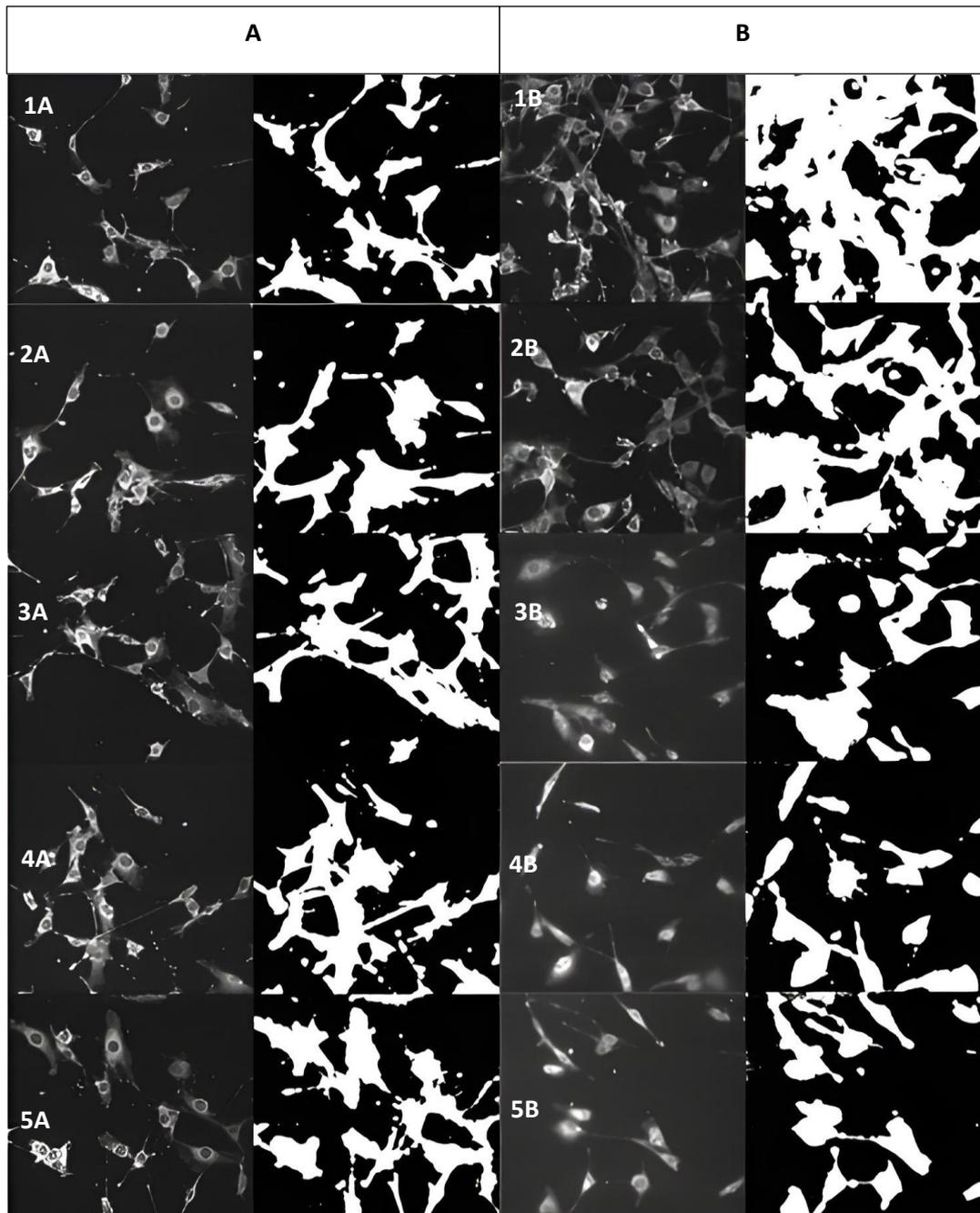


Figura 8. Segmentación por medio de Trainable Weka Segmentation en imágenes procedentes del canal Rojo para vinculina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

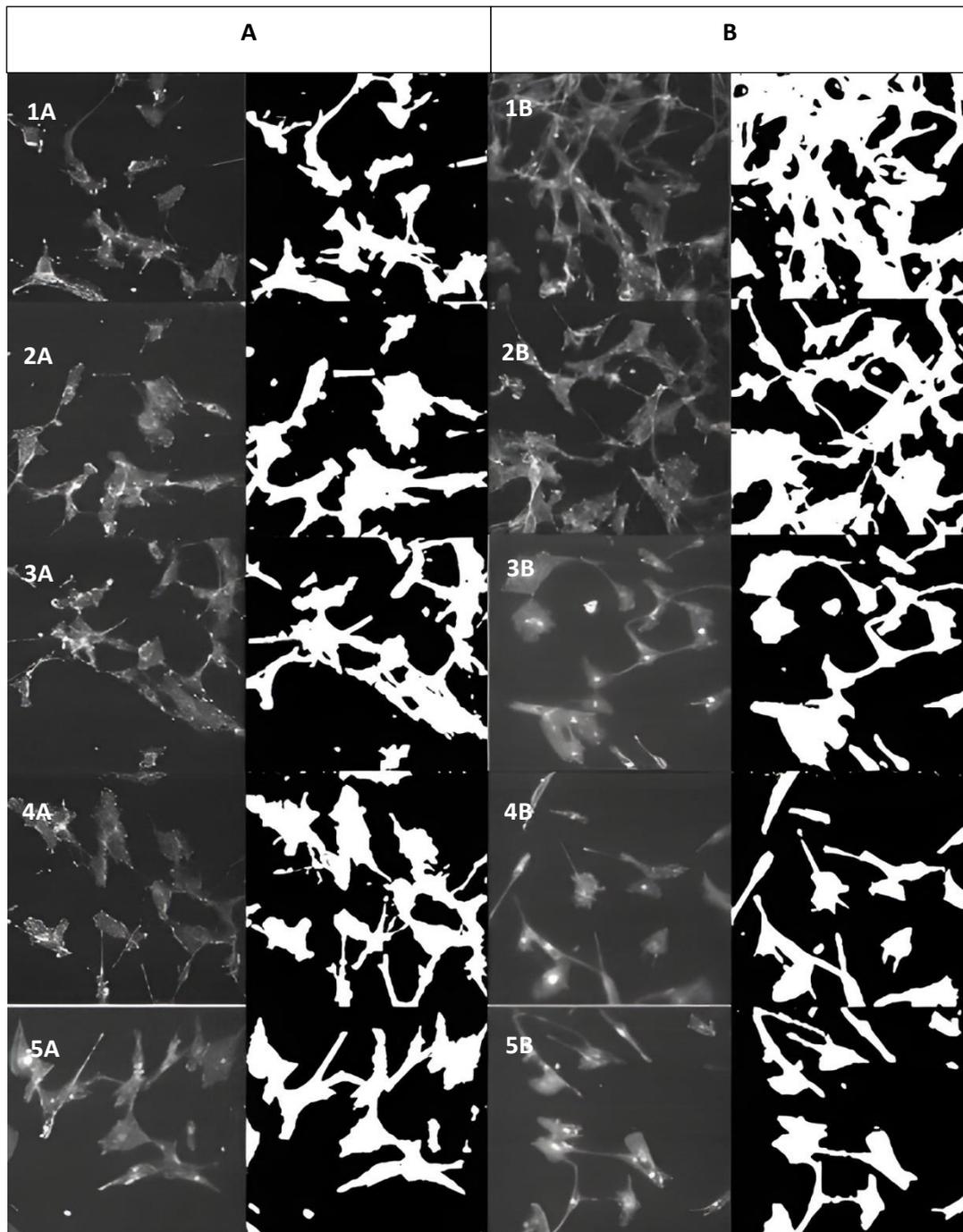


Figura 9. Segmentación por medio de Labkit en imágenes procedentes del canal verde para fibras de actina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

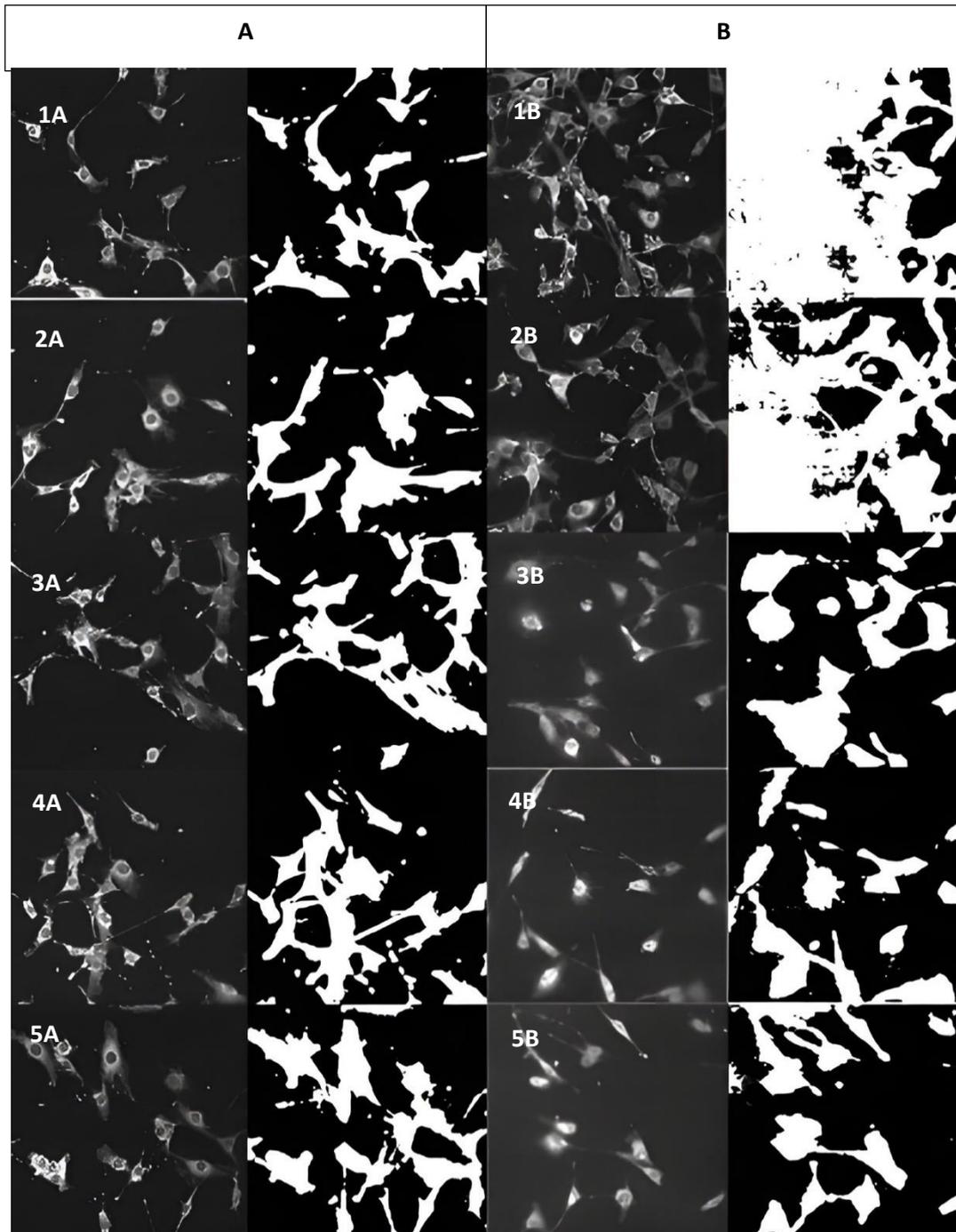


Figura 10. Segmentación por medio de Labkit en imágenes procedentes del canal rojo para vinculina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

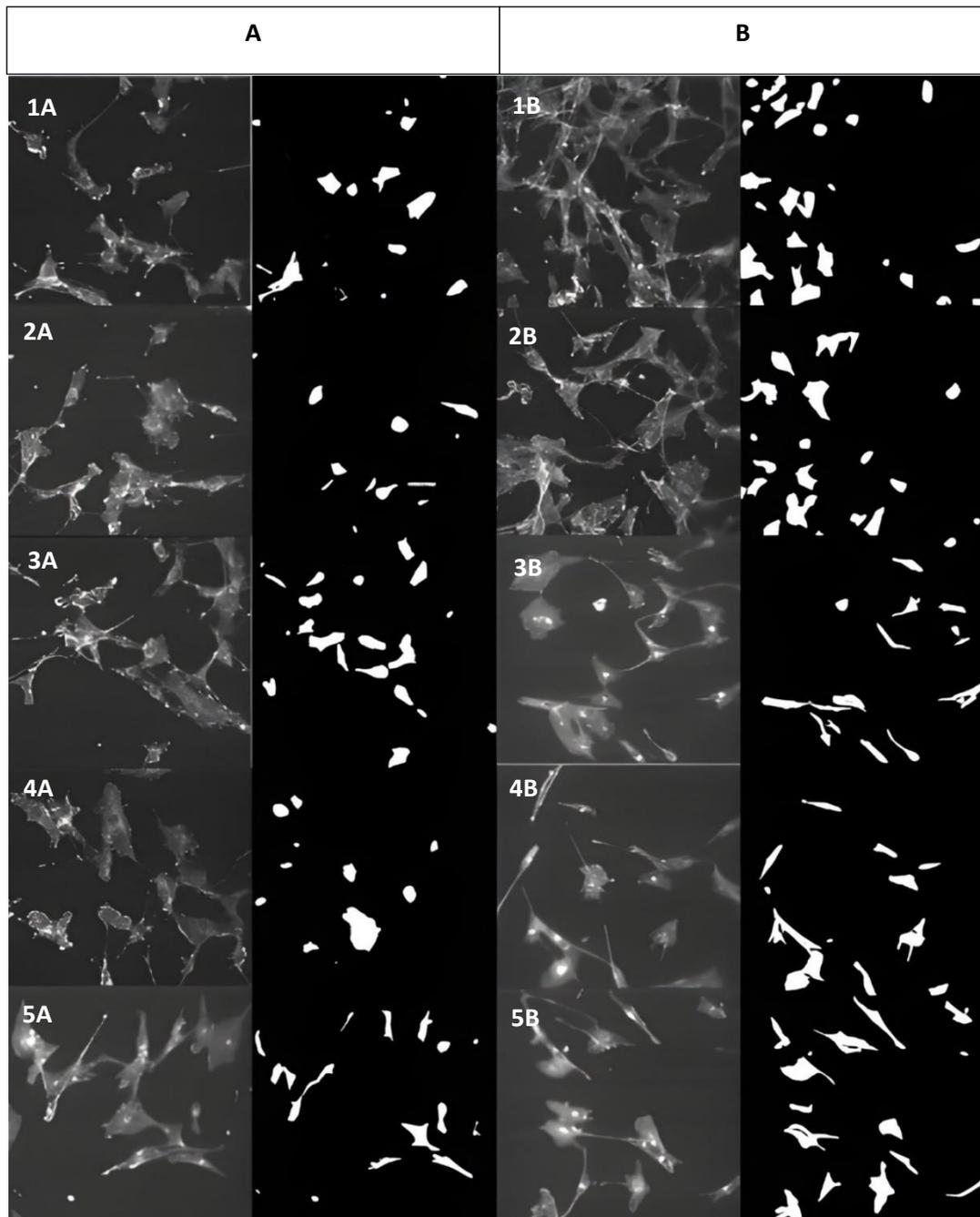


Figura 11. Segmentación por medio del modelo Cyto3 de cellpose en imágenes procedentes del canal verde para fibras de actina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

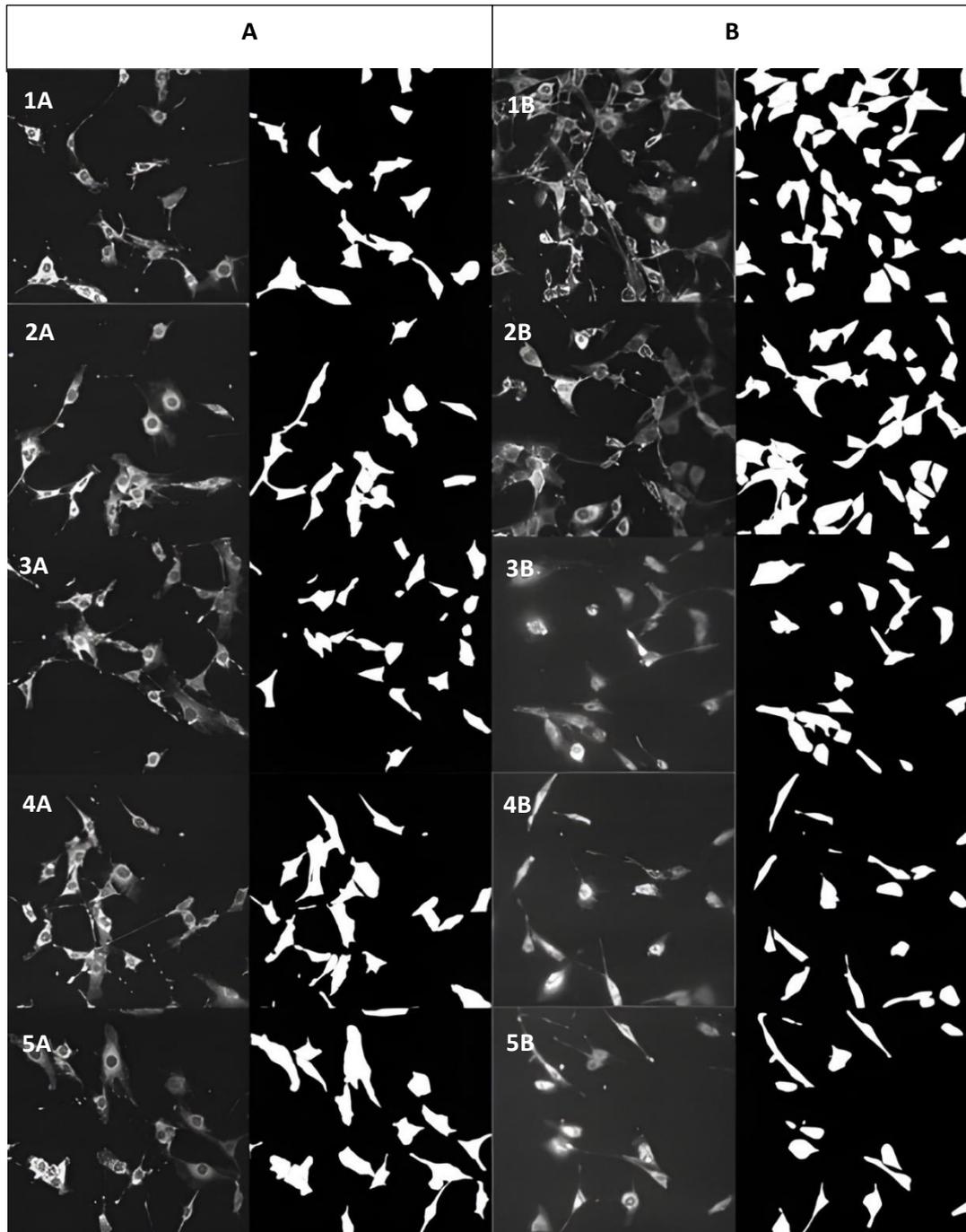


Figura 12. Segmentación por medio del modelo Cyto3 de cellpose en imágenes procedentes del canal rojo para vinculina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

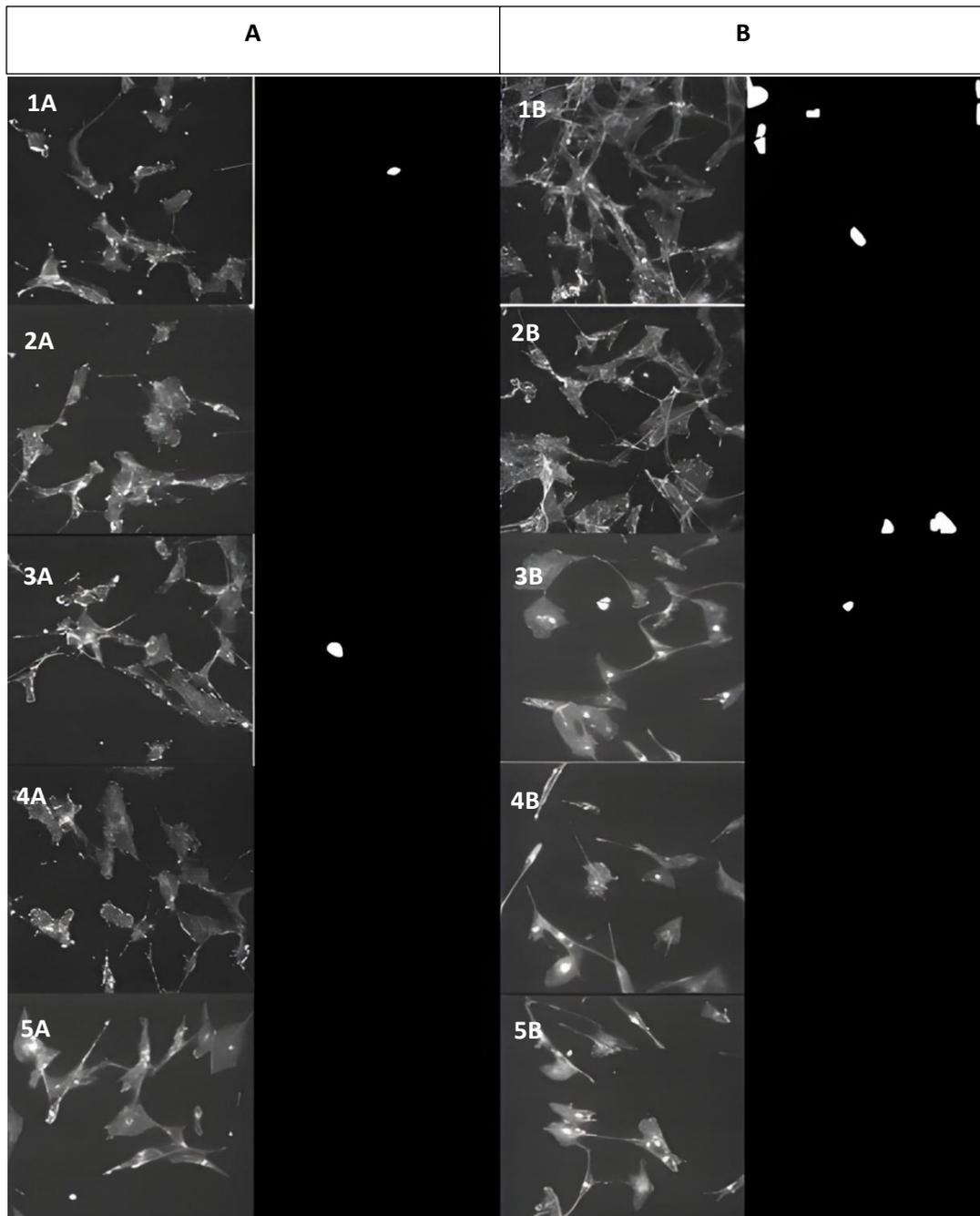


Figura 13. Segmentación por medio del modelo Tissuenet_cp3 de cellpose en imágenes procedentes del canal verde para fibras de actina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha)

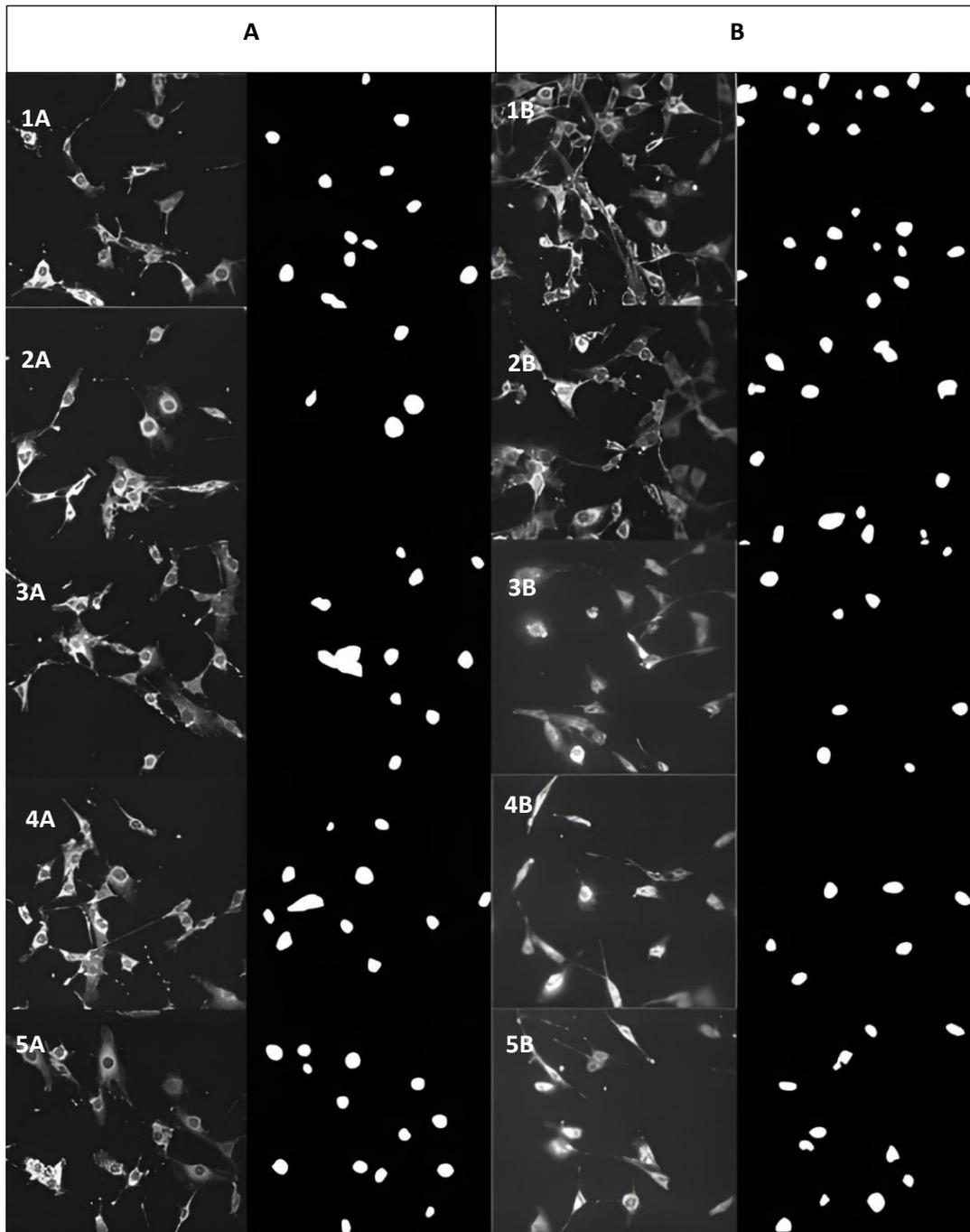


Figura 14. Segmentación por medio del modelo Tissuenet_cp3 de cellpose en imágenes procedentes del canal rojo para vinculina en dos tratamientos realizados A. grupo control (1A-5A imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha) y B. grupo expuesto a borato (1B-5B imágenes de referencia con su respectiva segmentación a la derecha).

5. Discusión

La segmentación de células musculares se ha convertido en una herramienta crucial para estudiar la morfología, adhesión celular y la comprensión de diversas enfermedades musculares. Además, permite analizar la respuesta de las células a distintos tratamientos. Los cambios en la estructura y distribución de las fibras de actina están involucrados en numerosos procesos celulares, como la diferenciación, proliferación y migración (Zonderland et al., 2019). La actina es una componente esencial del citoesqueleto, proporcionando soporte estructural y facilitando el movimiento celular necesario para la regeneración. En respuesta a daños, la actina y sus proteínas asociadas reorganizan el citoesqueleto para promover la cicatrización y regeneración de tejidos (Domínguez y Holmes, 2011). Por otro lado, la vinculina está asociada a la capacidad de las células para adherirse firmemente entre sí, siendo particularmente importante en procesos como la embriogénesis y la cicatrización de heridas (Reisler, 1993). La vinculina, una proteína localizada en la cara citoplasmática de las adhesiones célula-matriz y célula-célula, es indispensable para una adhesión celular robusta. Dos nuevas estructuras cristalinas revelan que la vinculina exhibe un alto grado de plasticidad estructural al unirse a ligandos, lo que podría facilitar cambios rápidos en la adhesión celular en respuesta a estímulos o tratamientos (Demali, 2004).

En este estudio analizamos células musculares de ratones provenientes de hidrogeles, expuestas a un tratamiento con borato y a un control. El borato induce la activación del transportador de borato (NaBC1) y de las integrinas que se unen a la fibronectina, lo que mejora la adhesión celular y la formación de fibras musculares (Ciriza et al., 2021). Esto, a su vez, induce un estado de adhesión que fortalece la unión de los mioblastos, promoviendo la fusión y maduración de los miotubos. De esta manera, se acelera el proceso de regeneración muscular (Ciriza et al., 2021). Como se puede observar en todas las imágenes, las células expuestas a borato presentan un mayor número de células y fibras de actina, lo cual dificulta más la segmentación de las mismas.

Desarrollar nuevos protocolos, software y herramientas avanzadas nos permitirá comprender mejor la naturaleza y el desarrollo de estas y muchas otras células. Esto facilitará el avance en la comprensión de enfermedades y procesos de regeneración,

además de contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos. Estos avances optimizarán el tiempo de investigación y reducirán los costos asociados, acelerando el descubrimiento y la implementación de terapias innovadoras.

El estudio de las fibras de actina y vinculina en células musculares presenta varias dificultades técnicas y metodológicas. Por ejemplo, las diferencias en la forma y tamaño de las células dificultan el análisis de la distribución de la actina. Además, tanto la vinculina como la actina son componentes esenciales del citoesqueleto, lo que las hace estructuralmente complejas (Zonderland et al., 2019).

La visualización y análisis de estas estructuras requieren técnicas avanzadas de microscopía y segmentación. Aquí, analizamos algunas de las técnicas actualmente disponibles para segmentar células, como el software Fiji y Cellpose, dentro de los cuales encontramos diferentes plugins y modelos que facilitan el análisis y segmentación de células. En el caso de Fiji, analizamos la segmentación manual, optimizada por un script de macro de ImageJ; el plugin Trainable Weka Segmentation, basado en algoritmos de aprendizaje automático; y Labkit, que utiliza un algoritmo basado en random forest. Mientras que para el software Cellpose, utilizamos los modelos preentrenados de Cyto3, un modelo super-generalista, y Tissuenet_cp3, un modelo dedicado a la segmentación de estructuras complejas.

Fiji es una distribución del software de código abierto ImageJ, específicamente adaptada para el análisis de imágenes biológicas. Integra prácticas modernas de ingeniería de software con potentes bibliotecas de software y una variedad de lenguajes de scripting para facilitar la creación rápida de prototipos y el intercambio de algoritmos de procesamiento de imágenes (Schindelin, et al., 2012).

5.1 Segmentación manual

Basándonos en los resultados obtenidos en Fiji para la segmentación de células musculares, se destaca la eficiencia de esta herramienta en la identificación y segmentación de estructuras, tanto en las imágenes de fibras de actina como en las de vinculina (Figura 5 y 6 respectivamente). La segmentación manual en Fiji requiere varios

pasos, donde la persona que realiza la segmentación debe supervisar y corregir manualmente las áreas de segmentación. Los pasos incluyen:

- Realizar un enhance contrast para visualizar mejor las estructuras y células.
- Aplicar un threshold para separar las estructuras y convertir la imagen en escala de grises a una imagen binaria, dividiéndola en fondo y primer plano.
- Realizar un subtract background para eliminar los píxeles que no formen parte de las células o estructuras a segmentar, limpiando la imagen.
- Finalmente, aplicar un nuevo threshold para segmentar las imágenes.

Es importante destacar que, para este y otros métodos dentro de Fiji, es necesario separar manualmente las células después del proceso de segmentación, ya que el programa puede delinear los bordes de las estructuras, pero no separar las células que están unidas en el tipo de imágenes usadas.

El proceso de segmentación manual resulta más complejo y consume mucho tiempo, especialmente cuando se deben segmentar grandes cantidades de imágenes (Reyes-Fernandez et al., 2019). Sin embargo, ofrece más libertad al permitir controlar cada paso del proceso. Además, permite obtener imágenes segmentadas simples sin necesidad de un post procesado extenso, ya que, al ser una segmentación manual, no deja píxeles o partículas extra que no formen parte de las estructuras o células a medir y cuantificar, evitando así la necesidad de eliminarlas posteriormente (Figura 5 y 6).

Es común encontrar dificultades en la segmentación y cuantificación manual de las características de las células musculares de manera precisa y sin errores, debido a las variaciones en su morfología según la etapa de diferenciación y el tipo de célula e imagen que se esté estudiando. Es crucial que las cuantificaciones sean exactas y reflejen lo observado biológicamente (Hinkle et al., 2021). Muchos equipos de investigación realizan cuantificaciones manuales de imágenes de microscopía para evaluar la viabilidad celular, la fusión y observar que efecto presentan diferentes tratamientos, debido a que la mayoría del software disponible no puede segmentar con precisión (Hinkle et al., 2021).

La cuantificación manual presenta limitaciones, como hemos mencionado anteriormente; puede variar entre investigadores y debe realizarse de forma ciega. La principal limitación es que es un proceso que consume mucho tiempo, especialmente porque se necesita analizar numerosas imágenes para obtener una precisión adecuada y un análisis estadístico riguroso (Hinkle et al., 2021). Por lo tanto, existe una necesidad real de desarrollar un software especializado en músculo que pueda medir diversas características de las células musculares esqueléticas de manera consistente, minimizando el error humano y siendo eficiente en tiempo (Hinkle et al., 2021).

Esta limitación impulsó la necesidad de desarrollar un proceso más automatizado para el análisis de imágenes en futuras investigaciones, lo que permitiría mejorar la eficiencia y productividad del estudio al analizar una mayor cantidad de datos en un tiempo reducido.

5.2. script de automatización

Para automatizar algunos pasos de la segmentación manual, se generó un script en lenguaje macro de ImageJ, como se puede observar en la Figura 1. Este script permite automatizar procesos sencillos como el ajuste de contraste (Enhance Contrast), la sustracción de fondo (Subtract Background) y la aplicación de umbral (Threshold), dejando la imagen lista para la separación de células y la medición de estructuras. Es necesario supervisar estos pasos para ajustar los umbrales según la imagen que se desee segmentar. El script resulta ser una herramienta de gran ayuda en el proceso de segmentación manual, proporcionando resultados útiles y precisos. De esta manera, es posible segmentar un mayor número de imágenes en menos tiempo, optimizando el flujo de trabajo y mejorando la eficiencia en el análisis de imágenes celulares.

5.3. Trainable Weka segmentation

Trainable Weka segmentation es un el plugin de FIJI que combina una colección de algoritmos de aprendizaje automático con un conjunto de características seleccionadas de la imagen para producir segmentaciones basadas en píxeles (Arganda-Carreras et al., 2017). Para entrenar los modelos tan solo se requiere una imagen similar a las que se va a segmentar y realizar un trazo de dos clases como mínimo para comenzar el

entrenamiento. La primera vez que se presiona el botón de entrenar modelo (Train model), las características de la imagen de entrada serán extraídas y convertidas a un conjunto de vectores de valores flotantes, que es el formato que esperan los clasificadores de Weka (Arganda-Carreras et al., 2017).

Este paso puede demorar un periodo de tiempo dependiendo del peso de las imágenes, el número de características y, también del número de núcleos de la computadora donde se esté ejecutando Fiji. Al terminar el entrenamiento correctamente, la imagen mostrada está completamente segmentada y lista para el proceso de separación de células y cuantificación de estructuras (Arganda-Carreras et al., 2017).

Como se puede observar en la Figura 7, la segmentación con este plugin fue bastante efectiva en general, destacando su eficacia en las imágenes del tratamiento control, en las cuales produce una mejor segmentación que en las imágenes del tratamiento con borato. Esto se debe principalmente a que el tratamiento con borato produce una aceleración en la maduración y regeneración de las células (Ciriza et al., 2021). Por lo tanto, en estas imágenes hay una mayor concentración de células y de estructuras principales como las fibras de actina y vinculina. Debido a esta alta densidad, el modelo de Trainable Weka Segmentation suele confundir estructuras y tiende a abarcar más zonas de forma errónea (Figura 7 1B). el plugin tuvo un mejor rendimiento en las imágenes del canal rojo para vinculina pues hubo menos zonas erróneas segmentadas (Figura 8). Este problema puede mejorar si el modelo se entrena con más imágenes, ya que la posibilidad de entrenar el modelo mediante una gran cantidad de datos permite que el proceso de segmentación sea más eficiente y, en muchos casos, más preciso. En esta ocasión, tanto para las imágenes de fibras de actina como para las de vinculina, el modelo produjo segmentaciones bastante precisas y útiles.

El plugin permite reducir notablemente el tiempo de segmentación, ya que con un modelo entrenado solo es necesario ejecutarlo en el conjunto de imágenes seleccionadas para proceder a la separación y cuantificación de células y estructuras. Sin embargo, el postprocesado requiere más tiempo porque la segmentación genera un mayor número de ROIs (regiones de interés) que deben ser revisadas manualmente.

Este enfoque demuestra que, aunque la automatización mejora significativamente la eficiencia del proceso de segmentación, la supervisión manual sigue siendo crucial para garantizar la precisión y calidad de los resultados en todos los modelos utilizados.

5.4. Labkit

El plugin Labkit genera una clasificación de píxeles basada en un algoritmo de bosques aleatorios (random forest) establecido para la segmentación semántica de imágenes, este algoritmo aplica un uso eficiente en memoria permitiendo que sea fácilmente usado en cualquier tipo de computadora (Arzt et al., 2022). Labkit es fácil de instalar en prácticamente todos los portátiles y estaciones de trabajo. La implementación del algoritmo en Labkit es muy similar a herramientas de aprendizaje automático como Trainable Weka Segmentation, pero pone un mayor énfasis en la escalabilidad (Arzt et al., 2022). El algoritmo de clasificación de píxeles de Labkit solo necesita una pequeña cantidad de datos de entrenamiento. Proporcionar una gran cantidad de datos de entrenamiento a menudo resulta en una clasificación de bajo rendimiento. En este caso, con una señalización correcta de las imágenes a segmentar, se obtuvo un resultado bastante preciso (Figura 8 y 9).

El algoritmo de clasificación de píxeles de Labkit aplica una lista de filtros en la imagen para recopilar información sobre los píxeles individuales. El cuadro de diálogo de configuración de clasificación de píxeles permite seleccionar qué filtros usa Labkit para mejorar o ajustar los resultados dependiendo de las imágenes que se desee segmentar, asegurando así un mejor resultado. Los ajustes predeterminados generalmente funcionan bien, pero seleccionar los filtros manualmente podría, en algunos casos, ayudar a mejorar el tiempo de ejecución y la calidad de los resultados (Arzt et al., 2022).

La principal característica de Labkit es su capacidad para manejar y segmentar un volumen muy elevado de imágenes, llegando a gestionar hasta terabytes de información (Arzt et al., 2022). Opcionalmente, se puede aprovechar la potencia de las unidades de procesamiento gráfico (GPU) para mejorar el rendimiento en tiempo de ejecución (Arzt et al., 2022). Actualmente, el volumen de datos que se generan en las investigaciones crece a un ritmo exponencial, especialmente en estudios de este tipo, donde es necesario analizar cientos o incluso miles de imágenes para obtener resultados fiables.

Esta herramienta permite realizar estos análisis en un tiempo significativamente menor que el requerido para hacerlo manualmente o con otras técnicas de segmentación.

Además, Labkit posee una interfaz de usuario intuitiva que facilita el entrenamiento de modelos (Figura 3). En cuanto a los resultados de segmentación, como se puede observar en la Figura 9, la segmentación realizada en las imágenes del canal verde para fibras de actina demostró ser la más efectiva de todas las técnicas utilizadas, produciendo una segmentación precisa y detallada tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con borato. Aunque en este último se presenta mayor dificultad debido a la unión de las células provocada por el tratamiento, el modelo tuvo un rendimiento efectivo y supo distinguir mejor los bordes de las estructuras. Además, el tiempo requerido para la segmentación es muy reducido, lo que lo convierte en un candidato ideal para este tipo de imágenes.

Para la segmentación de las imágenes del canal rojo para vinculina (Figura 10), el modelo tuvo una segmentación precisa en la mayoría de los casos. Sin embargo, en el tratamiento con borato tuvo problemas para distinguir las estructuras y segmentarlas correctamente, posiblemente debido a la proximidad y fusión de las células o al modelo en sí. Este problema podría mejorar ampliando el entrenamiento del modelo con más imágenes similares para mejorar su capacidad de identificación.

Este protocolo resultó ser más útil en la segmentación de imágenes de fibras de actina que en la segmentación de imágenes de vinculina.

5.5. Cellpose

Cellpose es un método de segmentación generalista basado en aprendizaje profundo mediante redes neuronales convolucionales (CNN) (Stringer et al., 2021). Las CNN son efectivas en la identificación de patrones en los datos de imagen debido a su capacidad para capturar características espaciales. A través de varias capas convolucionales, el modelo extrae características de bajo y alto nivel de las imágenes (Stringer et al., 2021). Esto incluye bordes, texturas y formas complejas. Las capas convolucionales generan mapas de características que representan diferentes aspectos de la imagen. que puede segmentar con precisión células de una amplia gama de tipos de imágenes y no requiere

reentrenamiento del modelo ni ajustes de parámetros. Cellpose se entrenó en un nuevo conjunto de datos con imágenes de células altamente variadas, que contiene más de 70,000 objetos segmentados (Stringer et al., 2021).

Cell pose Puede ser entrenado con diferentes conjuntos de datos, lo que permite personalizar el modelo para necesidades específicas de segmentación. La precisión del modelo depende en gran medida de la calidad y cantidad de datos de entrenamiento (Stringer et al., 2021). Modelos mal entrenados pueden producir segmentaciones inexactas como las ocurridas para ambos modelos probados en las imágenes de estudio como veremos en las Figuras 11, 12, 13 y 14.

Cellpose viene integrado con varios modelos pre entrenados que se pueden utilizar según las necesidades y las imágenes a segmentar. En este caso, tanto para las imágenes del canal verde de fibras de actina como para el canal rojo de vinculina, utilizamos los dos modelos considerados más adecuados: el modelo super-generalista Cyto3 y el modelo Tissuenet_cp3.

El software también incluye funciones para aplicar filtros y mejorar imágenes. En este caso, utilizamos el filtro de “denoise”, que permite limpiar el fondo de las imágenes para observar mejor la ubicación de las células y separarlas más eficazmente del fondo. Este filtro funcionó muy bien, realizando una eliminación de ruido y una separación del fondo mucho más efectiva que las funciones presentes en Fiji (Riendeau et al., 2024).

5.6. Cyto3

Cyto3 es la versión más generalista de Cellpose, diseñada principalmente para la segmentación de células y núcleos en imágenes de microscopía. Utilizando su algoritmo basado en redes neuronales convolucionales (CNN), pre entrenado con más de 70,000 imágenes, es capaz de segmentar imágenes con gran rapidez y facilidad. El modelo Cyto3 no solo permite la segmentación, sino también la restauración de imágenes con alto ruido o baja resolución (Stringer et al., 2021)

Cyto3 ofrece una segmentación sumamente rápida, ya que su algoritmo permite manejar grandes volúmenes de datos (Stringer et al., 2021). Al igual que Trainable Weka Segmentation y Labkit, la interfaz y uso de este software es muy sencilla. La ventaja es

que no es necesario entrenar el modelo, a diferencia de las dos técnicas mencionadas anteriormente; simplemente se aplica el modelo a la imagen o imágenes que se desean segmentar, lo que ahorra tiempo y permite iniciar la segmentación directamente.

El problema de usar modelos pre entrenados con datos variados es que no siempre ofrecen una segmentación precisa. El modelo Cyto3, a pesar de ser el modelo super-generalista de Cellpose y el más apropiado, no tuvo el rendimiento esperado en las imágenes de fibras de actina, como se puede observar en la Figura 11. Es capaz de reconocer las estructuras más representativas de las imágenes, pero no las reconoce completamente, especialmente en las imágenes tratadas con borato (1B-5B). La alta concentración de células dificulta aún más que el modelo las reconozca adecuadamente.

Las fibras de actina son estructuras complejas de segmentar, y el modelo Cyto3 probablemente no esté correctamente entrenado para el tipo de imágenes usadas en este estudio. También se podría observar una mejora en la segmentación de las imágenes ajustando parámetros o mejorando las imágenes con un preprocesamiento adecuado para obtener un resultado más favorable.

En cuanto a la segmentación de las imágenes del canal rojo para vinculina (Figura 12), se puede observar que el modelo Cyto3 realizó un mejor trabajo de segmentación en comparación con las imágenes de fibras de actina (Figura 11). Fue capaz de reconocer mejor las estructuras en ambos tratamientos, aunque con mayor dificultad en el tratamiento con borato. A pesar de esto, en varias imágenes no reconoció zonas importantes o las reconoció incompletamente.

En las imágenes de vinculina, el núcleo de las células es fácilmente visible, y una característica muy útil de estos modelos es que reconocen muy bien dónde termina una célula y dónde comienza otra. Esto resultó ser especialmente útil en la separación de células que se encuentran unidas. Esta característica no se encuentra en Fiji y permite que el post procesado de las imágenes segmentadas sea mucho más sencillo que con las técnicas usadas en Fiji.

5.7. Tissuenet_cp3

Este modelo es una versión especializada de Cellpose, diseñada principalmente para la segmentación de tejidos. Por lo tanto, ha sido entrenado con un conjunto de diversas imágenes de tejidos con diferentes características. Este modelo fue seleccionado debido a su capacidad para segmentar estructuras complejas, como las fibras de actina (Stringer y Pachitariu, 2024).

En la Figura 13 se puede observar el rendimiento de este modelo aplicado a las imágenes del canal verde para fibras de actina. En este caso, el modelo tuvo el rendimiento más deficiente, ya que en la mayoría de las imágenes no logra reconocer ninguna estructura. Esto demuestra que este modelo no es adecuado para reconocer fibras de actina, a pesar de haber sido entrenado para identificar estructuras complejas (Stringer y Pachitariu, 2024). Es probable que el conjunto de imágenes con las que fue entrenado el modelo no sirva para reconocer las estructuras de las imágenes usadas en este estudio. También puede deberse a que el tipo y formato de las imágenes que utilizamos no sean los correctos y adecuados para que el modelo las reconozca de manera eficiente. Finalmente, es posible que ajustando parámetros y mejorando las imágenes mediante preprocesamiento se puedan obtener mejores resultados.

En la Figura 14 podemos ver el rendimiento del modelo en las imágenes del canal rojo para vinculina. En este conjunto de imágenes, el modelo tuvo un rendimiento más apropiado, ya que pudo reconocer núcleos celulares en todas las imágenes, tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con borato. Además, fue capaz de separar células que se encontraban muy juntas, aunque en su mayoría solo pudo reconocer núcleos celulares y no logró segmentar el resto de estructuras. Es posible que se obtengan mejores resultados con un preprocesamiento más adecuado. En estas imágenes donde los núcleos son visibles, el modelo tuvo un mejor rendimiento, lo que podría indicar que el conjunto de datos con el que fue entrenado no es adecuado para el tipo de imágenes que se segmentaron.

Todas las técnicas probadas en la segmentación de las imágenes utilizadas en este estudio demuestran tener ventajas y desventajas según el tipo de imagen y la estructura que se segmenta. Además, el análisis de las células bajo diferentes técnicas y

condiciones experimentales reveló diferencias notables en la precisión y adaptabilidad de cada método. Como se puede observar en la Tabla 1, se han separado las diferentes técnicas utilizadas de acuerdo al tipo de imagen y tratamiento aplicado para comparar la eficacia de cada técnica en cada condición probada.

6. Conclusiones

Este trabajo evaluó la efectividad en términos de tiempo, eficacia y practicidad de dos de los softwares más utilizados para segmentar imágenes de microscopía. Dentro del software Fiji se evaluó la segmentación manual, la cual fue optimizada mediante un script en lenguaje de macro de ImageJ. También se evaluaron el plugin Trainable Weka Segmentation, que utiliza algoritmos de aprendizaje automático, y el plugin Labkit, que emplea un algoritmo basado en random forest para la toma de decisiones.

Dentro del software Cellpose se evaluaron los dos modelos considerados más apropiados para el tipo de imágenes a segmentar: el modelo super-generalista Cyto3, diseñado para la segmentación de células y núcleos en imágenes de microscopía, y el modelo Tissuenet_cp3, diseñado para la segmentación de tejidos en imágenes de microscopía.

Los resultados mostraron que cada técnica presenta sus ventajas y limitaciones dependiendo de las características de las estructuras a segmentar, así como del tipo de imagen y de los tratamientos expuestos. En general, las imágenes del canal verde, correspondientes a las fibras de actina, fueron las más complicadas de segmentar para todas las técnicas debido a su complejidad. Por otro lado, las imágenes del canal rojo, correspondientes a vinculina, obtuvieron mejores resultados en términos generales en todas las técnicas probadas.

En la segmentación manual, fue posible segmentar exitosamente las imágenes tanto del canal verde para fibras de actina como del canal rojo para vinculina. Las ventajas de la segmentación manual incluyen la capacidad de supervisar cada paso, manteniendo un control constante y asegurando una segmentación adecuada. Esto es especialmente útil en imágenes complejas, como las de células tratadas con borato, que pueden confundir a los modelos automatizados. Con el control manual, es posible manejar mejor estas situaciones.

Sin embargo, la segmentación manual requiere mucho tiempo y esfuerzo para lograr una segmentación precisa, por lo que generalmente se mantiene en una segmentación simple sin intentar delinear detalles exactos. Esto favorece enormemente el postprocesado, ya que no es necesario eliminar muchos ROIs (regiones de interés) debido a la simplicidad de la segmentación.

El plugin Trainable Weka Segmentation demostró ser efectivo en el proceso de segmentación, ya que en la mayoría de los casos reconoció correctamente las estructuras. Tuvo un mejor rendimiento segmentando las imágenes del canal rojo para vinculina, incluso en el tratamiento con borato, donde las células están más unidas, logrando un rendimiento más que adecuado.

El modelo que mejor se adaptó a las imágenes utilizadas en este estudio fue el plugin Labkit de FIJI, el cual demostró ser el más efectivo en la segmentación de fibras de actina, pudiendo segmentar y delinear con gran precisión las fibras de actina, además de identificar zonas exactas sin abarcar áreas incorrectas o incompletas.

Cellpose es un software que utiliza modelos preentrenados para realizar segmentaciones de imágenes de microscopía. En este estudio se analizaron dos modelos preentrenados: el modelo super-generalista Cyto3 y el modelo Tissuenet_cp3, diseñado para segmentar estructuras complejas como tejidos.

Tanto Cyto3 como Tissuenet_cp3 tuvieron problemas en la segmentación de las imágenes utilizadas en este estudio. Ambos modelos fueron deficientes en la detección de fibras de actina en las imágenes del canal verde. Si bien Cyto3 fue capaz de identificar algunas estructuras, aunque erróneas en muchos casos, Tissuenet_cp3 no logró reconocer estructuras para la segmentación en la mayoría de los casos.

Para la segmentación en las imágenes del canal rojo para vinculina, Cyto3 fue capaz de segmentar las imágenes de manera adecuada tanto en las imágenes del tratamiento control como en las imágenes del tratamiento con borato, a pesar de tener una mayor concentración de células. Sin embargo, esto no significa que segmentara todas las zonas correctamente, ya que, aunque identificó las células adecuadamente, en muchos casos no abarcaba todas las zonas correctas.

Por su parte, Tissuenet_cp3 reconoció solo núcleos celulares en las imágenes del canal rojo para vinculina, y fue capaz de identificar esta estructura correctamente en la mayoría de las imágenes. Sin embargo, en imágenes del tratamiento con borato, no reconoció todos los núcleos celulares. A pesar de su capacidad para reconocer núcleos celulares, el modelo no resultó útil para las estructuras que se desean segmentar.

A pesar de estos problemas, Cellpose ofrece características útiles para la segmentación de imágenes de microscopía. La utilización de modelos preentrenados ofrece la ventaja de ahorrar tiempo, permitiendo manejar grandes volúmenes de imágenes. Además, se observó que es capaz de separar correctamente las células que se encuentran muy unidas, lo que reduce el tiempo necesario para el postprocesado de imágenes, convirtiéndolo en una herramienta poderosa para el análisis de grandes cantidades de imágenes.

6.1 Perspectivas futuras

El software FIJI demostró ser una herramienta útil y precisa en la segmentación y medición de parámetros en células de tejido muscular. Sin embargo, se identificó la necesidad de desarrollar un proceso más automatizado para analizar eficientemente una gran cantidad de imágenes en futuros estudios. La herramienta Labkit resultó ser especialmente útil en la segmentación de fibras de actina, mientras que Trainable Weka Segmentation fue efectiva para la segmentación de vinculina. Cellpose es particularmente útil para la identificación y separación de células que se encuentran muy unidas, permitiendo reconocer estructuras complejas.

Basado en los hallazgos obtenidos de este análisis, se recomienda que para la segmentación de imágenes con estructuras complejas como las fibras de actina se implementen varias técnicas simultáneamente para lograr mejores resultados. Asimismo, surge la necesidad de entrenar modelos propios dedicados a este tipo de imágenes, lo que permitiría implementar una segmentación con un porcentaje muy alto de aciertos y reducir considerablemente el tiempo necesario para realizar estas tareas.

Este análisis destaca la importancia de ajustar la técnica de segmentación a los objetivos del estudio y a las propiedades de la muestra, sentando las bases para desarrollar protocolos más precisos en el análisis de células musculares en investigaciones futuras.

7. Bibliografía

- 1 Encarnacion-Rivera, L., Foltz, S., Hartzell, H., & Choo, H. (2019). Myosoft: An automated muscle histology analysis tool using machine learning algorithm utilizing Fiji/ImageJ software. PLoS ONE, 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229041>.
- 2 Musarò, A. (2014). The Basis of Muscle Regeneration., 2014, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/612471>.
- 3 Ciriza, J., Rodríguez-Romano, A., Nogueroles, I., Gallego-Ferrer, G., Cabezuelo, R., Pedraz, J., & Rico, P. (2021). Borax-loaded injectable alginate hydrogels promote muscle regeneration in vivo after an injury. Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications, 123. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112003>.
- 4 Flanigan, K. (1999). The Muscular Dystrophies. Seminars in Neurology, 32, 255 - 263. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1329199>.
- 5 Guerra-Torres, M., Suárez-Obando, F., García-Roblesa, R., & Ayala-Ramírez, P. (2019). Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. Pediatría, 52(1), 8-14.
- 6 Rodríguez-Romano, A., Gonzalez-Valdivieso, J., Moreno-Martínez, L., Costa, J., Osta, R., & Rico, P. (2023). Injectable borax-loaded alginate hydrogels reduce muscle atrophy, inflammation and generate neuroprotection in the SOD1G93A mouse model of ALS. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.11.14.567052>.
- 7 Luscombe, N. M., Greenbaum, D., & Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? An introduction and overview. Yearbook of medical informatics, 10(01), 83-100.
- 8 Vargas, M. G. F., Díaz, J. D. E., & Gamboa, D. A. U. (2019). CONTEO Y SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE FIBRAS MUSCULARES EN RATONES PARA EL ESTUDIO DE MEDICAMENTOS. Encuentro Internacional de Educación en Ingeniería.

- 9 Sirinukunwattana, K., Raza, S., Tsang, Y., Snead, D., Cree, I., & Rajpoot, N. (2016). Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 35, 1196-1206. <https://doi.org/10.1109/TMI.2016.2525803>.
- 10 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomančák, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- 11 Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods*. 2021 Jan;18(1):100-106. doi: 10.1038/s41592-020-01018-x. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33318659.
- 12 Saad, J., Fomich, M., DÍA, V. P., & Wang, T. (2023). A novel automated protocol for ice crystal segmentation analysis using Cellpose and Fiji. *Cryobiology*, 111, 1-8.
- 13 Zonderland, J., Wieringa, P., & Moroni, L. (2019). A quantitative method to analyse F-actin distribution in cells. *MethodsX*, 6, 2562-2569.
- 14 Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40(1), 169-186.
- 15 Reisler, E. (1993). Actin molecular structure and function. *Current opinion in cell biology*, 5(1), 41-47.
- 16 DeMali, K. A. (2004). Vinculin—a dynamic regulator of cell adhesion. *Trends in biochemical sciences*, 29(11), 565-567.
- 17 Reyes-Fernandez, P. C., Periou, B., Decrouy, X., Relaix, F., & Authier, F. J. (2019). Automated image-analysis method for the quantification of fiber morphometry and fiber type population in human skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, 9, 1-15.
- 18 Hinkle, E. R., Essader, T. O., Gentile, G. M., & Giudice, J. (2021). ViaFuse: Fiji macros to calculate skeletal muscle cell viability and fusion index. *Skeletal Muscle*, 11(1), 28.

19 Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., & Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33(15), 2424–2426.

doi:10.1093/bioinformatics/btx180

20 Arzt, M., Deschamps, J., Schmied, C., Pietzsch, T., Schmidt, D., Tomancak, P., ... Jug, F. (2022). LABKIT: Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data. *Frontiers in Computer Science*, 4. doi:10.3389/fcomp.2022.777728

21 Riendeau JM, Gillette AA, Guzman EC, Cruz MC, Kralovec A, Udgata S, Schmitz A, Deming DA, Cimini BA, Skala MC. Cellpose as a reliable method for single-cell segmentation of autofluorescence microscopy images. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Jun 10:2024.06.07.597994. doi: 10.1101/2024.06.07.597994. PMID: 38915614; PMCID: PMC11195115.

22 Stringer, C., & Pachitariu, M. (2024). Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation. *bioRxiv*, 2024-02.

8. Anexos

Las imágenes usadas para este estudio como los modelos entrenados y el script macro de Fiji se encuentran disponibles en este enlace:

[Segmentacion de celulas musculares](#)

9. Declaraciones obligatorias del uso de herramientas de IA.

El autor de este trabajo de investigación declara el uso de ChatGPT y Copilot durante la ejecución y redacción de este trabajo, con el fin de generar ideas relacionadas con el mismo, además de mejorar la gramática y redacción. Después de utilizar la herramienta, el autor reviso y edito el contenido según sea necesario y asume la total responsabilidad por el contenido de esta memoria.