

**CUANTIFICACIÓN DE PATRONES LOCOMOTORES DEL PEZ CEBRA USANDO
DESCRIPTORES DE MOVIMIENTO EN VÍDEO**

EDGAR ANDRÉS MONTENEGRO MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOMECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2021

**CUANTIFICACIÓN DE PATRONES LOCOMOTORES DEL PEZ CEBRA USANDO
DESCRIPTORES DE MOVIMIENTO EN VÍDEO**

EDGAR ANDRÉS MONTENEGRO MARTÍNEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Ingeniero de Sistemas e Informática**

Director:

Fabio Martínez Carrillo

Doctor en Ingeniería de sistemas y computación

Codirector:

Juan Esteban Franco Restrepo

Luis Carlos Guayacan Chaparro

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOMECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2021

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero darles las gracias a mis familiares, a mis padres Aminta Martínez Quintero y Edgar Jose Montenegro Rivero por su dedicación y apoyo en mi formación personal y profesional que me ha permitido alcanzar este gran logro de mi vida, le doy gracias a mi hermana Paula Andrea Montenegro Martínez por su apoyo moral e incondicional que me diste ante todas las adversidades que afrontamos, por los buenos consejos y por la buena convivencia que vivimos durante esta bonita etapa universitaria. Les agradezco a mis amigos mas cercanos sobre todo a Alejandro Ramirez por las risas que tuvimos durante todos estos años donde lo mas importante fue nunca desistir y apoyarnos ante cualquier adversidad, agradezco a mis codirectores Juan Esteban Franco y Luis Carlos Guayacan por su ayuda en el desarrollo de este gran trabajo, gracias por la orientación y todo el conocimiento que me aportaron el cual me ha enriquecido bastante. Mil gracias a mi director Fabio Martínez por su infinita paciencia, la dedicación, su compromiso, por el aprecio como su estudiante, por compartir su conocimiento y por su amistad. Finalmente quiero darle gracias a la escuela de ingeniería de sistemas por la formación que recibí la cual me permitió desarrollar por completo este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	17
2. OBJETIVOS	18
3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO DE CAPTURA DE LOCOMOCIÓN DE PECES CEBRA	19
3.1. SUJETOS	19
3.2. TRATAMIENTOS Y PRUEBAS DEL COMPORTAMIENTO	20
3.3. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO	21
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4. MÉTODO PROPUESTO: CUANTIFICACIÓN DE PATRONES CINEMÁTICOS DEL PEZ CEBRA	24
4.1. ANÁLISIS GLOBAL	24
4.2. ANÁLISIS LOCAL	26
4.2.1. Mapas cinemáticos	27
4.3. REPRESENTACIÓN CONVOLUCIONAL DE PATRONES CINEMÁTICOS	29
4.3.1. Patrones de peces cebra como vectores convolucionales embebidos	30
4.3.2. Reducción de dimensionalidad y graficación de datos en un espacio 2D	31
4.4. CONFIGURACIÓN DEL MÉTODO	32
4.4.1. Histogramas	32
4.4.2. Implementación de redes neuronales convolucionales	34

5. EVALUACIÓN Y RESULTADOS	37
5.1. PATRONES GLOBALES	37
5.2. PATRONES LOCALES	40
5.3. APRENDIZAJE DE PATRONES CONVOLUCIONALES	44
5.3.1. Resultados de redes convolucionales neuronales	44
5.3.2. Proyección de patrones embebidos en baja dimensionalidad (t-sne)	48
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Vista superior del tanque social	22
Figura 2. Metodología.	25
Figura 3. Adquisición de datos cinemáticos	35
Figura 4. Método de aprendizaje.	36
Figura 5. Ilustración del cálculo de trayectorias.	36
Figura 6. Patrones locomotores.	38
Figura 7. Media de ocurrencia de la posición para la prueba de comportamiento social.	40
Figura 8. Media de ocurrencias minuto a minuto y zona.	41
Figura 9. Resultados comparados con AnimalTracker.	45
Figura 10 Mapas de ocurrencia característicos de un solo pez.	46
Figura 11 Matrices de confusión	49
Figura 12 Ilustración de resultados t-SNE	50

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Resultados Correlación.	43
Tabla 2. Resultados Intersección.	44
Tabla 3. Resultados de la precisión en la clasificación de estrés agudo	47

RESUMEN

TÍTULO: Cuantificación de patrones locomotores del pez cebra usando descriptores de movimiento en video. *

AUTOR: Edgar Andrés Montenegro Martínez. **

PALABRAS CLAVE: Pez cebra, pruebas sociales, patrones locomotores, características cinemáticas, aprendizaje profundo, Redes neuronales convolucionales, histogramas de ocurrencia.

DESCRIPCIÓN: El pez cebra (*Danio Rerio*) es un modelo animal emergente ampliamente utilizado en el estudio de efectos farmacológicos, compuestos químicos, toxicología, trastornos neuropsiquiátricos, mecanismos de enfermedades, entre muchos otros. La locomoción y el análisis del comportamiento se han convertido en una prueba esencial para apoyar los bioensayos (pruebas en animales) llevados a cabo sobre el pez cebra. Muchas de las estrategias computacionales existentes requieren pasos de calibración, están limitadas a escenarios específicos y en muchos casos la dinámica del pez es solo aproximada por una trayectoria de movimiento global. Este trabajo presenta una estrategia para medir automáticamente mapas de ocurrencia cinemática que expresan patrones espacio-temporales del pez cebra, a partir de trayectorias locales de movimiento capturadas en un experimento de comportamiento social. En el presente trabajo, los peces cebra fueron sometidos a un estrés ambiental agudo, posteriormente a 10 o 100 μM (micro molar) de cafeína durante 20 minutos y finalmente a la prueba de comportamiento social durante 5 minutos. Como principal contribución, la estrategia propuesta devuelve mapas cinemáticos de ocurrencia que recuperan el historial de locomoción y que permite una mayor descripción del comportamiento social particular de cada espécimen en secuencias de vídeo. Estos mapas pueden realzar las regiones de interés y explicar los comportamientos en función de los patrones de frecuencia de velocidad y aceleración. Además, el enfoque propuesto tiene la capacidad de rastrear la locomoción global del pez cebra como las aplicaciones estándar. Los resultados locomotores muestran una disminución de la distancia, la velocidad y la aceleración principalmente en el grupo expuesto al estrés más 10 μM de cafeína. Además, los resultados muestran una preferencia por la zona social en todos los grupos que aumenta con la exposición al estrés más 100 μM de cafeína, estos resultados fueron verificados con mapas de ocurrencia para cada grupo.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática. Director: Fabio Martínez Carrillo, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: Quantification of zebrafish locomotive patterns using descriptors of video movement. *

AUTHOR: Edgar Andrés Montenegro Martínez **

KEYWORDS: Zebrafish, social tests, locomotor patterns, cinematic features, deep learning, convolutional neural networks, occurrence histograms.

DESCRIPTION: The zebrafish (*Danio Rerio*) is an emerging animal model widely used in the study of pharmacological effects, chemical compounds, toxicology, neuropsychiatric disorders, disease mechanisms, among many others. Locomotion and behavioral analysis have become an essential test to support bioassays (animal tests) carried out on zebrafish. Many of the existing computational strategies require calibration steps, are limited to specific scenarios and in many cases the fish dynamics is only approximated by a global motion trajectory. This paper presents a strategy to automatically measure kinematic occurrence maps expressing spatiotemporal patterns of zebrafish from local motion trajectories captured in a social behavior experiment. In the present work, zebrafish were subjected to acute environmental stress, then to 10 or 100 μM (micro molar) caffeine for 20 min and finally to the social behavior test for 5 min. As a main contribution, the proposed strategy returns kinematic occurrence maps that retrieve the locomotion history and allow further description of the particular social behavior of each specimen in video sequences. These maps can enhance regions of interest and explain behaviors in terms of velocity and acceleration frequency patterns. In addition, the proposed approach has the ability to track global zebrafish locomotion like standard applications. The locomotor results show a decrease in distance, velocity and acceleration mainly in the group exposed to stress plus 10 μM caffeine. In addition, the results show a preference for the social zone in all groups that increases with exposure to stress plus 100 μM caffeine, these results were verified with occurrence maps for each group.

* Degree work

** School of Physical-Mechanical Engineering. Department of Systems Engineering and Informatics. Advisor: Fabio Martínez Carrillo Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El pez cebra o *Danio Rerio* es una especie tropical vertebrada de entre 3 a 5 centímetros de longitud, originaria del sudeste de Asia. Este pez cuenta con una gran homología genética al del ser humano (70 % de similitud aproximadamente) ¹ por lo cual se ha utilizado como sujeto experimental para diferentes campos de investigación médica. Además, este espécimen tiene una serie de cualidades muy particulares tales como la transparencia de sus huevos y embriones, la gran cantidad de crías por desove (aproximadamente 200 huevos), un rápido desarrollo de huevo a pez cebra joven (5 días) y finalmente el costo de su mantenimiento es muy económico ². Estas características lo hacen de especial interés para la investigación biomédica, relacionando alguno de sus comportamientos y características con afecciones en el ser humano.

Actualmente, este pez es ampliamente utilizado como modelo animal para el estudio y tratamiento de enfermedades ^{3,4,5}, efectos de ciertas sustancias en los seres vivos

-
- ¹ CF, Howe K Clark MD Torroja. "Torrance J Berthelot C Muffato M Collins JE Humphray S McLaren K Matthews L et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome". En: *Nature* 496.7446 (), págs. 498-503.
 - ² ROJAS-MUÑOZ, Agustín; MIANA, Antonio Bernad y BELMONTE, Juan Carlos Izpisúa. "El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina". En: *Investigación y ciencia* 366 (2007), págs. 62-69.
 - ³ RAMAKRISHNAN, Lalita. "The zebrafish guide to tuberculosis immunity and treatment". En: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. 78. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2013, págs. 179-192.
 - ⁴ KULKEAW, Kasem y SUGIYAMA, Daisuke. "Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia". En: *Stem cell research & therapy* 3.6 (2012), pág. 55.
 - ⁵ LAM, Siew Hong, et al. "Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines". En: *BMC medical genomics* 4.1 (2011), pág. 41.

^{6,7,8,9}, la biología del desarrollo en los vertebrados ^{10,11,12}, entre muchos otros. De hecho, existen muchas patologías como desordenes neurológicos, comportamiento sociales y respuesta a ciertos fármacos que son difíciles de diagnosticar y de tratar en seres humanos, pero utilizando modelos animales, se han podido estudiar algunos comportamientos a través del estudio del movimiento y las características cinemáticas visualizadas durante la locomoción. Particularmente, los trastornos psicosociales como el autismo requieren metodologías alternativas de modelamiento que permitan explicar su complejidad en cuanto a las relaciones sociales, la adaptación y el comportamiento de los individuos afectados con respecto al entorno. El pez cebra es un ser social por naturaleza ^{13,14}, y por lo tanto puede ser usado como

-
- ⁶ SELVARAJ, Velanganni y SANTHAKUMAR, Kirankumar. "Analyzing locomotor activity in Zebrafish larvae using wrMTrck". En: *Zebrafish* 14.3 (2017), págs. 287-291.
- ⁷ RIHEL, Jason y SCHIER, Alexander F. "Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish". En: *Developmental neurobiology* 72.3 (2012), págs. 373-385.
- ⁸ MILLER, Noam, *et al.* "Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling". En: *Behavioural brain research* 240 (2013), págs. 192-196.
- ⁹ ZHDANOVA, Irina V, *et al.* "Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish". En: *Brain research* 903.1-2 (2001), págs. 263-268.
- ¹⁰ AMORES, Angel, *et al.* "Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution". En: *Science* 282.5394 (1998), págs. 1711-1714.
- ¹¹ GIRALDEZ, Antonio J, *et al.* "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish". En: *Science* 308.5723 (2005), págs. 833-838.
- ¹² HAFFTER, PASCAL y NUSSLEIN-VOLHARD, CHRISTIANE. "Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish." En: *International Journal of Developmental Biology* 40.1 (2003), págs. 221-227.
- ¹³ SURIYAMPOLA, Piyumika S, *et al.* "Zebrafish social behavior in the wild". En: *Zebrafish* 13.1 (2016), págs. 1-8.
- ¹⁴ OLIVEIRA, Rui F; SILVA, Joana F y SIMOES, José M. "Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner-loser effects". En: *Zebrafish* 8.2 (2011), págs. 73-81.

modelo animal para entender los efectos y causas que provocan dichas enfermedades, la exploración de nuevas alternativas de diagnóstico y el desarrollo de nuevos tratamientos con el fin de tratarlas en los seres humanos.

La interacción con otros individuos es una parte fundamental del comportamiento en muchos seres vivos, incluidos los humanos, y su alteración dinámica puede reflejar trastornos del sistema nervioso¹⁵. En los seres humanos, la alteración del comportamiento social puede reflejar trastornos del neurodesarrollo, como el autismo, o enfermedades adquiridas, incluyendo trastornos afectivos y cognitivos, que podrían provenir de diversas enfermedades^{16,17,18}. El análisis del comportamiento en modelos animales ha sido fundamental para explicar diversos fenómenos en áreas de investigación como la neurociencia, la psicología y la neuropsicofarmacología^{19,20,21}. En muchos modelos animales, los patrones de movimiento juegan un papel funda-

-
- ¹⁵ JIMÉNEZ, Karen M; PEREIRA-MORALES, Angela J y FORERO, Diego A. "Higher scores in the extraversion personality trait are associated with a functional polymorphism in the PER3 gene in healthy subjects". En: *Chronobiology international* 34.2 (2017), págs. 280-286.
- ¹⁶ WANG, Ying, *et al.* "Social impairment of children with autism spectrum disorder affects parental quality of life in different ways". En: *Psychiatry research* 266 (2018), págs. 168-174.
- ¹⁷ HINTERBUCHINGER, Barbara, *et al.* "Do patients with different psychiatric disorders show altered social decision-making? A systematic review of ultimatum game experiments in clinical populations". En: *Cognitive neuropsychiatry* 23.3 (2018), págs. 117-141.
- ¹⁸ DARÉ, Labanté Outcha, *et al.* "Co-morbidities of mental disorders and chronic physical diseases in developing and emerging countries: a meta-analysis". En: *BMC public health* 19.1 (2019), págs. 1-12.
- ¹⁹ MOLONEY, Aileen, *et al.* "Alzheimer's disease: insights from Drosophila melanogaster models". En: *Trends in biochemical sciences* 35.4 (2010), págs. 228-235.
- ²⁰ DWIVEDI, Shubham, *et al.* "Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism". En: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 95 (2019), págs. 56-65.
- ²¹ ALI, Shaukat; CHAMPAGNE, Danielle L y RICHARDSON, Michael K. "Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds". En: *Behavioural brain research* 228.2 (2012), págs. 272-283.

mental para correlacionar comportamientos emocionales, cognitivos y de interacción social. Por lo tanto, las herramientas tecnológicas son clave para apoyar la captura y el análisis de dichos patrones de locomoción mediante la cuantificación de patrones cinemáticos y dinámicos en esos especímenes. Por ejemplo, el uso de plataformas especializadas para capturar medidas de distancia, velocidad y aceleración se ha utilizado en modelos animales como ratones²², *Drosophila*^{23,24} o perros²⁵. Además, se han colocado algunos dispositivos especiales en el cuerpo de los animales para capturar las trayectorias cinemáticas y correlacionar las funciones neurológicas y cognitivas, como las contracciones musculares de instancia y la respiración. Sin embargo, estas metodologías podrían ser invasivas y alterar el movimiento natural de los animales, que están condicionados a escenarios específicos de captura. Actualmente, en la investigación preclínica, el pez cebra ha surgido como un modelo alternativo para la investigación debido a sus notables características sociales naturales^{13,26,27}. Por ejemplo, las alteraciones del comportamiento típico de cardumen, frecuentemente asociadas al pez cebra, se han encontrado como reflejo de funcio-

²² TANG, Wenlong y SU, Di. "Locomotion analysis and its applications in neurological disorders detection: state-of-art review". En: *Network modeling analysis in health informatics and bioinformatics* 2.1 (2013), págs. 1-12.

²³ GORELIK, Roman, *et al.* "Mechanisms of plasma membrane targeting of formin mDia2 through its amino terminal domains". En: *Molecular biology of the cell* 22.2 (2011), págs. 189-201.

²⁴ BRANSON, Kristin, *et al.* "High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*". En: *Nature methods* 6.6 (2009), págs. 451-457.

²⁵ NAITO, Akira; SHIMIZU, Yoshifusa y HANDA, Yasunobu. "Analyses of treadmill locomotion in adult spinal dogs". En: *Neuroscience research* 8.4 (1990), págs. 281-290.

²⁶ MILLER, Noam y GERLAI, Robert. "From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*)". En: *PloS one* 7.11 (2012), e48865.

²⁷ SHELTON, Delia S, *et al.* "Density and group size influence shoal cohesion, but not coordination in zebrafish (*Danio rerio*).". En: *Journal of Comparative Psychology* 129.1 (2015), pág. 72.

nes neurales^{28, 8,29}. Sin embargo, las condiciones morfológicas del pez cebra limitan su análisis en el estudio del comportamiento locomotor y las metodologías clásicas podrían resultar limitadas para explorar la compleja dinámica social del pez. En estos escenarios subacuáticos, los patrones de movimiento suelen obtenerse a partir de herramientas computacionales que analizan secuencias de vídeo. Estas herramientas requieren sofisticados procesos de calibración y se dedican a capturar información cinemática general de trayectorias globales que describen el movimiento de un espécimen en un escenario controlado^{30,31, 6}. En general, estas herramientas implican una segmentación y un seguimiento del objeto de interés mediante trayectorias globales. Sin embargo, estos resultados de análisis se basan en una descripción dinámica muy simplificada y pierden mucha información espacial relevante sobre los experimentos que podría ser fundamental para resaltar los hallazgos para apoyar la validación de una hipótesis. Las estrategias actuales de movimiento animal han complementado este análisis introduciendo conceptos de aprendizaje automático para caracterizar los patrones de movimiento a partir de las trayectorias de movimiento computadas. Por ejemplo, JAABA o Ctrax son aplicaciones de computadora que calculan descriptores de movimiento a partir de datos captados por trayectorias y generan información final que caracteriza el comportamiento, como se ha probado

²⁸ GERLAI, Robert. "Social behavior of zebrafish: from synthetic images to biological mechanisms of shoaling". En: *Journal of Neuroscience Methods* 234 (2014), págs. 59-65.

²⁹ SCERBINA, Tanya; CHATTERJEE, Diptendu y GERLAI, Robert. "Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study". En: *Amino acids* 43.5 (2012), págs. 2059-2072.

³⁰ FRANCO-RESTREPO, Juan E; FORERO, Diego A y VARGAS, Rafael A. "A review of freely available, open-source software for the automated analysis of the behavior of adult zebrafish". En: *Zebrafish* 16.3 (2019), págs. 223-232.

³¹ TUNGTUR, Sudheer K, *et al.* "Mouse Behavior Tracker: An economical method for tracking behavior in home cages". En: *BioTechniques* 63.5 (2017), págs. 215-220.

en la *Drosophila Melanogaster*^{32, 24}.

En este trabajo se propone una estrategia computacional para el análisis del comportamiento social del pez cebra basada en la cuantificación de patrones espacio-temporales densos durante la locomoción. La metodología propuesta es capaz de capturar el historial de movimiento de los peces, que está fuertemente correlacionado con los comportamientos sociales, y se expresa como mapas cinemáticos de ocurrencia espacial. Para ello, se graba la vista superior de un pez en una pecera, con una cámara relativamente estática. Se sigue al espécimen mediante una perspectiva global y se calculan un conjunto de trayectorias densas, es decir, el movimiento local a nivel de píxel asociado al pez. En cada momento, a partir de las trayectorias resultantes se calcula la velocidad y la aceleración, preservando la localización espacial de las medidas. A continuación, se obtienen los perfiles de movimiento, que acumulan las cinemáticas espacialmente y describen la historia del movimiento. Con este enfoque es posible realizar un análisis detallado del comportamiento de los peces y calcular cuantitativamente los patrones que representan los tratamientos a los que fueron sometidos los peces. Además estos mapas fueron utilizados para aprender una representación profunda y clasificar automáticamente niveles de estrés. Durante la validación, se realizaron pruebas de comportamiento en grupos de peces cebra de control y experimentales para evaluar el comportamiento social. A partir de los mapas de ocurrencia fue posible observar y analizar los patrones espaciales de los peces, y así, obtener mapas visuales que explican el comportamiento de cada grupo con notables diferencias en la cinemática. También estos mapas permiten determinar las frecuencias por zonas estudiadas (lateral, central y social) utilizando el conjunto de datos con peces cebra sometidos a estrés agudo y expuestos a concentraciones de cafeína. Desde la representación profunda

³² KABRA, Mayank, *et al.* "JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior". En: *Nature methods* 10.1 (2013), págs. 64-67.

se pudo construir un espacio embebido, en un espacio de baja dimensionalidad, que claramente agrupa los especímenes con patrones comportamentales similares.

1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las herramientas disponibles para la cuantificación de movimiento del pez cebrá se basan en métodos clásicos de seguimiento de trayectorias globales, lo cual resulta ser limitado para el estudio del comportamiento social. Además, en muchos de los experimentos, las trayectorias requieren intervención humana que conduce a errores en localización y variabilidad entre expertos que realizan la anotación. Además, estas metodologías no son lo suficientemente flexibles, presentando procedimientos y funciones adaptados a problemas clásicos de análisis de movimiento, lo cual puede restringir la exploración de características potencialmente descriptivas en el análisis cinemático del pez cebrá. Los métodos tradicionales solo permiten obtener una medición de cinemáticas globales, como velocidad, aceleración y distancia recorrida, calculadas sobre trayectorias únicas de carácter global que representan toda la historia de desplazamientos. Además, no se cuenta con alternativas claras que permitan caracterizar patrones locomotores relacionados con el comportamiento social. También en el contexto donde se desarrolla este trabajo se requieren aprender relaciones cinemáticas que permitan dar explicaciones a los comportamientos sociales y discriminar de forma automática entre los niveles inducidos de estrés y los patrones locomotores del pez en observación.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Cuantificar los patrones de movimiento del pez cebra, bajo diferentes niveles inducidos de estrés, mediante descriptores basados en trayectorias de secuencias en video.

Objetivos específicos

- Calcular trayectorias de movimiento para describir la dinámica de los peces, en entornos controlados, y diferentes condiciones de estrés.
- Cuantificar mapas cinemáticos, como descriptores de movimiento históricos para establecer relaciones de comportamiento social con respecto a las disposiciones espaciales del pez durante el experimento.
- Implementar una arquitectura convolucional que permita clasificar los niveles de estrés inducidos en cada pez utilizando sus respectivos mapas cinemáticos.
- Validar los descriptores de movimiento desarrollado en cuanto a la capacidad para describir cinemáticas del pez cebra relacionados con comportamientos sociales.

3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO DE CAPTURA DE LOCOMOCIÓN DE PECES CEBRA

A continuación se expondrá el diseño experimental que se adaptó para realizar la captura de datos de movimiento con peces cebra, en un experimento del comportamiento social sometidos a distintos niveles de cafeína. Estos datos fueron desarrollados por el grupo de investigación de ciencias biomédicas de la universidad Antonio Nariño durante el año 2017.

3.1. SUJETOS

Peces cebra de aleta corta de siete meses de edad se obtuvieron de un almacén local de animales en Bogotá, Colombia, y se aclimataron durante un período de al menos dos semanas antes de cualquier experimento. Los peces se mantuvieron en tanques de 7 litros, 400 ml por pez, a una temperatura de 27 ± 1 °C, pH entre 6.8 y 7.4 con una fase de luz oscura de 12:12 horas y alimentados una vez al día con una dieta estandarizada de suplemento marca TetraMin®. Cada tanque tenía un sistema de aireación y filtros para asegurar la calidad del agua. Se utilizó un total de 22 peces cebra machos y hembras. Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética en experimentación animal de la Universidad Antonio Nariño (junio 06/2017) de acuerdo a las políticas de modelos animales en investigación ³³.

³³ COUNCIL, National Research, *et al.* "Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research". En: (2003).

3.2. TRATAMIENTOS Y PRUEBAS DEL COMPORTAMIENTO

Se tomaron cuatro grupos de peces cebra adultos cada uno contando con 6 individuos por grupo ($n = 6$) excepto uno donde solo se contó con 4 ejemplares ($n = 4$), de los cuales 3 de ellos fueron sometidos inicialmente al Protocolo de Estrés Agudo (PEA) durante 3 días. Este tipo de estrés agudo incluye, el primer día, el calentamiento del agua a 33 °C durante 30 minutos, seguido de la transferencia a un tanque con la temperatura del agua a 23 °C; el segundo día, los peces fueron perseguidos con una red en el tanque contenedor durante 10 minutos y, por último, el tercer día, los peces fueron inmovilizados durante una hora en tubos de microcentrífuga de 2 ml, abiertos por ambos lados para permitir la circulación de agua oxigenada (Protocolo adaptado de Piato et al. 2011)³⁴. Es de esperarse que la exposición al estrés se incrementó y cambió cada día para evitar la habituación, La PEA se realizó en 2 grupos de seis individuos y el grupo de cuatro siempre por la tarde. El día 4, de los tres grupos sometidos a la PEA un grupo de seis y el de cuatro fueron expuestos a cafeína (100 gr de polvo, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) a concentraciones de 10 μM (1.94 mg/L) y 100 μM (19.41 mg/L) respectivamente durante 20 minutos. Todas las diluciones se hicieron en un tanque de 1L. Finalmente obtenemos la configuración experimental de un grupo control, un grupo sometido a la PEA (estrés más 0), un grupo sometido a la PEA y 10 μM de cafeína (estrés más 10 μM) y un grupo sometido a la PEA y 100 μM de cafeína (estrés más 100 μM). Individualmente, los peces fueron transferidos al tanque social (Figura 1) con medidas de 30 \times 10 cm (largo y ancho), lleno de agua dulce hasta 5 cm. Cada extremo del tanque tiene un compartimento de 10 \times 10 cm, uno vacío y otro con un pez (utilizado

³⁴ PIATO, Ângelo L, *et al.* "Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses". En: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35.2 (2011), págs. 561-567.

para estimular el comportamiento social y no registrado) que se situó en un extremo ³⁵. Se utilizó una cámara digital (iPhone X, Apple, California, EE.UU.) ubicada a 33 cm de la base del tanque en una vista superior, para grabar el comportamiento durante 5 minutos para ser analizado fuera de línea; los videos fueron grabados a 720p y 30 cuadros por segundo. La cámara tiene una apertura de lente de f/1.8 y estabilización óptica de imagen que reduce la distorsión del vídeo. Por último, la cafeína utilizada es un antagonista no selectivo del receptor de adenosina competitivo que bloquea los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y D_2 con efectos principalmente en el sistema nervioso central (SNC) ^{36,37} y cambios en el comportamiento del pez cebra aumentando la ansiedad, la agresividad y el estado de alerta ³⁷.

3.3. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO

En la metodología propuesta, desarrollamos dos análisis: El primero consiste en un análisis global del movimiento en los especímenes experimentales de pez cebra, ya que en los marcos clásicos, en cada fotograma, el pez cebra es representado por un punto, que es seguido durante el vídeo. En este enfoque, la coordenada (x, y) que corresponde al centro de masa del espécimen en movimiento se estima para cada fotograma. Así, la trayectoria global resultante se representa como el conjunto de puntos y las variables cinemáticas tradicionales (*Posición, Velocidad, Aceleración*) se calculan utilizando estos datos.

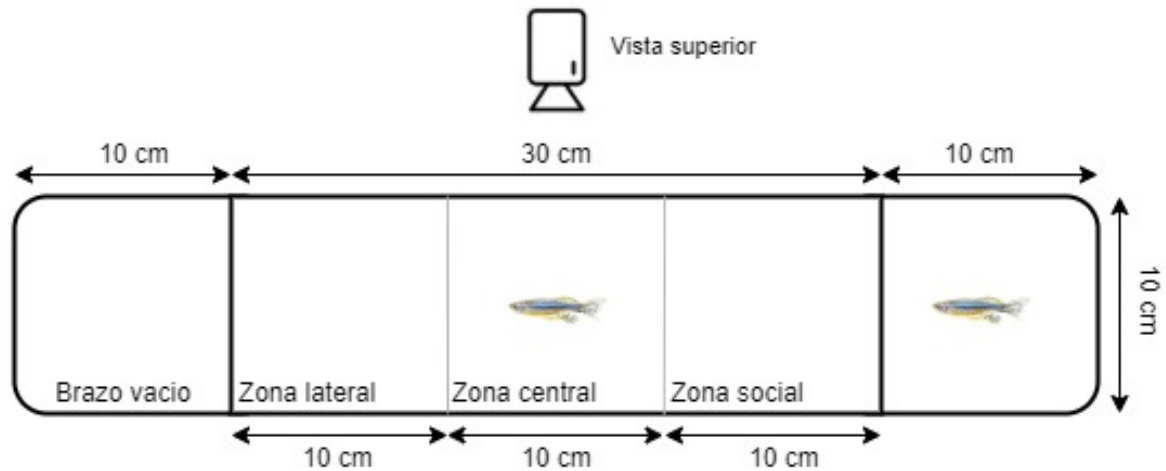
El segundo análisis recupera una representación densa del movimiento (velocidad

³⁵ GROSSMAN, Leah, *et al.* "Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish". En: *Behavioural brain research* 214.2 (2010), págs. 277-284.

³⁶ FERRÉ, Sergi. "Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders". En: *Psychopharmacology* 233.10 (2016), págs. 1963-1979.

³⁷ VICKERS, Neil J. "Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?" En: *Current biology* 27.14 (2017), R713-R715.

Figura 1. La longitud total del tanque (50 cm) está dividida en cada extremo (10 cm) con acrílico que permite a los peces ver a través de las divisiones. La zona central (30 cm) está dividida en tres zonas virtuales iguales de 10 x 10 cm, de izquierda a derecha, lateral, media y social. Las grabaciones de la zona central se hicieron desde una vista superior del tanque.



relativa de cada píxel) a partir de un algoritmo de flujo óptico. Las velocidades de los píxeles con movimiento coherente se agrupan para formar largas trayectorias de movimiento que representan el movimiento de la muestra con mayor información dinámica. A partir de estas largas trayectorias de movimiento, es posible calcular una cinemática local y diferenciable que también tiene una referencia espacial en el escenario de captura. A continuación, se capturó un histograma de frecuencias espaciales en 2D de cada una de las trayectorias cinemáticas que codifican la historia de los patrones de movimiento, lo que proporciona una información con mayor carácter descriptivo sobre el comportamiento social específico. Como línea de base, el análisis del comportamiento se realizó inicialmente a partir del sistema de seguimiento clásico de los ejemplares representados como un punto con el software libre

ImageJ (NIH, Maryland, USA) ³⁸ y el plugin AnimalTracker ³⁹ que permite el análisis semiautomático de la conducta animal. AnimalTracker proporcionó datos sobre la distancia total recorrida, la velocidad media, el tiempo total de congelación, el tiempo en una región de interés (ROI) y las trayectorias totales; los datos obtenidos se compararon posteriormente con el algoritmo propuesto.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones múltiples de grupos mediante análisis de varianza (ANOVA), el cual es un conjunto de pruebas en estadística inferencial que permite determinar si las medias de dos muestras son parecidas a través del análisis de factores continuos o categóricos. En este experimento se implementó ANOVA dos vías seguido de la prueba HSD de Tukey (Honestly-significant-difference) con los grupos mencionados anteriormente (control, estrés, estrés con 10 μ M y estrés con 100 μ M de cafeína) y de igual forma para analizar las diferencias estadísticas en regiones espaciales e intervalos temporales. La significación estadística se estableció en $p \leq 0.05$ en todas las comparaciones estadísticas.

³⁸ SCHINDELIN, Johannes, *et al.* "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis". En: *Nature methods* 9.7 (2012), págs. 676-682.

³⁹ GULYÁS, Márton, *et al.* *AnimalTracker: an ImageJ-based tracking API to create a customized behaviour analyser program*. 2016.

4. MÉTODO PROPUESTO: CUANTIFICACIÓN DE PATRONES CINEMÁTICOS DEL PEZ CEBRA

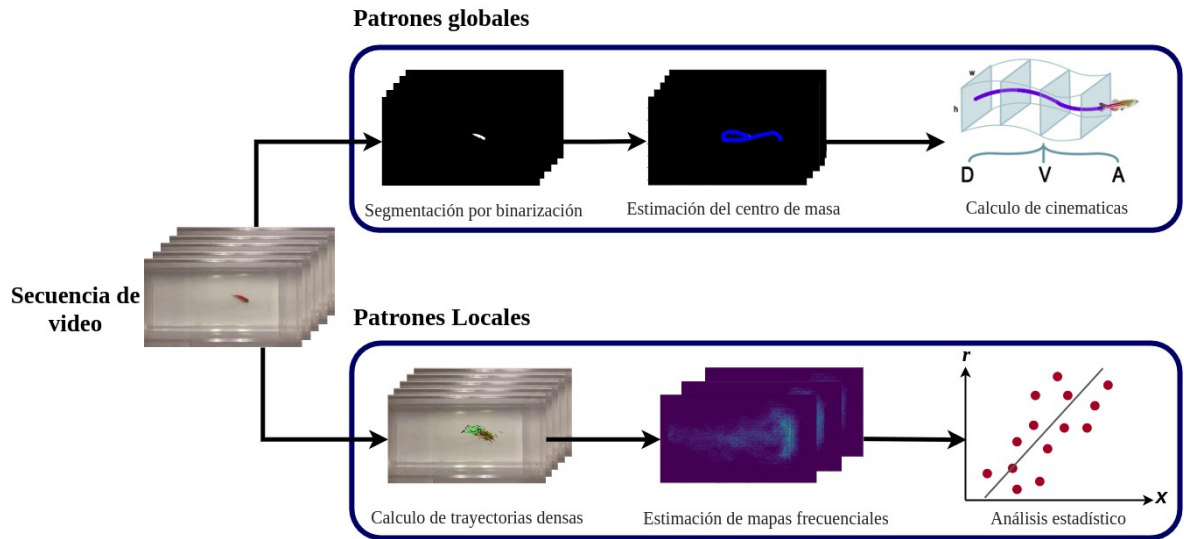
4.1. ANÁLISIS GLOBAL

Este trabajo basa el análisis de la locomoción en la descripción dinámica a partir de trayectorias largas de movimiento capturadas desde perspectivas globales y locales. En cuanto a las trayectorias globales, se aplicó una diferencia recurrente de fotogramas para modelar el escenario estático. A partir de dicha diferencia, se elimina el fondo y se segmenta automáticamente el objeto en movimiento (es decir, el pez cebra). Formalmente, el tanque se registra en una secuencia de vídeo, descrita por una secuencia de fotogramas $I_t(x)$, cuyos píxeles x que permanecen temporalmente con la misma apariencia se etiquetan como fondo $B(x)$. Esta estimación del fondo se consigue calculando la media aritmética del conjunto de fotogramas, como $B(x) = \frac{1}{N} \sum_1^N I_t(x)$ en toda la secuencia de vídeo, siendo N el número total de fotogramas del video estudiado. Por lo tanto, cada fotograma se sustrae de este fondo $S_0(x) = |B(x) - I_t(x)|$ para obtener una estimación de los píxeles que cambian respecto al cambio de los fotogramas. A continuación se obtiene una segmentación final aplicando una función de umbral que da lugar a una imagen binaria $S = \{s \in S_0 | s > \tau\}$, donde la silueta color blanco corresponde a la segmentación resultante del pez. Esta sencilla heurística permite una segmentación totalmente automática, eficaz y rápida del espécimen sin ninguna restricción adicional sobre la morfología o la tendencia de movimiento del pez. Una ilustración de la segmentación temporal obtenida se muestra en la Figura 3.A y todo el flujo de trabajo en la Figura 2.

A partir de esta segmentación temporal, fue posible capturar la trayectoria del centro de masa (*CoM*, por sus siglas en inglés) del pez cebra, definida como $C_t = (C_x, C_y)_t$,

durante el experimento (Figura 3.B). Este patrón temporal de *CoM* resume la posición, el movimiento y la estructura musculo-esquelética del pez en un único punto. El conjunto de puntos *CoM*, computados en cada fotograma a partir de la trayectoria *CoM* global que describe el desplazamiento general del pez cebra en estudio y constituye la historia global del movimiento a lo largo del vídeo. A partir de esta trayectoria de movimiento global (C_t , *CoM* durante el tiempo) fue posible recuperar primitivas cinemáticas como los componentes de velocidad $V_t = ||C_{t+1} - C_t||$ y la orientación del movimiento $\theta(t) = \tan^{-1}(\frac{V_y}{V_x})$ (Figura 3.C). Además, se capturó la aceleración como cinemática diferencial de las velocidades consecutivas $A_t = ||V_{t+1} - V_t||$.

Figura 2. Metodología. En la parte superior se representan las secuencias de vídeo que se analizan mediante el método de sustracción de fondo para obtener los datos de locomoción; en la parte inferior, el flujo óptico permite crear los mapas de ocurrencia para posteriormente ser analizados mediante correlación estadística.



Durante una primera evaluación, se comprobó que la distancia y la velocidad media obtenidas a partir de este enfoque automático se corresponden con las anotadas manualmente por un experto utilizando herramientas como el plugin AnimalTracker de ImageJ. Este hecho se traduce en una gran alternativa para llevar a cabo el análisis automático de especímenes individuales en múltiples experimentos que incluyen

las ciencias del comportamiento y el seguimiento de objetos en movimiento, evitando la anotación tediosa y dependiente de un experto sobre largas secuencias de vídeo, la cual, puede ser una tarea altamente subjetiva que puede generar resultados inconsistentes.

4.2. ANÁLISIS LOCAL

Una de las principales contribuciones de este trabajo es la descripción dinámica densa del comportamiento social del pez cebrado adulto, para ello, se computan un conjunto de largas trayectorias de movimiento que permiten anotar una mejor descripción histórica de patrones de movimiento particulares en cada grupo de tratamiento estudiado. Las trayectorias densas implementadas se recuperan a partir de campos vectoriales calculados entre fotogramas consecutivos a partir de un algoritmo de flujo óptico. En este trabajo se implementó el flujo multiescala de Farneback que tiene un balance adecuado entre precisión y velocidad para recuperar campos de velocidad en secuencias de vídeo ²⁴. Los patrones de velocidad del flujo óptico son relevantes para entender el comportamiento social de los peces pero resultan restrictivos para describir patrones complejos o temporalmente largos. El método utilizado para estimar dichas trayectorias empieza con la declaración de una rejilla espacial densa como campo vectorial que se encarga de rastrear los principales patrones de velocidad, que a lo largo de los fotogramas, se concatenan para formar trayectorias largas y densas de movimiento (*MDT*) ⁴⁰. Formalmente, cada trayectoria consiste en una serie de puntos que describen la trayectoria temporal de los píxeles que conforman el pez, denotados como $P(t) = p_1, p_2, p_3, p_4, \dots, p_n$ donde cada valor de P representa una coordenada, $p_n = (x_n, y_n)$. Por lo tanto, de la posición p_1

⁴⁰ WANG, Limin; QIAO, Yu y TANG, Xiaou. "Action recognition with trajectory-pooled deep-convolutional descriptors". En: *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. 2015, págs. 4305-4314.

a la p_2 existe un vector de velocidad que concatena ambas posiciones y que resulta del cálculo del flujo óptico entre dos fotogramas consecutivos. Tales trayectorias permiten la cuantificación de patrones espacio-temporales y el cálculo de cinemáticas como la distancia, la velocidad, la aceleración o la dirección angular. Esta anotación del movimiento como un conjunto de valores vectoriales que permite obtener una representación con mas información de la que se obtendría por el método de sustracción del fondo, así, se considera esta alternativa una herramienta mas óptima en la descripción de las características de los patrones locomotores de los peces (Figura 3.D). En un entorno rico en movimiento donde no solo están presente los desplazamientos del pez sino que también se debe tener en cuenta las ondulaciones del agua y los movimientos de los reflejos; es necesario filtrar las trayectorias eliminando aquellas cuyos desplazamientos fueron pequeños (menos de 4 píxeles), las cuales corresponden al fondo; las trayectorias por fuera de la región de interés, es decir, las que están por fuera del acuario no son de importancia así que se eliminan y finalmente se conservan aquellas trayectorias cercanas a la concentración de movimiento mas denso, en concreto, únicamente se conservan las trayectorias mas cercanas al pez.

Las *MDT* funcionan como descriptores espacio-temporales del movimiento del pez cebra con estados conductuales alterados. Caracterizan los movimientos irregulares que pueden presentar estos ejemplares en función de un fármaco o tratamiento utilizado (por ejemplo, su nivel de estrés y cafeína). La *MDT* es una gran herramienta en la caracterización de la dinámica social del pez cebra y permite el estudio de experimentos de comportamiento social, en relación con el entorno y la sensibilidad local de los diferentes segmentos del pez cebra.

4.2.1. Mapas cinemáticos A partir de las *MDT* fue posible resumir el comportamiento histórico de los peces como un mapa de ocurrencias X que para la cinemática de posición calcula la frecuencia en cada coordenada donde se detec-

tó el movimiento mediante la siguiente ecuación $X(p_x, p_y) = X(p_x, p_y) + 1$ sumando las cinemáticas encontradas en el mismo lugar durante el experimento. Para las otras variables de velocidad y aceleración calculamos el valor máximo obtenido por coordenada $V(p_x, p_y) = \max(\sqrt{(p_{x-1} - p_x)^2 + (p_{y-1} - p_y)^2})$ y $A(v_x, v_y) = \max(\sqrt{(v_{x-1} - v_x)^2 + (v_{y-1} - v_y)^2})$ de forma que nos centramos en las zonas de interés donde destacan los cambios o comportamientos más significativos. Estas distribuciones de frecuencias se almacenan en un mapa (con tamaño de fotograma $W \times H$), en el que cada ubicación contará la cinemática particular que resulte durante el experimento. Por lo tanto, en cada fotograma, el mapa se actualiza con las trayectorias cinemáticas computadas siendo la posición, la velocidad y la aceleración incluidas en este estudio (Figura 3.E-G). Al final de la secuencia, el mapa resultante tiene una ocurrencia histórica de cada cinemática para cada una de las posiciones de los fotogramas. Esta representación nos permite visualizar directamente las regiones de los fotogramas en las que el pez ha pasado más tiempo, o tienen perfiles de velocidad y aceleración particulares, denotando las regiones con mayor frecuencia de posiciones captadas por el pez en relación al tiempo del vídeo. Estos mapas de ocurrencia no se limitan a la comparación de valores con frecuencia de posiciones sino que también permiten comparar el comportamiento de más cinemáticas permitiendo cuantificar localmente datos como la velocidad o la aceleración y como en el caso anterior se obtiene una representación de la distribución espacial que además tiene en cuenta el comportamiento en el tiempo que en definitiva describe el movimiento del pez.

4.3. REPRESENTACIÓN CONVOLUCIONAL DE PATRONES CINEMÁTICOS

Una vez obtenidos los mapas cinemáticos se implementaron técnicas de aprendizaje máquina para aprender patrones cinemáticos discriminatorios, según diferentes grados de estrés o niveles de comportamiento. Para ello, se utilizaron herramientas de aprendizaje convolucional que en diferentes niveles y aprendiendo localmente *kernels* convolucionales, permitirán aprender una relación jerárquica, multinivel y no lineal, para representar los comportamientos de los especímenes según cierta concentración de cafeína y estrés inducido. En este problema entonces se configuraron arquitecturas que recibían mapas de ocurrencia dinámica, logrando minimizar reglas discriminatorias para resolver un problema de clasificación.

Una arquitectura convolucional es un algoritmo estructurado de aprendizaje máquina que codifica los datos normalmente proporcionados como un arreglo bidimensional (Matriz) de tal forma que es posible extraer o aprender características de la información visual presente en las imágenes, de este modo se logra calcular patrones singulares presentes en nuestros mapas cinemáticos. El aprendizaje de correlaciones no lineales a través de múltiples capas se resume entonces en un vector embebido que concatena las características más relevantes, pudiendo así detectar patrones entre el conjunto de datos, con respecto a una regla de optimización. Es decir, en términos de nuestro problema, cual es el nivel de estrés más probable que esta experimentando un pez particular. En este trabajo, se optó por el diseño de arquitecturas compactas convolucionales (entre 2 y 8 capas convolucionales fueron suficientes), teniendo en cuenta las consideraciones de relativamente poca cantidad de muestras por clase, así como la resolución de los mapas de ocurrencia.

Entonces, durante el entrenamiento de las arquitecturas se recibía la historia de movimiento captada por los mapas cinemáticos, los cuales a través de las convoluciones en diferentes capas, y las activaciones no-lineales, permitían determinar representaciones robustas, con explicación espacial, sobre los principales factores

que determinaban un grado particular de cafeína. Una vez entrenada la representación, se obtuvo una herramienta de clasificación como soporte en la tarea de análisis de movimiento, pero adicionalmente se podían extraer vectores embebidos que describan de forma compacta los comportamientos particulares del pez. Estos patrones, descritos como vectores embebidos, en las capas superiores de la arquitectura, resultaron útiles para observar poblacionalmente las similitudes dinámicas de los especímenes evaluados.

Para el tratamiento de nuestros datos proporcionamos a la red los 3 mapas cinemáticos calculados como una matriz de 3 canales y generamos un arreglo de datos de un tamaño final de $(150 \times 268 \times 3)$ siendo las dos primeras dimensiones la resolución de los mapas cinemáticos, el algoritmo de inteligencia artificial recibirá, entrenará y se evaluará con este arreglo de datos 3D para una posteriormente llevar a cabo una clasificación de los mismos.

4.3.1. Patrones de peces cebras como vectores convolucionales embebidos

La arquitectura convolucional entrenada describe patrones históricos de movimiento en diferentes niveles de representación y con respecto al nivel de cafeína, anotada en cada video secuencia. Esta descripción es jerárquica, con niveles independientes que progresivamente se van correlacionando para formar una nueva etapa de representación. Es por ello, que cada nivel puede ser analizado independientemente para validar los patrones a esa escala de procesamiento que están resultando más explicativos o de mayor soporte para llevar a cabo la tarea de clasificación. Por ejemplo, dado un mapa cinemático se pueden observar las activaciones en cada capa para visualizar las principales regiones con mayor aporte a la predicción final del nivel de cafeína. Además, Las últimas capas, que representan los vectores finales de representación se pueden entender como descriptores embebidos que resumen la información histórica y temporal con respecto a un patrón de movimiento y el nivel de cafeína suministrado. Estos vectores, por lo general unidimensionales, represen-

tan múltiples correlaciones no-lineales que han venido ajustándose con respecto a la regla de minimización impuesta. Particularmente, en nuestros trabajos los descriptores son tomados de la penúltima capa de la red entrenada, los cuales se ubican justamente antes de la capa de probabilidad que determina la clasificación final del espécimen.

4.3.2. Reducción de dimensionalidad y graficación de datos en un espacio 2D

Estos vectores por si solos pueden ser utilizados de forma independiente para analizar los comportamientos cinemáticos de los especímenes con respecto a los niveles de cafeína. En este trabajo, se propuso como una alternativa proyectar estos vectores embebidos en un espacio unificado para brindar una alternativa de análisis poblacional según los patrones dinámicos. En este sentido, los biólogos y profesionales interesados en el experimento pueden visualizar todos los especímenes en un espacio simplificado y observar las posibles asociaciones de especímenes con respecto a los niveles de cafeína, así como también apoyar nuevas hipótesis del estudio de los peces. Los vectores embebidos extraídos por cada secuencia de video son utilizados para construir un espacio de baja dimensionalidad (*t-SNE* por sus siglas en ingles: *T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) el cual mapea las entradas de N dimensiones a un espacio latente de dos componentes. El algoritmo t-SNE en primer lugar aplica una distribución de probabilidad sobre parejas de muestras en el espacio original de tal forma que datos *semejantes* (distancia entre la representación de puntos es cercana) marcan una probabilidad muy alta y de igual forma se marcara baja probabilidad cuando sean muy diferentes por ser lejanos. Luego, se define una distribución de probabilidad similar a la que se ve en el espacio de destino (el espacio de menor numero de componentes) y minimiza la denominada divergencia Kullback-Leibler entre las dos distribuciones con respecto a las posiciones de los puntos en el mapa (la divergencia Kullback-Leibler mide la similitud o diferencia entre dos funciones de distribución de probabilidad). En otras palabras:

t-SNE intenta reproducir la distribución del espacio original en el espacio final. De esa forma podemos comprobar visualmente qué tan bien se están etiquetando los datos de acuerdo a la información aprendida por los modelos de mejor resultado, esta respuesta en el mejor de los casos se puede ver una división casi precisa del conjunto de muestras.

4.4. CONFIGURACIÓN DEL MÉTODO

4.4.1. Histogramas En el análisis del movimiento por patrones locales cuantificamos el movimiento de los peces cebra utilizando el método de trayectorias locales propuesto por Wang ⁴⁰ con las mismas configuraciones de la publicación original. Las trayectorias tienen una duración de 15 fotogramas, que resultan computacionalmente apropiadas y son primitivas cinemáticas suficientes para describir la historia local de movimiento. Las trayectorias son entonces calculadas a lo largo de las secuencias de video, utilizando como base de representación estimaciones del campo vectorial resultante del flujo óptico de Farneback⁴¹ (ver ilustración en la Figura 6.B). Las trayectorias son de cálculo independiente y pueden tener diferentes orígenes durante la secuencia.

El conjunto de trayectorias contaba inicialmente con datos ruidosos debido a los reflejos de la pecera y por los datos de flujo calculados sobre el movimiento del agua, así que se filtraron eliminando las trayectorias muy cortas, específicamente se eliminaron las trayectorias cuya distancia total calculada por norma $L2$ fuera menor a cuatro píxeles ($d < 4$). Las trayectorias filtradas y evaluadas pertenecientes al movimiento del pez generan histogramas bidimensionales todos con tamaño 150×268 valores de frecuencia, esto quiere decir que el histograma resultante tiene las mis-

⁴¹ FARNEBÄCK, Gunnar. "Two-frame motion estimation based on polynomial expansion". En: *Scandinavian conference on Image analysis*. Springer. 2003, págs. 363-370.

mas dimensiones del fotograma del video y el valor de frecuencia a nivel de píxel es computado sobre todo el espacio de exploración a partir de la historia de las trayectorias densas.

Validación estadística de histogramas

Correlación estadística : Para obtener una diferenciación significativa, se realizó una correlación estadística denotado como (R) comparando los datos de peces con movimiento natural(Control) contra los tres tipos de niveles de estrés que fueron estudiados. Se compararon los mapas de ocurrencia de posiciones medias (histogramas) de los peces control con cada mapa de ocurrencia (5 minutos), es decir, contra los datos control, el estrés natural, el estrés más $10 \mu\text{M}$ y el estrés más $100 \mu\text{M}$ de cafeína. En primer lugar, los datos se transforman de un espacio bidimensional \mathbb{R}^2 a un espacio vectorial unidimensional \mathbb{R}^1 . R se calculó a partir de la siguiente ecuación $R = \frac{1}{N-1} \frac{\sum_{i=1}^N (b_i - \bar{B})(c_i - \bar{C})}{\sqrt{B}\sqrt{C}}$ donde $B = (b_1, b_2, b_3, \dots, b_n)$ es el mapa de ocurrencia de la posición media del grupo de control y $C = (c_1, c_2, c_3, \dots, c_n)$ corresponde a los datos de un histograma de cualquier grupo. Estos dos histogramas unidimensionales se compararon, generando un valor para cada comparación entre cada mapa individual frente al mapa medio de control.

Intersección entre histogramas Además, se desarrolló una comparación calculando la intersección de la resolución de los mapas de ocurrencia en un espacio unidimensional (\mathbb{R}^1). Para estimar la intersección de los mapas B y C de tamaño N , se calculó la suma de los valores mínimos entre cada uno de los componentes de nuestros histogramas B y C alineados con la siguiente ecuación: $d = \sum_{i=1}^N \min(b_i, c_i)$, donde d representa una distancia de similitud entre los mapas que puede variar entre 0 (Totalmente diferente) y 1 (Totalmente similar). En su totalidad los datos de control se compararon por intersección con todo el conjunto de datos (cada mapa individual con el mapa de control medio).

4.4.2. Implementación de redes neuronales convolucionales En la experimentación implementamos arquitecturas de 2,4,6 y 8 capas convolucionales para evaluar y comparar los resultados obtenidos de tal forma que se pudiera obtener valores de referencia. Adicional a ello tuvimos en consideración las arquitecturas del estado del arte *VGG16* y *VGG19*⁴² siendo estas estructuras predefinidas conocidas porque han ampliamente utilizadas en problemas con imágenes. Para ejecutar el entrenamiento primeramente nuestros datos fueron normalizados a valores entre 0 y 1 para simplicidad en los cálculos de la red. Los modelos fueron entrenados con 30 épocas para el modelo de 2 capas, 50 épocas para el de 4 capas y 70 épocas para 6 y 8 capas, esto debido a que los primeros modelos alcanzaban una convergencia mas rápido que los de mayor numero de capas. De igual forma se usaron 70 épocas para la *VGG16* y *VGG19*. En los parámetros de entrenamiento se utilizo un optimizador *Cross-Entropy* como función de pérdida con una tasa de entrenamiento de 0,0001. Finalmente con fines de experimentación se validaron las arquitecturas con 70 % (77 imágenes) para la fase de entrenamiento, esto es porque se busco que la red neuronal pueda aprender la mayor cantidad de características posibles de los ejemplos y de esa forma pueda evaluar de manera correcta un numero considerable de muestras, es decir, el 30 % (33 imágenes) restantes.

⁴² SIMONYAN, Karen y ZISSERMAN, Andrew. "Very deep convolutional networks for large-scale image recognition". En: *arXiv preprint arXiv:1409.1556* (2014).

Figura 3. Adquisición de datos cinemáticos. **A.** Imagen original. **B.** Segmentación de peces. **C.** Cálculo de la trayectoria global de los peces (CoM). **D.** Flujo óptico y trayectorias densas, sus correspondientes trayectorias densas de movimiento. **E.** Distribución del movimiento. **F.** Distribución de la velocidad. **G.** Distribución de la aceleración.

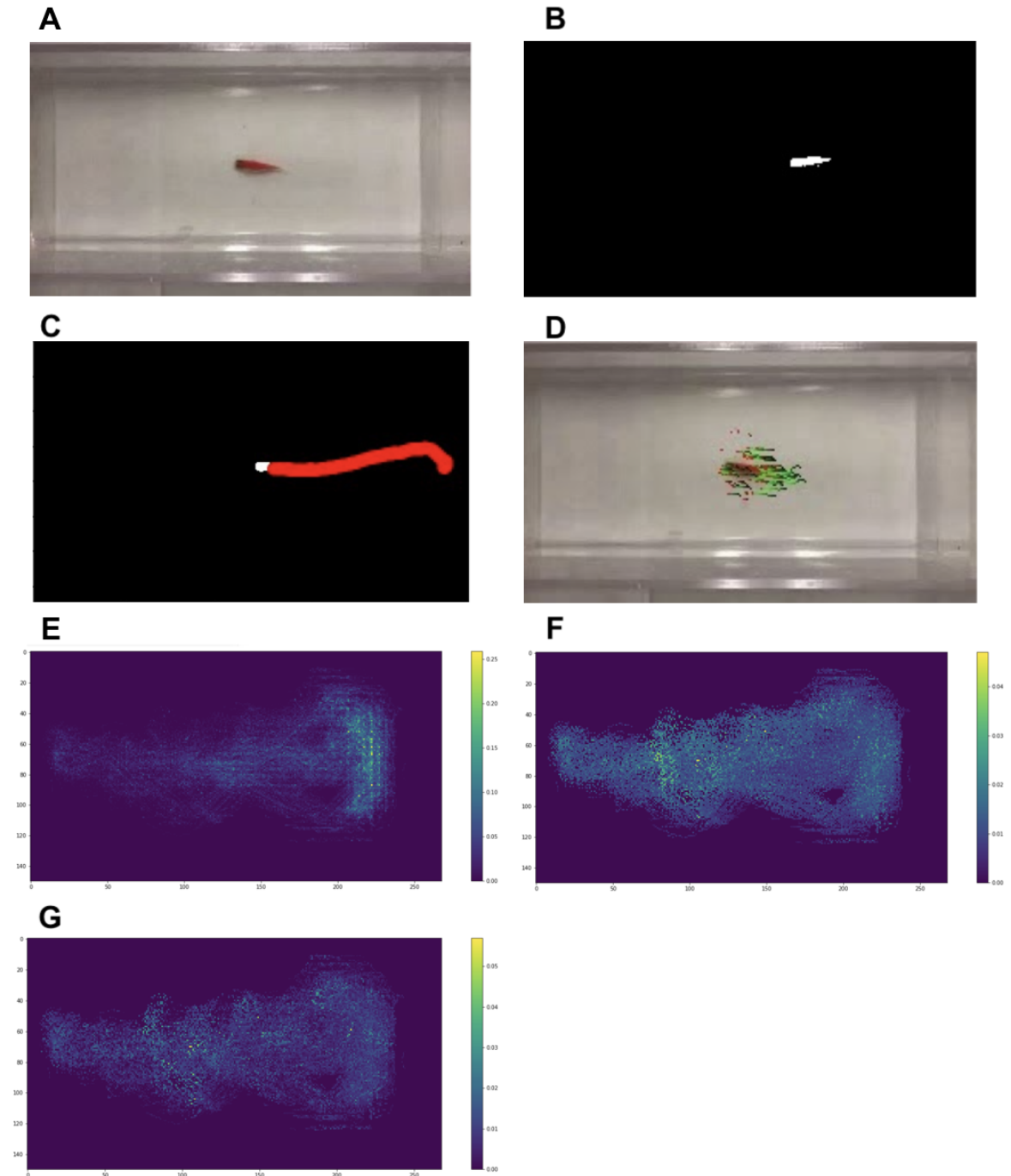


Figura 4. Método de aprendizaje. Flujo de trabajo en la caracterización de la conducta social del pez cebra, se parte de un video con el movimiento registrado de los ejemplares y a partir de sus variables cinemáticas calculadas en los mapas de ocurrencia se caracterizan conductas particulares asociadas a niveles de estrés.

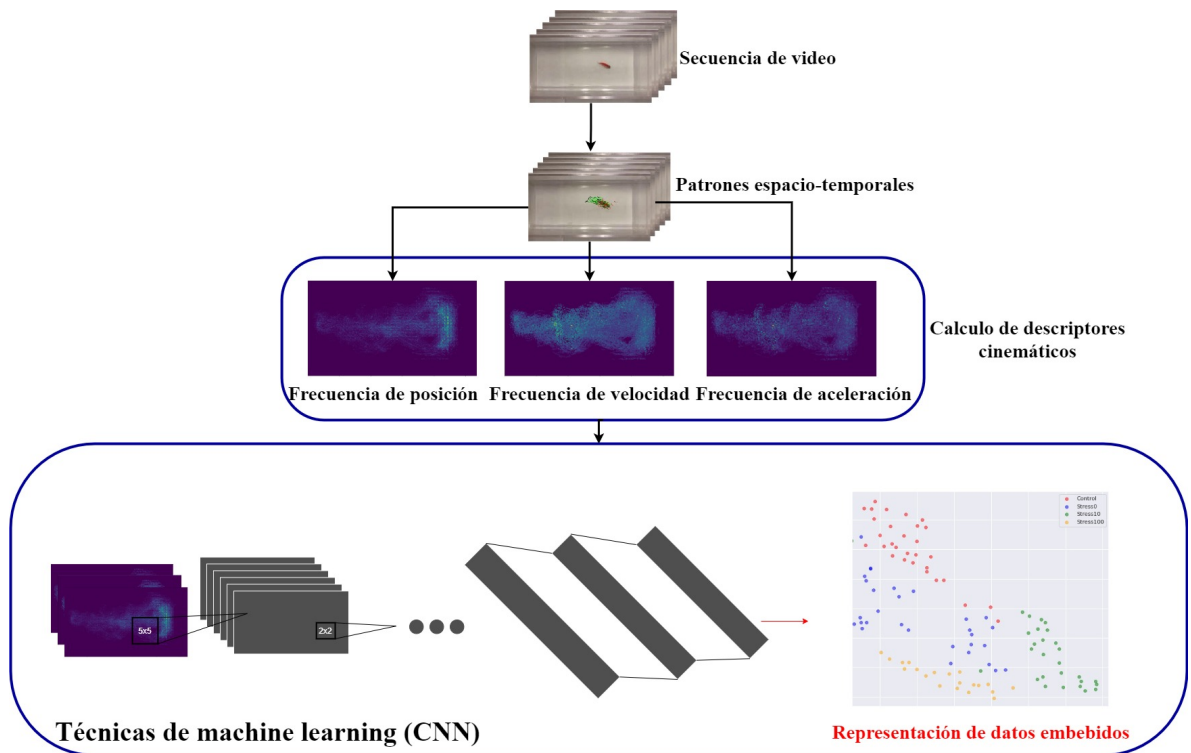


Figura 5. Ilustración del cálculo de trayectorias. **A.** Fotograma particular del pez en movimiento captado en vídeo desde una vista superior del tanque. **B.** La estimación del flujo óptico, se representa como un mapa de colores donde cada intensidad de color representa una dirección de los objetos en movimiento, la coloración circundante se debe a los movimientos aparentes del agua. **C.** Resultado final del cálculo de trayectorias extrayendo sólo las trayectorias de los peces.



5. EVALUACIÓN Y RESULTADOS

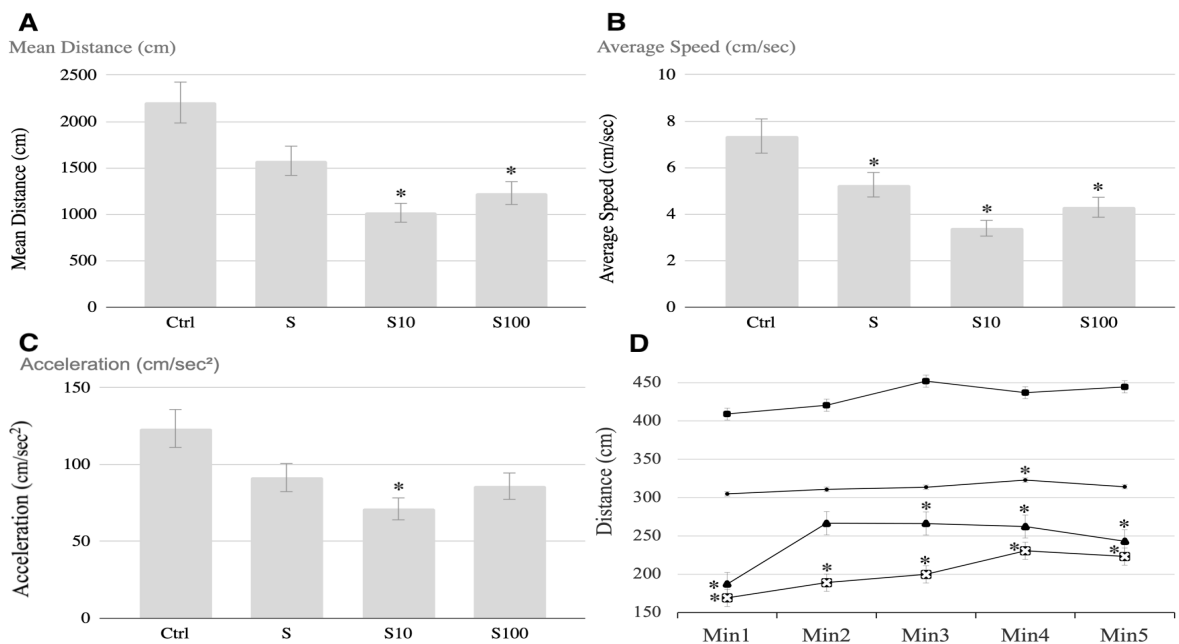
Los datos de comportamiento de los peces obtenidos en tareas sociales se analizaron comparando los siguientes grupos: control, estrés (sin ninguna sustancia), estrés más $10\mu\text{M}$ y estrés más $100\mu\text{M}$ de cafeína. Inicialmente, se analizó la distancia media, la velocidad media y la aceleración en un tanque completo. Este análisis es el típicamente desarrollado en los laboratorios y nos permite tener un punto de comparación con otras herramientas. Además, se comparo los cambios en cada minuto (0-1, 1-2, 2-3 y así sucesivamente) realizando un análisis minuto a minuto. También, se analizaron las ocurrencias, el tiempo de permanencia y de congelamiento (tiempo en que permaneció inmóvil) por zona (lateral, media y social).

5.1. PATRONES GLOBALES

Para el tanque completo, los grupos expuestos al estrés agudo y a la cafeína presentaron una disminución significativa del comportamiento locomotor. El ANOVA de dos vías mostró diferencias en la distancia media ($F= 10.04$, $p= <0.001$) y en la velocidad media ($F= 10.26$, $p= <0.001$), éstas fueron menores en comparación con el grupo control (Figura 3.A, B). La aceleración disminuyó significativamente en el grupo expuesto al estrés agudo y a $10\mu\text{M}$ de cafeína ($F= 2.97$, $p= 0.042$) en comparación con el grupo de control (Figura 3.C). Los resultados del comportamiento locomotor minuto a minuto en el tanque completo mostraron la misma tendencia mencionada anteriormente, el ANOVA de dos vías mostró una disminución significativa de la distancia principalmente en el estrés más $10\mu\text{M}$ en el minuto 1 ($F= 7.60$, $p= 0.002$), minuto 2 ($F= 7.07$, $p= 0.002$), minuto 3 ($F= 7.00$, $p= 0.003$), minuto 4 ($F= 10.12$, $p= <0.001$) y minuto 5 ($F= 6.75$, $p= 0.003$). La prueba post-hoc de Tukey reveló una disminución significativa de la distancia en el grupo de estrés más $100\mu\text{M}$ en el

minuto 1 ($p= 0.011$), en el minuto 3 ($p= 0.040$), en el minuto 4 ($p= 0.004$) y en el minuto 5 ($p= 0.016$) en comparación con el grupo de control; finalmente, el grupo de estrés mostró una disminución significativa de la distancia en el minuto 4 ($p= 0.030$) en comparación con el grupo de control (Figura 3.D).

Figura 6. Grupos de izquierda a derecha, control, estrés (sin ninguna sustancia), estrés más $10\mu\text{M}$ y estrés más $100\mu\text{M}$ de cafeína (Ctrl, S, S10, S100, respectivamente). A. Distancias medias recorridas. La distancia fue menor en los grupos S10 y S100 en comparación con Ctrl. B. Velocidad media. La velocidad fue menor en S, S10 y S100 en comparación con Ctrl. C. Aceleración media (fue menor en S10 ($p=0,042$, $F= 2,97$)). D. Distancia por minuto. Los cuadrados corresponden al grupo de control, los puntos al grupo de estrés, las X al estrés más $10\mu\text{M}$ y los triángulos al estrés más $100\mu\text{M}$. La distancia fue significativamente menor en el grupo S10 en los minutos 1 a 5. Todo ello comparado con el grupo Ctrl. Los grupos marcados con asterisco indican un valor $p \leq 0,05$. Las barras indican las medias con el error estándar (SE), $n= 6$ por grupo. La significación estadística se determinó mediante un ANOVA de dos vías seguido de la prueba HSD de Tukey (Honestly-significant-difference) de comparación múltiple.



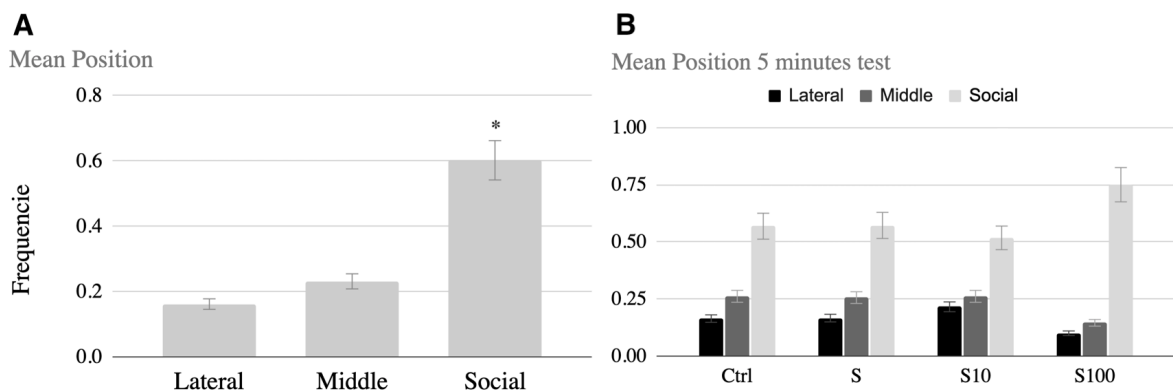
Para calcular la permanencia de los peces en una zona determinada, se utilizaron mapas de ocurrencia de posiciones. Los resultados se presentan en un rango de 0 a 100%. El análisis de ocurrencias por zonas mostró una preferencia significativa

en todos los grupos por la zona social en comparación con las zonas media y lateral (ANOVA, $F= 36.04$, $p= <0.001$) (Figura 4.A). El ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas entre las zonas y los grupos experimentales en comparación con el control en la prueba de cinco minutos; zona lateral ($F= 0.608$, $p= 0.61$), zona media ($F= 0.849$, $p= 0.48$) y zona social ($F= 0.741$, $p= 0.54$) (Figura 4.B). Cabe destacar que existe una preferencia por la zona social, especialmente para el grupo sometido a estrés más $100 \mu\text{M}$ de cafeína que se mantuvo un tiempo medio del 75 %, disminuyendo la exploración en las otras zonas.

Un análisis minuto a minuto (Figura 8) utilizando un ANOVA de dos vías no mostró una diferencia significativa de las zonas exploradas. De todos modos, con un patrón de comportamiento similar al mencionado anteriormente, el pez cebra mostró una mayor frecuencia en la zona social con algunos cambios por minuto y grupo. En el minuto uno, la exploración lateral fue mayor en el grupo expuesto al estrés más $100 \mu\text{M}$ de cafeína, pero sin diferencias significativas en contraste con el grupo control ($F= 0.64$, $p= 0.54$); en el minuto dos, hubo un cambio conductual, la exploración lateral se redujo sin diferencias significativas en comparación con el grupo control ($F= 1.16$, $p= 0.35$). Este patrón conductual se acentuó en el minuto cuatro (sólo en el grupo estrés más $100 \mu\text{M}$), prevaleciendo la exploración en la zona social y disminuyendo la exploración en la zona lateral y media ($F= 50.19$, $p= 0.004$, $p= 0.002$ respectivamente), en cambio, el grupo control no mostró diferencias significativas en la zona lateral y media ($p= 0.6$, $p= 1$ respectivamente) en comparación con la zona social (Figura suplementaria 2). Estos resultados sugieren que tanto el estrés agudo como $10 \mu\text{M}$ de cafeína son capaces de reducir el comportamiento locomotor sin cambios en el comportamiento social. Por otra parte, el estrés agudo asociado a la exposición a $100 \mu\text{M}$ de cafeína, además de reducir el comportamiento locomotor, aumenta significativamente la cohesión social con efecto en el tiempo, siendo el primer minuto una fase de reconocimiento del entorno y posteriormente la marcada

preferencia por la zona social.

Figura 7. Media de ocurrencia de la posición para la prueba de comportamiento social. Grupos en el eje x de izquierda a derecha, control, estrés (sin ninguna sustancia), estrés más $10\mu\text{M}$ y estrés más $100\mu\text{M}$ de cafeína (Ctrl, S, S10, S100, respectivamente), el eje y muestra el porcentaje para cada zona (lateral, media y social). A. Media de ocurrencias en todos los grupos., la zona social fue preferida en comparación con las zonas lateral y media ($p = <0,001$, $p = <0,001$ respectivamente, $F = 36,04$), $n = 22$ por grupo. B. Media de ocurrencias por grupo y zona en 5 minutos. La zona social fue preferida por el grupo S100, pero sin diferencias estadísticas ($F = 0,741$, $p = 0,54$). Los grupos marcados con asterisco indican un valor $p \leq 0,05$. Las barras indican las medias con el error estándar (SE), $n = 6$ por grupo.

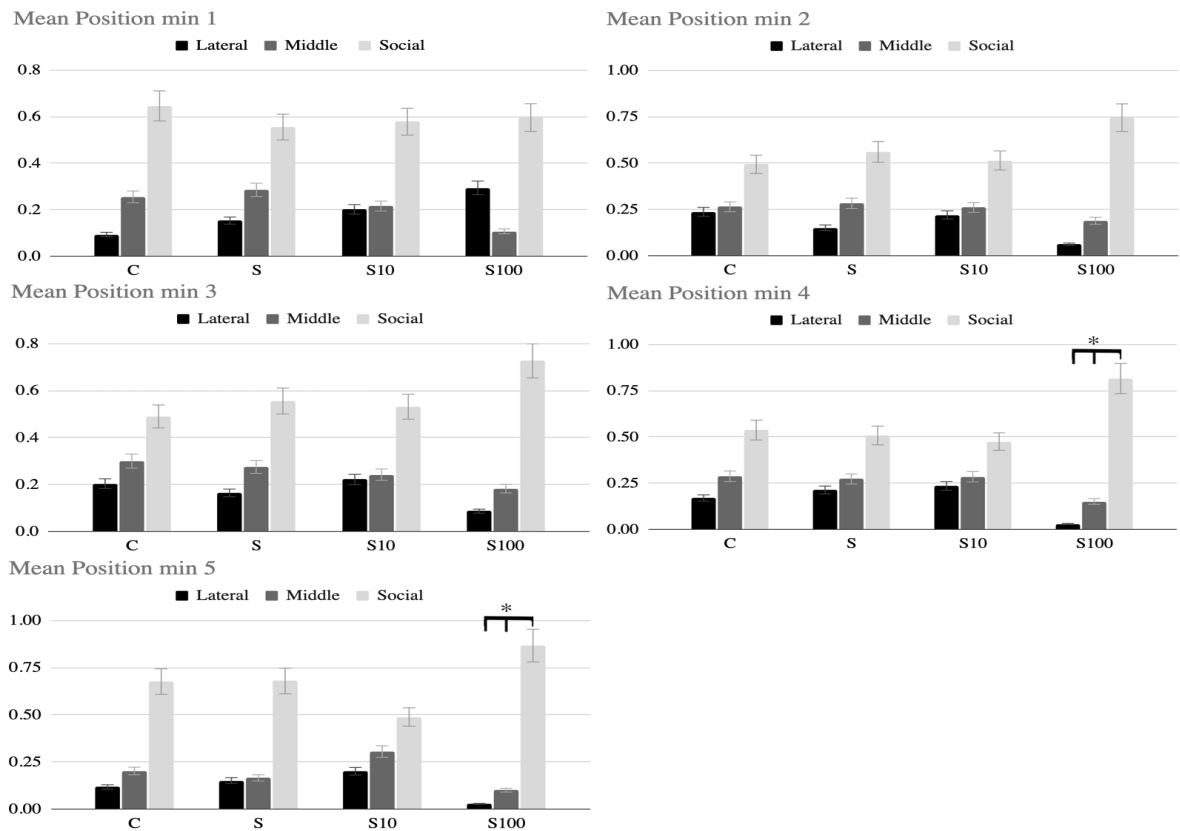


Para validar los resultados obtenidos, se realizó una comparación de la distancia y la velocidad con los resultados de AnimalTracker. Como se puede observar en la Figura 9, ambos resultados son similares, sin embargo, debido a la calibración manual de algunos pasos para el procesamiento de imágenes en AnimalTracker, el pez/objeto puede perderse en algunos fotogramas y por lo tanto se pierde información. Es importante tener en cuenta que algunas posibles variaciones pueden corresponder a la calibración de los píxeles por cm, por esta razón se enfatiza la estandarización de algunos parámetros para minimizar el error al procesar los videos.

5.2. PATRONES LOCALES

Para cada grupo fue posible extraer los patrones característicos como los mapas acumuladores (o mapa promedio). Se calculó el mapa medio por grupo y, con él, su

Figura 8. Media de ocurrencias minuto a minuto y zona. Grupos en el eje x de izquierda a derecha, control, estrés (sin ninguna sustancia), estrés más 10 μ M y estrés más 100 μ M de cafeína (C, S, S10, S100, respectivamente), el eje y muestra el porcentaje para cada zona (lateral, media y social). Los grupos marcados con asterisco indican un valor $p \leq 0,05$. Las barras indican las medias con el error estándar (SE), n = 6 por grupo.



respectiva desviación estándar. Los resultados muestran las regiones características con mayor concentración de movimiento resumidas en un único mapa (Figura 5). La columna de la izquierda muestra los mapas de ocurrencia de posición media por grupos, los valores de intensidad que componen los tonos más fuertes de blanco representan las áreas más exploradas mientras que los negros representan las de ausencia de movimiento.

El grupo de control tuvo una mayor exploración en las zonas medias y laterales, sobre todo con preferencia por la zona social ubicada a la derecha; el grupo de estrés

en nivel cero de cafeína muestra un patrón similar al de control, pero con una distintiva disminución de la exploración; el grupo expuesto a estrés 10 y 100 μM muestran una exploración reducida lo que sugiere que el efecto de la sustancia cafeína con la inducción de estrés agudo afecta directamente al sistema locomotor del pez de forma que se evidencia distancias muy cortas en niveles altos de estrés y tendencia a permanecer inmóviles. El grupo estrés 10 presenta un comportamiento disminuido, asociado al patrón denominado *thigmotaxis* cuya definición es la tendencia del individuo en permanecer o explorar los extremos de su entorno de movimiento, pero paradójicamente este comportamiento es contrario a lo que se espera en los animales alterados, sin embargo, el debate aún persiste porque puede ser una respuesta exploratoria⁴³. Por último, el grupo expuesto al estrés y a 100 μM mostró una disminución de la thigmotaxis, de la exploración en la zona lateral y una marcada preferencia por la zona social y media del tanque en comparación con el control. Uno de los factores mas importantes para analizar en este experimento es poder medir variaciones de diferentes niveles de estrés con respecto a los patrones control. En este sentido los patrones control son la línea base para determinar alteraciones causadas durante en el experimento. Para cuantificar estos resultados, se analizaron los histogramas mediante correlación e intersección estadística. Estas medidas se realizaron tomando como base los patrones medios del grupo control y comparando estos con respecto a los demás grupos afectados por estrés o diferentes valores de cafeína (ver resumen en la Tabla 1 para correlación y Tabla 2 para la medida de intersección).

Estos resultados mostraron que los mapas de posición de ocurrencia media entre los controles, tienen una correlación significativa ($R = 0.81$, $p=0.025$) e intersección

⁴³ LISSEK, Shmuel. "TOWARD AN ACCOUNT OF CLINICAL ANXIETY PREDICATED ON BASIC, NEURALLY MAPPED MECHANISMS OF PAVLOVIAN FEAR-LEARNING: THE CASE FOR CONDITIONED OVERGENERALIZATION". En: *Depression and anxiety* 29.4 (2012), págs. 257-263.

Tabla 1. Resultados Correlación. Resultados de la comparación entre el grupo de control contra el estrés (S), el estrés más 10 μ M (S10) y el estrés más 100 μ M (S100).

Correlación						
	<i>Posición</i>	<i>p</i>	<i>Velocidad</i>	<i>p</i>	<i>Aceleración</i>	<i>p</i>
	Ctrl		Ctrl		Ctrl	
Ctrl	0.81	0.025	0.86	0.014	0.83	0.020
S	0.75	0.042	0.82	0.022	0.78	0.03
S10	0.51	0.15	0.55	0.12	0.51	0.15
S100	0.67	0.16	0.76	0.12	0.70	0.15

de 0.69. Deduciendo así patrones típicos entre los especímenes que no han sido sometidos a ninguna variación. Por otra parte, la comparación de los mapas de posición de ocurrencia media con respecto al grupo de estrés mostraron una correlación moderada ($R= 0.75$, $p=0.042$) e intersección de 0.62. La correlación del grupo expuesto a estrés más 10 μ M mostró una correlación débil ($R= 0.51$, $p=0.15$) e intersección de 0,56, con respecto nuevamente al grupo control. Así mismo, el grupo expuesto a estrés más 100 μ M mostró una correlación moderada ($R= 0.67$, $p=0.16$) e intersección de 0,58, todos ellos comparados con el grupo de control. Por lo tanto, los modelos y mapas de ocurrencia propuestos en este trabajo resultan interesantes ante la comunidad científica para visualizar las diferencias o similitudes entre los grupos; es muy útil para estudios en farmacología, en los que es necesario analizar el efecto biológico y conductual de un fármaco.

Las cinemáticas generadas a partir de un solo pez cambian ligeramente. Como puede verse en la figura 5, la velocidad de un individuo del grupo de control muestra un área de mayor ocurrencia en comparación con su posición y aceleración. Este patrón aparece de forma similar en los mapas de los otros grupos. Sin embargo, sus patrones espaciales cambian entre los grupos debido al tratamiento aplicado. El mapa de control presenta una mayor exploración en las zonas media y lateral en comparación con los otros grupos; el mapa de estrés muestra una exploración en el centro del tanque, disminuyendo la thigmotaxis; el mapa de estrés más 10 μ M muestra una

Tabla 2. Resultados Intersección. Intersección entre el grupo de control (Ctrl) y S, S10 y S100. Se utilizaron cinemáticas de posición, velocidad y aceleración para crear las comparaciones.

Intersección			
	<i>Posición</i>	<i>Velocidad</i>	<i>Aceleración</i>
	Ctrl	Ctrl	Ctrl
Ctrl	0.69	0.75	0.68
S	0.62	0.72	0.64
S10	0.56	0.62	0.55
S100	0.58	0.65	0.54

marcada preferencia por la zona social, con menor exploración en las zonas media y lateral; finalmente, el de estrés más $100\mu\text{M}$ muestra un patrón similar al grupo de estrés más $10\mu\text{M}$, pero con menor exploración en la zona lateral.

5.3. APRENDIZAJE DE PATRONES CONVOLUCIONALES

A continuación se presentan los resultados adquiridos en los procesos de entrenamiento y evaluación con redes neuronales convolucionales y segmentación de vectores embebidos en un espacio de baja dimensionalidad.

5.3.1. Resultados de redes convolucionales neuronales Los resultados obtenidos muestran un aprendizaje con convergencia rápida en las arquitecturas propuestas donde la precisión en la fase de entrenamiento llegando con exactitud al 100%. En el mismo sentido, la validación obtuvo unos resultados favorables lo que muestra que la red no se sobre-entrenó y fue capaz de capturar patrones de la historia de movimiento para realizar una clasificación automática. Todas las arquitecturas fueron evaluadas en un esquema multi-clase, según los diferentes niveles de estrés, siendo estas arquitecturas capaces de realizar una clasificación apropiada, con ciertos errores por la variabilidad asociada al movimiento del espécimen, el cual queda

Figura 9. Resultados comparados con AnimalTracker. Las columnas grises oscuras representan los datos obtenidos con Zebramov y las columnas grises claras con AnimalTracker. El eje X muestra cada vídeo/animal analizado y el eje Y la distancia (A) y la velocidad (B).

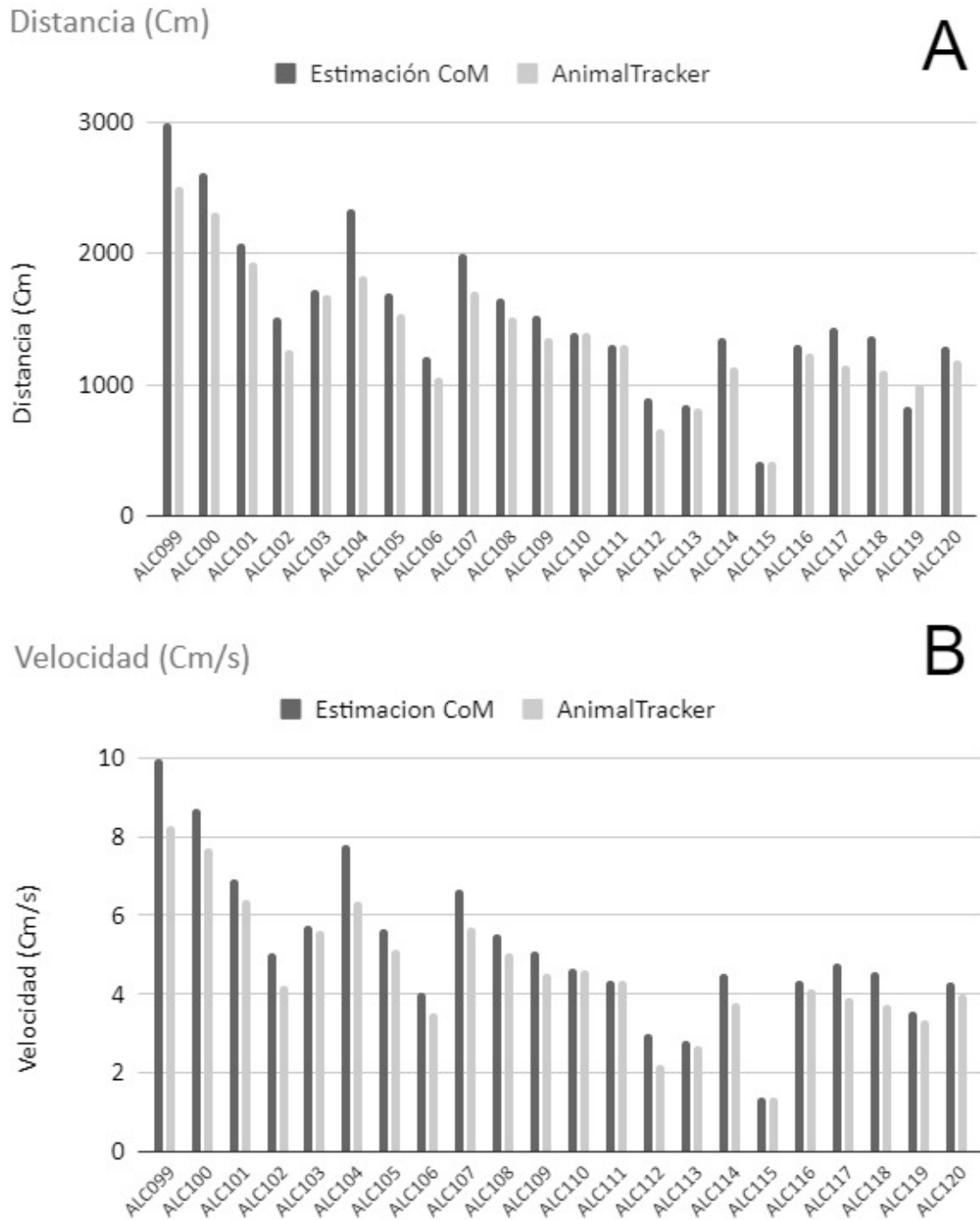
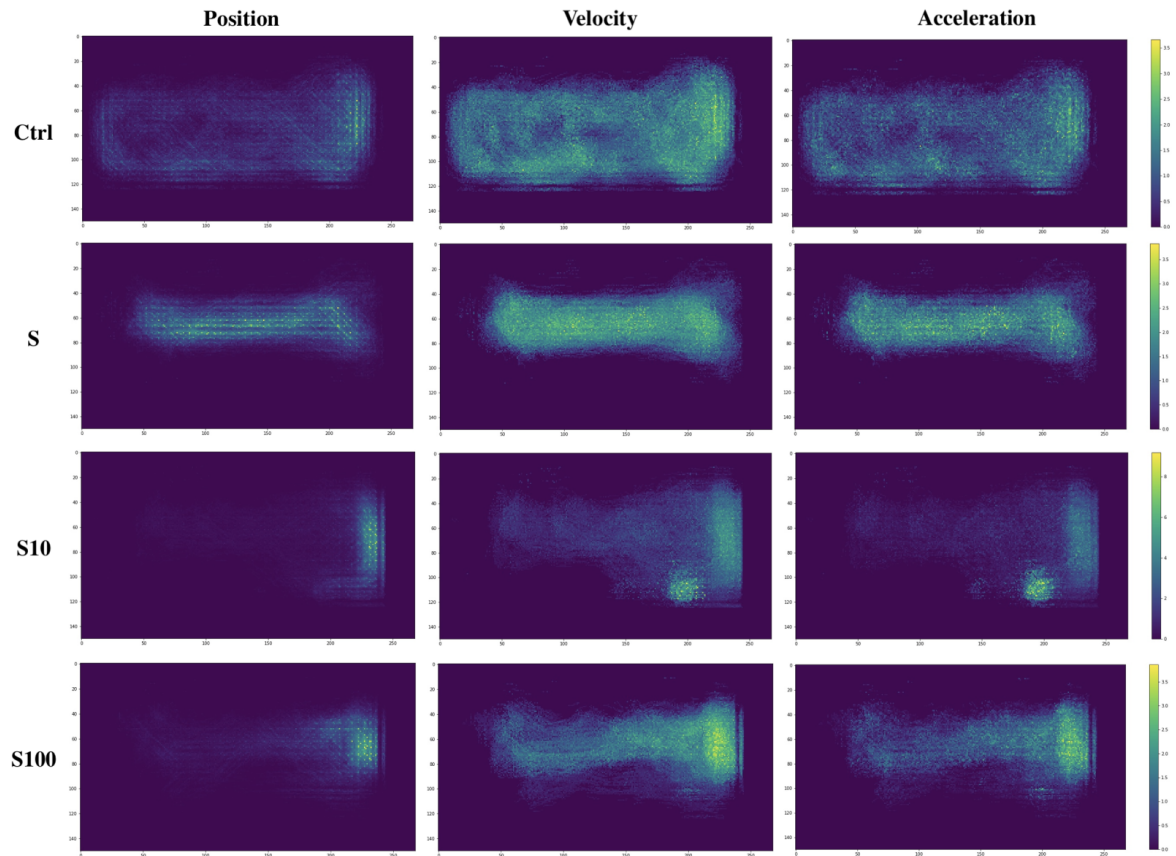


Figura 10. Mapas de ocurrencia característicos de un solo pez. Las filas representan el grupo (Ctrl, S, S10 y S100) y las columnas la cinemática (posición, velocidad y aceleración). Las regiones de menor ocurrencia tienden a una tonalidad morada y las de mayor ocurrencia al color amarillo. Obsérvese que en dicha escala de color la intensidad puede cambiar en función de la cinemática analizada, aunque pertenezca a un solo individuo.



registrado en los mapas de ocurrencia. En los resultados de validación se muestran valores considerables de precisión, cuyos valores están entre el 70 % y 85 % en la caracterización de datos desconocidos, siendo la red de 4 capas convolucionales la arquitectura de mejores resultados en ambos experimentos. La precisión en la fase de entrenamiento y validación tienden a aumentar con una cercanía mutua al 100 %. También arquitecturas pre-entrenadas como la VGG mostraron resultados favorables, por encima del 80 %, pero con una reducción en la efectividad para capturar la representación con respecto a redes mas sencillas y compactas. Este hecho puede estar asociado a la cantidad de datos disponibles durante el entrenamiento y la relativamente extensa arquitectura convolucional de estas redes típicas en el estado del arte. En la tabla 3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la tarea de clasificación, para las diferentes arquitecturas evaluadas.

Tabla 3. Resultados de la clasificación de estrés agudo

Arquitectura	Entrenamiento(%)	Validacion(%)
LENET-5	100	84.09
4 Conv	100	84.09
6 Conv	100	81.81
8 Conv	100	79.54
VGG16	100	81.81
VGG19	100	79.54

De igual forma evaluamos los modelos a través de la matriz de confusión que permite discernir entre la efectividad de clasificación por cada clase considerada en el problema. Específicamente, estas matrices cuentan el número de aciertos y las clases en que se obtuvo una predicción errónea para evaluar si esto representa un patrón en la clasificación. Se dice que el método tuvo una muy buena precisión cuando los aciertos están ubicados en la diagonal principal los cuales son los aciertos en el *ground truth*. En la Figura 11 se reportan los resultados logrados por todas las configuraciones de redes entrenadas, destacando los resultados obtenidos de la arquitectura convolucional constituida por cuatro capas convolucionales. Se pue-

de observar en general una detección destacable para los ejemplos etiquetados con comportamientos control, así como también para los especímenes afectados con 10 μM y 100 μM de cafeína. Las mayores dificultades que se reportan en la representación convolucional ocurren al discriminar entre los especímenes con estrés cero (S0) y el grupo control. Esta dificultad resulta natural en el experimento, teniendo en cuenta que los especímenes de estrés cero no han sido sometidos a sustancias que cambien su comportamiento típico, y su comportamiento puede tener una tendencia a los patrones control con una variabilidad más grande. Para las otras redes diseñadas se puede observar un comportamiento similar en el reconocimiento por cada clase.

5.3.2. Proyección de patrones embebidos en baja dimensionalidad (t-sne) Finalmente, como resultado de este trabajo se optó por construir un espacio embebido de baja dimensionalidad para evidenciar grupos y tendencias de especímenes según las características cinemáticas e históricas recopiladas en los vectores de alto nivel, de las redes convolucionales. Para ello, se seleccionó la red del modelo de 4 capas convoluciones, esto debido a que esta arquitectura obtuvo mejores resultados. En esta red el vector embebido resultante durante el entrenamiento fue de 10 valores, el cual fue aproximado a dos componentes, utilizando la aproximación propuesta por el t-sne. La Figura 12 ilustra el espacio de baja dimensionalidad resultante para los embebidos de la arquitectura convolucional. En este caso los colores representan las clases de estrés, así como también se hace por la distinción de una figura geométrica.

Los datos de mapas cinemáticos fueron agrupados correctamente casi en su totalidad teniendo ciertos ejemplos cuyas posiciones se alejan de su grupo esperado, en el análisis de estos datos singulares que fueron en considerable medida ejemplos del grupo de estrés en el nivel 10 μM se presentaron casos de reflejos en la persecución del comportamiento visualizando un seguimiento en la zona central de la

Figura 11. Matrices de confusión. Aciertos y equivocaciones cometidos por cada red en la evaluación de datos desconocidos. Los mejores resultados fueron los obtenidos por el modelo de 2 y 4 capas convoluciones.

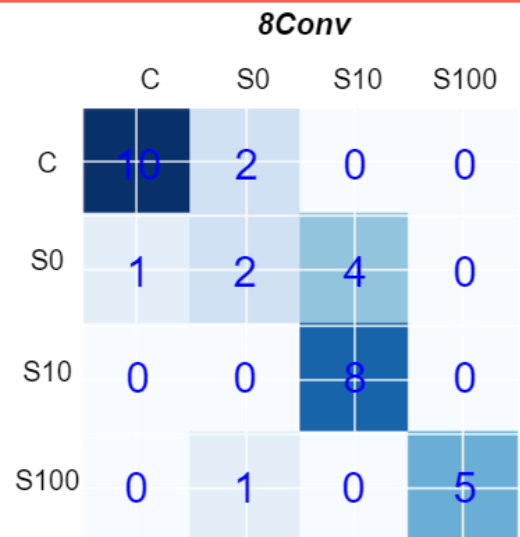
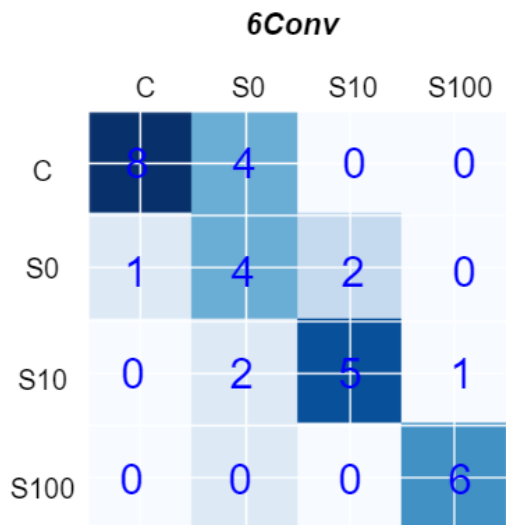
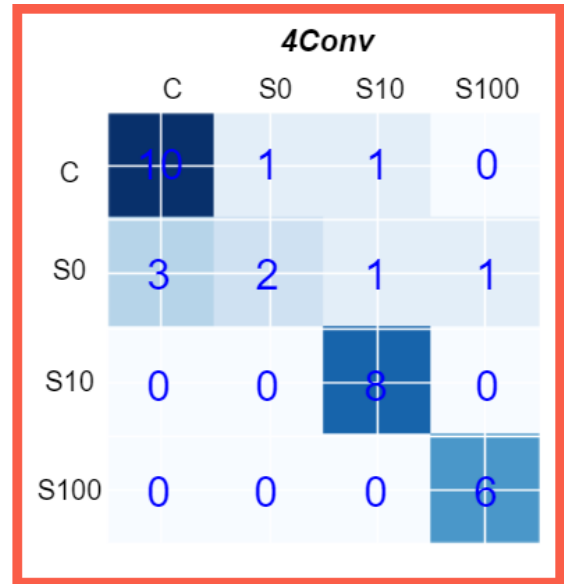
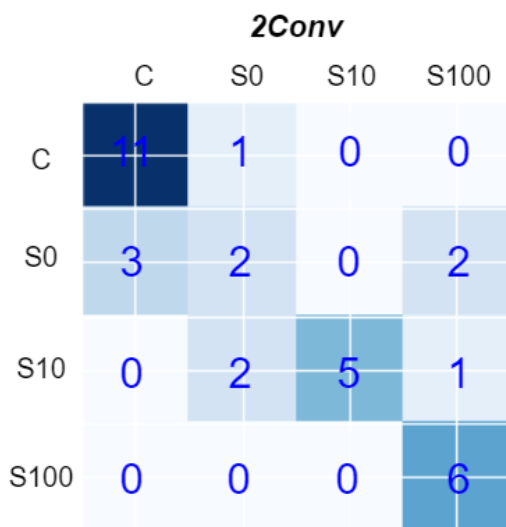
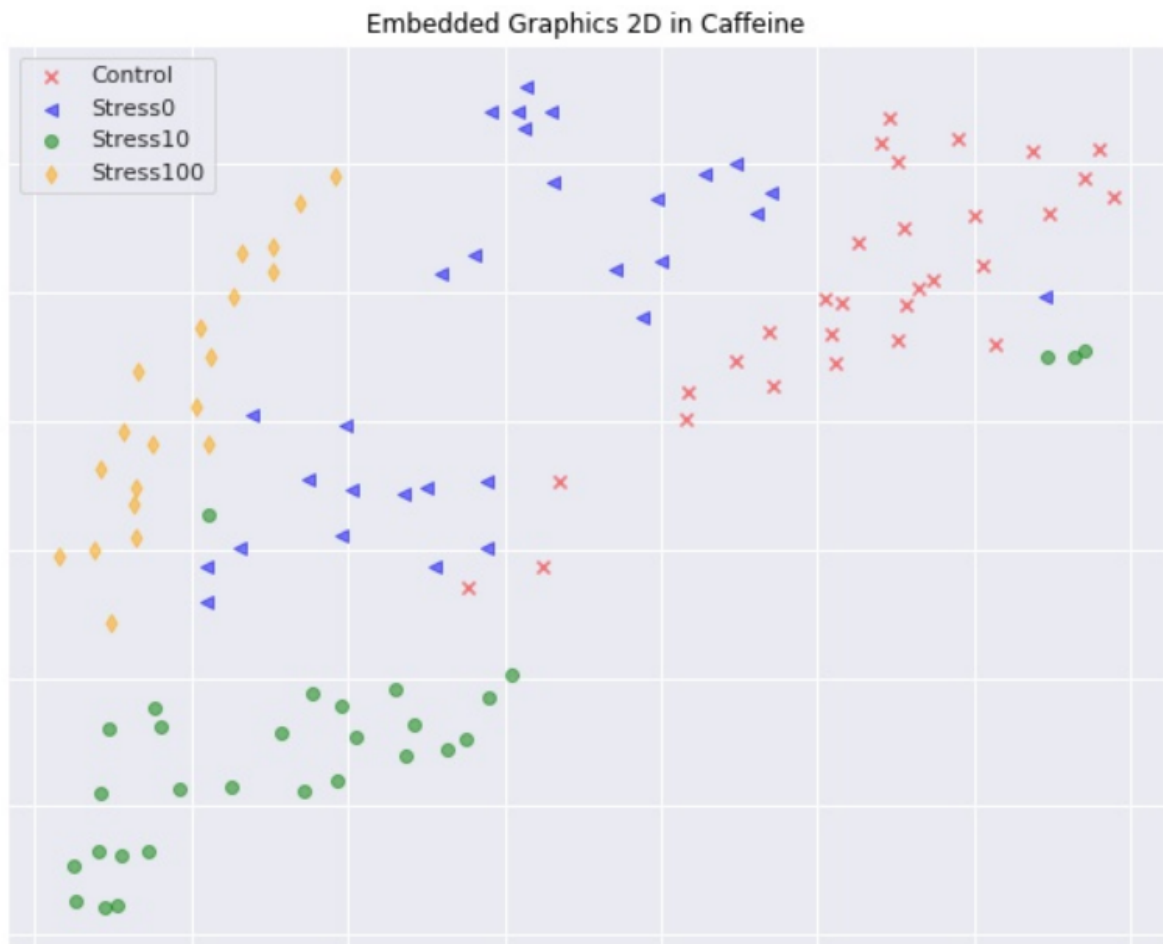


Figura 12. Ilustración de resultados t-SNE. Reducción de dimensionalidad de embebidos resultantes y agrupación de datos por color.



pecera, un caso contrario a lo que se esperaría en un ejemplo de estrés $10\mu\text{M}$ de acuerdo a los comportamientos generales de cada clase visualizados en la Figura 10. Se tuvo en cuenta el índice de ansiedad thigmotaxis. De acuerdo a la Figura 10 las clases estudiadas $10\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$ presentaron en un nivel elevado thigmotaxis regular mientras que en los grupos estrés sin ningún nivel de cafeína no se encontró tendencia de movimiento en los extremos. Los datos de estrés $10\mu\text{M}$ se desvían del resultado esperado porque fue el grupo que más varió su comportamiento por cada ejemplar, unos peces de esta clase presentaron mayor tendencia a permanecer inmóviles y se confirma que a partir de ciertos ejemplos de mapas observados los resultados de estos patrones fueron semejantes a los de la clase control en cuanto a las formas observadas las cuales son visualmente parecidas con la diferencia de contar con desplazamientos más cortos y menor captación de movimiento. Estos mapas de baja dimensionalidad representan una alternativa para el análisis del comportamiento locomotor, pudiendo evidenciar patrones poblacionales, pero además encontrando fenómenos particulares que se asocian a otras clases.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso una metodología novedosa, basada en análisis de video, para la cuantificación de patrones locomotores de peces zebra, sometidos a diferentes niveles de estrés. La metodología propuesta solo requiere secuencias de video convencionales para aproximar tanto la dinámica general del pez (análisis clásico), como descripciones densas de movimiento, expresadas como mapas de ocurrencia, que pueden ser determinantes para entender el comportamiento de los especímenes. Los resultados evidencian que esta herramienta computacional es una alternativa a los esquemas tradicionales de análisis, pero que además aborda de forma nuevos esquemas para la representación dinámica.

Los esquemas tradicionales se basan únicamente en un análisis de distancia de cada animal, medido muchas veces de forma manual en cada fotograma. En este trabajo se conservó el análisis de distancias, calculado de forma automática, siguiendo el centro de masa. También, a partir de esta trayectoria general se pudieron calcular cinemáticas diferenciales como la velocidad y aceleración, que permitían expandir el análisis cinemático, asociado a ciertas situaciones de estrés inducido por la sustancia de la cafeína. De otra parte, en este trabajo se propusieron mapas de ocurrencia que marcan históricamente la zonas con patrones salientes del pez, durante el experimento. Estos histogramas fueron calculados tanto para la posición, como para la velocidad y la aceleración. Para resumir la información durante la ejecución del experimento, se tomaron la media y varianza de los mapas, sin embargo, la implementación propuesta puede desplegarse y actualizarse en cada instante de la ejecución. Estos mapas resultan útiles para entender los fenómenos conductuales, por ejemplo, discriminar entre las zonas de mayor permanencia y las de mayor aceleración o distancia. En una prueba de objeto novedoso, por ejemplo, estas medidas pueden discriminar si los animales tienen una menor velocidad y aceleración

cerca del objeto novedoso pero más distancia recorrida cerca del objeto. Una característica del algoritmo propuesto es una gran proximidad a lo que se esperaría en el sentido físico, donde las zonas de baja o alta ocurrencia permiten desarrollar un análisis visual más representativo del movimiento físico de los peces. Por lo tanto, los análisis basados en estos mapas de ocurrencia permiten realizar evaluar de correlación estadística, comparando directamente las posiciones y los histogramas (mapas) de locomoción. Además, otras ventajas son un menor tiempo de extracción de datos, un algoritmo de código abierto y parámetros de comportamiento adicionales. Sin embargo, se recomiendan unos parámetros mínimos de grabación, como la estabilidad de la cámara y el contraste entre el animal y el entorno ³⁰.

Algunas limitaciones relacionadas con la grabación de vídeo pueden afectar al análisis automático de los datos. Por ejemplo, los reflejos de luz son el problema más frecuente en la pérdida de seguimiento; la lente de ojo de pez crea distorsión del espacio, haciendo que la calibración de la medición sea difícil e inexacta; la baja resolución de vídeo produce pérdida de información debido a un bajo número de cuadros por segundo (*fps*) procesados; y la inestabilidad de la cámara produce datos erróneos del comportamiento locomotor. Por lo tanto, se recomienda grabar los vídeos reduciendo la cantidad de luz directa sobre la superficie del agua o del acuario, para ello se pueden utilizar espejos o utilizar un material translúcido como una hoja de papel blanco entre la fuente de luz y el acuario; evitar el uso de lentes de distorsión; utilizar cámaras capaces de grabar vídeo a un mínimo de 30fps y una resolución de vídeo de 720p (1280 x 720 píxeles). Por último, es muy recomendable mantener la estabilidad de la cámara con un trípode o una superficie plana y transparente (como el acrílico).

Relacionado con el experimento del pez zebra, anteriormente se ha demostrado que altas dosis de cafeína son capaces de reducir la exploración y aumentar el cortisol corporal (hormona tipo esteroidea que se libera en presencia de estrés) en el pez ce-

bra, lo que puede traducirse en un efecto ansiógeno(que causa ansiedad)⁴⁴ y se ha demostrado que después de un estrés agudo, los niveles de cortisol pueden reducirse utilizando fluoxetina(antidepresivo) o bromazepam(fármaco de efecto relajante) y, por lo tanto, la medición del comportamiento locomotor no muestra diferencias significativas con el control ^{45,46}. La afinidad de la cafeína es mayor por los receptores A1 y A2A, pero su efecto ansiógeno se debe principalmente a los receptores A1 ^{36,47}, lo que a su vez se relaciona con la reducción de la actividad locomotora. Por otra parte, el estrés agudo, como la extracción de los peces cebra de sus tanques y el transporte entre peceras de diferente temperatura durante 30 minutos, puede producir una reducción de la actividad locomotora y de la exploración en los peces cebra de tipo salvaje en la prueba de inmersión en tanques nuevos y en la prueba de caja de luz/oscuridad⁴⁸. Se han realizado enfoques similares en el pez cebra para estudiar las diferencias de género en el comportamiento agresivo⁴⁹, la locomoción y la cohesión del cardumen ³⁶, mostrando una reducción de la exploración, más ataques de congelación y tendencia a la cohesión social. Anteriormente, no se habían estudiado en el pez cebra los efectos conductuales sociales del estrés y la cafeína

⁴⁴ LADU, Fabrizio, *et al.* "Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus". En: *Behavioural brain research* 289 (2015), págs. 48-54.

⁴⁵ ABREU, Murilo S, *et al.* "Divergent effect of fluoxetine on the response to physical or chemical stressors in zebrafish". En: *PeerJ* 5 (2017), e3330.

⁴⁶ MARCON, Matheus, *et al.* "Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline". En: *Psychopharmacology* 233.21 (2016), págs. 3815-3824.

⁴⁷ MAXIMINO, Caio, *et al.* "Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety and arousal in zebrafish". En: *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 109.3 (2011), págs. 203-207.

⁴⁸ SONG, Cai, *et al.* "Building neurophenomics in zebrafish: effects of prior testing stress and test batteries". En: *Behavioural brain research* 311 (2016), págs. 24-30.

⁴⁹ RAMBO, Cassiano L, *et al.* "Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress". En: *Physiology & Behavior* 171 (2017), págs. 50-54.

combinados. Con los resultados obtenidos en este trabajo, la combinación del estrés ambiental agudo asociado a la exposición a la cafeína en dosis altas, aumenta la cohesión social, posiblemente causada por la suma de los efectos ansiógenos, lo que a su vez explica la disminución de la exploración en otras áreas del tanque. Sin embargo, los mecanismos del estrés y de la cafeína en el SNC siguen sin estar claros y es necesario seguir investigando en muchos campos como la fisiología, la psicofarmacología, la neurogenética y la etología, entre otros.

Los resultados muestran la utilidad de un método automatizado, cumpliendo así con el objetivo en el análisis de patrones complejos de comportamiento en el pez cebra, que puede ser extrapolado a otros modelos animales y a los humanos. Los datos necesarios son únicamente los vídeos grabados del espécimen experimental; el formato y tamaño del vídeo no afecta a la metodología ya que nuestro algoritmo ajusta el tamaño a nuestro estándar trabajado (150×268 px). Otra de las ventajas fundamentales del método está en la aplicación de trayectorias densas, este gran número de puntos cercanos y compactos sobre los objetos en movimiento muestran una forma más característica del movimiento cercana al comportamiento real. Con este conjunto de puntos adquirimos imágenes de frecuencia similares a los mapas térmicos evidenciando directamente las principales zonas o regiones de mayor interés, disminución del movimiento, desplazamientos largos y cambios bruscos. Además, el grupo expuesto a estrés más $10 \mu\text{M}$ de cafeína reduce su comportamiento locomotor. Podemos afirmar que el estrés agudo disminuye la velocidad media pero no afecta a la tendencia del comportamiento social y la cafeína afecta al comportamiento locomotor, disminuyendo el movimiento en el pez cebra.

BIBLIOGRAFÍA

ABREU, Murilo S, *et al.* “Divergent effect of fluoxetine on the response to physical or chemical stressors in zebrafish”. En: *PeerJ* 5 (2017), e3330 (vid. pág. 54).

ALI, Shaukat; CHAMPAGNE, Danielle L y RICHARDSON, Michael K. “Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds”. En: *Behavioural brain research* 228.2 (2012), págs. 272-283 (vid. pág. 12).

AMORES, Angel, *et al.* “Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution”. En: *Science* 282.5394 (1998), págs. 1711-1714 (vid. pág. 11).

BRANSON, Kristin, *et al.* “High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*”. En: *Nature methods* 6.6 (2009), págs. 451-457 (vid. págs. 13, 15, 26).

CF, Howe K Clark MD Torroja. “Torrance J Berthelot C Muffato M Collins JE Humphray S McLaren K Matthews L *et al.* 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome”. En: *Nature* 496.7446 (), págs. 498-503 (vid. pág. 10).

COUNCIL, National Research, *et al.* “Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research”. En: (2003) (vid. pág. 19).

DARÉ, Labanté Outcha, *et al.* “Co-morbidities of mental disorders and chronic physical diseases in developing and emerging countries: a meta-analysis”. En: *BMC public health* 19.1 (2019), págs. 1-12 (vid. pág. 12).

- DWIVEDI, Shubham, *et al.* “Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism”. En: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 95 (2019), págs. 56-65 (vid. pág. 12).
- FARNEBÄCK, Gunnar. “Two-frame motion estimation based on polynomial expansion”. En: *Scandinavian conference on Image analysis*. Springer. 2003, págs. 363-370 (vid. pág. 32).
- FERRÉ, Sergi. “Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders”. En: *Psychopharmacology* 233.10 (2016), págs. 1963-1979 (vid. págs. 21, 54).
- FRANCO-RESTREPO, Juan E; FORERO, Diego A y VARGAS, Rafael A. “A review of freely available, open-source software for the automated analysis of the behavior of adult zebrafish”. En: *Zebrafish* 16.3 (2019), págs. 223-232 (vid. págs. 14, 53).
- GERLAI, Robert. “Social behavior of zebrafish: from synthetic images to biological mechanisms of shoaling”. En: *Journal of Neuroscience Methods* 234 (2014), págs. 59-65 (vid. pág. 14).
- GIRALDEZ, Antonio J, *et al.* “MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish”. En: *Science* 308.5723 (2005), págs. 833-838 (vid. pág. 11).
- GORELIK, Roman, *et al.* “Mechanisms of plasma membrane targeting of formin mDia2 through its amino terminal domains”. En: *Molecular biology of the cell* 22.2 (2011), págs. 189-201 (vid. pág. 13).
- GROSSMAN, Leah, *et al.* “Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish”. En: *Behavioural brain research* 214.2 (2010), págs. 277-284 (vid. pág. 21).

GULYÁS, Márton, *et al.* *AnimalTracker: an ImageJ-based tracking API to create a customized behaviour analyser program.* 2016 (vid. pág. 23).

HAFFTER, PASCAL y NUSSLEIN-VOLHARD, CHRISTIANE. “Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish.” En: *International Journal of Developmental Biology* 40.1 (2003), págs. 221-227 (vid. pág. 11).

HINTERBUCHINGER, Barbara, *et al.* “Do patients with different psychiatric disorders show altered social decision-making? A systematic review of ultimatum game experiments in clinical populations”. En: *Cognitive neuropsychiatry* 23.3 (2018), págs. 117-141 (vid. pág. 12).

JIMÉNEZ, Karen M; PEREIRA-MORALES, Angela J y FORERO, Diego A. “Higher scores in the extraversion personality trait are associated with a functional polymorphism in the PER3 gene in healthy subjects”. En: *Chronobiology international* 34.2 (2017), págs. 280-286 (vid. pág. 12).

KABRA, Mayank, *et al.* “JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior”. En: *Nature methods* 10.1 (2013), págs. 64-67 (vid. pág. 15).

KULKEAW, Kasem y SUGIYAMA, Daisuke. “Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia”. En: *Stem cell research & therapy* 3.6 (2012), pág. 55 (vid. pág. 10).

LADU, Fabrizio, *et al.* “Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus”. En: *Behavioural brain research* 289 (2015), págs. 48-54 (vid. pág. 54).

LAM, Siew Hong, *et al.* “Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines”. En: *BMC medical genomics* 4.1 (2011), pág. 41 (vid. pág. 10).

LISSEK, Shmuel. “TOWARD AN ACCOUNT OF CLINICAL ANXIETY PREDICTED ON BASIC, NEURALLY MAPPED MECHANISMS OF PAVLOVIAN FEAR-LEARNING: THE CASE FOR CONDITIONED OVERGENERALIZATION”. En: *Depression and anxiety* 29.4 (2012), págs. 257-263 (vid. pág. 42).

MARCON, Matheus, *et al.* “Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline”. En: *Psychopharmacology* 233.21 (2016), págs. 3815-3824 (vid. pág. 54).

MAXIMINO, Caio, *et al.* “Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety and arousal in zebrafish”. En: *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 109.3 (2011), págs. 203-207 (vid. pág. 54).

MILLER, Noam y GERLAI, Robert. “From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*)”. En: *PloS one* 7.11 (2012), e48865 (vid. pág. 13).

MILLER, Noam, *et al.* “Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling”. En: *Behavioural brain research* 240 (2013), págs. 192-196 (vid. págs. 11, 14).

MOLONEY, Aileen, *et al.* “Alzheimer’s disease: insights from *Drosophila melanogaster* models”. En: *Trends in biochemical sciences* 35.4 (2010), págs. 228-235 (vid. pág. 12).

NAITO, Akira; SHIMIZU, Yoshifusa y HANDA, Yasunobu. "Analyses of treadmill locomotion in adult spinal dogs". En: *Neuroscience research* 8.4 (1990), págs. 281-290 (vid. pág. 13).

OLIVEIRA, Rui F; SILVA, Joana F y SIMOES, José M. "Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner–loser effects". En: *Zebrafish* 8.2 (2011), págs. 73-81 (vid. pág. 11).

PIATO, Ângelo L, *et al.* "Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses". En: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35.2 (2011), págs. 561-567 (vid. pág. 20).

RAMAKRISHNAN, Lalita. "The zebrafish guide to tuberculosis immunity and treatment". En: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. 78. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2013, págs. 179-192 (vid. pág. 10).

RAMBO, Cassiano L, *et al.* "Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress". En: *Physiology & Behavior* 171 (2017), págs. 50-54 (vid. pág. 54).

RIHEL, Jason y SCHIER, Alexander F. "Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish". En: *Developmental neurobiology* 72.3 (2012), págs. 373-385 (vid. pág. 11).

ROJAS-MUÑOZ, Agustín; MIANA, Antonio Bernad y BELMONTE, Juan Carlos Izpisúa. "El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina". En: *Investigación y ciencia* 366 (2007), págs. 62-69 (vid. pág. 10).

SCERBINA, Tanya; CHATTERJEE, Diptendu y GERLAI, Robert. "Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study". En: *Amino acids* 43.5 (2012), págs. 2059-2072 (vid. pág. 14).

SCHINDELIN, Johannes, *et al.* “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis”. En: *Nature methods* 9.7 (2012), págs. 676-682 (vid. pág. 23).

SELVARAJ, Velanganni y SANTHAKUMAR, Kirankumar. “Analyzing locomotor activity in Zebrafish larvae using wrMTrck”. En: *Zebrafish* 14.3 (2017), págs. 287-291 (vid. págs. 11, 14).

SHELTON, Delia S, *et al.* “Density and group size influence shoal cohesion, but not coordination in zebrafish (*Danio rerio*).” En: *Journal of Comparative Psychology* 129.1 (2015), pág. 72 (vid. pág. 13).

SIMONYAN, Karen y ZISSERMAN, Andrew. “Very deep convolutional networks for large-scale image recognition”. En: *arXiv preprint arXiv:1409.1556* (2014) (vid. pág. 34).

SONG, Cai, *et al.* “Building neurophenomics in zebrafish: effects of prior testing stress and test batteries”. En: *Behavioural brain research* 311 (2016), págs. 24-30 (vid. pág. 54).

SURIYAMPOLA, Piyumika S, *et al.* “Zebrafish social behavior in the wild”. En: *Zebrafish* 13.1 (2016), págs. 1-8 (vid. págs. 11, 13).

TANG, Wenlong y SU, Di. “Locomotion analysis and its applications in neurological disorders detection: state-of-art review”. En: *Network modeling analysis in health informatics and bioinformatics* 2.1 (2013), págs. 1-12 (vid. pág. 13).

TUNGTUR, Sudheer K, *et al.* “Mouse Behavior Tracker: An economical method for tracking behavior in home cages”. En: *BioTechniques* 63.5 (2017), págs. 215-220 (vid. pág. 14).

VICKERS, Neil J. "Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?"
En: *Current biology* 27.14 (2017), R713-R715 (vid. pág. 21).

WANG, Limin; QIAO, Yu y TANG, Xiaoou. "Action recognition with trajectory-pooled deep-convolutional descriptors". En: *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. 2015, págs. 4305-4314 (vid. págs. 26, 32).

WANG, Ying, *et al.* "Social impairment of children with autism spectrum disorder affects parental quality of life in different ways". En: *Psychiatry research* 266 (2018), págs. 168-174 (vid. pág. 12).

ZHDANOVA, Irina V, *et al.* "Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish". En: *Brain research* 903.1-2 (2001), págs. 263-268 (vid. pág. 11).