



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

---

---



FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMA DE ANÁLISIS BASADO EN  
APRENDIZAJE PROFUNDO DE  
MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE  
CÉLULAS INFECTADAS CON SARS-CoV-2 Y  
ZIKV

**TESIS PROFESIONAL**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA

**PRESENTA:**  
I.B. BRIANDA ALEXIA AGUNDIS TINAJERO

**DIRECTOR(ES) DE TESIS:**  
DR. MAURICIO COMAS GARCÍA  
DR. ALDO RODRIGO MEJÍA RODRÍGUEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., AGOSTO 2024

SISTEMA DE ANÁLISIS BASADO EN APRENDIZAJE PROFUNDO DE MICROGRAFÍAS  
ELECTRÓNICAS DE CÉLULAS INFECTADAS CON SARS-CoV-2 Y ZIKV © 2024 por está  
bajo licencia [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) 



**UASLP**  
Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

San Luis Potosí, S. L. P, 18 de agosto de 2022

**Dr. Mauricio Comas García**  
**Dr. Aldo Rodrigo Mejía Rodríguez**  
**Profesores Investigadores**  
**Posgrado en Ciencias de la Vida**  
**P r e s e n t e.-**

La solicitud para el registro de título de tesis y de Subcomité de Tesis de la estudiante de Maestría en Ciencias de la Vida **Brianda Alexia Agundis Tinajero**, fue revisada por Comité Académico del Posgrado en su reunión ordinaria del 18 de agosto del presente año, resultando **APROBADA** y quedando registrada ante la Coordinación del Posgrado de la siguiente manera:

**Título de Tesis:** " *Sistema de Análisis basado en Aprendizaje Profundo de Micrografías Electrónicas de Células Infectadas con SARS-CoV-2.*", dirigida por el Dr. Mauricio Comas García (Director) y el Dr. Aldo Rodrigo Mejía Rodríguez (Co-Director).

**Subcomité de Tesis integrado por:**

Dr. Daniel Ulises Campos Delgado  
Dr. Roberto C. Salgado Delgado  
Dra. Guadalupe Dorantes Méndez (suplente)  
Dr. Mauricio Comas García

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente.



Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida  
Facultad de Ciencias, UASLP

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)



San Luis Potosí, S. L. P, 15 de junio de 2024

Dr. Mauricio Comas García  
Dr. Aldo Rodrigo Mejía Rodríguez  
Profesores Investigadores  
Posgrado en Ciencias de la Vida  
P r e s e n t e.-

Por este conducto se aprueba su solicitud de ajuste al título de tesis de la estudiante de Maestría en Ciencias de la Vida **Brianda Alexia Agundis Tinajero**. El ajuste atiende evaluaciones semestrales donde se sugirió ampliar los objetivos para que la tesis pudiera contener datos de células infectadas con otro virus que no causara un daño tan extenso a la estructura celular y así poder obtener un mejor entrenamiento de la red neuronal.

**Título de Tesis:** *"Sistema de Análisis basado en Aprendizaje Profundo de Micrografías Electrónicas de Células Infectadas con SARS-CoV-2".* (aprobado el 18 de agosto de 2022)

**Nuevo Título de Tesis:** *"Sistema de Análisis basado en Aprendizaje Profundo de Micrografías Electrónicas de Células Infectadas con SARS-CoV-2 y ZIKV".*

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente.



Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida  
Facultad de Ciencias, UASLP

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)



---

A Kiry, mi gatita, que ha pasado la mitad de mi vida a mi lado, en mis momentos más oscuros y que estoy segura sin ella no hubiera podido seguir.

---



---

### *Agradecimientos*

---

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Facultad de Ciencias por su respaldo y apoyo, por fomentar siempre el cumplimiento de mis metas académicas.

A mis directores de tesis, el Dr. Mauricio Comas García por la paciencia y disponibilidad para enseñarme acerca de temas nuevos, transmitiendo su pasión por su área de estudio y el Dr. Aldo Rodrigo Mejía Rodríguez por todo su apoyo y consejos para lograr la realización de la tesis, así como su acompañamiento en la frustración cuando no salía el resultado esperado. Les estoy inmensamente agradecida.

A mis sinodales el Dr. Daniel Campos, el Dr. Roberto Salgado, la Dra. Guadalupe Dorantes y el Dr. Marco Mendoza por su apoyo, correcciones y sugerencias a lo largo de la investigación realizada.

A todos los profesores cuyas enseñanzas son la base para poder avanzar en la investigación.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos y el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina por brindarme las herramientas y el espacio para la realización de esta tesis de maestría.

Al CONAHCYT por el apoyo económico brindado que me permitió realizar y culminar esta investigación.

Al Dr. Ignacio Lara Hernández y el Biol. Miguel Ángel Coronado Ipiña por todo su apoyo y conocimiento impartido durante mi aprendizaje en un área de estudio externa a la mía, enseñándome con paciencia las características de las micrografías y virus con los que han trabajado.

Al Dr. Diomar Rodríguez por su ayuda al introducirme en un nuevo campo como lo es la Inteligencia Artificial, explicándome y resolviendo todas las dudas que surgían en el camino.

A mis hermanos Iván Carlo y Gibrán David por todo su apoyo brindado cuando me quería dar por vencida, porque sin ellos no podría haber terminado la maestría.

A todas las personas que me han acompañado en este camino, de quienes he obtenido enseñanzas, quienes me han apoyado en momentos difíciles y con quien he compartido momentos y risas para poder llegar hasta aquí.

---

*Índice*

---

<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>13</b>
1.1 SARS-CoV-2 .....	14
1.1.1 Estructura del SARS-CoV-2 .....	14
1.1.2 Formas de transmisión y manifestaciones clínicas.....	15
1.1.3 Variantes del SARS-CoV-2.....	16
1.2 El virus del Zika.....	16
1.2.1 Estructura del virus del Zika.....	17
1.2.2 Formas de transmisión y manifestaciones clínicas.....	17
1.3 La mitocondria.....	18
1.3.1 Respuesta mitocondrial ante una infección viral.....	18
1.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	19
<b>Capítulo 2. Antecedentes.....</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>22</b>
3.1 Hipótesis.....	22
3.2 Objetivo general.....	22
3.3 Objetivos particulares.....	22
<b>Capítulo 4. Metodología .....</b>	<b>23</b>
4.1 Generación del banco de micrografías.....	23
4.2 Selección de micrografías y segmentación manual de mitocondrias.....	23
4.3 Obtención de métricas manualmente.....	26
4.4 Segmentación de mitocondrias mediante una red convolucional tipo U-Net.....	27
4.4.1 Capa de convolución.....	28
4.4.2 Función de activación.....	29
4.4.3 Capa de pooling.....	29
4.4.5 Arquitectura U-Net.....	29
4.5 Procesamiento de imágenes.....	31

4.5.1 Normalización de imágenes.....	31
4.5.2 Operaciones morfológicas.....	32
4.5.3 Filtro Gaussiano.....	33
4.6 Obtención de métricas automáticamente.....	33
4.7 Validación de la herramienta.....	34
<b>Capítulo 5. Resultados .....</b>	<b>35</b>
5.1 Obtención de datos manualmente.....	35
5.2 Estrategias de segmentación mediante arquitectura U-Net.....	37
5.2.1 Segmentación automática con micrografías originales.....	37
5.2.2 Segmentación automática con micrografías normalizadas.....	41
5.2.3 Segmentación automática con operaciones morfológicas .....	41
5.2.4 Segmentación automática con filtro Gaussiano.....	44
5.3 Obtención de métricas de forma automática.....	45
5.4 Validación.....	51
5.4.1 Coeficiente de Correlación de Concordancia de Lin.....	51
5.4.2 Índice de Similitud DICE.....	52
<b>Capítulo 6. Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>Capítulo 7. Conclusiones .....</b>	<b>59</b>
7.1 Trabajo a futuro.....	59
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>60</b>

---

*Índice de Tablas*

---

Tabla 1 Síntomas característicos de cada Variante .....	16
Tabla 2. Total de mitocondrias segmentadas manualmente en micrografías de células infectadas con SARS-CoV-2 y ZIKV .....	35
Tabla 3. Promedios obtenidos de forma manual de las mitocondrias en células control e infectadas con SARS-CoV-2 y el virus de Zika.....	36
Tabla 4. Valores de pérdida y precisión obtenidos al realizar las distintas pruebas de segmentación para las mitocondrias en células infectadas y control.....	38
Tabla 5. Valores obtenidos de la red U-Net entrenada con micrografías preprocesadas con un filtro Gaussiano con $\sigma=2$ .....	44
Tabla 6. Total de mitocondrias segmentadas manual y automáticamente .....	46
Tabla 7. Promedios y desviaciones estándar obtenidos de las métricas calculadas para las mitocondrias segmentadas de forma automática. ....	46
Tabla 8. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de área calculada para cada grupo de mitocondrias.....	51
Tabla 9. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de circularidad calculada para cada grupo de mitocondrias .....	51
Tabla 10. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de aspect ratio calculada para cada grupo de mitocondrias .....	52
Tabla 11. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de redondez calculada para cada grupo de mitocondrias .....	52
Tabla 12. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de foco calculada para cada grupo de mitocondrias.....	52
Tabla 13. Valores obtenidos para el conjunto de micrografías control e infectadas con variantes de SARS-CoV-2. ....	53
Tabla 14. Valores obtenidos para el conjunto de micrografías control e infectadas con ZIKV. ....	55

---

*Índice de Figuras*

---

Fig. 1 Imagen obtenida por medio de Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM).....	13
Fig. 2 Estructura del SARS-CoV-2 y su genoma.....	15
Fig. 3 Rutas de transmisión del SARS-CoV-2. ....	15
Fig. 4 Genoma y estructura del ZIKV.....	17
Fig. 5 Transmisión del ZIKV.....	17
Fig. 6 Partes de la mitocondria y como se observa por medio de una micrografía electrónica de transmisión de electrones (TEM).....	18
Fig. 7 Respuesta mitocondrial ante distintos virus de ARN.....	19
Fig. 8 Microscopio de transmisión de electrones.....	19
Fig. 9 Diagrama del funcionamiento del TEM.....	20
Fig. 10 Ejemplos del conjunto de datos de micrografías.....	24
Fig. 11 Micrografías de células infectadas con ZIKV tomadas con una magnificación menor.....	25
Fig. 12 Micrografías con organelos que tienen una forma similar.....	25
Fig. 13 Segmentación manual de micrografías de células infectadas realizadas mediante el programa ImageJ.....	26
Fig. 14 Micrografía de TEM de una mitocondria ilustrando como medir manualmente con el programa ImageJ.....	27
Fig. 15 Ejemplo del proceso de convolución en una imagen.....	27
Fig. 16 Arquitectura de una CNN.....	28
Fig. 17 Ejemplo de un kernel de 2x2 convolucionando una imagen.....	28
Fig. 18 Comportamiento de una función ReLU.....	29
Fig. 19 Ejemplo de una capa de MaxPooling de 2x2.....	29
Fig. 20 Arquitectura de la U-Net.....	30
Fig. 21 Ejemplo de imagen obtenida mediante distintas transformaciones para el conjunto de aumentación de datos.....	31
Fig. 22 Micrografía normalizada.....	32
Fig. 23 Ejemplo del proceso de dilatación en una imagen binaria.....	32
Fig. 24 Operación morfológica de dilatar aplicado a una máscara binaria.....	33
Fig. 25 Micrografía con filtro Gaussiano.....	33
Fig. 26 Máscara binaria con dos mitocondrias.....	34
Fig. 27 Ejemplo del proceso de segmentación manual mediante el programa ImageJ.....	35
Fig. 28 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas manualmente de mitocondrias en micrografías control e infectadas con SARS-CoV-2 con media y percentiles.....	36
Fig. 29 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma manual de las mitocondrias en micrografías control e infectadas con ZIKV con media y percentiles.....	37
Fig. 30 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión en entrenamiento obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net para cada grupo de micrografías; a) Conjunto de datos completo de SARS-CoV-2, b) Conjunto de datos completo ZIKV.....	38
Fig. 31 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net para cada grupo de micrografías; a) Delta, b) Ómicron, c) Control.....	39

Fig. 32 Comparación de las segmentaciones obtenidas para la variante Delta .....	40
Fig. 33 <i>Comparación entre las segmentaciones obtenidas para la variante Ómicron</i> .....	40
Fig. 34 Dos ejemplos de resultados obtenidos con la red U-Net utilizando las micrografías originales de células infectadas con ZIKV .....	41
Fig. 35 Gráficas de función de precisión y pérdida .....	42
Fig. 36 Segmentaciones obtenidas de forma automática entrenando a la red U-Net con micrografías normalizadas .....	43
Fig. 37 Segmentaciones obtenidas de forma automática con un preprocesamiento en las máscaras binarias .....	43
Fig. 38 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net entrenada con micrografías preprocesadas con un filtro Gaussiano .....	44
Fig. 39 Segmentaciones obtenidas de forma automática añadiendo un filtro Gaussiano a las micrografías originales ZIKV .....	45
Fig. 40 Segmentaciones obtenidas de forma automática añadiendo un filtro Gaussiano a las micrografías originales SARS-CoV-2 .....	45
Fig. 41 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma automática de cada mitocondria en micrografías control e infectadas con SARS-CoV-2 con media y percentiles.....	47
Fig. 42 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma automática para cada mitocondria en micrografías control e infectadas con ZIKV con media y percentiles. ....	47
Fig. 43 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual para cada variante de SARS-CoV-2 y células control.....	48
Fig. 44 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma automática para cada variante de SARS-CoV-2 y células control. ....	48
Fig. 45 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual tomando únicamente las mitocondrias correspondientes a las obtenidas de forma automática para cada variante de SARS-CoV-2 y células control.....	49
Fig. 46 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual para células infectadas con ZIKV y células control.....	49
Fig. 47 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma automática para células infectadas con ZIKV y células control. ....	50
Fig. 48 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual tomando únicamente las mitocondrias correspondientes a las obtenidas de forma automática para células infectadas con ZIKV y células control. ....	50
Fig. 49 Histograma de los índices obtenidos para cada micrografía de células control e infectadas con las variantes Delta y Ómicron. ....	53
Fig. 50 Ejemplo de una segmentación con un alto índice DICE, obtenido de una micrografía Control.....	54

Fig. 51 Segmentación con el índice DICE más bajo, obtenido en una micrografía de una célula infectada con la variante DELTA .....	54
Fig. 52 Histograma de los índices obtenidos para cada micrografía de células control e infectadas con ZIKV. ....	55
Fig. 53 Mejor segmentación obtenida de forma automática de células infectadas con ZIKV	56
Fig. 54 Peor índice DICE obtenido en células infectadas con ZIKV.....	56

---

*Abreviaciones*

---

(+)ssRNA – ARN monocatenario de sentido positivo  
AP – Aprendizaje Profundo  
AR – Aspect Ratio  
ATP – Adenosín Trifosfato  
CCCLIN – Coeficiente de Correlación de Concordancia de Lin  
CICSaB – Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina  
CNN – Red Neuronal Convolutacional  
CZS – Síndrome Congénito de Zika  
EM – Microscopía Electrónica  
IA – Inteligencia Artificial  
IFN – Interferón  
InDRE – Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica  
Kb – Kilobases  
MERS-CoV – Síndrome Respiratorio de Oriente Medio  
Nsp – Proteína No Estructural  
OMS – Organización Mundial de la Salud  
ORF – Marco de Lectura Abierto  
R0 – Número de Reproducción Básico  
ReLU – Unidad Lineal Rectificada  
SARS-CoV – Síndrome Respiratorio Agudo Severo  
SARS-CoV-2 – Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo  
SDRA – Dificultad Respiratoria Aguda  
SE – Elementos Estructurales  
TEM – Microscopía Electrónica de Transmisión de Electrones  
VHRh – Virus Sincitial Respiratorio  
VOC – Variantes de Preocupación  
VOI – Variantes de Interés  
ZIKV- Virus del Zika

---

## Resumen

---

A lo largo de la historia, se han reportado varios virus que afectan a los humanos, muchos de los cuales son patógenos que causan una variedad de enfermedades e incluso la muerte. En algunos casos, estos virus han resultado en emergencias de salud de nivel pandémico (p. ej. Virus de la viruela, la influenza y la poliomielitis). En los últimos 15 años, se han experimentado epidemias y pandemias mundiales causadas por el virus del *Zika* (*ZIKV*) y el *SARS-CoV-2*, respectivamente. Ambos son virus de ARN monocatenario de sentido positivo [(+)ssRNA] que afectan la arquitectura celular a través de su interacción.

Un organelo esencial para el estudio de las interacciones célula-virus y la respuesta inmune durante una infección es la mitocondria. Se ha demostrado que las mitocondrias exhiben diferentes respuestas a las infecciones virales, y los cambios en su morfología pueden usarse para predecir la respuesta inmune generada, dando lugar a la obtención de blancos terapéuticos. Esto se logra mediante el análisis de la morfología mitocondrial en imágenes obtenidas a través de Microscopía Electrónica de Transmisión de Electrones (TEM por sus siglas en inglés) en Secciones Ultrafinas, realizando la segmentación y toma de métricas para su posterior estudio. Sin embargo, este proceso es altamente laborioso, requiriendo un tiempo considerable por parte del microscopista experto y está sujeto a la experiencia del investigador para la identificación de las mitocondrias. Por lo tanto, tiene un sesgo de subjetividad alto.

Para abordar lo mencionado, este trabajo se centra en desarrollar una herramienta de Aprendizaje Profundo (AP) basada en una Red Neuronal Convolucional (CNN por sus siglas en inglés) con arquitectura U-Net, diseñada para el análisis automático de mitocondrias en cultivos celulares no infectados y en cultivos celulares infectados con el virus *SARS-CoV-2* o el *ZIKV* en micrografías TEM. Los resultados obtenidos muestran que la herramienta desarrollada alcanza una precisión superior al 85% en la identificación, segmentación y caracterización de mitocondrias, lo que permite una detección más rápida de mitocondrias dañadas. Reduciendo significativamente la carga de trabajo y disminuyendo el sesgo en los resultados causado por la subjetividad del observador, facilitando estudios sobre la remodelación mitocondrial en contextos de infección viral, con implicaciones significativas para comprender mejor las respuestas celulares a patógenos emergentes.

---

*Abstract*

---

Throughout history several viruses that affect humans have been reported, many of them being pathogenic, causing a range of diseases and even death. In some cases, these viruses have resulted in pandemic-level health emergencies (i.e., smallpox, influenza, and polio). In the last 15 years, worldwide epidemics and pandemics caused by the *Zika* virus (*ZIKV*) and *SARS-CoV-2*, respectively, have been experienced. Both are positive-sense single-stranded RNA [(+)ssRNA] viruses that affect the cell architecture through their interaction.

One essential organelle in studying cell-virus interactions and the immune response during an infection is the mitochondria. It has been shown that the mitochondria exhibit different responses to viral infections, and the changes in its morphology can be used to predict the generated immune response, leading to the identification of therapeutic targets. This is achieved through a mitochondrial morphology analysis using images obtained via Transmission Electron Microscopy (abbreviated as TEM) in ultrathin sections, involving segmentation and metric measurements for subsequent study. However, this process is highly labour-intensive, requiring considerable time from the expert microscopist, and it is subject to the researcher's experience for the mitochondria morphology analysis, leading to a wide subjectivity bias.

To cope with the aforementioned, this work is focused on developing a Deep Learning tool based on a Convolutional Neural Network (abbreviated as CNN) with a U-Net architecture, designed for the automatic mitochondria analysis in both uninfected and *SARS-CoV-2* or *ZIKV* infected cell cultures in TEM images. The results obtained show that the developed tool achieves over 85% accuracy in the mitochondria identification, segmentation, and characterization, allowing a faster damaged mitochondria detection. Thus, enabling a large workload reduction and subjectivity bias minimization in the obtained results, and facilitating studies on mitochondrial remodelling in viral infection contexts, which have significant implications for better understanding cellular responses to emerging pathogens.

---

## CAPÍTULO 1. Introducción

---

La replicación viral tiene como una de sus consecuencias la remodelación de la arquitectura de una célula infectada. Los cambios morfológicos en los organelos son el producto directo e indirecto de la replicación viral y la interacción célula-virus, por lo tanto, la caracterización de los organelos es esencial para entender el ciclo infeccioso viral [1]. Además, esta caracterización nos puede permitir entender el origen de la patogénesis viral estos cambios permiten buscar blancos terapéuticos.

En un estudio realizado por Lara-Hernández *et al.* [2] se analizaron las alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias de cultivos celulares infectados con el virus respiratorio sincitial humano (VHRh) mediante el TEM. Sin embargo, este estudio se realizó únicamente en mitocondrias relativamente intactas lo que conlleva un sesgo en los resultados. Además, la mayoría de los estudios de cambios morfológicos de los organelos se realizan de forma cualitativa y en su mayoría con fines descriptivos, esta actividad demanda mucho tiempo y tiene un sesgo observacional importante [3].

Es importante mencionar, que una de las limitantes del análisis manual por un observador entrenado es que en las imágenes de TEM se encuentran numerosas estructuras subcelulares que muestran formas irregulares y parecidas entre sí, tonalidades de grises parecidas y una textura similar entre los organelos (ver Fig. 1), las cuales no siempre se pueden clasificar siguiendo los protocolos y técnicas disponibles.

Por lo que el objetivo de este proyecto es poder generar una herramienta basada en AP que permita realizar un análisis cuantitativo y cualitativo para identificar, caracterizar y generar métricas de los cambios estructurales de los organelos de interés de una célula infectada con respecto a una célula sana de forma eficiente y confiable. Además, de que permita disminuir la subjetividad del estudio y aumentar el poder estadístico al estudiar un número de micrografías y organelos que resulta prohibitivo cuando esto se realiza por métodos manuales.

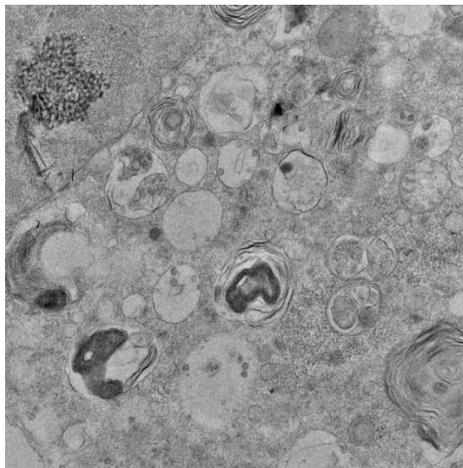


Fig. 1 Imagen obtenida por medio de Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM).

## 1.1 SARS-CoV-2

La infección por el Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (*SARS-CoV-2*) causante de la enfermedad *COVID-19* es el tercer coronavirus altamente patogénico que se propaga a la población humana. Este fue precedido por los virus del síndrome respiratorio agudo severo (*SARS-CoV*) (2002-2004) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (*MERS-CoV*) (2012).

Los primeros reportes de pacientes con síntomas de una neumonía atípica, después llamada *COVID-19*, empezaron a finales de 2019. Sin embargo, solo unos meses después se produjo una rápida transmisión de persona a persona y una propagación intercontinental, por lo que esta enfermedad fue declarada una pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020 [4]. Desde entonces, por lo menos ~ 770 millones de personas han sido infectadas por *COVID-19*, con más de 7 millones de muertes alrededor del mundo. El *SARS-CoV-2* tiene una menor letalidad que el *SARS-CoV* o el *MERS-CoV*, pero tiene una mucho mayor transmisibilidad. Durante la emergencia mundial del *SARS-CoV-2* surgieron múltiples variantes, las cuales tuvieron diferentes tasas de letalidad y transmisibilidad, que hasta el día de hoy todavía no está completamente claro si la diferencia de letalidad entre diferentes variantes (p. ej. *Delta* vs *Ómicron*) se debe a la presencia de anticuerpos neutralizantes producidos por las vacunas o infecciones previas, a una interacción patógeno hospedero que resultó en consecuencias patogénicas diferentes, o ambas.

### 1.1.1 Estructura del SARS-CoV-2

El *SARS-CoV-2* pertenece a la familia *Coronaviridae* siendo un virus de (+)ssRNA con envoltura. Tiene un genoma de 30 kilobases (kb) y es perteneciente al género *Betacoronavirus* al igual que el *SARS-CoV* y el *MERS-CoV*. Solo los *Betacoronavirus* son patogénicos para los humanos.

El genoma viral tiene 14 marcos de lectura abierto (por sus siglas en inglés ORF); los dos primeros tercios codifican 16 proteínas no estructurales (por sus siglas en inglés nsp 1-16) y el tercio final codifica 9 proteínas accesorias y 4 proteínas estructurales. Estructuralmente, el virión o partícula consiste en una cápside helicoidal producida por la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína espícula (S). Esta última permite que el virión entre a las células del huésped (Fig. 2) [4,5].

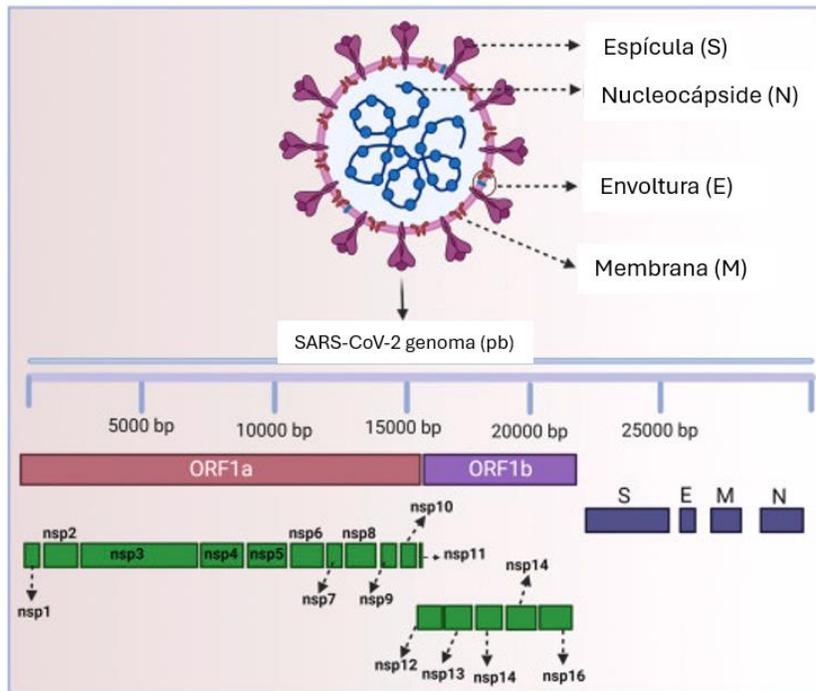


Fig. 2 Estructura del SARS-CoV-2 y su genoma. Modificada de [5].

### 1.1.2 Formas de transmisión y manifestaciones clínicas

El SARS-CoV-2 presenta una transmisión por medio de gotículas: de forma aérea, por contacto directo de persona a persona o contacto indirecto cayendo estas gotitas a la superficie de objetos (Fig. 3).

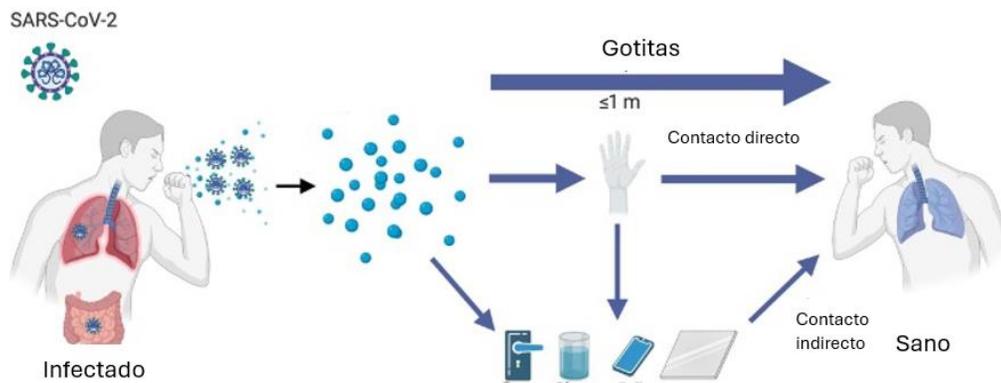


Fig. 3 Rutas de transmisión del SARS-CoV-2. Modificada de [4].

Los síntomas más comunes provocados por el COVID-19 son fiebre, tos y disnea, causando síntomas graves similares a una gripe que pueden empeorar hasta una dificultad respiratoria aguda (SDRA), neumonía, insuficiencia renal o muerte, además de poder tener secuelas a largo plazo como la inflamación miocárdica, entre muchas otras [4].

A pesar de que todas las variantes comparten sintomatología, se han podido identificar manifestaciones clínicas específicas de cada variante las cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Síntomas característicos de cada Variante.

<b>Manifestaciones clínicas por Variante</b>	
<b><i>Delta</i></b>	<b><i>Ómicron</i></b>
Pérdida del olfato	Estornudos
Pérdida del gusto	Dolor de cabeza y garganta
Pulso elevado	Fatiga
Baja oxigenación	Fluido nasal

### 1.1.3 Variantes del SARS-CoV-2

Los virus con un genoma de (+)ssRNA tienen una tasa de mutación relativamente alta, comparada con la de otros tipos de virus. Esta tasa de mutación es órdenes de magnitud más alta que la que se observa en organismos procariontes y eucariontes. Estas mutaciones son una consecuencia de las interacciones virus-hospedero, y pueden modificar su potencial patogénico, permitiendo que evada el sistema inmune de una manera más eficiente. De hecho, durante la emergencia sanitaria por COVID-19 la OMS estableció una catalogación para las distintas variantes emergentes del SARS-CoV-2 como: variantes de preocupación (VOC) y variantes de interés (VOI).

Dentro de las VOC encontramos a las variantes *Delta* y *Ómicron* con las que se trabajó en este proyecto.

La variante *Delta* se identificó en diciembre del 2020 en la India por primera vez, presentando una naturaleza altamente infecciosa y siendo la responsable de la segunda ola de infecciones con alta mortalidad por COVID-19.

La variante *Ómicron* identificada por primera vez en Sudáfrica en noviembre del 2021, mostrando una alta infectividad entre la población, pero una mortalidad mucho menor a la variante *Delta* [5].

El número de reproducción básico (R0) se utiliza para estimar el promedio de personas que infectará una persona contagiada, mientras que *Delta* presenta un R0 entre 3 y 8, la variante *Ómicron* tiene una transmisibilidad aproximada 3 veces mayor que *Delta*. Sin embargo, durante la ola de infección presentada por *Ómicron* el riesgo de enfermedad grave y hospitalización se redujo en 73%, así como la estancia promedio de hospitalización y por lo tanto los decesos por COVID-19 [6].

## 1.2 El virus del Zika

El ZIKV se identificó por primera vez en un mono *Rhesus* (*Macacus mulata*) en Uganda, África en 1947. Durante la década de 1983 se encontró el virus como una cepa diferente en Asia, sin embargo, fue hasta 2015 cuando los brotes de ZIKV alcanzaron proporciones pandémicas en Brasil dando lugar a que se declarara una emergencia sanitaria por la OMS en el 2016 [7,8]. Es interesante que, mientras la diseminación del ZIKV en África y Asia tomó décadas, la propagación de este virus en prácticamente todo el continente americano tomó solo unos cuantos meses.

### 1.2.1 Estructura del virus del Zika

El ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*, siendo un virus de (+)ssRNA con un genoma de aproximadamente 10,7 kb. Dentro del genoma del ZIKV se encuentran 3 proteínas estructurales: la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la cápside (C), además de 7 proteínas no estructurales (nsp1-nsp5) (ver Fig. 4) [7,8].

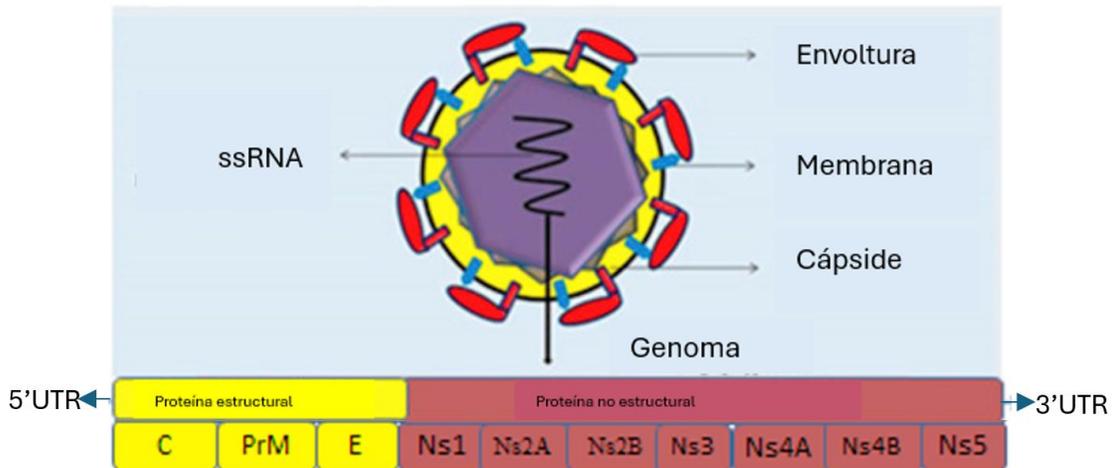


Fig. 4 Genoma y estructura del ZIKV. Modificado de [7].

### 1.2.2 Formas de transmisión y manifestaciones clínicas

La principal forma de transmisión del ZIKV es por la picadura de mosquitos que funcionan como vectores del virus, principalmente de la familia *Aedes*. Sin embargo, algo que lo diferencia del resto de los flavivirus es que se puede transmitir por contacto sexual con personas infectadas o de la madre al feto durante el embarazo (ver Fig. 5) [7,8].

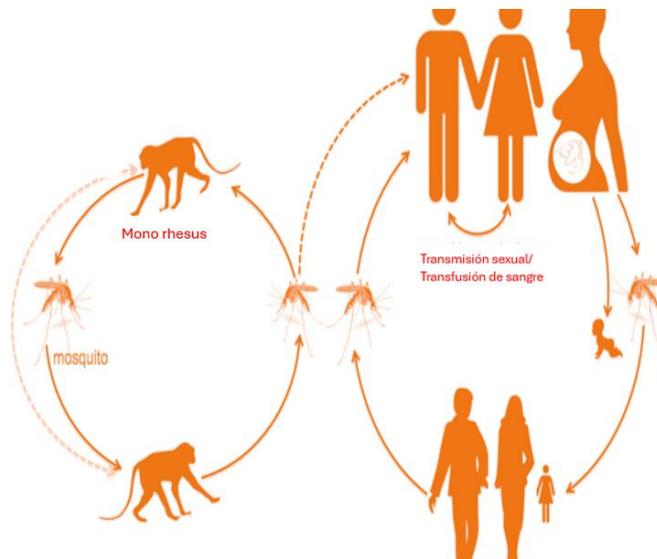


Fig. 5 Transmisión del ZIKV. Modificada de [7].

Los bebés de madres infectadas pueden presentar defectos congénitos, entre ellos microcefalia o el síndrome congénito de *Zika* (CZS). En adultos se pueden desarrollar algunas manifestaciones neurológicas como la meningitis, encefalitis, convulsiones o el síndrome de Guillian-Barré [8].

### 1.3 La mitocondria

La mitocondria es un organelo celular cuyo principal objetivo es la generación de energía química mediante adenosín trifosfato (ATP) para activar las reacciones bioquímicas de la célula. Se caracteriza por poseer una doble membrana donde se produce la energía, presenta crestas mitocondriales y un ADN propio, además varía la cantidad de mitocondrias encontradas en cada célula con base en el requerimiento de energía de esta (Fig. 6) [9].

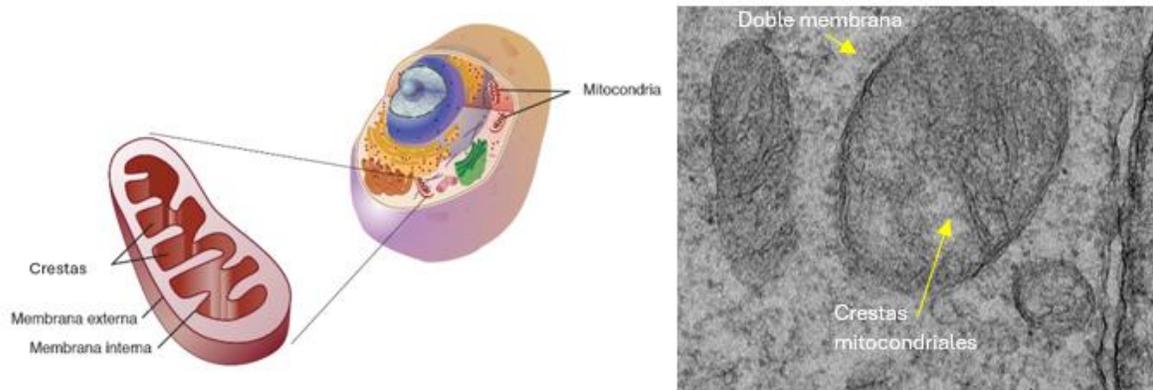


Fig. 6 Partes de la mitocondria y como se observa por medio de una micrografía electrónica de transmisión de electrones (TEM) [9].

Además de producir energía, se ha demostrado que las mitocondrias desempeñan un papel importante en distintas funciones celulares como la apoptosis, el desarrollo celular, el control del ciclo celular y participan en las vías inmunitarias innatas [10,11]. De hecho, la morfología de una mitocondria cambia dependiendo del tipo de respuesta inmune ante un insulto biológico.

#### 1.3.1 Respuesta mitocondrial ante una infección viral

En estudios realizados por Singh *et al.* [10] se analiza la respuesta generada por las mitocondrias ante virus de RNA, donde el *ZIKV* induce fisión estimulando la ruta NF- $\kappa$ B, mientras que el *SARS-CoV-2* induce a la fusión mitocondrial generando una respuesta de interferón (IFN) (Fig. 7), donde la fisión se refiere a la división mitocondrial en organelos más pequeños y la fusión es la integración de mitocondrias en un solo organelo [10]. De hecho, se asume que un virus solo puede causar fusión o fisión mitocondrial, sugiriendo que para un patógeno en particular hay una respuesta inmune generalizada predominante para toda una población de hospederos. Estos son solo dos ejemplos de cómo una infección viral cambia la ultraestructura mitocondrial y como este cambio está relacionado a la respuesta inmune que se genera durante la infección. Por lo tanto, es posible predecir el tipo de respuesta inmune (i.e., proinflamatoria vs. antiinflamatoria) al caracterizar los cambios ultraestructurales de la mitocondria con respecto a una célula no infectada.

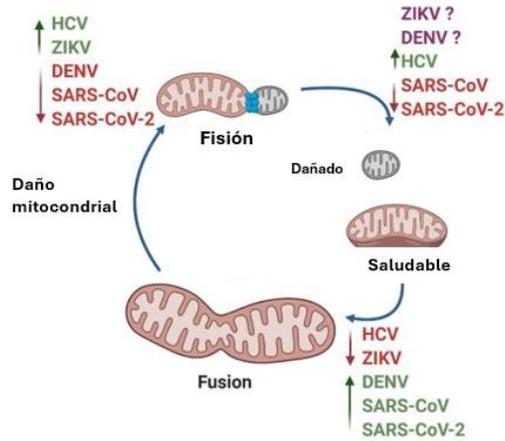


Fig. 7 Respuesta mitocondrial ante distintos virus de ARN, mientras el ZIKV induce a fisión, los CoV inducen fusión mitocondrial [10].

#### 1.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica (EM por sus siglas en inglés) permite obtener imágenes en 2D y 3D de tejidos, células, componentes subcelulares y complejos moleculares en escalas nanométricas con una alta resolución, lo que permite llevar a cabo el análisis de la ultraestructura de varios organelos. En este tipo de microscopía podemos encontrar el TEM de secciones ultrafinas (Fig. 8) [12], el cual permite estudiar con gran detalle la morfología ultraestructural celular.

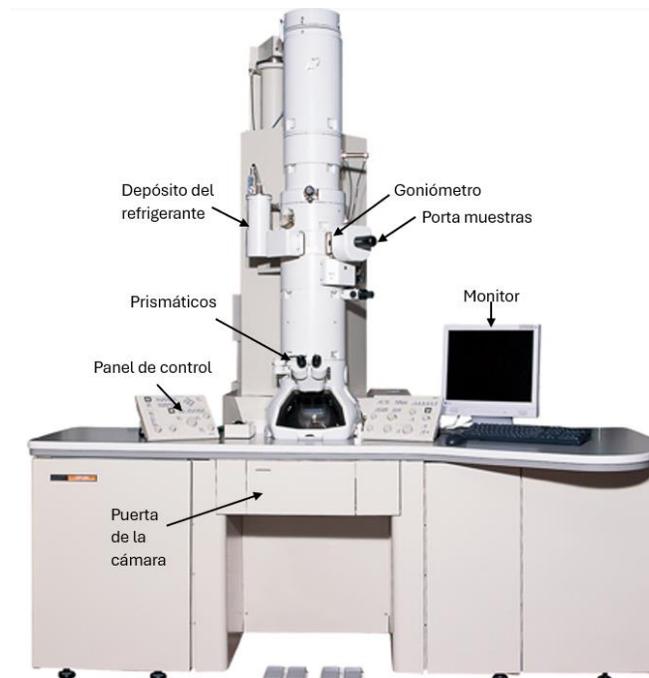


Fig. 8 Microscopio de transmisión de electrones.

El TEM permite estudiar la estructura de muestras ultrafinas proporcionando una resolución de imagen 2D mayor que los microscopios de luz visible ya que no está limitada por el principio de límite de difracción. Este tipo de microscopía utiliza un haz de electrones con una aceleración que permite atravesar las muestras y detectar los electrones transmitidos (Fig. 9), lo que facilita el estudio de una forma más detallada de la estructura de los organelos [13,14].

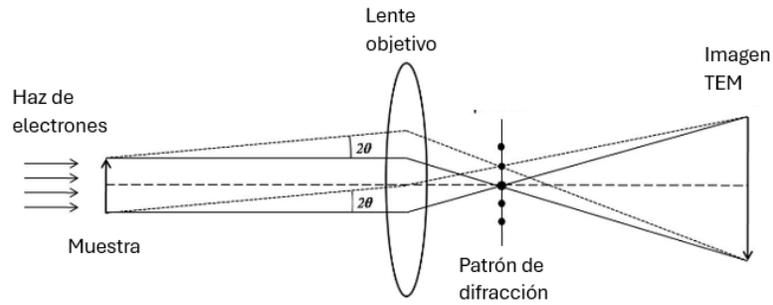


Fig. 9 Diagrama del funcionamiento del TEM. Modificada de [14].

Como ya se mencionó el uso de imágenes obtenidas por TEM es fundamental para el estudio de estructuras en distintas áreas de la investigación; sin embargo, este es un trabajo que requiere invertir mucho tiempo. Heinrich *et al.* [15,16] realizaron la segmentación manual de una parte de una célula completa la cual contenía numerosos orgánulos en dos semanas. Sin embargo, estimaron que la segmentación manual de la célula les llevaría 60 años.

En la literatura, es posible encontrar metodologías para la identificación, segmentación y clasificación de virus dentro de células utilizando AP. Esto ha permitido observar los diferentes estados de maduración y morfogénesis del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) [17].

También se han realizado segmentaciones de otras células como en el caso de Guay *et al.* [18] quienes realizaron la segmentación de células plaquetarias mediante el conjunto de CNN 2D y 3D para lidiar con el ruido y poco contraste de las imágenes obtenidas con microscopía electrónica.

En el ámbito de la segmentación de mitocondrias, existen varios softwares de código abierto basados en AP. MitoMo, desarrollado por Zahedi *et al.* [19], es una herramienta que permite la clasificación morfológica y la evaluación de la salud celular en imágenes fluorescentes. Por otro lado, MitoNet, creado por Conrad *et al.* [20], es un software entrenado con diversos conjuntos de datos de imágenes TEM. Aunque ha demostrado un buen rendimiento, su eficacia es limitada, lo que subraya que la segmentación de mitocondrias en imágenes TEM aún representa un desafío significativo.

Schrage *et al.* [21] realizaron una comparación de métodos de segmentación aplicados a mitocondrias infectadas con SARS-CoV-2, utilizando una arquitectura U-Net, MitoNet, y una versión ajustada de MitoNet para imágenes de células infectadas (originalmente entrenado con células sanas). La red ajustada ofreció los mejores resultados, aunque no superó el 75% de similitud en las segmentaciones, evidenciando las dificultades persistentes en la segmentación de mitocondrias en células infectadas por virus.

### 3.1 Hipótesis

La implementación de una herramienta basada en técnicas de AP para el análisis automático de micrografías de TEM permitirá la identificación y delimitación automática de mitocondrias y realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la remodelación mitocondrial en células infectadas con *SARS-CoV-2* y el *ZIKV*.

### 3.2 Objetivo general

Generar una herramienta con técnicas de AP para el análisis de micrografías de TEM para la delimitación (segmentación) y caracterización de mitocondrias de células infectadas con diferentes variantes del *SARS-CoV-2* y el *ZIKV*.

### 3.3 Objetivos particulares

1. Generar una base de datos de banco de micrografías de TEM de células control y células infectadas con las variantes *Ómicron* y *Delta* del *SARS-CoV-2* y *ZIKV*.
2. Realizar la selección de micrografías y segmentación manual de las mitocondrias que permitan evaluar la herramienta de análisis de imágenes TEM.
3. Obtener métricas que sirvan para describir la morfología de las mitocondrias mediante el programa de ImageJ®.
4. Generar un programa que permita la obtención de métricas de forma automática.
5. Implementar técnicas de AP para la segmentación automática de mitocondrias en imágenes de TEM.
6. Evaluar el desempeño comparando las métricas obtenidas mediante AP con las calculadas manualmente.

#### 4.1 Generación del banco de micrografías

Para la obtención de micrografías infectadas con SARS-CoV-2 las muestras fueron tomadas por parte del personal del instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) mediante la recolección de exudados nasofaríngeos de pacientes con una infección activa.

La infección de los cultivos celulares se realizó por el personal del InDRE en un laboratorio BSL3, gracias a un convenio que tiene este instituto con el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB), basados en la metodología de Harcourt *et al.* [22] en la línea celular Vero, una vez que el comité de bioseguridad del InDRE determinó que las muestras ya no eran infecciosas fueron enviadas al CICSaB.

Posteriormente los cultivos fueron fijados de acuerdo con los protocolos establecidos por el laboratorio de Ensamblaje Viral y Sistemas Biológicos de la Sección de Microscopía de Alta Resolución del CICSaB.

Se realizaron cortes ultrafinos con una navaja de diamante en un ultramicrotomo EM-UC7 (Leica) con un grosor de 70nm. Los cortes fueron teñidos con Citrato de Plomo y Acetato de Uranilo para ser observados en el TEM modelo JEM-JEOL-2100 a 200kV con el filtro del objetivo #1 insertado y con la cámara OneView Gatan 4K, la observación de las muestras mediante TEM se basó en el protocolo propuesto por Nagashima *et al.* [23].

En el caso de las micrografías infectadas con el ZIKV personal del CICSaB realizó el cultivo de astrocitos desde una línea celular neural humana hNS-1 de acuerdo con el protocolo de Villa *et al.* [24], los astrocitos se aislaron y caracterizaron para su posterior infección con el ZIKV mediante la metodología de Rubio *et al.* [25]

Utilizando una navaja de diamante en el ultramicrotomo EM-UC7 (Leica) se realizaron cortes se secciones ultrafinas de 70nm. los cuales fueron teñidos con Citrato de Plomo y Acetato de Uranilo para observarse en el microscopio de transmisión de electrones JEM-JEOL-2100 a 200kV con el filtro del objetivo #2 insertado y utilizando la cámara OneView Gatan 4K.

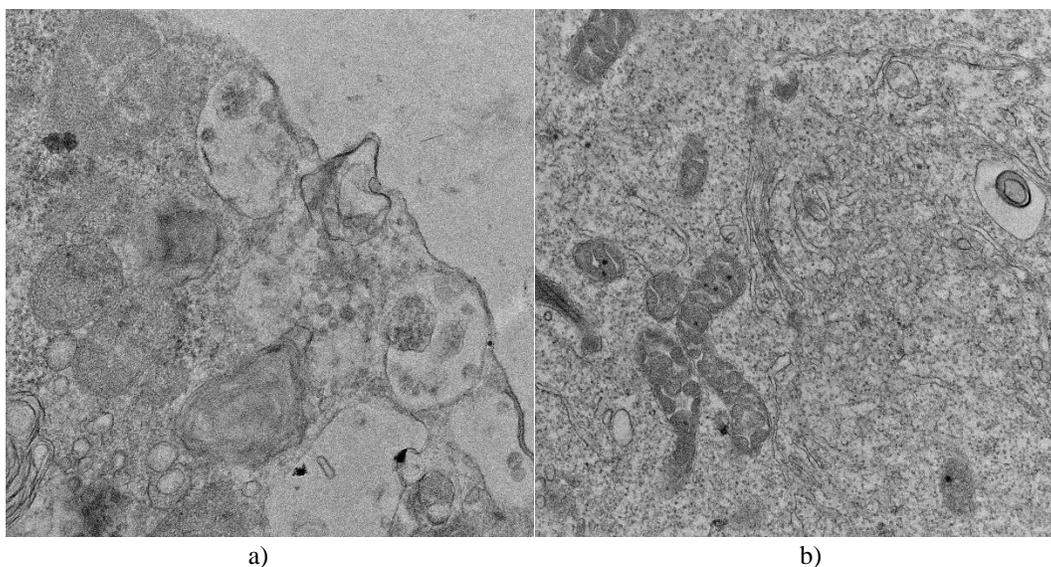
Destacando que la contribución en este proyecto se limitó al análisis e interpretación de los datos obtenidos, y no a la ejecución de estos procedimientos experimentales.

#### 4.2 Selección de micrografías y segmentación manual de mitocondrias

Para la segmentación de mitocondrias en células infectadas con SARS-CoV-2 se seleccionaron 100 micrografías: 50 micrografías control (no infectadas) y 50 micrografías infectadas, siendo 25 de la variante *Delta* y 25 de *Ómicron*.

Además, se seleccionaron 50 micrografías de células infectadas con ZIKV, 25 imágenes control (no infectadas) y 25 infectadas, para realizar pruebas buscando mejorar el rendimiento de la red haciendo discriminación entre estas para tener imágenes con el menor ruido posible y con mitocondrias claras. La Fig. 10a muestra un ejemplo de una micrografía de una célula infectada con *Delta* donde las mitocondrias no se aprecian definidas, ya que presentan una tonalidad de gris y textura similar a toda la célula, mientras

que en la Fig. 10b se observa una micrografía de una célula infectada con *ZIKV*, en la cual las mitocondrias están bien definidas, diferenciándose al resto de la célula en tono de gris y forma.



*Fig. 10 Ejemplos del conjunto de datos de micrografías; a) micrografía de una célula infectada con Delta donde las mitocondrias no se ven bien definidas, presentan una tonalidad de gris y una textura similar al citoplasma y otros organelos, b) micrografía de una célula infectada con ZIKV donde las mitocondrias se distinguen del resto de la célula en tonalidad de gris y forma.*

Se descartaron micrografías con una menor magnificación donde se observará gran parte de la célula (Fig. 11), para así poder centrarnos en las mitocondrias. También, se descartaron micrografías que contuvieran mitocondrias anormales, un gran número de cuerpos de mielina, lisosomas, gotas de lípidos y cuerpos multilaminares para evitar crear una confusión durante el entrenamiento de la red neuronal por la presencia de organelos con una composición similar (Fig. 12).

La segmentación y obtención de métricas de mitocondrias se realizó de forma manual utilizando el software ImageJ® [26], siendo verificado y validado cada dato y segmentación por expertos del Laboratorio de Ensamblaje Viral y Sistemas biológicos del CICSaB, con un total de 586 y 214 mitocondrias para *SARS-CoV-2* y *ZIKV*, respectivamente. Se obtuvieron la máscara binaria de cada mitocondria (Fig. 13b) y del conjunto de estas para cada micrografía. Posteriormente se multiplicó la imagen binaria con la imagen original para tener las mitocondrias sin el fondo (Fig. 13c).

Es importante mencionar que estas líneas celulares, incluso en muestras no infectadas, presentan tanto mitocondrias dañadas como sanas. Por lo tanto, se realizó una segmentación con base en las dos posibles morfologías observadas dependiendo del corte de la célula, tratando de que sea lo más cercano a la morfología original de la mitocondria para llevar a cabo mediciones con el menor error posible y utilizando todas las mitocondrias sin importar su estado.

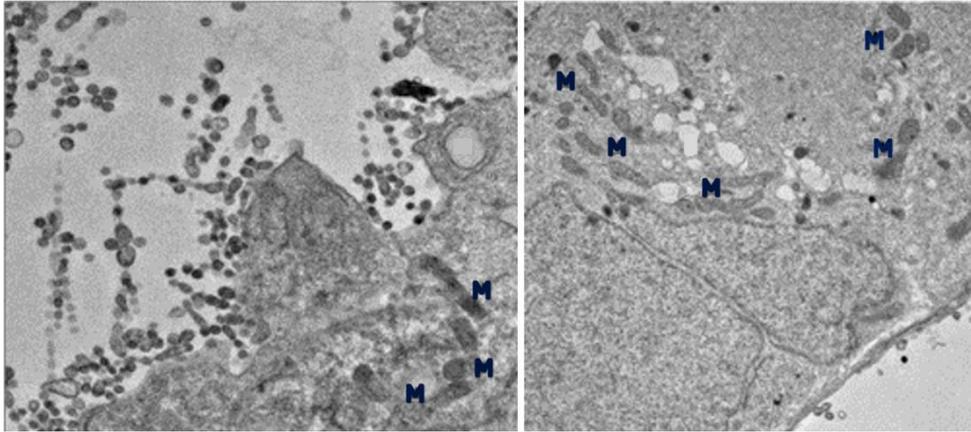


Fig. 11 Micrografías de células infectadas con ZIKV tomadas con una magnificación menor mostrando gran parte de la célula, varios organelos y mitocondrias (M) que el objetivo a estudiar.

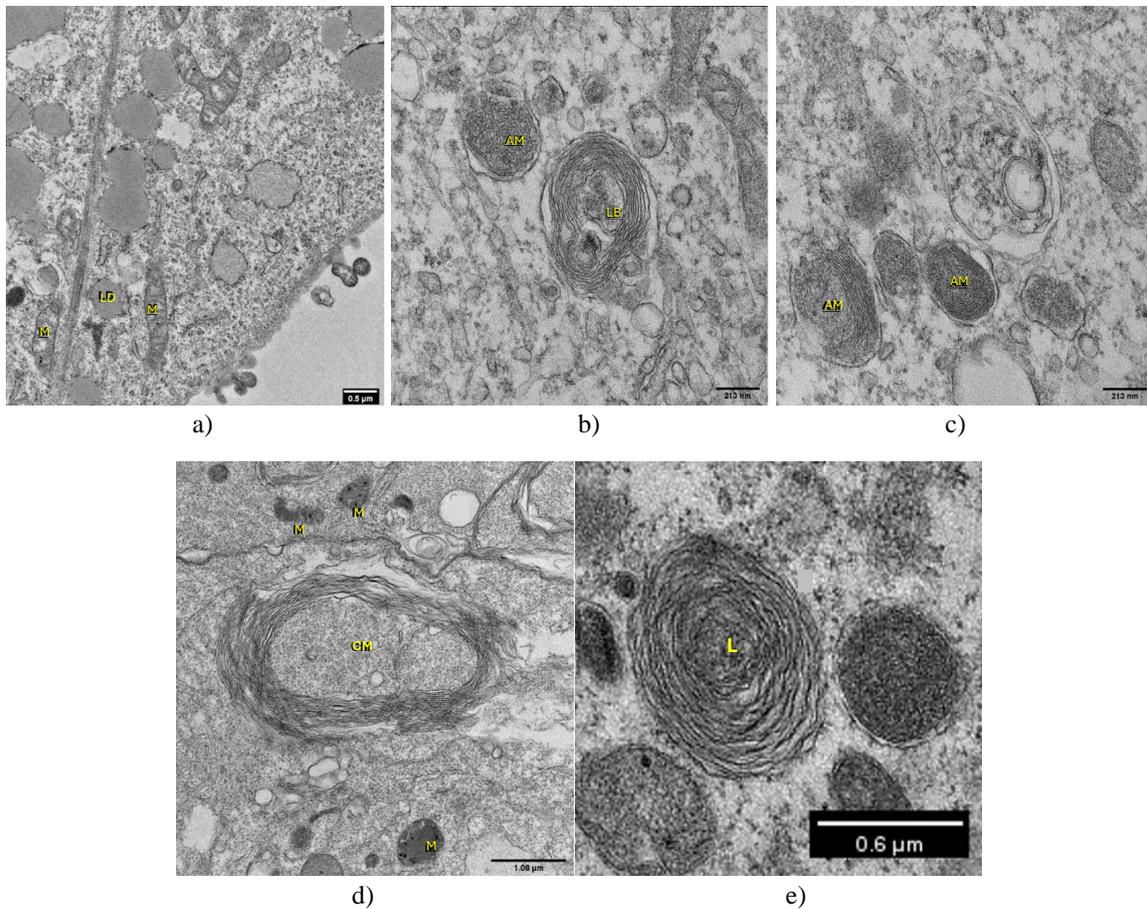


Fig. 12 Micrografías con organelos que tienen una forma similar; a) se observan gotas de lípidos (LD) junto a mitocondrias (M), b) cuerpo multilaminar (LB) y una mitocondria anormal (AM), c) mitocondrias anormales (AM), d) cuerpo de mielina (CM), e) lisosoma (L).

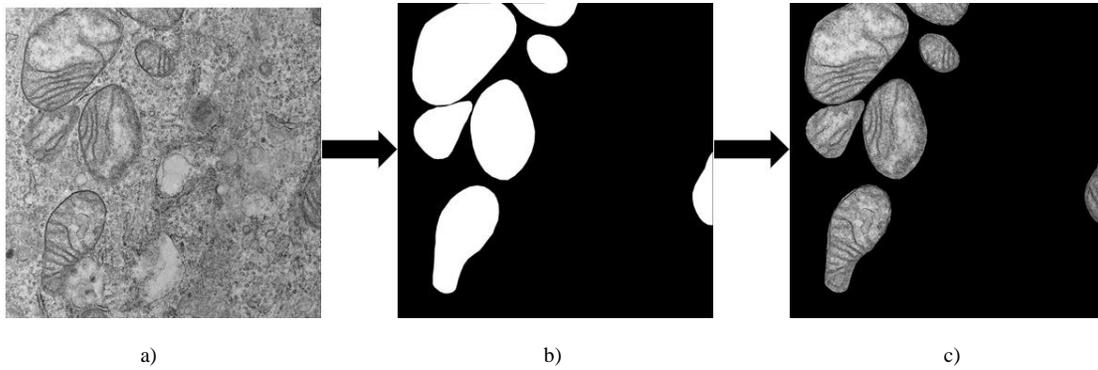


Fig. 13 Segmentación manual de micrografías de células infectadas realizadas mediante el programa ImageJ; a) micrografía original, b) máscara binaria de las mitocondrias encontradas dentro de la micrografía, c) mitocondrias segmentadas multiplicando la imagen original y la máscara binaria para obtenerlas independientes del fondo.

### 4.3 Obtención de métricas manualmente

Con ayuda del programa ImageJ® se calcularon de forma manual las métricas de área, circularidad, aspecto ratio (AR), redondez y foco de cada una de las mitocondrias segmentadas, para poder evaluar el desempeño del sistema realizando una comparación entre los resultados obtenidos contra los generados por nuestra herramienta.

A continuación, se muestran las ecuaciones de cada métrica:

$$Circularidad = \frac{4*\pi*A}{P^2} \quad (6.1)$$

$$AR = \frac{E_{mayor}}{E_{menor}} \quad (6.2)$$

$$Redondez = \frac{4*A}{\pi*E_{mayor}^2} \quad (6.3)$$

$$Foco = \sqrt{E_{mayor}^2 - E_{menor}^2} \quad (6.4)$$

Donde:

- $A$  = Área
- $P$  = Perímetro
- $E_{mayor}$  = Eje mayor
- $E_{menor}$  = Eje menor

Para cada mitocondria se realizó además el cálculo del perímetro, eje mayor y eje menor necesarios para la obtención de las métricas de interés, como se ilustra en la Fig. 14.

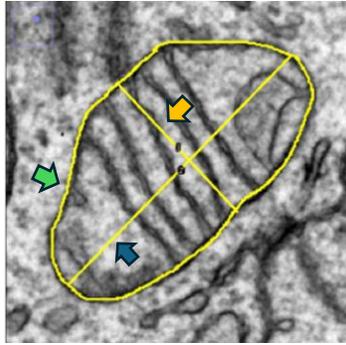


Fig. 14 Micrografía de TEM de una mitocondria ilustrando como medir manualmente con el programa ImageJ el área y circularidad (flecha verde) con el contorno de la mitocondria, así como el eje mayor (flecha azul) y eje menor (flecha naranja) [26].

#### 4.4 Segmentación de mitocondrias mediante una red convolucional tipo U-Net

Las CNN son un tipo de red neuronal, con una arquitectura de AP, que ha demostrado ser capaz de aprender características de información espacial de los objetos, como, por ejemplo, en imágenes, teniendo un buen desempeño también con entradas como voz y audio.

Entendiendo por convolución al proceso de deslizar un filtro sobre la imagen original, realizando el producto punto entre cada píxel y superponiendo la suma ponderada de los pixeles en la posición del filtro (ver Fig. 15) para formar nuevas capas de la imagen que permitan extraer las características del objeto de interés.

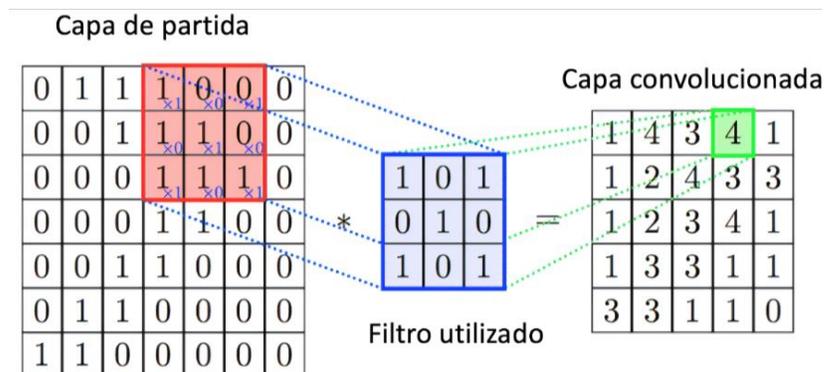


Fig. 15 Ejemplo del proceso de convolución en una imagen. Se establece un filtro que se deslizará a través de la imagen de entrada para obtener una capa convolucionada de esta. Obtenida de [27].

Las CNN funcionan procesando la información de una imagen de entrada mediante un conjunto de capas convolucionales, las cuales identificarán las características de la imagen comenzando por rasgos simples como el color, aumentando la complejidad de las características identificadas hasta reconocer elementos completos en la imagen, para poder realizar una clasificación de los objetos en la imagen y realizar la segmentación que se busca (ver Fig. 16) [28].

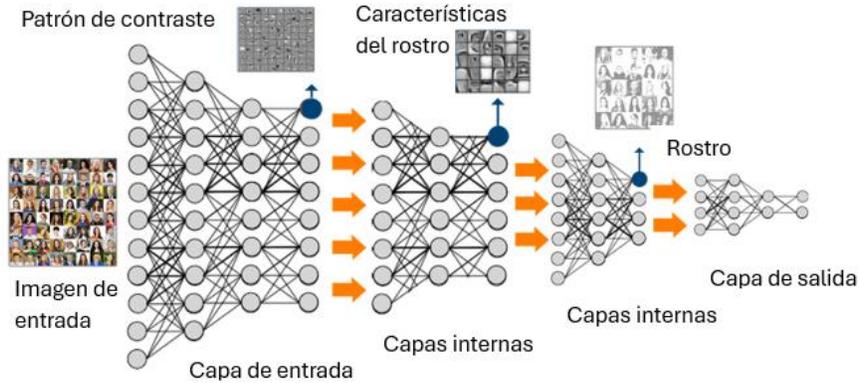


Fig. 16 Arquitectura de una CNN con las capas conectadas permitiendo identificar características de la imagen de entrada para realizar una segmentación específica de lo que se busca identificar. Obtenida de [29].

A continuación, se describirán los tipos de capas que se encuentran en la arquitectura de una CNN.

#### 4.4.1 Capa de convolución

La capa de convolución es el elemento más importante de una CNN, y está formada por un conjunto de kernels o filtros que hacen una operación de convolución en la imagen lo que permite generar el mapa de características a la salida.

En la Fig. 17 se ilustra como se lleva a cabo el proceso de convolución, teniendo una imagen de entrada de 4x4 y un kernel de convolución de 2x2. El kernel se desplazará realizando una multiplicación de píxel a píxel y la suma final de todos los pixeles será el nuevo valor del primer píxel de la nueva imagen convolucionada. De esta forma se resaltan distintas características de la imagen, como se mencionó anteriormente comenzando por características simples hasta las más complejas y tras una repetición de convoluciones con un conjunto de imágenes de entrada la red aprenderá a identificar el elemento que se quiere segmentar.

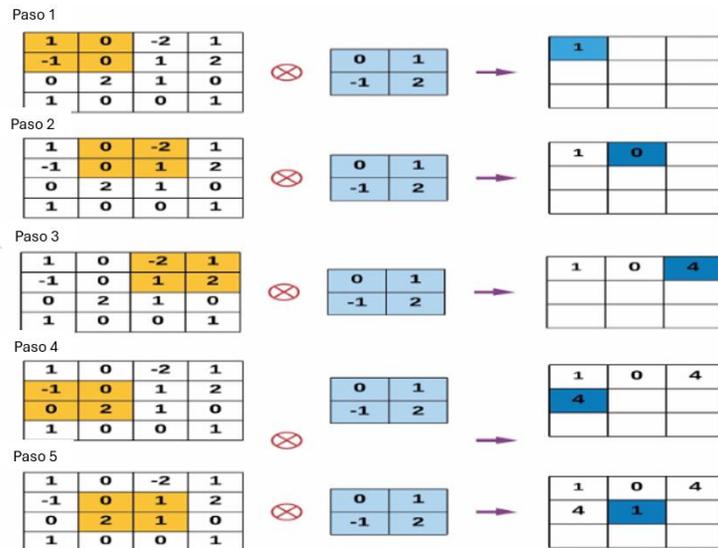


Fig. 17 Ejemplo de un kernel de 2x2 convolucionando una imagen. Modificada de [28].

#### 4.4.2 Función de activación

La tarea principal de la función de activación es la de servir como filtro para permitir que la salida de una capa sirva como entrada para otro conjunto de capas, modificando el valor o imponiendo un límite que debe sobrepasar; permitiendo que la red neuronal sea capaz de resolver problemas más complejos eliminando la información que no será de ayuda.

Existen diversas funciones de activación, entre ellas la Sigmoid, Tanh, ELU y ReLU (Rectified Linear Unit o Unidad Lineal Rectificada) siendo la más utilizada para CNN y la implementada en nuestra red. El comportamiento de esta función permite igualar a cero la salida en caso de tener una entrada negativa y mantener el valor de la salida cuando es positiva, como se ilustra en la Fig. 18, lo que evita una saturación en el algoritmo facilitando el entrenamiento [28].

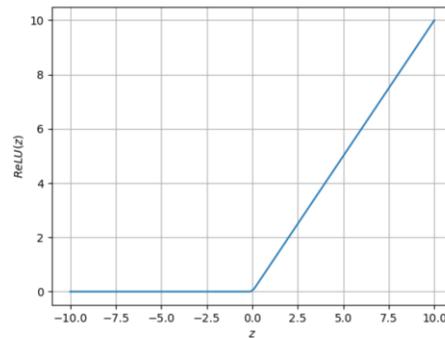


Fig. 18 Comportamiento de una función ReLU, convirtiendo en cero una salida negativa y manteniendo los valores positivos [28].

#### 4.4.3 Capa de pooling

Esta capa se utiliza para discriminar las características obtenidas después del proceso de convolución, conservando las características más dominantes, es decir, las características que más serán de utilidad para la identificación del objeto a segmentar.

La capa de pooling más utilizada es el MaxPooling el cual utiliza un kernel que establece como nuevo valor el máximo valor de los píxeles anteriores como se ilustra en la Fig.19, donde se utiliza un kernel de 2x2 que se irá deslizando a lo largo de la imagen para establecer los valores máximos encontrados comparando los píxeles como el valor del nuevo píxel en la posición del kernel [28].

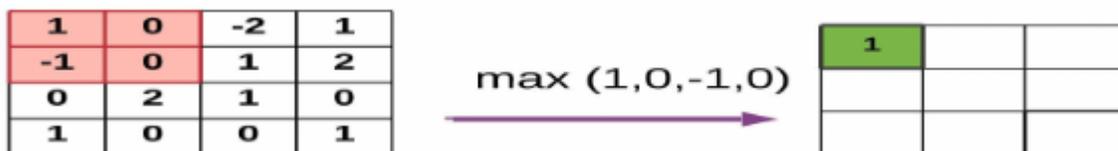


Fig. 19 Ejemplo de una capa de MaxPooling de 2x2 que establece el mayor valor encontrado al píxel de la nueva imagen [28].

#### 4.4.4 Arquitectura U-Net

La segmentación mediante AP se basó en una CNN con arquitectura tipo U-Net propuesta por Ronneberger *et al.* [30] con el lenguaje de programación de Python, la cual consiste en dos partes simétricas (ver Fig. 20), utilizando la arquitectura de una CNN, la cual cuenta con 4 bloques con dos capas de convolución de 3x3 con función de activación ReLU y un

Maxpooling de 2x2 para el lado izquierdo, permitiendo extraer las características de lo que se busca segmentar y 4 bloques con una convolución transpuesta, la cual ahora expandirá la imagen en el lado derecho, donde se realizará la segmentación a partir de las características extraídas anteriormente, por lo tanto se contrae la imagen del lado izquierdo para obtener características y se expande en el lado derecho para realizar la segmentación.

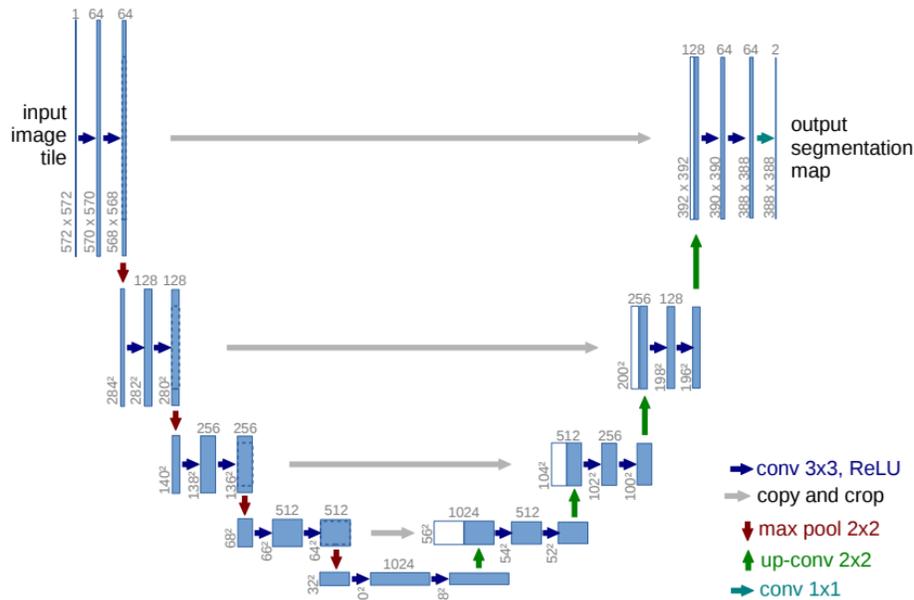


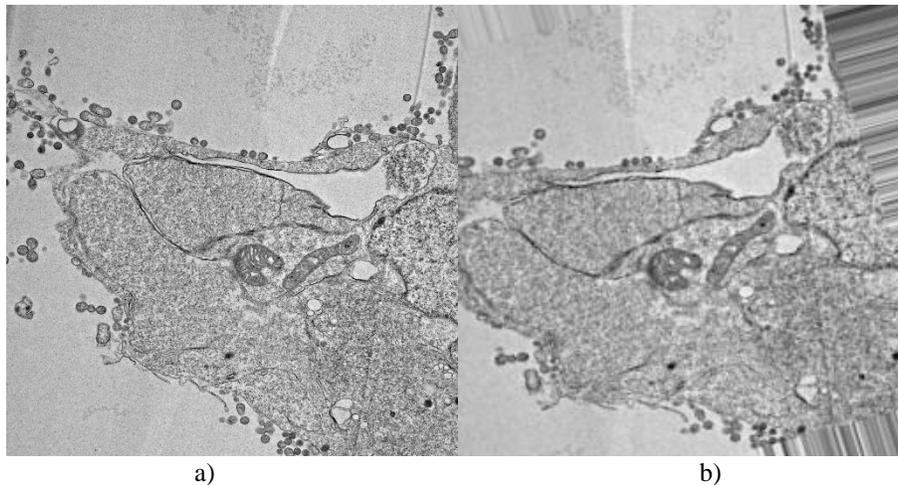
Fig. 20 Arquitectura de la U-Net; utilizando dos lados simétricos, en la parte izquierda una arquitectura común de una CNN, del lado derecho se usan convoluciones transpuestas para expandir la imagen [30].

Con el fin de mejorar el rendimiento de la herramienta se enriqueció el conjunto de datos disponible, realizando un aumento de datos, para esto nuestra red se entrenó con imágenes de entrada con una dimensión original de 2048 x 2048 píxeles y se ajustaron a 256 x 256 píxeles para disminuir el tiempo computacional del entrenamiento de la red, la cual se entrenó durante 100 épocas, entendiendo por época a un ciclo completo de entrenamiento sobre el conjunto de datos; originalmente para entrenamiento se cuenta con 80 micrografías y se estableció un tamaño de lote de 10 imágenes aleatorias para aplicar un conjunto de operaciones de forma aleatoria (no necesariamente todas las transformaciones) a las imágenes de entrada con las siguientes transformaciones geométricas en cada imagen:

- Rotación: permite girar una imagen en grados de 0° a 180° aleatoriamente, para el entrenamiento de nuestra red rotamos 20°.
- Desplazamiento horizontal y vertical: con esta transformación se desplaza la imagen una fracción del ancho y alto total, tomando valores aleatorios entre -1 a 1 indicando el valor total de la imagen. Para esta transformación se utilizó un valor de .1, es decir, el 10% de la medida de la imagen para todos nuestros datos.
- Acercamiento a la imagen: esta transformación es la aplicación de aumento de la escala a la imagen original
- Rotar horizontalmente: Invierte las filas y columnas horizontalmente.

Finalmente se rellenaron los espacios que puedan quedar vacíos después de realizar la transformación con los valores de los pixeles vecinos, esto para mejorar el entrenamiento y evitar el sobreajuste de la red. Además, se establecieron 30 pasos por época, lo que establece cuantos lotes de imágenes definen una única época, por lo tanto, en una época se están obteniendo 300 imágenes transformadas geométricamente, esto repetido por las 100 épocas para obtener un conjunto de datos de entrenamiento de 30,000 imágenes.

En la Fig. 21 se muestra un ejemplo de una imagen original y una imagen obtenida después de realizar las transformaciones.



*Fig. 21 Ejemplo de imagen obtenida mediante distintas transformaciones para el conjunto de aumentación de datos; a) micrografía original de una célula infectada con ZIKV, b) micrografía obtenida a partir de un conjunto de transformaciones geométricas.*

## **4.5 Procesamiento de imágenes**

Con el fin de buscar la mejor segmentación posible, se aplicaron a las imágenes de TEM distintos algoritmos de procesamiento de imágenes, los cuales se describen en las siguientes subsecciones.

### **4.5.1 Normalización de imágenes**

Considerando que las micrografías disponibles en la base de datos tienen distintas intensidades en escala de grises, debido a diversos factores de escala e iluminación, estas se normalizaron para evitar variaciones en el resultado de la segmentación mediante la U-Net. Se tomó como referencia la imagen que mejor resultado de segmentación había generado previamente al usar la red con las micrografías originales.

En la normalización se modificaron las intensidades de los pixeles de cada micrografía para que coincidieran con el histograma de la imagen referencia, permitiendo diferenciar la tonalidad de gris de la mitocondria del resto de la célula y remarcando sus características (Fig. 22).

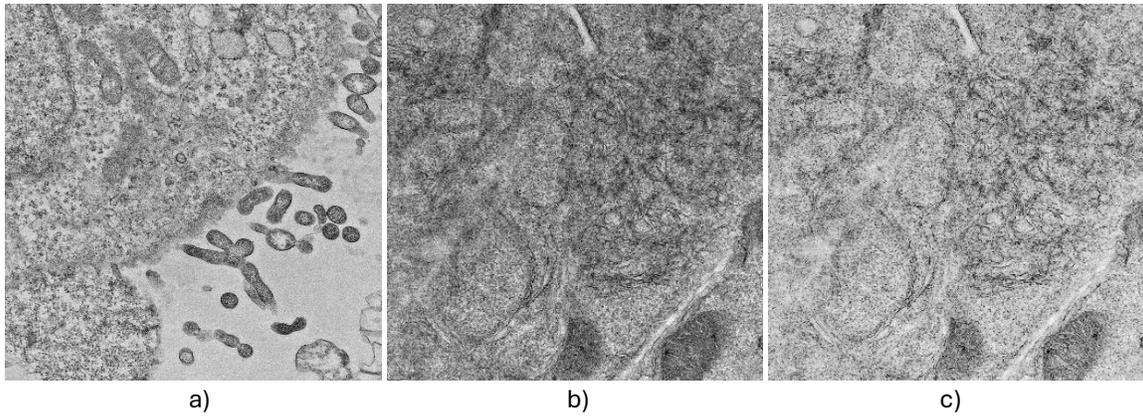


Fig. 22 Micrografía normalizada; a) micrografía de referencia, b) micrografía original, c) micrografía normalizada con el histograma de la imagen referencia donde se puede apreciar el cambio en la tonalidad comparada con la imagen b).

#### 4.5.2 Operaciones morfológicas

Tomando en cuenta que las mitocondrias que presentan un daño grave a causa de alguno de los virus, se decidió aumentar el contorno de las máscaras binarias, para comprobar si esto permitía a la red conocer más características de las mitocondrias.

Para llevar a cabo este aumento se utilizó la operación morfológica dilatar, la cual permite realizar un aumento del número de píxeles en el borde del área de la imagen binaria (ver Fig. 23), a través de distintos elementos estructurales (por sus siglas en inglés SE).

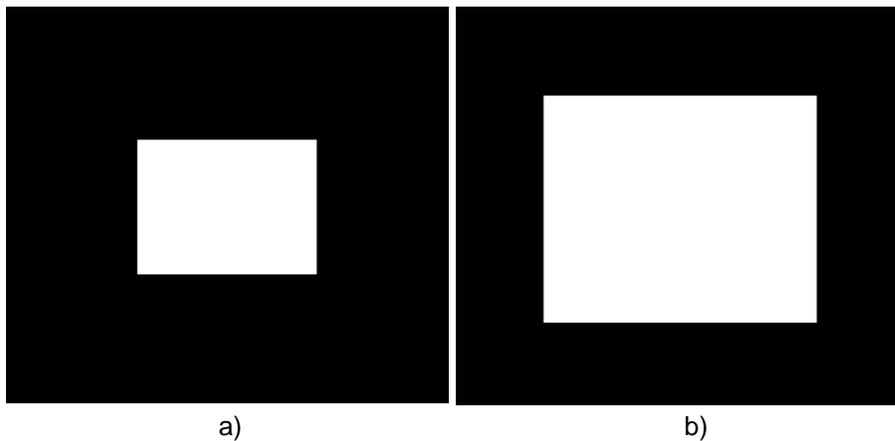


Fig. 23 Ejemplo del proceso de dilatación en una imagen binaria; a) imagen original, b) imagen con una dilatación con un factor de 40 píxeles.

Después de probar con diversos SE, se decidió de forma empírica utilizar un cuadrado de 30 píxeles de tamaño ( $\text{square}=30$ ) para aumentar alrededor de la máscara binaria en un factor de 30 píxeles, obteniendo una máscara binaria dilatada como la que se muestra en la Fig. 24b, permitiendo de esta forma que la red pueda considerar más información fuera del borde de las mitocondrias originales (ver Fig. 24a).

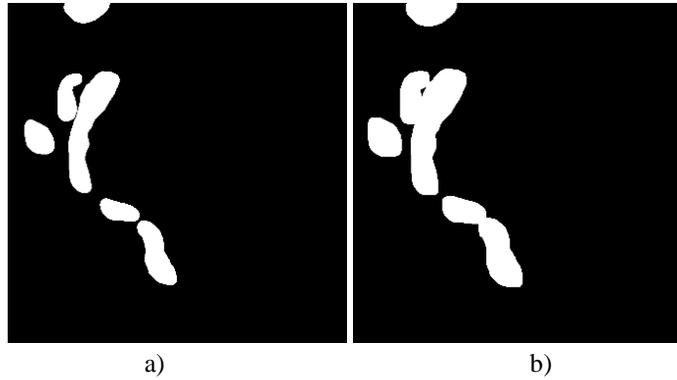


Fig. 24 Operación morfológica de dilatar aplicado a una máscara binaria; a) máscara binaria original, b) máscara binaria dilatada.

### 4.5.3 Filtro Gaussiano

Considerando la retroalimentación de uno de los expertos que ayudaron al entendimiento e identificación de las mitocondrias en las micrografías, se decidió aplicar un filtro Gaussiano con una desviación estándar de dos ( $\sigma=2$ ). Este filtro fue aplicado a cada micrografía original para suavizar la granularidad presente en las imágenes y eliminar el ruido sin perder definición de las diversas estructuras celulares (Fig. 25).

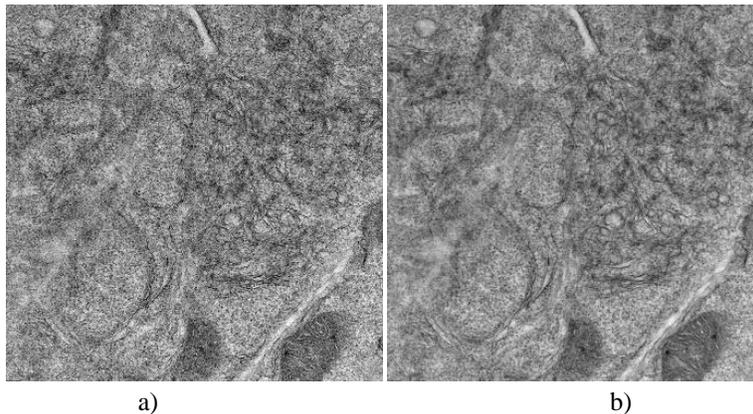


Fig. 25 Micrografía con filtro Gaussiano; a) micrografía original de una célula infectada con ZIKV, b) micrografía con un filtro Gaussiano con una  $\sigma=2$ .

Se manejó una  $\sigma=2$  por recomendación de expertos en micrografías, al ser este valor considerado como óptimo dada la resolución y magnificación que manejan al momento de obtener las micrografías para evitar perder detalles como las crestas mitocondriales.

### 4.6 Obtención de métricas automáticamente

La obtención de métricas morfológicas de forma automática requiere tener por separado cada mitocondria, esto se realizó con ayuda del software MATLAB<sup>®</sup> 2021, para esto se tiene como imagen de entrada la máscara binaria obtenida de forma automática mediante la U-Net, se identifican los objetos y se separan en una nueva imagen binaria, obteniendo como resultado tantas mascararas binarias como objetos en la imagen (ver Fig. 26).

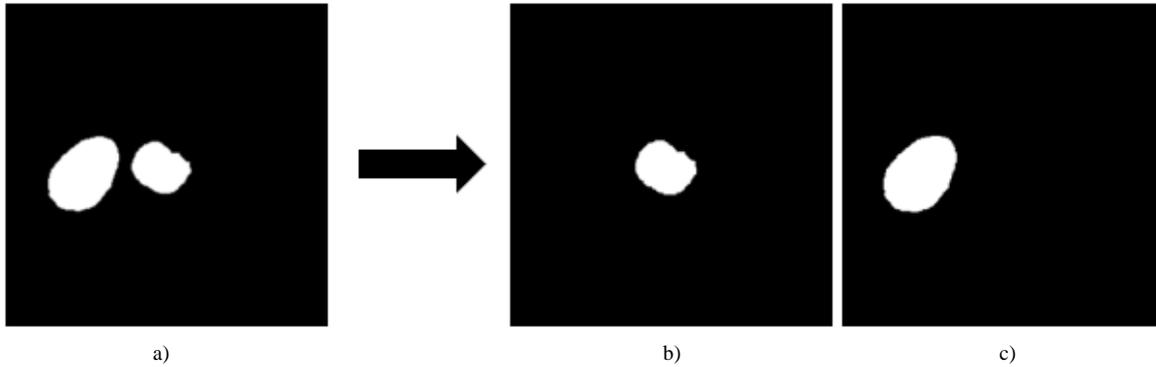


Fig. 26 Máscara binaria con dos mitocondrias; a) segmentación obtenida de forma automática, b) y c) máscaras binarias de cada mitocondria por separado.

Una vez teniendo cada mitocondria de forma individual se obtuvieron el área, circularidad, AR, redondez y foco de cada una.

#### 4.7 Validación de la herramienta

La validación de la herramienta se realizó mediante la estimación del coeficiente de correlación de concordancia de Lin (CCCLin) [31] con el software R 4.2.1<sup>®</sup>. Este método permite comparar dos mediciones de una misma variable, tomando una técnica de medición existente como el estándar de oro o medición de referencia.

El CCCLin se define como:

$$\rho_c = \frac{2\rho\sigma_x\sigma_y}{(\mu_x - \mu_y)^2 + \sigma_x^2 + \sigma_y^2} \quad (6.5)$$

Donde:

- $x$  = Conjunto de datos como estándar de oro
- $y$  = Conjunto de datos a evaluar
- $\rho$  = Coeficiente de correlación entre conjuntos

El valor de  $\rho_c$  oscila entre -1 y 1, y hay una concordancia perfecta cuando los valores se acercan a 1, una discordancia perfecta si se acerca -1 y en caso de ser 0 no hay concordancia.

Además, se validó el traslape de la segmentación obtenida de forma automática con la segmentación manual mediante el índice DICE. Este tiene valores entre 0 y 1, donde 1 indica una superposición perfecta entre las segmentaciones analizadas y en 0 no existe similitud y se define como:

$$DICE = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|} \quad (6.6)$$

Donde:

- $A, B$  = Conjunto de píxeles
- $|\cdot|$  = Cardinalidad de cada conjunto
- $\rho$  = Coeficiente de correlación entre conjuntos

### 5.1 Obtención de datos manualmente

Se segmentaron un total de 586 y 214 mitocondrias de micrografías de células infectadas con SARS-CoV-2 y el ZIKV, respectivamente. En la Fig. 27 se observa un ejemplo de las imágenes utilizadas y sus respectivas segmentaciones. La Tabla 2 muestra el total de mitocondrias encontradas para cada grupo de micrografías.

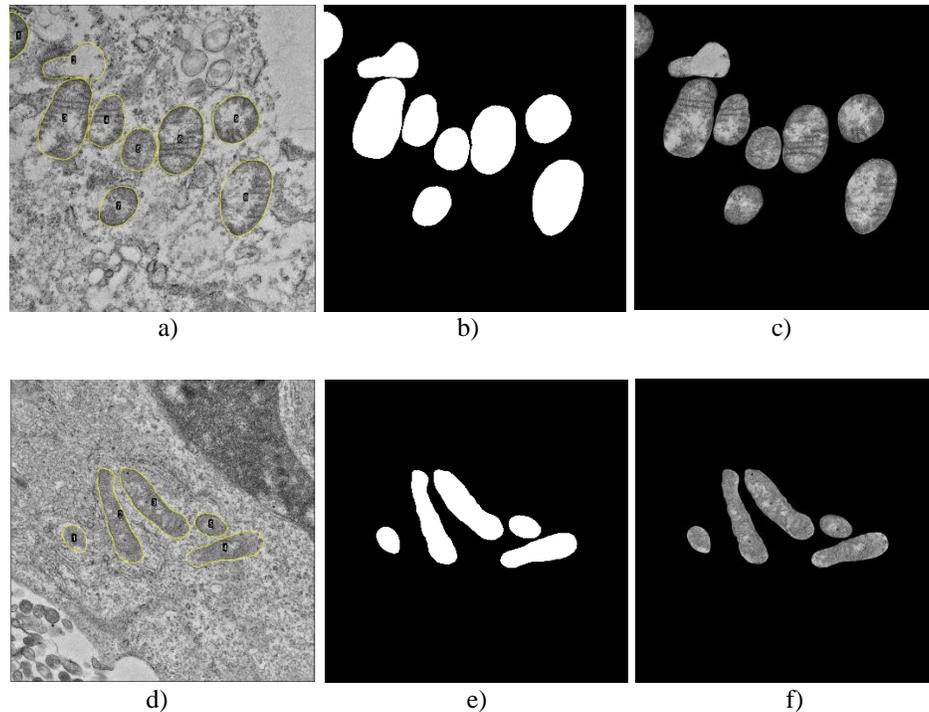


Fig. 27 Ejemplo del proceso de segmentación manual mediante el programa ImageJ. Las imágenes a), b) y c) muestran una micrografía control de células infectadas con SARS-CoV-2, en la cual se segmentan las mitocondrias para posteriormente obtener su máscara binaria y de esta forma segmentar las mitocondrias independientes del fondo de la célula; en las imágenes d), e) y f) se muestra el mismo proceso realizado con una micrografía control de células infectadas con ZIKV.

Tabla 2. Total de mitocondrias segmentadas manualmente en micrografías de células infectadas con SARS-CoV-2 y ZIKV.

		Micrografías	# de mitocondrias individuales	Total
<b>SARS-CoV-2</b>	Delta	25	142	586
	Ómicron	25	151	
	Control	50	293	
<b>ZIKV</b>	Infectadas	25	86	214
	Control	25	128	

En la Tabla 3 se muestran los promedios y desviaciones estándar de las métricas obtenidas de forma manual, los cuales serán utilizados como valores de referencia cuando se realice la comparación con las métricas obtenidas de forma automática. En la Fig. 28 y 29 se pueden observar las diferencias que presentan las mitocondrias como consecuencia de la interacción célula-virus, para el caso de las micrografías de SARS-CoV-2 se observa que las mitocondrias infectadas con Ómicron presentan una circularidad y una redondez menor a las infectadas con Delta y al Control, debido a que el virus provoca que las mitocondrias se elonguen por un proceso de fusión mitocondrial. De igual forma en AR y Foco hay una notoria diferencia en las mitocondrias de Ómicron, lo que puede indicar que está actuando de forma diferente el virus dentro de la célula.

Para el ZIKV se corrobora mediante las métricas obtenidas que las mitocondrias sufren cambios por la interacción con el virus al mostrar cambios entre los grupos de Control e Infectadas.

Tabla 3. Promedios y desviaciones estándar obtenidos de forma manual de las mitocondrias en células control e infectadas con SARS-CoV-2 y el virus de Zika.

		Área (píxeles <sup>2</sup> )	Circularidad	AR	Redondez	Foco
<b>SARS-CoV-2</b>	Delta	49580±52083	0.87±0.13	1.55±0.61	0.71±0.18	0.41±0.26
	Ómicron	49151±56168	0.74±0.20	2.34±1.23	0.54±0.21	0.66±0.53
	Control	59668.±43571	0.85±0.13	1.62±0.55	0.67±0.16	0.63±0.36
<b>ZIKV</b>	Infectadas	140694±131437	0.81±0.16	1.86±0.81	0.61±0.20	0.73±0.36
	Control	52171±44885	0.70±0.21	2.53±1.35	0.50±0.23	0.83±0.62

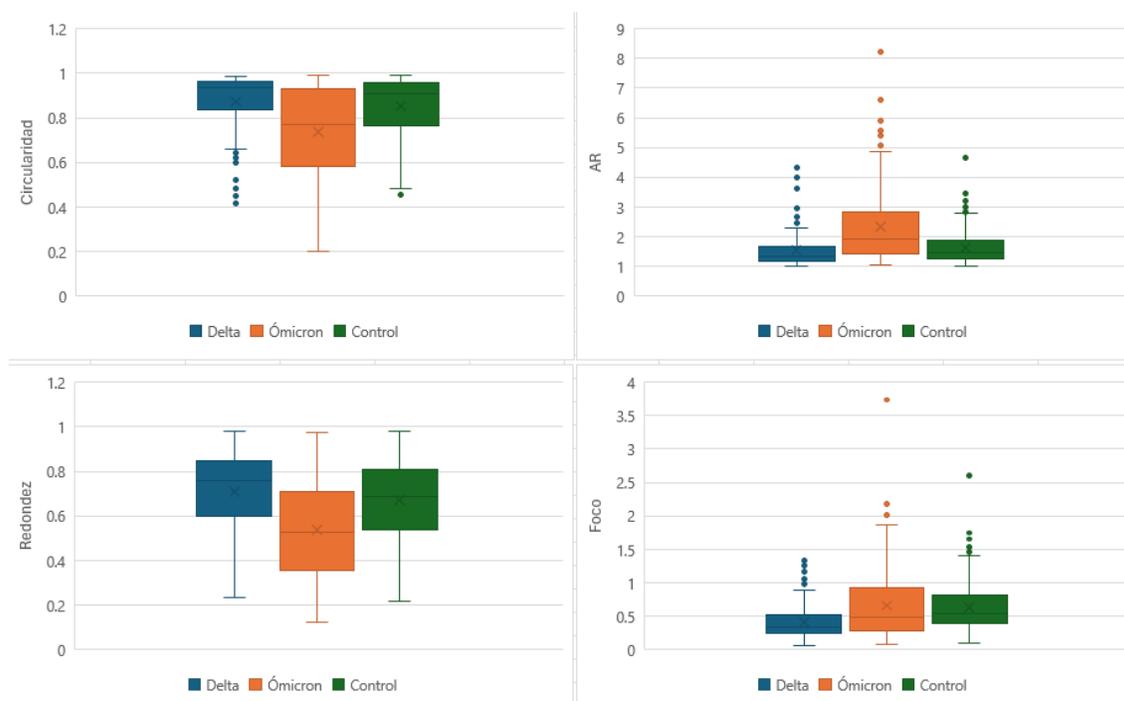


Fig. 28 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas manualmente de mitocondrias en micrografías control e infectadas con SARS-CoV-2 con media y percentiles.

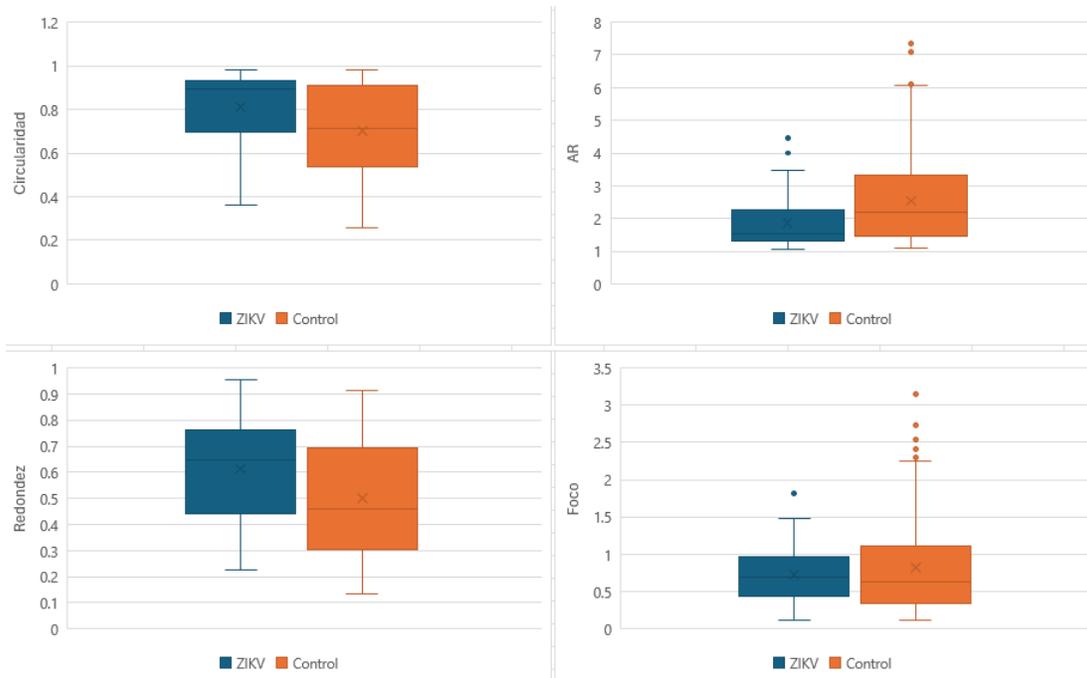


Fig. 29 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma manual de las mitocondrias en micrografías control e infectadas con ZIKV con media y percentiles.

## 5.2 Estrategias de segmentación mediante arquitectura U-Net

Inicialmente se realizó una prueba de segmentación automática mediante la arquitectura U-Net propuesta en [30] utilizando como entrada las micrografías originales para el SARS-CoV-2 y ZIKV. A partir de este resultado inicial, se buscó aplicar diversas técnicas de procesamiento de imágenes sobre las micrografías con el objetivo de encontrar una mejor segmentación. Considerando que las mitocondrias de las imágenes de ZIKV tenían una mejor definición, se comenzó a trabajar con las imágenes de este virus y con base en estos resultados, se procedió a replicar la metodología para la segmentación de las mitocondrias de células infectadas con las distintas variantes de SARS-CoV-2.

### 5.2.1 Segmentación automática con micrografías originales

Para llevar a cabo la segmentación con la arquitectura U-Net se utilizó un enfoque de división de datos de 80-20 para entrenamiento y prueba respectivamente. Adicionalmente, se realizaron cinco pruebas con la red, la primera utilizando el conjunto de datos completo de micrografías de SARS-CoV-2, la segunda utilizando únicamente las 50 micrografías control, una más solo con las micrografías infectadas con *Delta* y otra con las micrografías infectadas con *Ómicron*. Finalmente se realizó una segmentación con las 50 micrografías de células control e infectadas con ZIKV.

A continuación, en la Tabla 4 se muestran los valores de pérdida y precisión obtenidos en cada metodología de segmentación, entrenando a la red por 100 épocas:

Tabla 4. Valores de pérdida y precisión obtenidos al realizar las distintas pruebas de segmentación para las mitocondrias en células infectadas y control.

	<b>SARS-CoV-2 datos completo</b>	<b>Delta</b>	<b>Ómicron</b>	<b>SARS-CoV-2 Control</b>	<b>ZIKV datos completo</b>
<b>Precisión</b>	0.988	0.995	0.996	0.992	0.994
<b>Pérdida</b>	0.030	0.011	0.008	0.019	0.012

Las funciones de pérdida y precisión mostraron un buen desempeño por parte de la red ya que no se encontró sobreajuste (Fig. 30 y 31), de igual forma la U-Net detectó correctamente donde se encontraban las mitocondrias, con excepción de las células infectadas con la variante Delta, la cual compromete por completo la integridad de las mitocondrias; sin embargo, no se obtuvo la mejor definición en las segmentaciones.

En las Fig. 32, 33 y 34 se puede observar la micrografía original de células infectadas con *Delta*, *Ómicron* y *ZIKV* respectivamente, junto a su máscara binaria obtenida de forma manual y las segmentaciones obtenidas de forma automática, sin embargo, estas segmentaciones no muestran un resultado satisfactorio en comparación de las segmentaciones manuales.

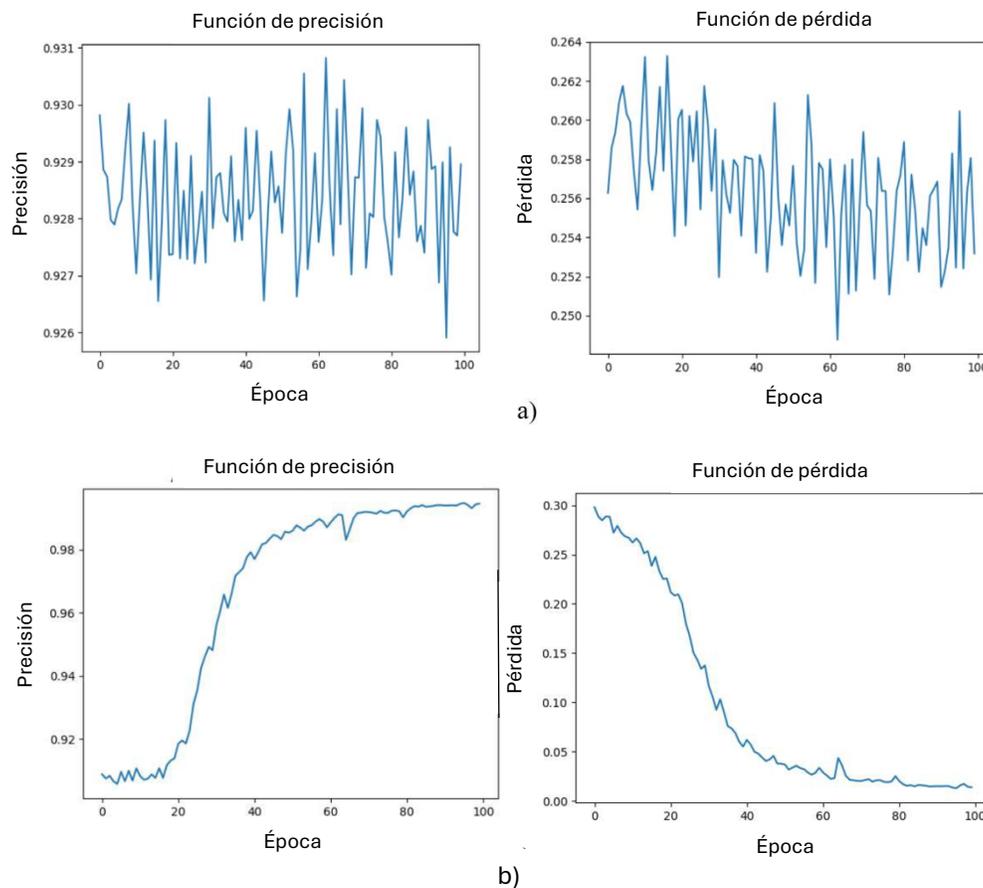


Fig. 30 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión en entrenamiento obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net para cada grupo de micrografías; a) Conjunto de datos completo de SARS-CoV-2, b) Conjunto de datos completo ZIKV.

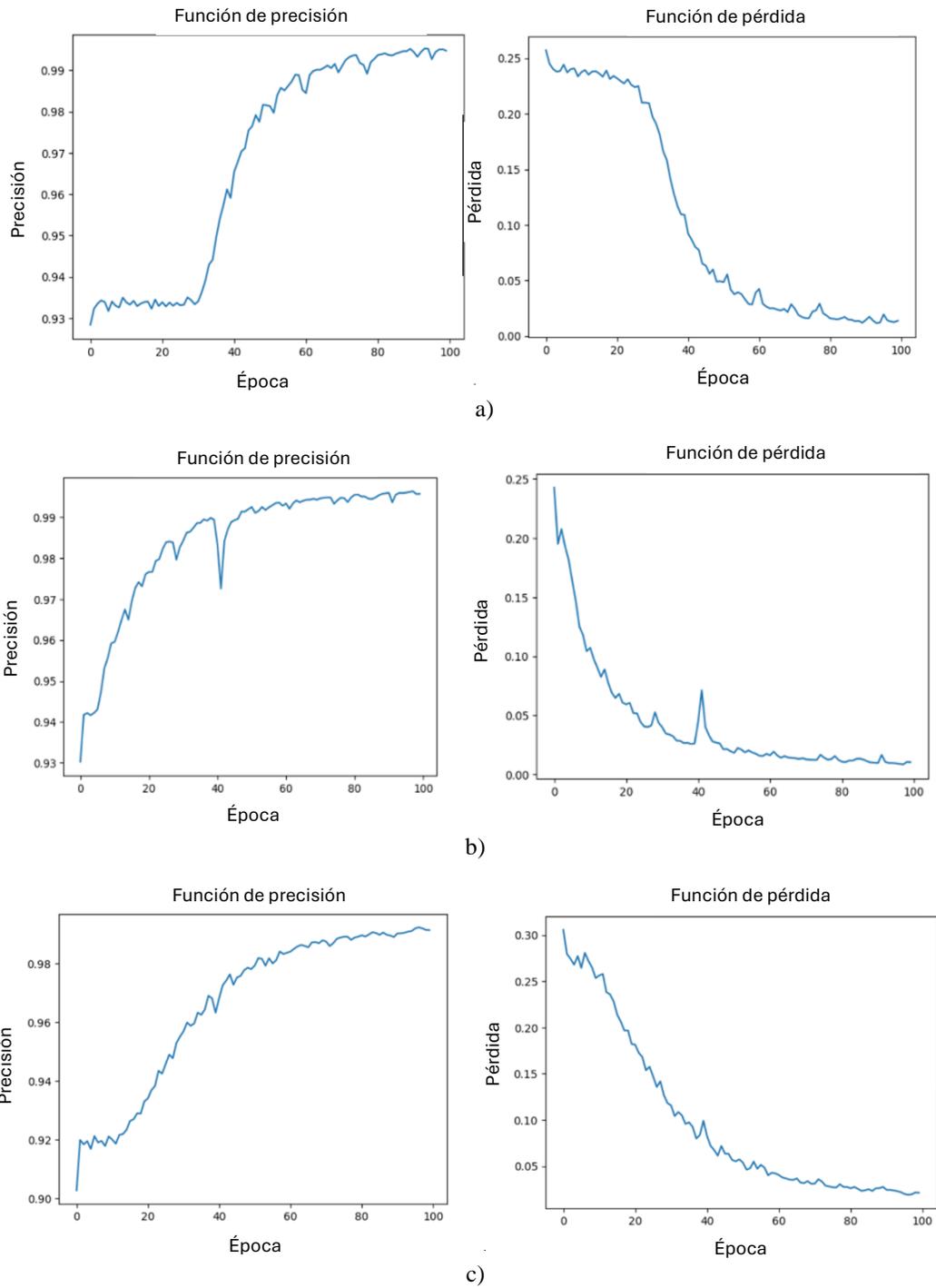


Fig. 31 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net para cada grupo de micrografías; a) Delta, b) Ómicron, c) Control.

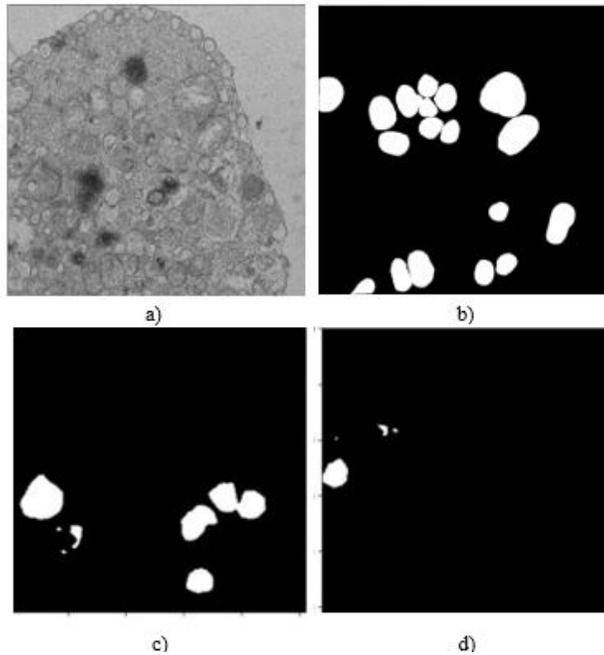


Fig. 32 Comparación de las segmentaciones obtenidas para la variante Delta; a) micrografía de una célula infectada por la variante Delta, b) máscara binaria realizada manualmente, c) segmentación generada por la U-Net entrenada con todas las micrografías, d) segmentación de las micrografías de Ómicron únicamente

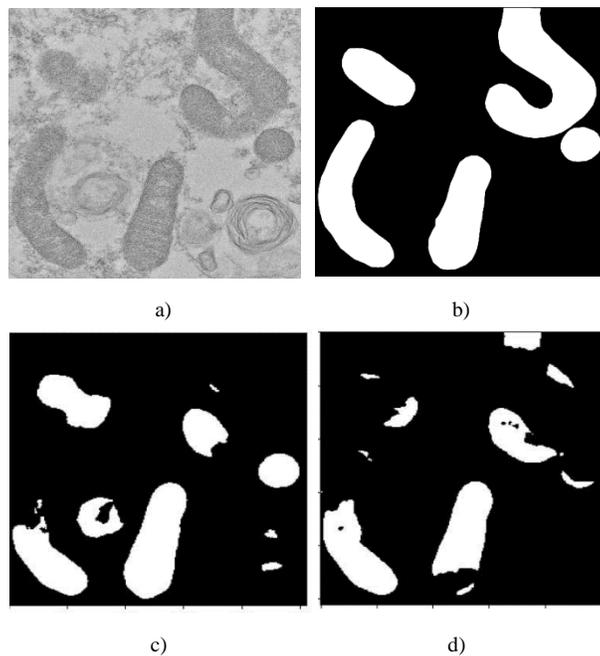


Fig. 33 Comparación entre las segmentaciones obtenidas para la variante Ómicron; a) micrografía de una célula infectada por la variante Ómicron, b) máscara binaria obtenida por la segmentación manualmente, c) segmentación generada por la U-Net entrenada con el conjunto de datos completo, d) segmentación de las micrografías de Ómicron únicamente.

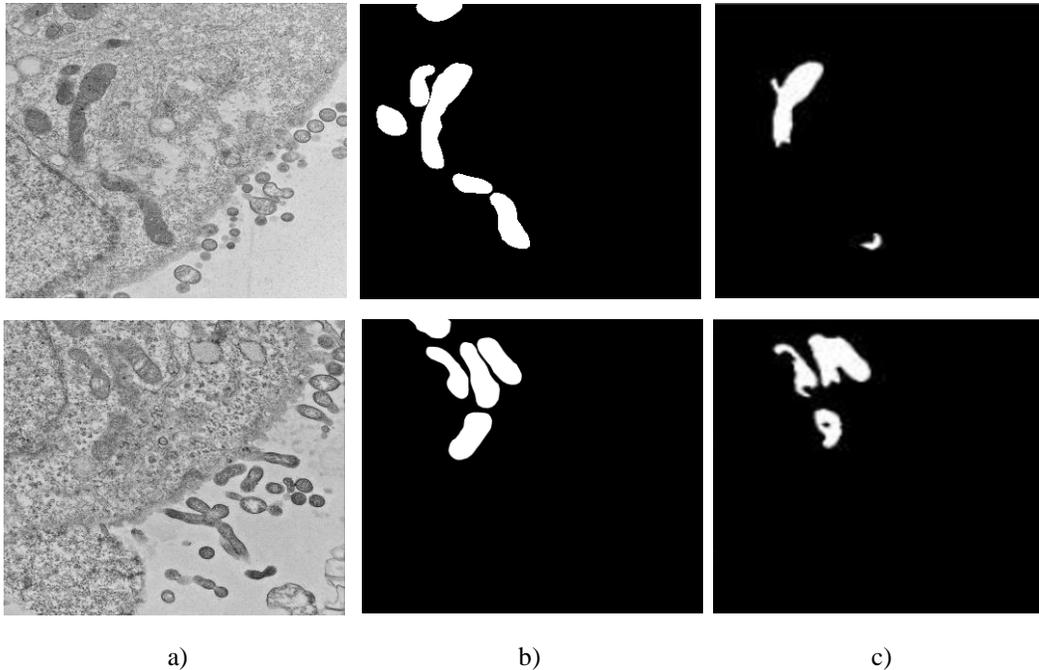


Fig. 34 Dos ejemplos de resultados obtenidos con la red U-Net utilizando las micrografías originales de células infectadas con ZIKV; a) micrografía original infectada con ZIKV, b) segmentación realizada de forma manual, c) segmentación obtenida de forma automática

### 5.2.2 Segmentación automática con micrografías normalizadas

Los resultados obtenidos entrenando a la red utilizando las micrografías normalizadas de células infectadas con ZIKV mostraron sobreajuste en las 100 y 95 épocas, por lo que se probó con 65 épocas. Esto nos dio un valor de pérdida de 0.0070 y precisión de 0.9970 (Fig. 35). A pesar de obtener buenos valores de desempeño las segmentaciones no fueron satisfactorias (ver Fig. 36), lo que puede indicar que la red siga teniendo un sobreajuste a pesar de disminuir el número de épocas o que las imágenes sigan sin ser las óptimas para su entrenamiento.

### 5.2.3 Segmentación automática con operaciones morfológicas

En esta implementación, se utilizaron máscaras binarias con un preprocesamiento de dilatación, aumentando el área de las mitocondrias con la idea de que la red aprendiera un mayor número de características, particularmente para aquellas mitocondrias que presentan daño en su membrana. Sin embargo, esto no benefició la segmentación obtenida de forma automática (ver Fig. 37), ya que al realizar la dilatación y por la cercanía de las mitocondrias estas se unieron, dando la impresión de que son una sola mitocondria, por esto no se identifican de forma correcta las características para realizar una segmentación satisfactoria.

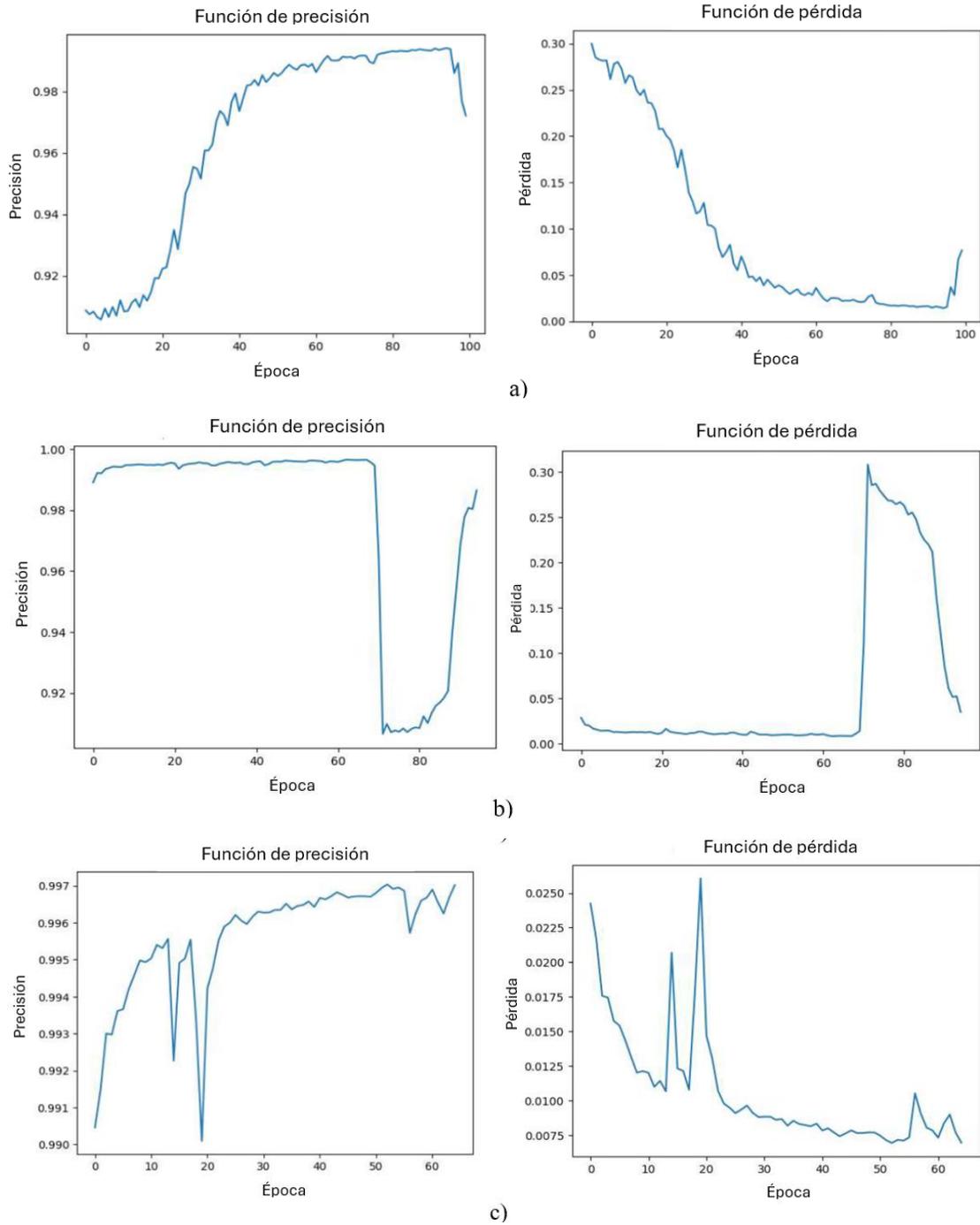


Fig. 35 Gráficas de función de precisión y pérdida; a) se muestra un sobreajuste alrededor de la época 95, b) se entrenó con 95 épocas y nuevamente mostró sobreajuste a las 65 épocas, c) valores obtenidos entrenando con 65 épocas.

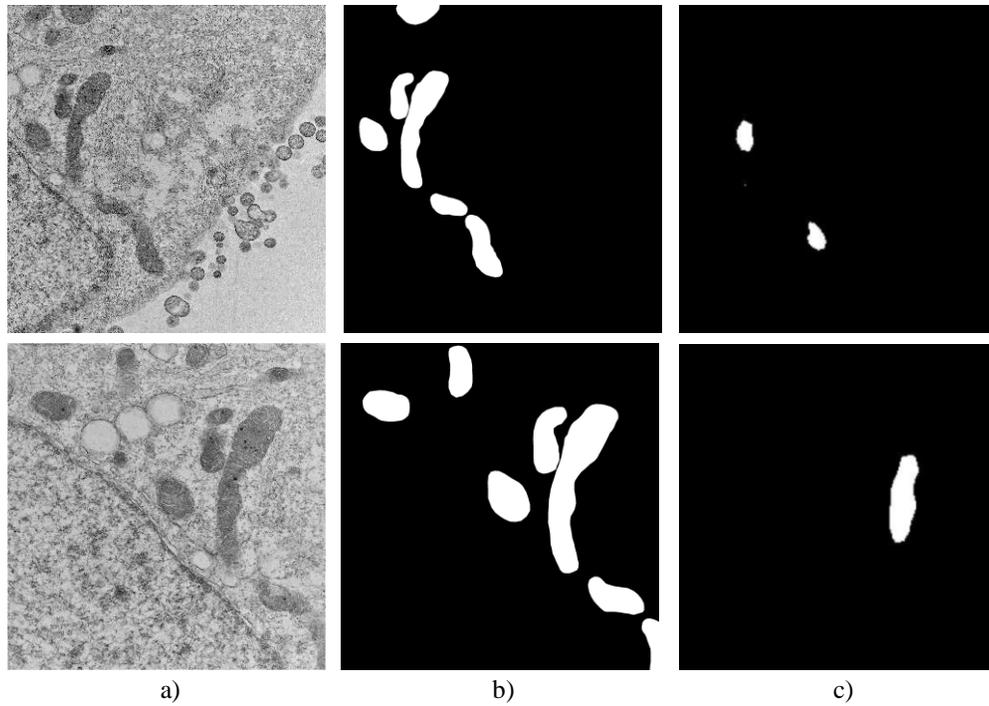


Fig. 36 Segmentaciones obtenidas de forma automática entrenando a la red U-Net con micrografías normalizadas; a) micrografía normalizada de células infectadas con el virus de ZIKA, b) segmentación manual, c) segmentación obtenida mediante la IA.

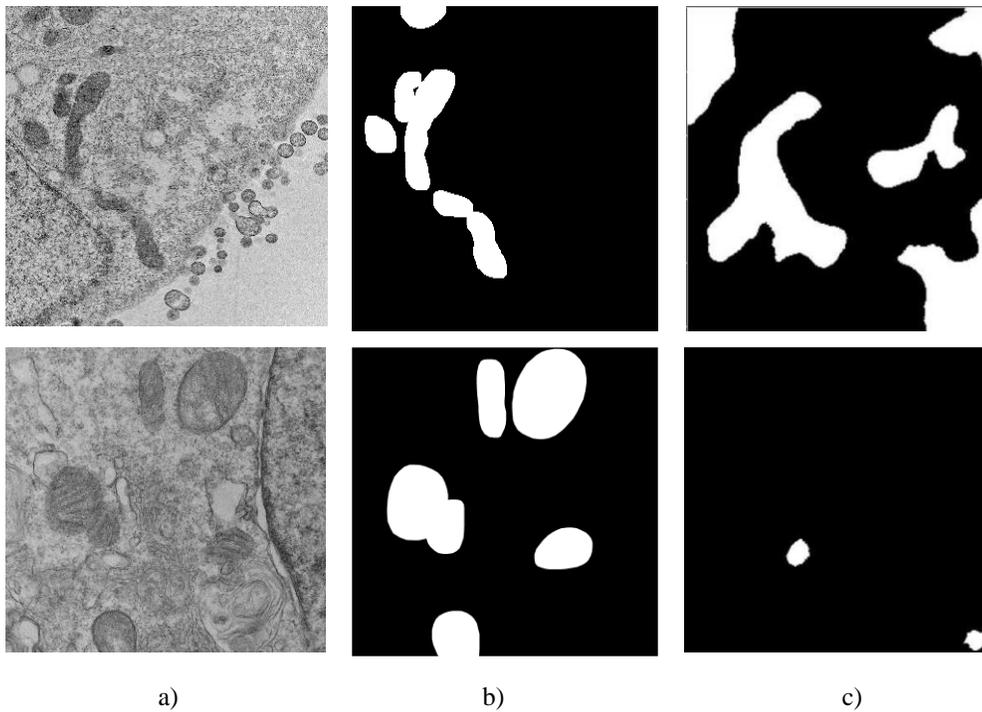


Fig. 37 Segmentaciones obtenidas de forma automática con un preprocesamiento en las máscaras binarias; a) micrografía original de células infectadas con ZIKV, b) segmentación realizada manualmente con un factor de dilatación de 30 píxeles, c) segmentaciones obtenidas de forma automática.

### 5.2.4 Segmentación automática con filtro Gaussiano

Finalmente se probó entrenar a la red con micrografías a las que se les aplicó un filtro Gaussiano con una  $\sigma=2$ , para células infectadas con *ZIKV* (ver Fig. 39). Esto resultó en una segmentación satisfactoria con respecto a las obtenidas anteriormente. Por tal motivo, esta misma metodología fue utilizada para las micrografías de *SARS-CoV-2*, también encontrando resultados favorables (ver Fig. 40). La Tabla 5 y Fig. 38 muestran los valores obtenidos de precisión y pérdida de la red.

Tabla 5. Valores obtenidos de la red U-Net entrenada con micrografías preprocesadas con un filtro Gaussiano con  $\sigma=2$ , consiguiendo una mejor segmentación automática.

	Precisión	Pérdida
<b>SARS-CoV-2</b>	0.991	0.021
<b>ZIKV</b>	0.995	0.011

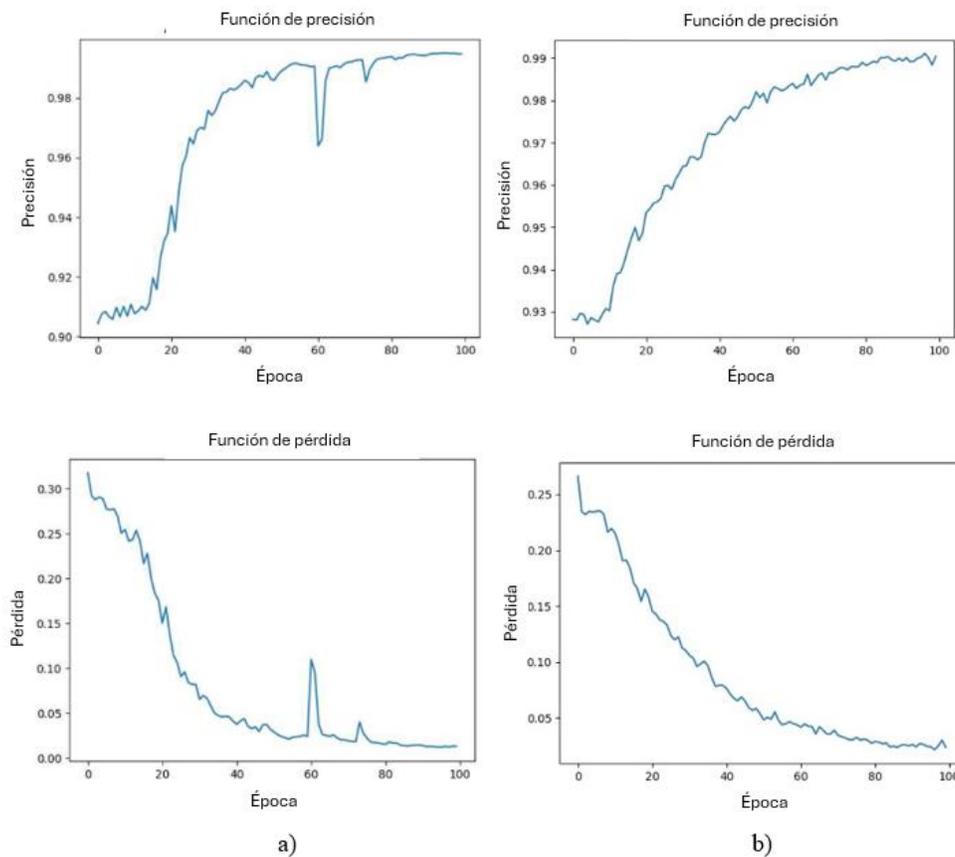


Fig. 38 Gráficas de las funciones de pérdida y precisión obtenidas con la segmentación automática mediante la arquitectura U-Net entrenada con micrografías preprocesadas con un filtro Gaussiano; a) gráficas para el grupo de micrografías control e infectadas con *ZIKV*, b) gráficas del grupo de micrografías infectadas con distintas variantes de *SARS-CoV-2* y control.

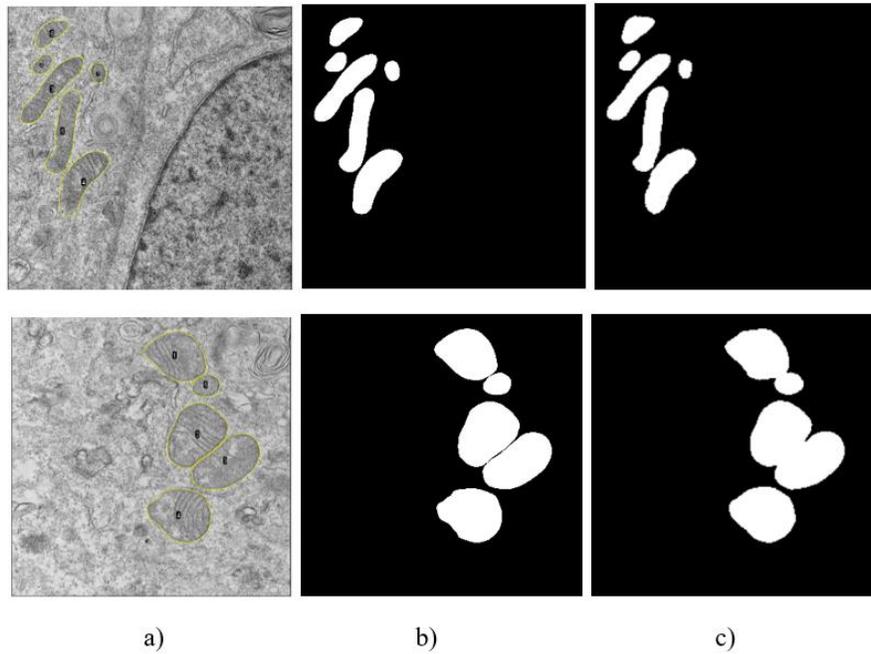


Fig. 39 Segmentaciones obtenidas de forma automática añadiendo un filtro Gaussiano a las micrografías originales; a) micrografía de células infectadas con el ZIKV, b) segmentación realizada manualmente c) segmentaciones obtenidas de forma automática.

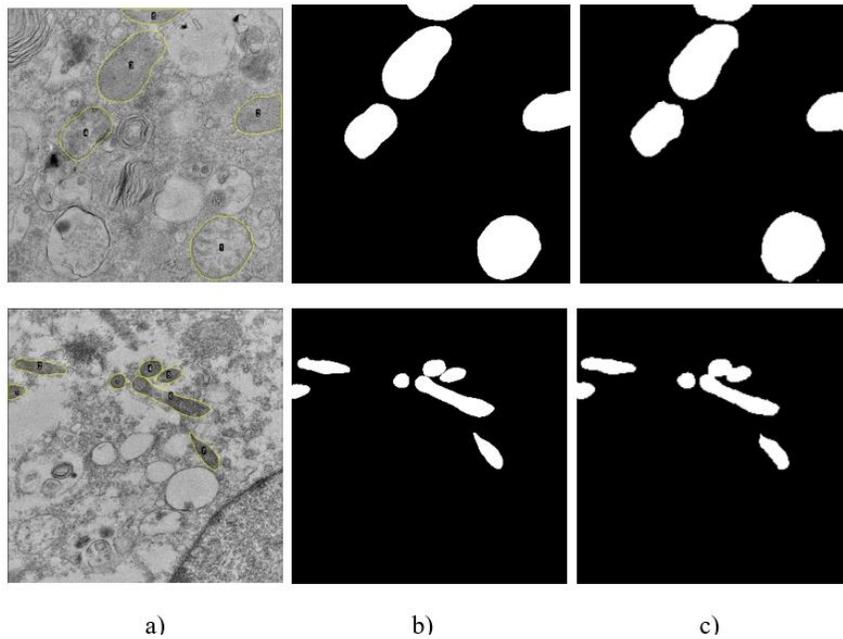


Fig. 40 Segmentaciones obtenidas de forma automática añadiendo un filtro Gaussiano a las micrografías originales; a) micrografías de células infectadas con distintas variantes de SARS-CoV-2, b) segmentación realizada de forma manual c) segmentaciones obtenidas de forma automática.

En la Fig. 39b y 39c, así como en la Fig. 40b y 40c podemos observar que se identificaron de forma correcta las mitocondrias tanto en células infectadas con *ZIKV* como en células infectadas con las variantes *Delta* y *Ómicron*. Esto se logró, sin importar las diversas morfologías que se encuentran en las imágenes analizadas; sin embargo, en aquellos casos en donde hay una gran cercanía entre las mitocondrias y por tal motivo algunas mitocondrias se unen de forma artificial la segmentación presenta algunas dificultades particularmente. A pesar de este artefacto, se considera que los resultados alcanzados con esta metodología son los mejores encontrados, y por esta razón se decidió realizar la obtención de métricas de forma automática utilizando estas segmentaciones.

### 5.3 Obtención de métricas de forma automática

Para realizar la medición automática de métricas de interés, se trabajó únicamente con las mitocondrias que presentaban una segmentación individual bien delimitada (Tabla 6), teniendo más del 50% de mitocondrias para el conjunto de datos de *SARS-CoV-2*, y un 68% de mitocondrias para *ZIKV*. Se considera que un total de 447 mitocondrias segmentadas de forma individual es un número suficiente con las cuales obtener métricas de forma automática para realizar una evaluación de la herramienta, comparando los resultados con las estimaciones manuales.

Tabla 6. Total de mitocondrias segmentadas manual y automáticamente, con el porcentaje de mitocondrias obtenidas de forma automática con respecto a las segmentadas de forma manual.

		Mitocondrias segmentadas manualmente	Total mitocondrias	Mitocondrias segmentadas automáticamente	Total mitocondrias
<i>SARS-CoV-2</i>	Delta	142	586	50 (35%)	300 (51%)
	Ómicron	151		102 (67%)	
	Control	293		148 (50%)	
<i>ZIKV</i>	Infectadas	86	214	57 (66%)	147 (68%)
	Control	128		90 (70%)	

Para las mitocondrias individuales segmentadas automáticamente se obtuvieron las mismas métricas de forma automática que las obtenidas manualmente. En las Tablas 7 y 8 se muestran los promedios y desviación estándar de cada métrica calculada y se graficaron los promedios por grupo de micrografías (Fig. 41 y 42), teniendo gráficos muy similares a los obtenidos de forma manual a pesar de utilizar únicamente un porcentaje de mitocondrias.

Tabla 7. Promedios y desviaciones estándar obtenidos de las métricas calculadas para las mitocondrias segmentadas de forma automática.

		Área (píxeles <sup>2</sup> )	Circularidad	AR	Redondez	Foco
<i>SARS-CoV-2</i>	Delta	69467±62716	0.70±0.08	1.48±0.48	0.71±0.17	0.42±0.22
	Ómicron	48883±37304	0.63±0.13	1.99±0.97	0.57±0.22	0.62±0.44
	Control	69025±51074	0.69±0.07	1.51±0.37	0.69±0.16	0.62±0.31
<i>ZIKV</i>	Infectadas	169057±155685	0.66±0.10	1.78±0.71	0.62±0.20	0.78±0.36
	Control	52171±52422	0.70±0.17	2.53±1.36	0.50±0.24	0.83±0.81

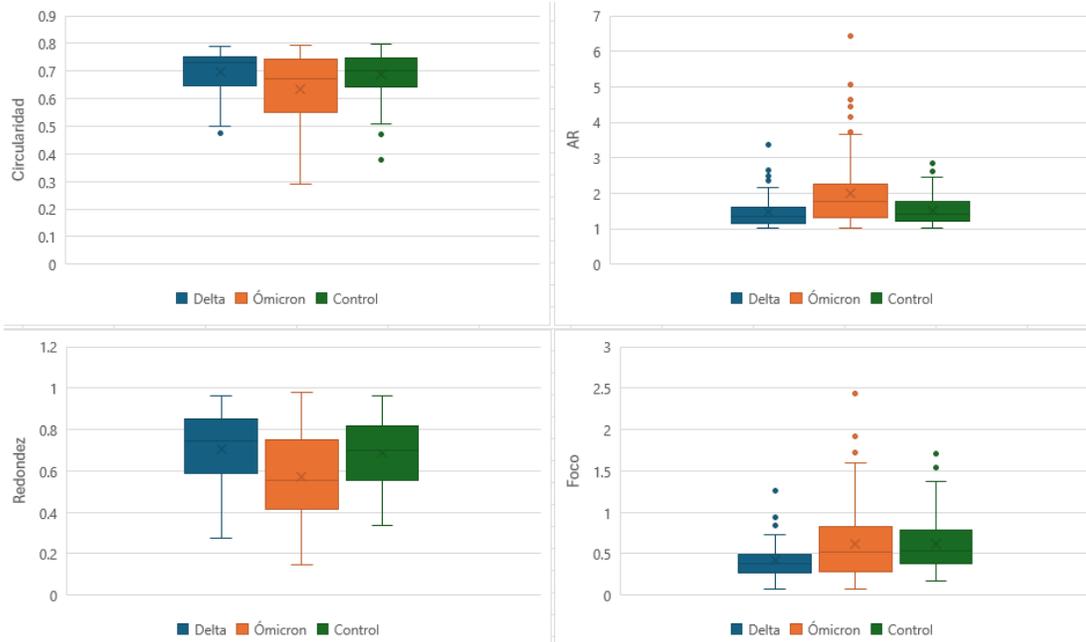


Fig. 41 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma automática para cada mitocondria en micrografías control e infectadas con SARS-CoV-2 con media y percentiles.

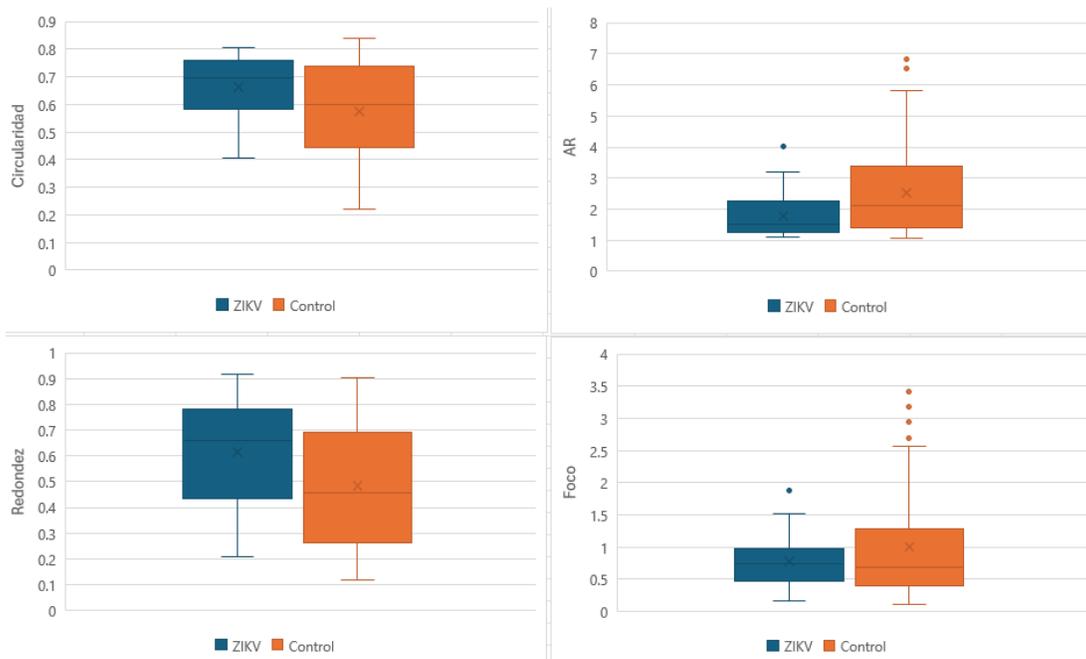


Fig. 42 Gráficos de cajas de las métricas obtenidas de forma automática para cada mitocondria en micrografías control e infectadas con ZIKV con media y percentiles.

Las métricas obtenidas de forma manual, de forma automática y las métricas obtenidas de forma manual pero únicamente las correspondientes a las obtenidas de forma automática se muestran en las Fig. 43, 44, 45, 46, 47 y 48 como gráficos de dispersión para analizar el cambio en la arquitectura de las mitocondrias como consecuencia de la interacción célula-virus, además que se puede observar el mismo comportamiento de ambas maneras de obtención de datos, a pesar de tener un menor número de mitocondrias para el análisis automático.

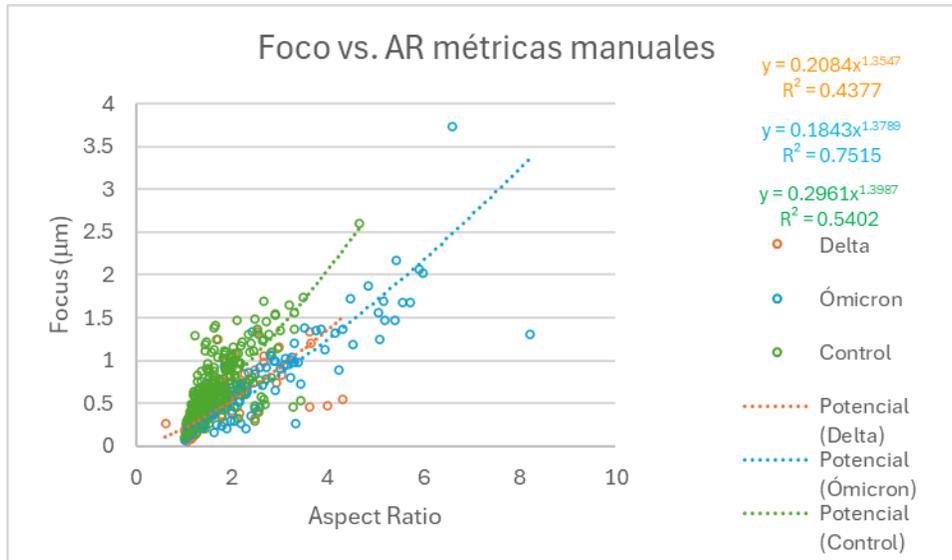


Fig. 43 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual para cada variante de SARS-CoV-2 y células control.

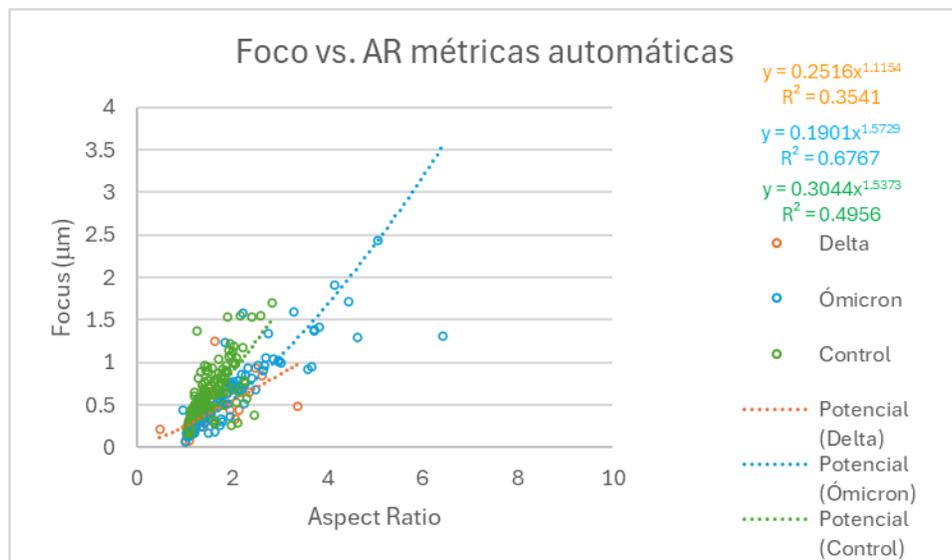


Fig. 44 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma automática para cada variante de SARS-CoV-2 y células control.

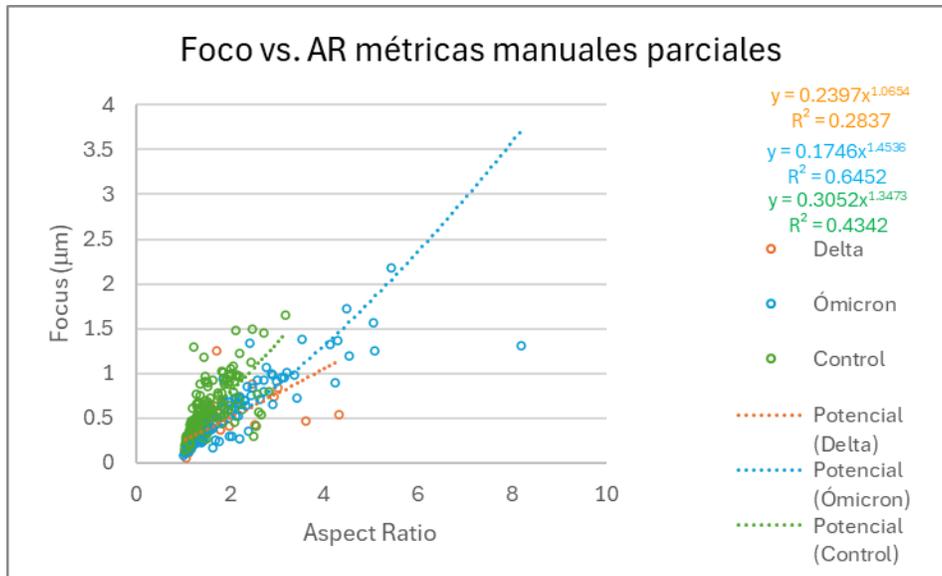


Fig. 45 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual tomando únicamente las mitocondrias correspondientes a las obtenidas de forma automática para cada variante de SARS-CoV-2 y células control.

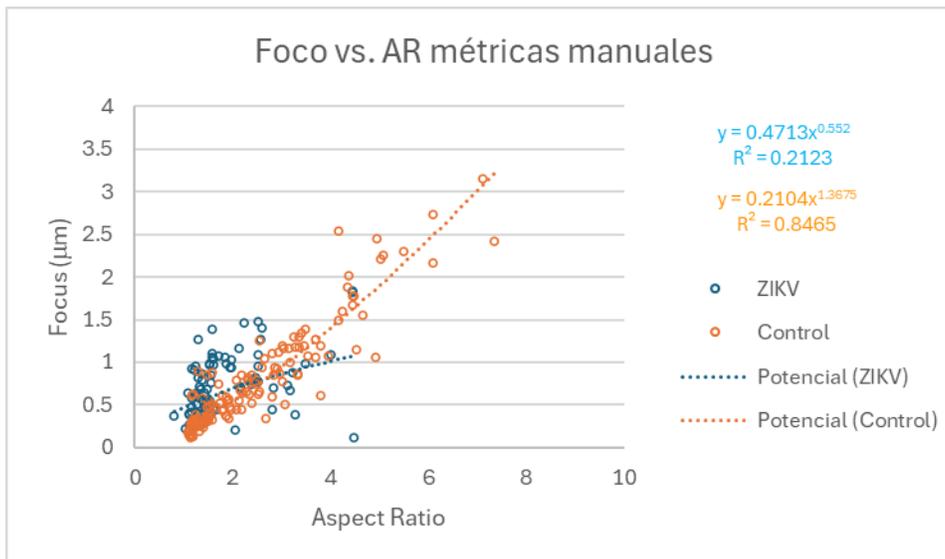


Fig. 46 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual para células infectadas con ZIKV y células control.

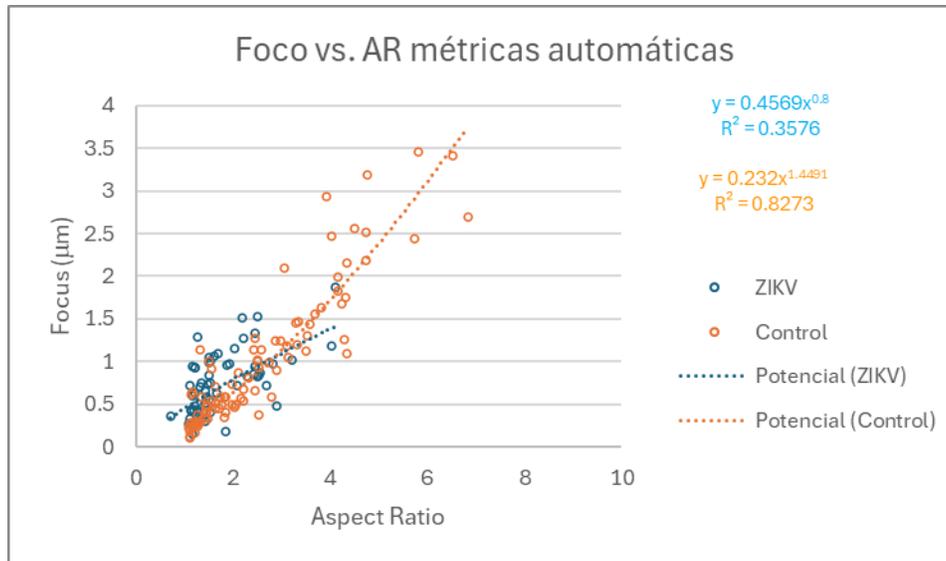


Fig. 47 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma automática para células infectadas con ZIKV y células control.

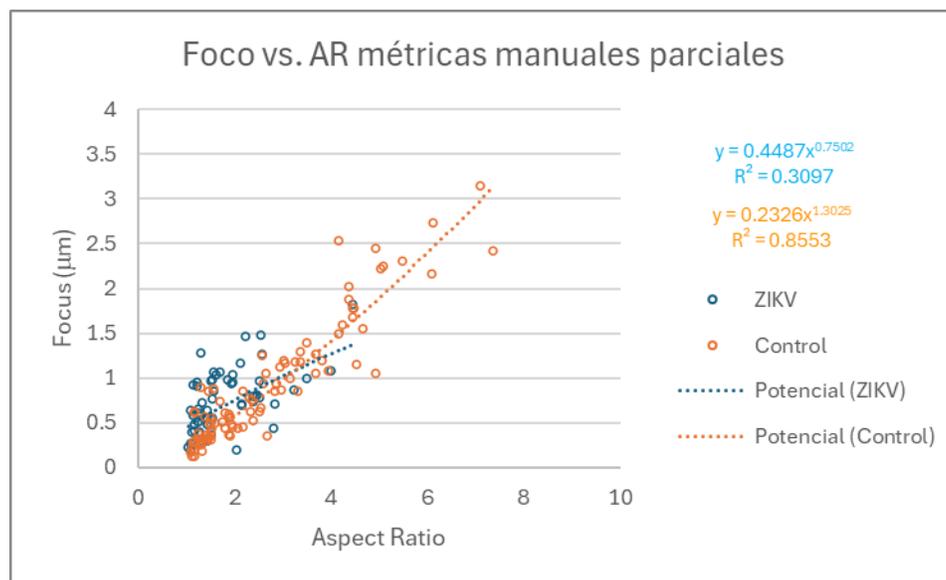


Fig. 48 Gráfica de dispersión que muestra los valores de foco vs. AR para cada mitocondria y la ecuación de regresión lineal calculada para cada grupo obtenidos de forma manual tomando únicamente las mitocondrias correspondientes a las obtenidas de forma automática para células infectadas con ZIKV y células control.

## 5.4 Validación

Para realizar la evaluación de la herramienta se utilizó el CCCLin, comparando las métricas obtenidas de forma manual como el estándar de oro contra las obtenidas de forma automática. Para esta validación, hay que recordar que se tomaron en cuenta únicamente los datos de las mitocondrias de las que se obtuvo una segmentación individual automática bien delimitada.

Además, se calculó el índice de similitud DICE para comparar de forma global las segmentaciones obtenidas, sobreponiendo la imagen de segmentación automática con la imagen de segmentación manual, y evaluar la similitud entre ellas, sin importar la segmentación individual de cada mitocondria.

### 5.4.1 Coeficiente de correlación de Concordancia de Lin

Las Tablas 8, 9, 10, 11 y 12 muestran los valores obtenidos de cada métrica calculada para las mitocondrias control e infectadas, además se calculó el límite inferior y superior con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Tabla 8. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de área calculada para cada grupo de mitocondrias.

Conjunto de datos	Área				
	Delta	SARS-CoV-2		ZIKV	
		Ómicron	Control	Infectadas	Control
<b>CCC Lin</b>	0.98	0.96	0.98	0.99	0.96
<b>Límite inferior</b>	0.98	0.94	0.97	0.99	0.94
<b>Límite superior</b>	0.99	0.97	0.98	0.99	0.97

Tabla 9. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de circularidad calculada para cada grupo de mitocondrias.

Conjunto de datos	Circularidad				
	Delta	SARS-CoV-2		ZIKV	
		Ómicron	Control	Infectadas	Control
<b>CCC Lin</b>	0.40	0.62	0.22	0.51	0.81
<b>Límite inferior</b>	0.28	0.54	0.16	0.40	0.75
<b>Límite superior</b>	0.51	0.70	0.28	0.61	0.85

Tabla 10. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de aspect ratio calculada para cada grupo de mitocondrias.

Conjunto de datos	Aspect ratio				
	SARS-CoV-2			ZIKV	
	Delta	Ómicron	Control	Infectadas	Control
<b>CCC Lin</b>	0.81	0.95	0.92	0.97	0.97
<b>Límite inferior</b>	0.72	0.94	0.90	0.96	0.97
<b>Límite superior</b>	0.87	0.96	0.94	0.98	0.98

Tabla 11. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de redondez calculada para cada grupo de mitocondrias.

Conjunto de datos	Redondez				
	SARS-CoV-2			ZIKV	
	Delta	Ómicron	Control	Infectadas	Control
<b>CCC Lin</b>	0.92	0.95	0.93	0.97	0.96
<b>Límite inferior</b>	0.87	0.93	0.91	0.95	0.95
<b>Límite superior</b>	0.95	0.96	0.95	0.98	0.97

Tabla 12. Coeficiente de correlación de concordancia de Lin, límite superior e inferior para la métrica de foco calculada para cada grupo de mitocondrias.

Conjunto de datos	Foco				
	SARS-CoV-2			ZIKV	
	Delta	Ómicron	Control	Infectadas	Control
<b>CCC Lin</b>	0.96	0.97	0.97	0.97	0.96
<b>Límite inferior</b>	0.93	0.96	0.96	0.96	0.94
<b>Límite superior</b>	0.97	0.98	0.97	0.98	0.97

#### 5.4.2 Índice de similitud DICE

Con el fin de evaluar las segmentaciones realizadas de forma automática de las micrografías completas, se calculó el índice DICE para ambos conjuntos de datos. La Tabla 13 y 14 muestran la media obtenida para cada grupo de micrografías, su desviación estándar y los índices máximos y mínimos encontrados. También se graficó un histograma para diversos valores de índice DICE, con rangos entre 0.09 y 0.99 (ver Fig. 49 y 52) donde se observa que la mayoría de las segmentaciones presentan una similitud arriba del 90%.

Esto indica que, de forma global, en cada micrografía, la segmentación automática cuantitativamente es muy similar a las segmentaciones realizadas de forma manual, a pesar de que hay algunas mitocondrias que aparecen unidas.

Tabla 13. Valores obtenidos para el conjunto de micrografías control e infectadas con variantes de SARS-CoV-2.

Índice DICE SARS-CoV-2	
<b>Media</b>	0.86
<b>Desviación estándar</b>	0.13
<b>Máximo</b>	0.96
<b>Mínimo</b>	0.09

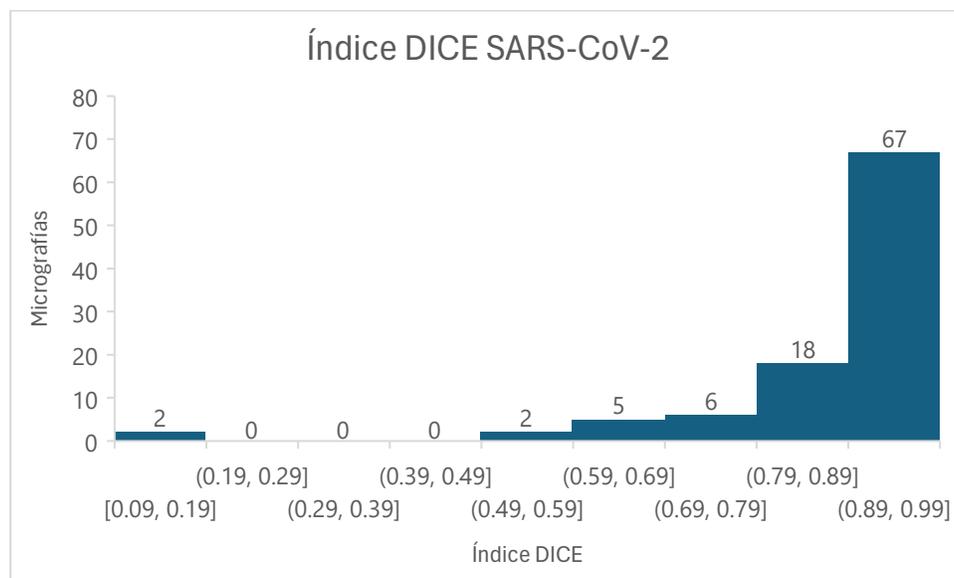


Fig. 49 Histograma de los índices obtenidos para cada micrografía de células control e infectadas con las variantes Delta y Ómicron.

Las Fig. 50 y 51 muestran ejemplos de las micrografías que obtuvieron el mejor y peor índice DICE para las células infectadas con SARS-CoV-2. En la Fig. 50a se pueden observar mitocondrias bien delimitadas y con un tono de gris distinto a la micrografía en general, lo cual permite realizar una mejor segmentación a diferencia de la Fig. 51a en la cual la mitocondria presenta una textura similar a otras partes de la micrografía, así como una tonalidad de gris similar en toda la imagen.

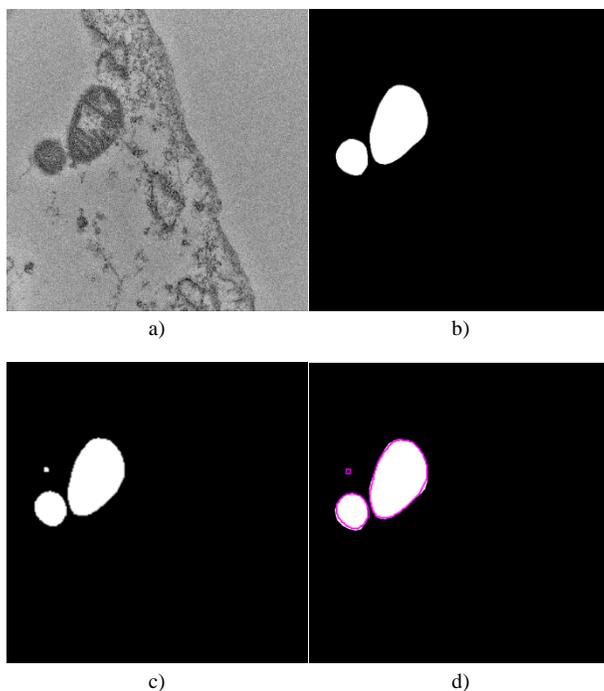


Fig. 50 Ejemplo de una segmentación con un alto índice DICE, obtenido de una micrografía Control; a) micrografía original, b) segmentación realizada manualmente, c) segmentación obtenida de forma automática, d) ambas máscaras superpuestas, en blanco la segmentación manual y en morado la segmentación obtenida automáticamente.

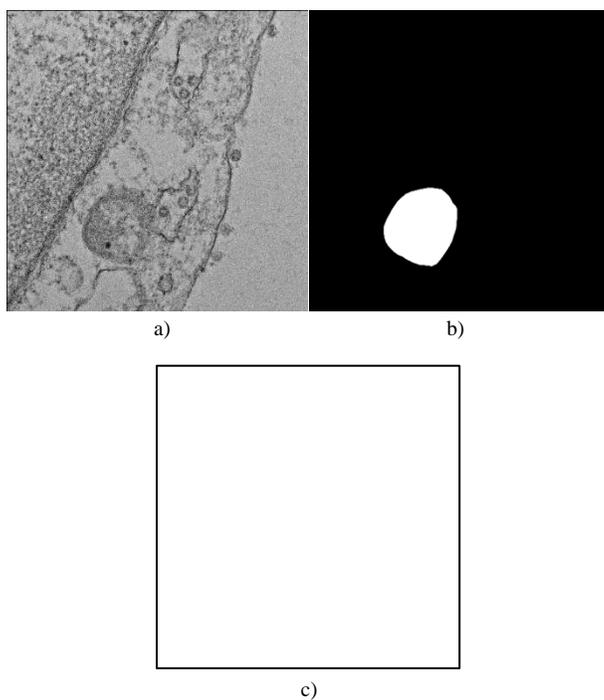


Fig. 51 Segmentación con el índice DICE más bajo, obtenido en una micrografía de una célula infectada con la variante DELTA; a) micrografía original, b) segmentación manual, c) segmentación automática la cual indica que todo es mitocondria, resultado de una micrografía que presenta una textura y tonalidad de gris similar en toda la imagen.

Tabla 14. Valores obtenidos para el conjunto de micrografías control e infectadas con ZIKV.

Índice DICE ZIKV	
<b>Media</b>	0.89
<b>Desviación estándar</b>	0.11
<b>Máximo</b>	0.98
<b>Mínimo</b>	0.35

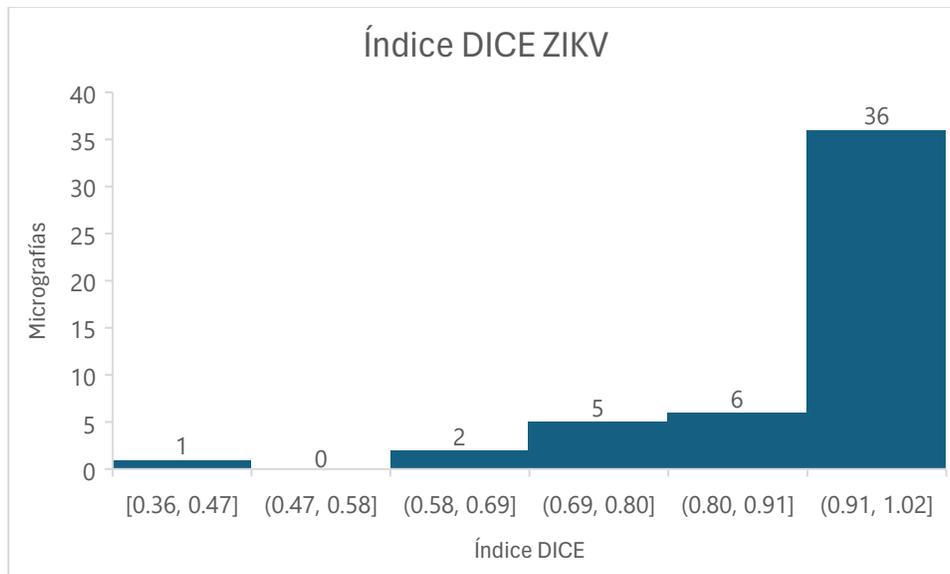


Fig. 52 Histograma de los índices obtenidos para cada micrografía de células control e infectadas con ZIKV.

En las Fig. 53 y 54 se presentan las segmentaciones con el máximo y mínimo índice DICE obtenido para células infectadas con ZIKV. La Fig. 53a muestra una célula infectada con el ZIKV donde se pueden observar las características de las mitocondrias, dando como resultado una buena segmentación de forma automática comparada con la Fig. 54a que presenta una micrografía con una textura y tonalidades de gris similares para toda la célula.

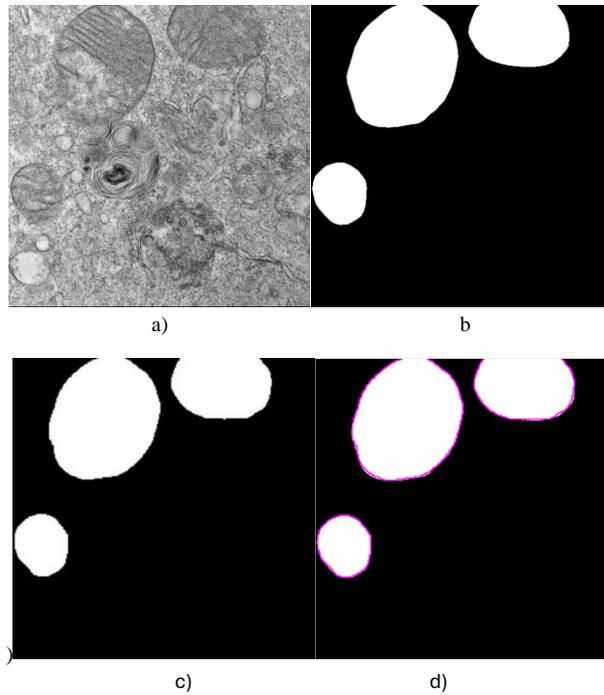


Fig. 53 Mejor segmentación obtenida de forma automática para células infectadas con ZIKV; a) micrografía original, b) segmentación manual, c) segmentación automática, d) segmentación manual y en morado el contorno de la segmentación obtenida de forma automática.

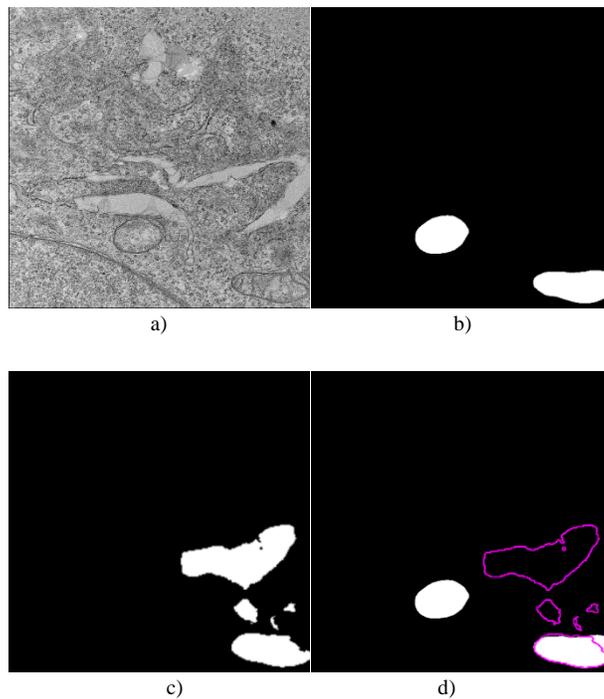


Fig. 54 Peor índice DICE obtenido en células infectadas con ZIKV; a) micrografía original, b) segmentación realizada de forma manual, c) segmentación obtenida de forma automática, d) contorno de la segmentación automática superpuesto a la segmentación manual.

Se presentaron dificultades al realizar la segmentación de forma automática debido a que las micrografías de SARS-CoV-2 mostraban mitocondrias con un daño considerable, incluso en el grupo Control. Esto se debe a que la línea celular Vero, utilizada para la infección, son células inmortalizadas. Además, las tonalidades de gris entre las mitocondrias y los demás organelos son similares, y la textura es parecida en toda la imagen. A diferencia del conjunto de datos de células infectadas con ZIKV donde las micrografías se seleccionaron bajo los criterios mencionados en la sección 4.2. Por lo tanto, podemos mejorar el rendimiento de nuestra red teniendo un protocolo bien establecido para el tipo de micrografías que se utilizan para entrenamiento de la red, permitiéndola conocer las características del organelo de interés de mejor forma.

El preprocesamiento con un filtro Gaussiano utilizando un  $\sigma=2$  mejoró considerablemente el proceso de la segmentación; al eliminar el ruido de la imagen y suavizarla permite que la red aprenda mejor las características de la mitocondria, consiguiendo resultados comparables a los obtenidos de forma manual por expertos, con un índice DICE con una media superior al 85% en cuanto a la similitud global de la segmentación.

A pesar de no tener una segmentación perfectamente delimitada para cada mitocondria, la Inteligencia Artificial (IA) pudo identificar mitocondrias sanas y dañadas, así como las mitocondrias de las cuales solo se observa una porción, obteniendo así una coincidencia de más del 80% del CCCLin para las métricas obtenidas de forma automática con respecto a las manuales. Esto es de gran importancia ya que disminuye considerablemente el tiempo de trabajo de meses a días, ya que la segmentación automática se lleva a cabo en aprox. 30seg de una micrografía, el tiempo que requerirá de forma manual va a depender de cuantas estructuras se encuentre en la imagen y de la experiencia del observador. De esta forma el experto puede identificar de forma más rápida mitocondrias dañadas, no únicamente las que se encuentran intactas y tomar métricas de forma automática para su posterior evaluación, además de poder entender de una forma más rápida la dinámica mitocondrial, para predecir la respuesta que se presenta a la infección y ahorrando tiempo para estudiar por otros medios si en efecto la predicción a la respuesta inmune es correcta.

Comprobando la utilidad de la herramienta con los datos obtenidos de forma automática mostrados en las Fig. 47 los cuales indican que efectivamente en las mitocondrias de células infectadas con ZIKV se presenta una respuesta de fisión como respuesta inmune, ya que se tiene un foco y AR bajo lo que nos habla de mitocondrias con una morfología más circular. Lo que es consistente con lo reportado en la literatura por Singh *et al.* [10]. Sin embargo, el efecto en las mitocondrias por la infección con las variantes *Delta* y *Ómicron*, fue diferente entre sí. Las métricas obtenidas indican que las mitocondrias infectadas con *Ómicron* presentan un proceso de fusión, al obtener un foco y AR más grande como se observa en la Fig. 44 lo que indica una elongación de la mitocondria, mientras que las células infectas con la variante *Delta* presentan un proceso de fisión mitocondrial. Estos resultados son novedosos ya que sugieren que esta línea celular tiene una respuesta inmune celular diferente para *Delta* y *Ómicron* algo que no se ha reportado previamente.

Estos resultados sugieren que la infección de astrocitos humanos con *ZIKV* y de células Vero con *SARS-CoV-2 Delta* resulta en una respuesta de citocinas pro-inflamatorias (principalmente *NK-kb*) la cual es consistente con una respuesta inmune potente asociada a una enfermedad mucho más grave. Es decir, una infección que resulta en una respuesta de citocinas proinflamatorias que genera un daño o efecto patológico más fuerte en el individuo infectado que cuando se estimula la respuesta de IFN. De hecho, la infección de células Vero con *SARS-CoV-2 Ómicron* sugiere que este virus genera una respuesta de tipo IFN. Esto es consistente con el hecho de que, aunque muchas más personas se infectaron con *SARS-CoV-2 Ómicron* que *Delta* la letalidad de *Ómicron* fue mucho menor. De hecho, esta observación es muy interesante ya que no es claro que la baja letalidad de *Ómicron* comparada con *Delta* se debe a la tasa de vacunación cuando ocurrió la ola de infecciones predominadas por *Ómicron*, o si se debe a que la infección por *Ómicron* es mucho menos patogénica que *Delta*, o ambas situaciones. Si bien nuestro estudio no puede determinar el efecto de la vacunación o infecciones previas en el desarrollo de *COVID-19* severo, el análisis tanto manual como por IA de la morfología mitocondrial apoya la hipótesis de que *SARS-CoV-2 Ómicron* es una cepa atenuada que causa una reacción inmune que no es pro-inflamatoria como *Delta*, por lo que la enfermedad es mucho menos grave que en pacientes infectados con *SARS-CoV-2 Delta*. Además, el hecho de que la respuesta de los astrocitos humanos infectados con el *ZIKV* sea pro-inflamatoria es consistente con el daño al sistema nervioso central que se observa tanto en fetos (i.e., microcefalia) como en adultos (i.e., Síndrome de Guillián-Barré).

En el presente trabajo se desarrolló una herramienta para el análisis de micrografías de TEM, basada en técnicas de AP para la segmentación y caracterización de mitocondrias de células infectadas con diferentes variantes del SARS-CoV-2 y el ZIKV.

Los resultados obtenidos por nuestra red fueron altamente satisfactorios, permitiendo la identificación, segmentación y análisis automático de las mitocondrias con una precisión superior al 85%. Esta herramienta podría significar una notable reducción en el tiempo de trabajo y minimiza la subjetividad en los estudios de arquitectura celular mediante micrografías de TEM. Además, sería posible un análisis más rápido de la respuesta inmune ante virus, al permitir la observación tanto de mitocondrias intactas como dañadas, eliminando posibles sesgos en los resultados.

Inicialmente, la falta de un protocolo estandarizado para la adquisición de imágenes afectó el rendimiento de la red. Sin embargo, implementar un filtro Gaussiano como parte del pre-procesamiento fue fundamental para mejorar el entrenamiento de la red. Este filtro suavizó las imágenes y redujo el ruido, optimizando así la capacidad de la red para identificar con precisión las estructuras mitocondriales en las micrografías.

En conclusión, nuestra herramienta basada en IA representa un avance significativo para la investigación, facilitando estudios sobre la remodelación mitocondrial en contextos de infección viral, con implicaciones importantes para entender mejor las respuestas celulares ante patógenos emergentes como el SARS-CoV-2 y el ZIKV.

### **7.1 Trabajo a futuro**

Debido a que no se pudieron obtener métricas de forma automática de todas las mitocondrias segmentadas ya que por su cercanía se encuentran unidas, se buscará generar un programa que nos permita segregarlas para, de esta forma, tener el 100% de métricas de forma automática.

Tratando de evitar los problemas que se presentaron durante la realización de este proyecto, se analizarán los datos obtenidos hasta el momento para establecer un protocolo con los mejores parámetros para la toma de micrografías para lograr el mejor desempeño de la red. También se buscará realizar una clasificación con base en el daño mitocondrial de forma automática.

Ya que se obtuvieron buenos resultados con la segmentación y análisis de mitocondrias, se probará el desempeño de la herramienta con otros organelos que sean de interés para la investigación. Además, que para este proyecto se trabajó con la estructura U-Net ya que ha reportado un buen resultado para la segmentación semántica de imágenes, sin embargo, se plantea modificar su arquitectura, o utilizar otras metodologías de AP en el estado del arte como Transfer Learning, buscando obtener un mejor desempeño en la segmentación.

---

*Referencias bibliográficas*

---

- [1] Romero-Brey, I. and R. Bartenschlager, Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses*, 2014. 6(7): p. 2826-57.  
<https://doi.org/10.3390/v6072826>
- [2] Lara-Hernandez, I., Muñoz-Escalante, J. C., Bernal-Silva, S., Noyola, D. E., Wong-Chew, R. M., Comas-García, A., & Comas-García, M. (2023). Ultrastructural and functional characterization of mitochondrial dynamics induced by human respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells. *Viruses*, 15(7), 1518.  
<https://doi.org/10.3390/v15071518>
- [3] Romero-Brey, I., et al., Three-dimensional architecture and biogénesis of membran structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog*, 2012. 8(12): p. e1003056.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>
- [4] Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100–1115.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- [5] Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*, 9(3), e13952.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13952>
- [6] Fan, Y., Li, X., Zhang, L. et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 7, 141 (2022).  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00997-x>
- [7] Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- [8] Bhat, E. A., Ali, T., Sajjad, N., Kumar, R., & Bron, P. (2023). Insights into the structure, functional perspective, and pathogenesis of ZIKV: an updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 165(115175), 115175.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115175>
- [9] Mitochondria. (n.d.). *Genome.gov*. Retrieved April 2024, from <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Mitochondria>
- [10] Singh, S., Dirani, K., & Kumar, A. (2022). Intricacy of mitochondrial dynamics and antiviral response during RNA virus infection. *Frontiers in Virology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fviro.2022.918806>
- [11] West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 11(6), 389–402.

<https://doi.org/10.1038/nri2975>

[12] Aswath, A., Alshahaf, A., Giepmans, B. N. G., & Azzopardi, G. (2023). Segmentation in large-scale cellular electron microscopy with deep learning: A literature survey. *Medical Image Analysis*, 89(102920), 102920.

<https://doi.org/10.1016/j.media.2023.102920>

[13] Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). (n.d.). Ual.es. Retrieved April 2024, [https://www.ual.es/universidad/serviciosgenerales/stecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-transmision?idioma=es\\_ES](https://www.ual.es/universidad/serviciosgenerales/stecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-transmision?idioma=es_ES)

[14] 8.2: Microscopía Electrónica de Transmisión. (2022, October 30). LibreTexts Español; [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica\\_Anal%C3%ADtica/M%C3%A9todos\\_F%C3%ADsicos\\_en\\_Qu%C3%ADmica\\_y\\_Nano\\_Ciencia\\_\(Barron\)/08%3A\\_Estructura\\_en\\_la\\_Escala\\_Nano/8.02%3A\\_Microscop%C3%ADa\\_Electr%C3%B3nica\\_de\\_Transmisi%C3%B3n](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/M%C3%A9todos_F%C3%ADsicos_en_Qu%C3%ADmica_y_Nano_Ciencia_(Barron)/08%3A_Estructura_en_la_Escala_Nano/8.02%3A_Microscop%C3%ADa_Electr%C3%B3nica_de_Transmisi%C3%B3n)

[15] Heinrich, L., Bennett, D., Ackerman, D. et al. Segmentación de orgánulos de células enteras en microscopía electrónica de volumen. *Nature* 599, 141–146 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03977-3>

[16] Aswath, A., Alshahaf, A., Giepmans, B. N. G., & Azzopardi, G. (2023). Segmentation in large-scale cellular electron microscopy with deep learning: A literature survey. *Medical Image Analysis*, 89(102920), 102920.

<https://doi.org/10.1016/j.media.2023.102920>

[17] Rey, J. S., Li, W., Bryer, A. J., Beatson, H., Lantz, C., Engelman, A. N., & Perilla, J. R. (2021). Deep-learning in situ classification of HIV-1 virion morphology. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 5688–5700.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.001>

[18] Guay, M.D., Emam, Z.A.S., Anderson, A.B. et al. Segmentación celular densa para EM utilizando conjuntos de redes neuronales 2D-3D. *Sci Rep* 11, 2561 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81590-0>

[19] Zahedi, A., On, V., Phandthong, R. et al. Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning. *Sci Rep* 8, 16354 (2018).

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34455-y>

[20] Conrad, R., & Narayan, K. (2023). Instance segmentation of mitochondria in electron microscopy images with a generalist deep learning model trained on a diverse dataset. *Cell Systems*, 14(1), 58-71.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.12.006>

[21] Schrage, M., Rus, M.-A., Niessen, M., Burgoyne, T., Pinto, A., & Lau, K. (2023). Automated segmentation of mitochondria in virus-infected cells using deep learning models. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of*

America, *Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 29 (Supplement\_1), 979–981.

<https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.490>

[22] Harcourt, J., Tamin, A., Lu, X., Kamili, S., Sakthivel, S., & Murray, J. (2020). Severe acute respiratory síndrome Coronavirus from patient with 2019 novel Coronavirus disease. *Emerg Infect Dis.*, 26(6), 1266-73.

[23] Nagashima, K., Tobin, G. J., & Gonda, M. A. (1996). Immunologic and Ultrastructural Characterization of HIV Oseudovirions Containing Gag and Env Precursor Proteins Engineered in Insect Cells. *Methods*. 10(2), 208-218.

doi: 10.1006/meth.1996.0096.

[24] Villa A, Snyder EY, Vescovi A, Martínez-Serrano A. Establecimiento y propiedades de una línea de células madre neurales perpetuas dependientes de factores de crecimiento del SNC humano. *Neurología Experimental*. 2000; 161(1):67–84. pmid:10683274

[25] Rubio-Hernández, E. I., Comas-García, M., Coronado-Ipiña, M. A., Colunga-Saucedo, M., González Sánchez, H. M., & Castillo, C. G. (2023). Astrocytes derived from neural progenitor cells are susceptible to Zika virus infection. *PloS One*, 18(3), e0283429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283429>

[26] Lam, J., Katti, P., Biete, M., Mungai, M., AshShareef, S., Neikirk, K., Garza Lopez, E., Vue, Z., Christensen, T. A., Beasley, H. K., Rodman, T. A., Murray, S. A., Salisbury, J. L., Glancy, B., Shao, J., Pereira, R. O., Abel, E. D., & Hinton, A., Jr (2021). A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells*, 10(9), 2177. <https://doi.org/10.3390/cells10092177>

[27] Calvo, D. (2017, July 20). *Red Neuronal Convolutional CNN*. Diego Calvo. <https://www.diegocalvo.es/red-neuronal-convolucional/>

[28] Ghosh, A., Sufian, A., Sultana, F., CHAKRABORTY, A. & De, D. (2019). Conceptos fundamentales de la red neuronal convolucional. *Biblioteca de referencia de sistemas inteligentes*, 172:519–567.

doi: 10.1007/978-3-030-32644-9\_36

[29] Lu, L., Wang, X., Carneiro, G., & Yang, L. (Eds.). (2019). *Deep learning and convolutional neural networks for medical imaging and clinical informatics*. Springer International Publishing.

[30] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, “U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation,” in *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*. Springer, 2015, 234–241. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1505.0...>

[31] Lawrence I-Kuei Lin (2000). A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 56, 324-325 (March).