

USO DA FERRAMENTA DEEPLABCUT PARA AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO ESPACIAL E RETENÇÃO DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS MUTANTES COM ALTERAÇÕES NO SISTEMA VESTIBULAR

Pellagio, Nicolas Braga

Massironi, Silvia Maria Gomes

Mejia, Jorge

Mori, Cláudia Madalena Cabrera

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

e-mail: n.bragap@usp.br

Objetivos

Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica, bem como avaliar a aplicabilidade de softwares gratuitos, como o DeepLabCut (DLC) para análise de parâmetros comportamentais de camundongos mutantes.

Métodos e Procedimentos

Foram revisados artigos e sites referentes à softwares gratuitos e do software comercial EthoVision® XT (Noldus, Wageningen, Netherlands) usados para análise de parâmetros comportamentais de animais de laboratório, em especial camundongos. Também foram testados alguns dos softwares para comparação dos resultados com os resultados obtidos com o EthoVision XT 15, além dos dados obtidos pelos softwares, também foram comparados a praticidade do uso, conhecimento prévio para usar corretamente e tempo de treino necessário para aprender a usar o software.

Os softwares testados foram: AnimalTracker, DLC e EthoWatcher. Todos foram instalados em um notebook Dell, modelo Inspiron 15z, CORE i7 e sistema operacional Microsoft Windows 10. Os vídeos utilizados foram

gravados em um experimento anterior do labirinto de barnes.

Resultados

O EthoVision XT é um software comercial que foi desenvolvido para análise de comportamento de animais de laboratório, tanto em tempo real quanto por vídeos gravados. Ele funciona de forma automática fracionando os vídeos em frames e binarizando eles em uma escala de cinza para diferenciar o animal do fundo (base do labirinto, por exemplo) ou através da saturação de cores no espectro RGB (RED, GREEN and BLUE), permitindo que o rastreamento do animal seja pelo seu centro de gravidade, que foi a forma considerada neste estudo, ou por marcações coloridas nos animais. Esse programa conta com uma gama de configurações pré-definidas para diversos tipos de labirintos e modelos animais, mas também existe a possibilidade de personalizar todo o experimento e mesmo as configurações pré-definidas não são fixas, permitindo que o pesquisador às ajuste de acordo com as suas necessidades. O layout pouco intuitivo do programa não é muito amigável para o usuário iniciante, mas após algumas horas e tentativas é possível utilizar o programa sem problemas; aliado com o suporte

dado pela Noldus e com o manual disponibilizado junto do software, torna-se relativamente fácil aprender a usá-lo. Assim, com o design da arena, configurações de detecção do animal e de parâmetros a serem obtidos totalmente personalizáveis, o EthoVision é uma excelente ferramenta para a análise automatizada do comportamento de camundongos. Algumas desvantagens desse programa são o alto custo de aquisição, que fica ainda mais elevado caso seja realizada uma forma de análise mais específica, em que é necessária a aquisição de pacotes de dados, as novas versões não são atualizadas gratuitamente e exige um computador com um processador i7 e um hard disk (HD) de 1TB para que o programa seja executado adequadamente.

O DeepLabCut é um software desenvolvido por Mathis, M. W. et. al. na plataforma Anaconda que usa Python como linguagem de programação. Esse programa utiliza a rede neuronal DeeperCut e é totalmente gratuito. Assim como o EthoVision, ele funciona fragmentando o vídeo em frames que ele usa para aprender a reconhecer o animal, sua vantagem em relação ao EthoVision XT nesse aspecto é que ele permite a identificação de infinitos pontos no animal, sendo possível análises tanto em 2D quanto em 3D, porém esse processo é semi-automático, uma vez que é necessário programar o DLC para fragmentar os vídeos e após a fragmentação é necessário marcar manualmente os pontos em cada amostra de frames. A análise dos vídeos e a obtenção de dados é feita de forma automática, porém assim como na etapa anterior é necessário programar a análise. Em especial a primeira vez que a análise é feita (caso seu computador não possua uma unidade de processamento gráfico (GPU)), leva cerca de uma semana para ser concluída, pois o DLC necessita criar uma rede neuronal para conseguir analisar os vídeos e esse processo é feito no Google Colaboratory que permite escrever e executar Python no navegador. No entanto, o Google Colab possui um limite de horas que pode ser usado gratuitamente e que aumenta a quantidade de passos necessários e a programação necessária para se conseguir analisar os dados. Os dados obtidos são brutos e em coordenadas de X e Y e necessitam de um outro programa para serem processados em parâmetros, uma vez feito isso os dados

obtidos são precisos e completos, permitindo análises detalhadas do comportamento de camundongos mutantes. Assim é um programa excelente em termos de dados obtidos e de possibilidades de análise, mas a necessidade de conhecimento prévio de programação em Python torna a utilização limitada e pouco prática, uma vez que a dificuldade de uso é alta e necessita da constante assistência de um colaborador especializado em programação em Python.

O EthoWatcher é um software que foi desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina. O programa funciona de forma semelhante ao EthoVision, porém ele faz a análise subtraindo o fundo dos frames analisados. Sua plataforma é amigável com o usuário e extremamente intuitiva, usando um sistema passo a passo que só permite avançar quando a etapa é concluída. No entanto, esse programa só processa vídeos no formato .AVI, necessitando que o vídeo esteja compactado no formato chamado de MPEG-2. O conversor sugerido pelos desenvolvedores não reconhece alguns vídeos, mesmo eles já estando no formato .AVI, por esse motivo os desenvolvedores foram contactados para suporte, porém nenhuma resposta foi obtida, o que tornou esse programa inutilizável e impossibilitou a comparação.

O AnimalTracker é um plugin do software ImageJ e usando as próprias ferramentas do ImageJ tanto para processamento de imagem quanto para análise de dados. Esse software consegue analisar e fornecer alguns parâmetros como: distância percorrida, trajetória do animal, velocidade média e tempo médio de imobilidade, seu funcionamento é semelhante ao EthoVision, realizando a binarização em escalas de cinza de frames dos vídeos e ele também remove o fundo dos vídeos. Além disso, o AnimalTracker permite a personalização da arena a ser analisada e alterações nos parâmetros, porém estas necessitam de conhecimentos específicos de programação. Neste caso o que impossibilitou a análise foi o ImageJ que só processa vídeos em .AVI e mesmo usando dois conversores diferentes, ele apresentou erro ao reconhecer os vídeos, mas como demonstrado por Gulyás, M. et. al., os resultados são precisos e satisfatórios, além de ser um programa fácil de usar e contar com alguns modelos de configuração de arena.

O software Mouse Behavior Tracker desenvolvido por Tungstur, S. K. et. al, é uma junção do plugin wrMTrck (ou worm track) com o ImageJ e assim como nos outros softwares é feita a conversão dos vídeos para uma escala de cinza e é feita a binarização das imagens removendo o fundo dos frames analisados. Alguns filtros também foram usados para reduzir ruídos, como borrões das imagens. Assim os vídeos foram analisados e como relatado por Tungstur, S. K. et. al., os resultados foram muito próximos aos do EthoVision XT, com uma relação entre os programas de $0,98 \pm 0,03$, para um grupo de 6 camundongos da linhagem C57BL/6.

Conclusões

Com a revisão de literatura sobre os softwares apresentados, concluímos que cada software apresenta suas vantagens e desvantagens. Todos apresentam bons resultados, permitindo o uso na pesquisa de comportamento de camundongos e análises estatísticas mais profundas. Uma das vantagens dos softwares apresentados é a sua disponibilidade gratuita, em comparação com o EthoVision que possui um alto custo. Já no quesito facilidade de uso e layout da plataforma, o AnimalTracker e o EthoWatcher se destacam, em comparação com os demais que exigem maior tempo e dedicação para se aprender a utilizar, sendo o mais difícil nesse quesito o DeepLabCut. Todos apresentam ótimas personalizações das áreas de interesse do labirinto a ser analisado e dos resultados, com exceção do AnimalTracker que é necessário ter um certo grau de conhecimento em programação para personalizar os parâmetros avaliados. Todos também reconhecem com facilidade os animais e conseguem manter o rastreamento durante todo o experimento com o mínimo de perdas. Quanto às exigências de hardware o EthoVision XT e o DLC apresentam desvantagem já que é necessário um computador mais potente para que eles funcionem bem, mas o DLC contorna esse problema com o uso do Google Colaboratory. E quanto à possibilidade de análise e aprofundamento dos dados, o DLC se sobressai por permitir análises em 3D e de partes específicas do corpo do animal, enquanto os demais realizam apenas análises em 2D. Por tanto, o uso de um ou mais desses programas vai depender do objetivo do estudo,

bem como da disponibilidade financeira e de pessoal no laboratório. Existindo um software que melhor se encaixa em cada cenário.

Referências Bibliográficas

- wrMTrck [plugin]. In: phage [homepage of Jesper Søndergaard Pedersen]. [S. l.], [201-]. Disponível em: <http://www.phage.dk/plugins/wrmtrck.html>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- EthoVision XT [software]. In: phage [Animal Behavior Research of Noldus]. Disponível em: noldus.com/ethovision-xt. Acesso em: 15 ago. 2022.
- AnimalTracker [plugin]. In: phage [homepage of AnimalTracker]. Disponível em: <http://animaltracker.elte.hu/>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- EthoWatcher [software]. In: phage [homepage of EthoWatcher]. Disponível em: <https://ethowatcher.paginas.ufsc.br/>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- TUNGSTUR, S. K., NISHIMUNE, N., NISHIMUNE, H., RADEL, J.; Mouse Behavior Tracker: An economical method for tracking behavior in home cages. *Biotechniques*, 63(5): 215–220, 2018.
- BROOKS, D. S., et. al.; 2016. Optimization of wrMTrck to monitor Drosophila larval locomotor activity. *Elsevier, Journal of Insect Physiology*, 93-94 (2016) 11-17, 2016.
- SELVARAJ, V., VENKATASUBRAMANIAN, H., SANTHAKUMAR, K., ILANGO, K. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish. *Elsevier, Journal of Neuroscience Methods*, 320 (2019) 16-25, 2019.
- SELVARAJ, V., SANTHAKUMAR, K. Analyzing Locomotor Activity in Zebrafish Larvae Using wrMTrck. *TechnoFish-Metod*, vol. 00, number 00, 2017
- GULYÁS, M. et. al.; 2016. AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behavior Analyser Program. *Neuroinform* (2016) 14:479–481, 2016.
- JUNIOR, C. F. C., et. al.; 2012. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavior and video-tracking analysis in laboratory animals. *Elsevier, Computers in Biology and Medicine*, 42 (2012) 257-264, 2012.
- MATHYS, M. W. et. al.; 2019. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation

across species and behaviors. Nature Protocols, vol. 14, 2152-2176, 2019.

NOLDUS, L. P. J. J., SPINK, A. J., TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers, 33 (3), 398-414, 2001.

USE OF THE DEEPLABCUT TOOL FOR ASSESSMENT OF SPATIAL LEARNING AND MEMORY RETENTION IN MUTANTS MICE WITH ALTERATIONS IN THE VESTIBULAR SYSTEM

Pellagio, Nicolás Braga

Massironi, Silvia Maria Gomes

Mejia, Jorge

Mori, Cláudia Madalena Cabrera

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

e-mail: n.bragap@usp.br

Objectives

This study aimed to carry out a literature review, as well as to evaluate the applicability of free software, such as DeepLabCut (DLC) for the analysis of behavioral parameters of mutant mice.

Materials and Methods

Articles and websites referring to free software and the commercial software EthoVision® XT (Noldus, Wageningen, Netherlands) used to analyze behavioral parameters of laboratory animals, especially mice, were reviewed. Some of the software were also tested to compare the results with the results obtained with the EthoVision XT 15, in addition to the data obtained by the software, the practicality of use, prior knowledge to use it correctly and the training time needed to learn to use the software were also compared.

The tested software were: AnimalTracker, DLC and EthoWatcher. All were installed on a Dell notebook, model Inspiron 15z, CORE i7 and Microsoft Windows 10 operating system. The videos used were recorded in a previous experiment of the Barnes Maze.

Results

EthoVision XT is a commercial software that was developed for analyzing the behavior of laboratory animals, both in real time and by recorded video. It works automatically by dividing the videos into frames and binarizing them in a grayscale to differentiate the animal from the background (base of the maze, for example) or through color saturation in the RGB spectrum (RED, GREEN and BLUE), allowing that the tracking of the animal by its center of gravity, which was the way considered in this study, or by colored markings on the animals. This program has a range of predefined configurations for different types of mazes and animal models, but there is also the possibility to customize the entire experiment and even the predefined configurations are not fixed, allowing the researcher to adjust them according to your needs. The program's unintuitive layout is not very friendly for the novice user, but after a few hours and attempts it is possible to use the program without problems; combined with the support provided by Noldus and the manual provided with the software, it becomes relatively easy to learn how to use it. Thus, with the arena design, animal detection settings and parameters to be obtained fully customizable, EthoVision is an excellent tool for automated analysis of mouse

behavior. Some disadvantages of this program are the high acquisition cost, which is even higher if a more specific form of analysis is performed, in which the acquisition of data packages is necessary, the new versions are not updated for free and it requires a computer with a i7 processor and a 1TB hard disk (HD) for the program to run properly.

DeepLabCut is a software developed by Mathis, M. W. et. al. on the Anaconda platform that uses Python as its programming language. This program uses the DeeperCut neural network and is completely free. Like EthoVision, it works by fragmenting the video into frames that it uses to learn to recognize the animal, its advantage over EthoVision XT in this aspect is that it allows the identification of infinite points on the animal, making it possible to analyze both in 2D and in 3D, however this process is semi-automatic, since it is necessary to program the DLC to fragment the videos and after the fragmentation it is necessary to manually mark the points in each sample of frames. Video analysis and data collection is done automatically, however, as in the previous step, it is necessary to program the analysis. Especially the first time the analysis is performed (if your computer does not have a graphics processing unit (GPU)), it takes about a week to complete, as the DLC needs to create a neural network to be able to analyze the videos and this process is done in Google Collaboratory which allows you to write and run Python in the browser. However, Google Colab has a limit of hours that can be used for free and that increases the number of steps needed and the programming needed to be able to analyze the data. The data obtained are raw and in X and Y coordinates and require another program to be processed into parameters, once this is done, the data obtained are accurate and complete, allowing detailed analysis of the behavior of mutant mice. Thus, it is an excellent program in terms of data obtained and possibilities of analysis, the need for prior knowledge of Python programming makes its use limited and impractical, since the difficulty of use is high and requires the constant assistance of a contributor specialized in Python programming.

EthoWatcher is a software that was developed at the Federal University of Santa Catarina. The program works similarly to EthoVision, but it does the analysis by subtracting the

background from the analyzed frames. Its platform is user-friendly and extremely intuitive, using a step-by-step system that only allows you to proceed when the step is completed. However, this program only processes videos in .AVI format, requiring the video to be compressed in a format called MPEG-2. The converter suggested by the developers does not recognize some videos, even though they are already in .AVI format, for this reason the developers were contacted for support, but no response was obtained, which made this program unusable and impossible to compare.

AnimalTracker is a plugin to the ImageJ software and uses ImageJ's own tools for both image processing and data analysis. This software is able to analyze and provide some parameters such as: distance traveled, animal trajectory, average speed and average immobility time, its operation is similar to EthoVision, performing the grayscale binarization of video frames and it also removes the background of videos. In addition, AnimalTracker allows customization of the arena to be analyzed and changes in parameters, however these require specific programming knowledge. In this case, what made the analysis impossible was ImageJ, which only processes .AVI videos and even using two different converters, it presented an error when recognizing the videos, but as shown by Gulyás, M. et. al., the results are accurate and satisfactory, in addition to being an easy-to-use program and having some arena configuration models.

The Mouse Behavior Tracker software developed by Tungstur, S. K. et. al, is a combination of the wrMTrck plugin (or worm track) with ImageJ and, as in other software, the videos are converted to grayscale and the images are binarized, removing the background of the analyzed frames. Some filters were also used to reduce noise, such as image blur. So the videos were analyzed and as reported by Tungstur, S. K. et. al., the results were very close to those of EthoVision XT, with a relationship between programs of 0.98 ± 0.03 , for a group of 6 mice of the C57BL/6 strain.

Conclusions

With the literature review on the software presented, we concluded that each software has its advantages and disadvantages. All

show good results, allowing use in mouse behavior research and deeper statistical analysis. One of the advantages of the presented software is its free availability, compared to EthoVision, which has a high cost. In terms of ease of use and platform layout, AnimalTracker and EthoWatcher stand out, compared to others that require more time and dedication to learn to use, being the most difficult in this regard DeepLabCut. All of them have great customizations of the areas of interest of the maze to be analyzed and the results, with the exception of AnimalTracker, which requires a certain degree of programming knowledge to customize the evaluated parameters. All also easily recognize the animals and manage to keep track throughout the experiment with minimal losses. As for the hardware requirements, the EthoVision XT and the DLC have a disadvantage since a more powerful computer is needed for them to work well, but the DLC gets around this problem with the use of Google Colaboratory. And as for the possibility of analyzing and deepening the data, the DLC stands out for allowing analysis in 3D and of specific parts of the animal's body, while the others only perform 2D analysis. Therefore, the use of one or more of these programs will depend on the objective of the study, as well as the financial and personnel availability in the laboratory. Having a software that best fits each scenario.

References

wrMTck [plugin]. *In*: phage [homepage of Jesper Søndergaard Pedersen]. [S. l.], [201-]. Disponível em: <http://www.phage.dk/plugins/wrmtrck.html>. Acesso em: 10 ago. 2022.

EthoVision XT [software]. *In*: phage [Animal Behavior Research of Noldus]. Disponível em: noldus.com/ethovision-xt. Acesso em: 15 ago. 2022.

AnimalTracker [plugin]. *In*: phage [homepage of AnimalTracker]. Disponível em: <http://animaltracker.elte.hu/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

EthoWatcher [software]. *In*: phage [homepage of EthoWatcher]. Disponível em: <https://ethowatcher.paginas.ufsc.br/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

TUNGTUR, S. K., NISHIMUNE, N., NISHIMUNE, H., RADEL, J.; Mouse Behavior

Tracker: An economical method for tracking behavior in home cages. *Biotechniques*, 63(5): 215–220, 2018.

BROOKS, D. S., et. al.; 2016. Optimization of wrMTck to monitor *Drosophila* larval locomotor activity. *Elsevier, Journal of Insect Physiology*, 93-94 (2016) 11-17, 2016.

SELVARAJ, V., VENKATASUBRAMANIAN, H., SANTHAKUMAR, K., ILANGO, K. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish. *Elsevier, Journal of Neuroscience Methods*, 320 (2019) 16-25, 2019.

SELVARAJ, V., SANTHAKUMAR, K. Analyzing Locomotor Activity in Zebrafish Larvae Using wrMTck. *TechnoFish-Metod*, vol. 00, number 00, 2017

GULYÁS, M. et. al.; 2016. AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behavior Analyser Program. *Neuroinform* (2016) 14:479–481, 2016.

JUNIOR, C. F. C., et. al.; 2012. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavior and video-tracking analysis in laboratory animals. *Elsevier, Computers in Biology and Medicine*, 42 (2012) 257-264, 2012.

MATHYS, M. W. et. al.; 2019. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nature Protocols*, vol. 14, 2152-2176, 2019.

NOLDUS, L. P. J. J., SPINK, A. J., TEGELBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 33 (3), 398-414, 2001.