

Alba Rodriguez Omenac

Algoritmo de inteligencia artificial para la cuantificación neuronal histológica en imágenes de la enfermedad de Parkinson

Proyecto de final de Grado
dirigido por Dr. Pere Ràfols Soler
dirigido por Dr. Miquel Vila Bover

Grado en Ingeniería Biomédica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2023

Agradecimientos

Antes de presentar este proyecto, me gustaría expresar mi gratitud a todos los grandes profesionales de VilaLAB que me ayudaron a conseguir mi objetivo durante estos meses, en especial, me gustaría agradecer al Dr. Miquel Vila por darme la oportunidad de trabajar de cerca con el tratamiento de imagen digital e inteligencia artificial en el campo de las neurociencias, lo cual me ha hecho darme cuenta de lo que quiero hacer en el futuro. Me gustaría agradecerle también la confianza que ha depositado en mí desde el primer momento y las cálidas e interesantes charlas que hemos tenido sobre el proyecto y las innovaciones que podríamos hacer en el futuro. Gracias, Miquel, por acompañarme durante esta etapa de mi carrera y por transmitirme ese interés por la neurología.

Además, quiero agradecer a la Dra. Thais Cuadros por ser la luz en medio de la nada. Gracias por ser tan paciente conmigo, por compartir sus técnicas y equipos de laboratorio y por ser una gran maestra. Su apoyo ha hecho que mi trabajo sea mucho más próspero y gratificante.

A Pere, por guiarme en cada paso de este proyecto, priorizando el trabajo bien hecho por encima de la cantidad de código escrito. Gracias por hacerme aprender a ser paciente y a ver como todo esfuerzo tiene su recompensa.

A mis padres y a mis abuelos, quienes siempre me han apoyado en cada decisión que he tomado a lo largo de mi vida. Todo lo que he conseguido es gracias a vosotros.

Resumen

La neurociencia es uno de los campos más atractivos a la hora de investigar debido a su constante evolución y complejidad, ya que el cerebro es uno de los mayores misterios de la ciencia. Centrándonos en el desarrollo de técnicas para que sea más fácil de entender, las nuevas tecnologías como la inteligencia artificial y el aprendizaje automático han sido de gran utilidad para obtener y gestionar grandes cantidades de datos. La información neuronal es uno de los campos donde se pueden aplicar.

Hasta ahora, las muestras histológicas siempre se han observado mediante microscopios, tanto ópticos como electrónicos, y se han obtenido fotografías de los cortes a través de ellos. Ahora, con los avances tecnológicos que siguen evolucionando, han surgido nuevas formas de poner a disposición estas muestras a través de aplicaciones cuyos programas están configurados para realizar ciertas técnicas de enfoque, magnificación, captura y procesado de imágenes para desarrollar estudios cada vez más precisos con un margen de pérdida de información y error casi nulo.

Este proyecto revela la generación desde cero de un algoritmo que utiliza inteligencia artificial (IA) para cuantificar neuronas, utilizando muestras de cerebro humano postmortem de pacientes con la enfermedad de Parkinson y controles sanos. El proceso comienza con la obtención de estos cerebros de animales y humanos para análisis histológicos e inmunohistoquímicos completos hasta cuantificaciones morfométricas basadas en IA utilizando el modelo *YOLOv8* de Ultralytics y un análisis de procesado de imagen. Esto supone un gran avance para el estudio ya que hasta ahora solo se habían configurado algoritmos de semicuantificación para una zona seleccionada de la muestra, que ahora será completamente prescindible gracias a la validación de este algoritmo.

Índice

1 Enfermedades Neurodegenerativas	5
1.1 Introducción a la enfermedad de Parkinson	5
1.2 Componentes neurológicos	7
1.3 Patogénesis y neuropatología	9
1.4 Etiología	12
1.5 Epidemiología	13
1.6 Tratamiento	14
1.7 Neuromelanina	16
1.8 Inteligencia Artificial y Machine Learning: aplicaciones a las enfermedades neurodegenerativas y a la enfermedad de Parkinson	19
2 Modelos humanos	22
3 Hipótesis y objetivos	22
4. Materiales y métodos	23
4.1 Anticuerpos	23
4.2 Tinción hematoxilina-eosina	24
4.3 Técnica inmunohistoquímica con parafina	26
4.4 Técnica inmunohistoquímica con muestras flotantes	32
4.5 Resultados inmunohistoquímicos	33
4.6 Análisis en software Aiforia Cloud e ImageJ	51
4.7 Procesado de imagen y algoritmo <i>YOLOv8</i>	55
5. Resultados del análisis en Python	61
6. Conclusiones	75
7. Referencias	77
8. Anexo	79

1 Enfermedades neurodegenerativas

Existen numerosas enfermedades que causan cambios tanto físicos como mentales en cuanto hay cambios neurológicos. Aquellas enfermedades relacionadas con trastornos neurológicos son conocidas como enfermedades neurodegenerativas.

Estas, según un estudio realizado por las Naciones Unidas, afectan a una de cada seis personas en todo el mundo y prevalece en hombres mayores de 60 años.

Entre ellas, destacan las siguientes enfermedades:

- Enfermedad de Alzheimer: es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente y principal causa de pérdida de memoria progresiva. Es frecuente en personas mayores de 65 años. Se caracteriza por cambios en el cerebro que posteriormente forman depósitos de ciertas proteínas. Estos hacen que el cerebro reduzca su tamaño y que las neuronas mueran.
- Enfermedad de Parkinson: enfermedad caracterizada principalmente por síntomas motores como el temblor. Dificulta la realización de tareas cotidianas como puede ser comer o beber. Afecta principalmente a hombres de la tercera edad, aunque se pueden llegar a manifestar los síntomas antes si ha habido algún traumatismo craneal previo.
- Enfermedad de Huntington: se trata de una enfermedad neurodegenerativa de carácter hereditario que se caracteriza por el desgaste de las células del cerebro. El diagnóstico sólo puede obtenerse mediante una prueba genética
- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA): enfermedad que afecta a la pérdida del control del aparato locomotor a causa de la deterioración progresiva de las neuronas motoras, que van desde el cerebro a la médula espinal y finalmente llegan a los músculos.

1.1 Introducción a la enfermedad de Parkinson

A medida que pasa el tiempo, percibimos cambios tanto físicos como mentales asociados a enfermedades que pueden limitar nuestro día a día, disminuir la calidad de vida e incluso terminar con ella.

Una de estas enfermedades es la enfermedad de Parkinson. Esta se caracteriza por presentar una serie de síntomas motores y no motores asociados a la degeneración neuronal crónica, provocando que quede una lesión irreparable en el sistema nervioso central.

La enfermedad de Parkinson fue descubierta el año 1817 por el médico James Parkinson. Actualmente es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer y es de causa idiopática. Se relaciona esta enfermedad por los síntomas más notorios, como puede ser el temblor, la inestabilidad, la rigidez y la agitación incontrolable, los cuales aparecen espontáneamente, pero se ha comprobado que la misma degeneración que produce la alteración del movimiento, también provoca pérdidas de memoria, de expresión y de atención.

La degeneración neuronal que se sufre cuando se padece esta enfermedad es debido al cúmulo de un pigmento marrón llamado neuromelanina (NM) en el interior de las neuronas dopaminérgicas con la edad, concretamente en la *substantia nigra (SN)* del cerebro, ubicada en el mesencéfalo y a la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy, los cuales no solo causan cambios a nivel estructural sino también a nivel funcional como puede ser la alteración de pensamiento, el estado de ánimo y la conducta [1].

Actualmente, esta enfermedad no tiene cura, pero hay tratamientos disponibles para reestructurar la dopamina estriatal y así evitar más pérdida a nivel neuronal.

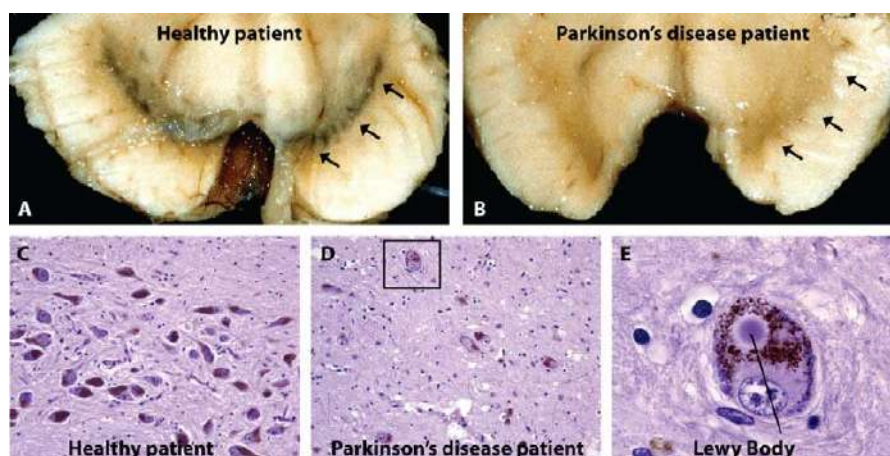


Figura 1 - Imagen comparativa entre cerebro de un paciente sano y uno con la enfermedad de Parkinson. (Liviú Aron - *Genetic analysis of dopaminergic neuron survival*)

Afecta principalmente a las personas mayores que se encuentran en un rango de 60 a 90 años. La incidencia de padecer esta enfermedad es de una de cada mil personas y no distingue entre sexos, razas, aunque varios estudios han demostrado que la padecen más hombres que mujeres.

En casos muy extremos, la enfermedad puede llegar a aparecer en una edad temprana debido a factores externos o mutaciones genéticas que han provocado cambios neuronales.

Aun así, existen ciertos factores de riesgo que pueden llegar a provocar la enfermedad, aunque su origen sea totalmente desconocido.

Estos factores son:

- Edad: se sabe con certeza que el proceso de envejecimiento está estrechamente relacionado con padecer la enfermedad puesto que es el principal factor de riesgo.
- Sexo: algunos estudios indican que suelen padecerla más hombres que mujeres, aunque no se debe obviar ya que sigue bajo investigación. Se cree que tiene relación con la producción de estrógenos sobre las neuronas

- dopaminérgicas ya que produce un efecto neuroprotector frente a la enfermedad.
- Genética: existen factores genéticos que pueden llegar a producir más neuromelanina en unos individuos que en otros, ya sea por mutaciones que han sufrido y han hecho que los niveles de este pigmento se disparan y se van acumulando en el interior de las neuronas.
 - Lesión cerebral o craneal: Un traumatismo fuerte o varios golpes en la cabeza pueden llegar a promover que los niveles de neuromelanina suban, llegando a desarrollar la enfermedad de Parkinson, sobretodo aquellos golpes que pueden llegar a hacer que el individuo pierda el conocimiento o sufra una lipotimia.
 - Área geográfica: Se sabe con certeza que los países más desarrollados tienen una esperanza de vida mayor, por lo tanto, aquellos tendrán un índice mayor de enfermos de Parkinson. También, aquellos lugares que contengan sustancias contaminadas para la ingesta, como puede ser el agua proveniente de pozos o incluso alimentos que contengan pesticidas tienen mayor tasa de sufrirla ya que pueden derivar a una inhibición de la dopamina y se eleva la cantidad de radicales libres [1].

1.2 Componentes neurológicos

El tejido cerebral comprende varios tipos celulares que forman su estructura tan compleja, entre ellos destacan la presencia de neuronas dopaminérgicas, microglia y astrocitos para comprender el funcionamiento y desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, su fisiología es más extensa.

Se conoce con exactitud que las neuronas son las principales portadoras y procesadoras de información. El cerebro comprende una cantidad de entre cien millones y un billón de neuronas. Estas tienen una forma redonda u ovalada con algunas prolongaciones filamentosas llamadas dendritas, las cuales permiten la transmisión de información entre neuronas a través de un proceso llamado sinapsis. En la sinapsis se produce un impulso eléctrico llamado potencial de acción que viaja a través de las dendritas de una neurona y llega a las dendritas de otra gracias a la liberación de neurotransmisores [2].

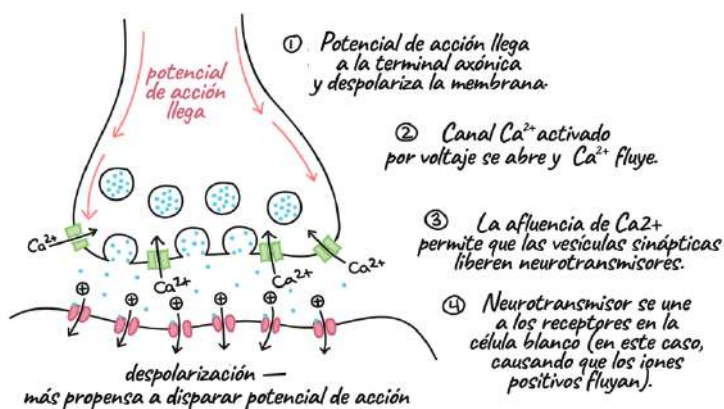


Figura 2 - Proceso de sinapsis neuronal (fuente: Khan Academy - La sinapsis)

Para comprender el rol que tienen las neuronas en las enfermedades neurodegenerativas, concretamente en la enfermedad de Parkinson, nos deberemos centrar en las neuronas dopaminérgicas.

Estas son un tipo de neurona en el sistema nervioso central que produce y libera dopamina [3], un neurotransmisor que desempeña un papel clave en el comportamiento motivado por la recompensa, el control motor y la regulación emocional. Estas neuronas se encuentran en varias regiones del cerebro, incluida la sustancia negra. La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra es una característica clave de la enfermedad de Parkinson y está asociada con los síntomas motores característicos de la enfermedad. Por el contrario, el aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas en la vía de la recompensa se asocia con los efectos de refuerzo de las drogas de abuso y otros comportamientos adictivos. El estudio de la función y disfunción de las neuronas dopaminérgicas es un área clave de investigación en neurociencia, con importantes implicaciones para el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos.

Las células gliales son un tipo de célula no neuronal del sistema nervioso central que brinda apoyo y protección a las neuronas. Hay varios tipos de células gliales, incluidos astrocitos, microglia y oligodendrocitos, cada uno con funciones específicas. En la enfermedad de Parkinson, se cree que las células gliales desempeñan un papel en la respuesta neuroinflamatoria y contribuyen a la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas [4]. Se están realizando investigaciones para comprender mejor la contribución de las células gliales a la enfermedad de Parkinson y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la disfunción de las células gliales.

Una aplicación interesante de la inteligencia artificial para la cuantificación neuronal en imágenes de la enfermedad de Parkinson es el uso de algoritmos de aprendizaje automático para identificar y segmentar células gliales en datos de neuroimagen. Estas técnicas se pueden utilizar para analizar grandes conjuntos de datos e identificar cambios sutiles en el número o la morfología de las células gliales, lo que brinda información sobre el papel de la glía en la enfermedad de Parkinson y los objetivos potenciales para la terapia [5].

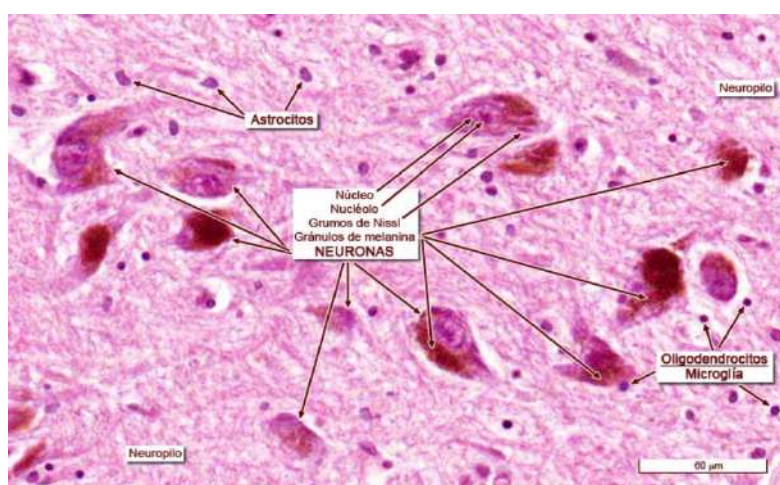


Figura 3 - Citoarquitectura de la sustancia negra donde se observan diferentes componentes neurológicos en una imagen con tinción hematoxilina-eosina.

1.3 Patogénesis y neuropatología

La enfermedad de Parkinson está generalmente caracterizada por el déficit del movimiento acompañado de otros síntomas no motores. Debido a la degeneración neuronal ocurrida en la substantia nigra, concretamente en la porción ventral del mesencéfalo, producida por la acumulación de neuromelanina [6] en neuronas dopaminérgicas, se producen alteraciones como la acinesia y la bradicinesia. También se debe a la presencia de cuerpos de Lewy e inclusiones intracelulares de alfa-sinucleína agregada. La causa exacta de la enfermedad de Parkinson no se sabe con certeza, pero se cree que involucra tanto factores genéticos como ambientales. Se ha propuesto que la patogénesis implica estrés oxidativo y nitrativo [7], excitotoxicidad, inflamación, disfunción mitocondrial, proteólisis alterada y disfunción en otros sistemas neuronales no dopaminérgicos. Investigaciones recientes también han implicado la disfunción de los astrocitos y la desregulación del microARN en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

Se conocen varios mecanismos relacionados con la patogénesis de esta enfermedad, entre los cuales destacan la acumulación de α -sinucleína, la disfunción mitocondrial o bien la neuroinflamación.

Los agregados de α -sinucleína en el cerebro no tienen una estructura terciaria definida como deberían tener la mayoría de proteínas pero eso puede cambiar dependiendo el medio en el que se encuentre. En la enfermedad de Parkinson, la α -sinucleína adopta una estructura tipo amiloide rica en láminas β que es propensa a agregarse. [6]

Recientes estudios en roedores sugieren que la forma oligomérica temprana de la proteína α -sinucleína es más neurotóxica que las fibrillas insolubles maduras, lo que se ha validado en basados en células. Las especies oligoméricas de α -sinucleína tienen la capacidad de acelerar la agregación anormal de proteínas y podrían ser el mecanismo subyacente a la propagación de la patología de la α -sinucleína en el cerebro.

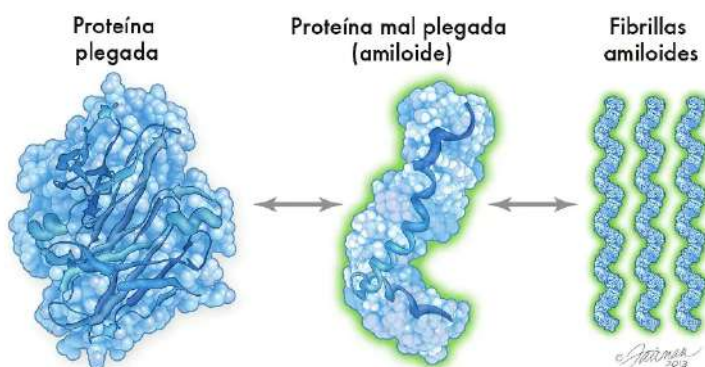


Figura 4 - Estructura amiloide correspondiente a la α -sinucleína (Fuente: Amiloidosis.es)

Se considera también que la disfunción de las mitocondrias es un aspecto clave en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (EP) tanto idiopática como hereditaria. Los primeros estudios post mortem en el cerebro de personas con Parkinson informaron una

deficiencia del complejo mitocondrial I [8], lo que proporcionó uno de los primeros vínculos directos entre la disfunción mitocondrial y la EP.

El abuso de sustancias como el MPTP, que se absorbe en las neuronas dopaminérgicas, también produce síntomas parkinsonianos y la inhibición del complejo mitocondrial I. Defectos en el complejo mitocondrial I pueden ser cruciales para impulsar la muerte de las células dopaminérgicas debido al agotamiento de la energía. Muchos de los genes conocidos que causan la EP familiar desempeñan un papel en la homeostasis mitocondrial. Finalmente, se sabe que la proteína α -sinucleína interfiere con la función mitocondrial y puede acumularse dentro de la membrana mitocondrial, lo que resulta en daños a la actividad del complejo I y aumenta el estrés oxidativo [9].

Además, los estudios post mortem en pacientes con enfermedad de Parkinson han descrito una activación microglial y del complemento, infiltración de linfocitos T y aumento de concentración de citoquinas proinflamatorias en el SNpc (Substantia Nigra pars compacta) y el cuerpo estriado en comparación con individuos sanos. Asimismo, la neuroimagen de tomografía por emisión de positrones ha demostrado una mayor activación microglial en pacientes con enfermedad de Parkinson al principio de la enfermedad en comparación con sujetos sanos. La inhibición de la activación microglial con minociclina antes y después del insulto neurotóxico condujo a una atenuación significativa de la muerte de células DA en el SNpc, lo que sugiere que los procesos inflamatorios pueden estar contribuyendo a la degeneración de estas células. Además, hay una gran cantidad de evidencia que sugiere que la proteína α -sinucleína puede desencadenar directamente la activación microglial e iniciar procesos inflamatorios. También hay evidencia genética que sugiere que la activación inmunitaria podría contribuir etiológicamente a la enfermedad de Parkinson. Finalmente, datos recientes han demostrado que en pacientes con enfermedad de Parkinson, un perfil de marcadores inmunitarios más proinflamatorio en el suero se asocia con una progresión más rápida de los síntomas motores y una función cognitiva más deteriorada.

Además de los mencionados anteriormente, existen otros sistemas que también intervienen en la patogénesis de la enfermedad como sistemas disfuncionales de aclaramiento de proteínas, el sistema de ubiquitina-proteasoma y el sistema de autofagia-lisosoma.

Por otro lado, cuando hablamos de neuropatología nos referimos al conjunto de enfermedades a nivel tisular del sistema nervioso. En ese caso, un cerebro de una persona enferma de Parkinson presenta una leve atrofia en el córtex frontal y, en menos casos, dilatación ventricular. El principal cambio morfológico de un cerebro enfermo se puede observar haciendo un corte transversal en el tronco encefálico, donde se puede observar una despigmentación de la SNpc directamente relacionada con la muerte de las neuronas dopaminérgicas, las cuales contienen neuromelanina, sustancia principal de la coloración de esta región cerebral [6].

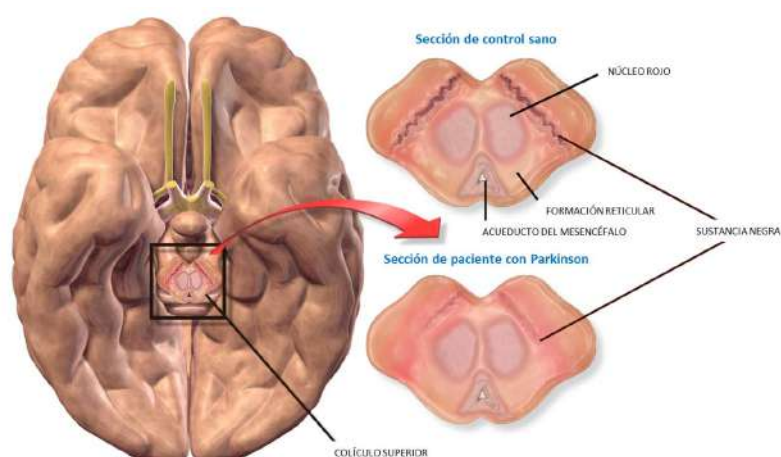


Figura 5 - Diferenciación de la SNpc entre un cerebro enfermo y un caso control (Fuente: Identificación de compuestos potencialmente terapéuticos para la enfermedad de Parkinson utilizando modelos en *Drosophila* y en células humanas - Universidad de Valencia).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de células nerviosas en la SNpc, lo que conduce a una disminución en los niveles de dopamina en el cuerpo estriado, lo que se cree es responsable de los síntomas motores cardinales. Además, hay una pérdida celular generalizada en varios núcleos subcorticales y múltiples sistemas de neurotransmisores no dopaminérgicos también se ven afectados. Estos sistemas pueden explicar algunos de los síntomas no motores que no responden bien a las terapias de reemplazo de dopamina, aunque los mecanismos patológicos precisos de estos síntomas aún no están claros.

Como principales características neuropatológicas en la enfermedad de Parkinson encontramos la distribución de α -sinucleína y cuerpos de Lewy tanto fuera como dentro del cerebro y la interacción de la α -sinucleína con otras proteínas.

A nivel microscópico, el sello patológico de la EP es la presencia de cuerpos de Lewy (LB), que son depósitos citoplásmicos anormales dentro de los cuerpos celulares neuronales, y neuritas distróficas (neuritas de Lewy), que a menudo son axonales. Estos cuerpos de Lewy son inmunorreactivos para la proteína α -sinucleína [6].

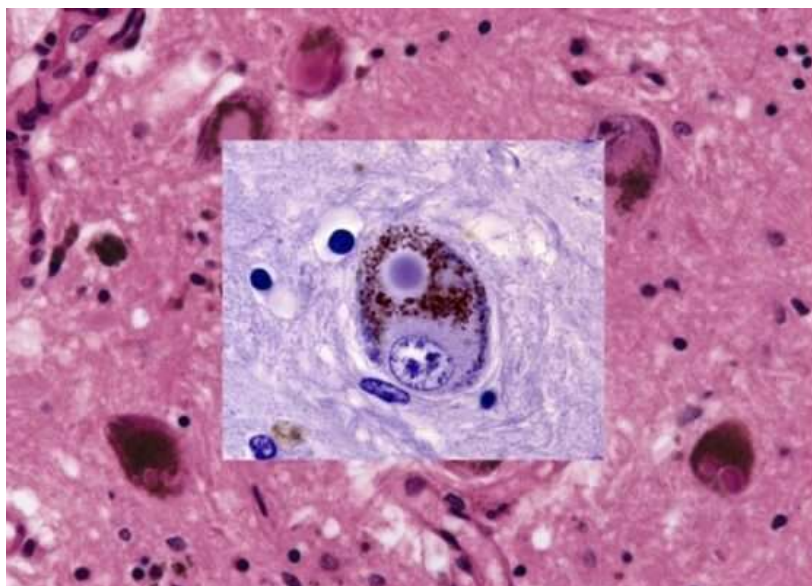


Figura 6 - Cuerpo de Lewy dentro de una neurona (Fuente: euroespes.com)

Por otro lado, tanto estos como la α -sinucleína no permanecen solamente en el cerebro. También se ha observado en la médula espinal y en los ganglios simpáticos cervicales y torácicos, así como en varios órganos periféricos como la retina, el útero, la vejiga, la piel, partes del sistema cardiovascular y el sistema gastrointestinal. Esto sugiere una participación significativa del sistema nervioso periférico en la EP y plantea la cuestión de si la patología de la α -sinucleína se origina en el cerebro o en la periferia.

1.4 Etiología

La etiología de la enfermedad de Parkinson no está completamente clara, aunque se ha identificado una predisposición genética en algunos casos. También pueden haber factores ambientales y genéticos que actúen como desencadenantes o contribuyentes.

Se ha especulado que la exposición a ciertos factores ambientales puede aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. Algunos de estos factores incluyen la exposición a toxinas ambientales, como pesticidas y herbicidas, metales pesados (como el plomo y el mercurio), y productos químicos industriales. Sin embargo, aún no se ha establecido completamente una relación directa entre estos factores y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Además, se ha sugerido que factores como la edad avanzada, el género masculino y antecedentes familiares de Parkinson pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, aunque no se consideran causas directas de la enfermedad.

La identificación de formas raras de EP impulsadas genéticamente y su subsiguiente comprensión de las disfunciones celulares que impulsan la neurodegeneración han avanzado sustancialmente gracias a estudios relacionados con las mutaciones causantes

de enfermedades. Estudiar mutaciones individuales ha contribuido enormemente a definir fenotipos celulares ligados a vías de señalización molecular relacionadas con un gen específico, lo que puede servir como arquetipos celulares para las formas habituales y esporádicas de la enfermedad. La clasificación de los fenotipos de la EP se realiza mediante factores de estratificación como la edad de inicio, la presencia o ausencia de antecedentes familiares y la presencia o ausencia de variantes patológicas conocidas. Sorprendentemente, la mayoría de los casos de EP son esporádicos, mientras que solo el 10% de los pacientes refiere un componente hereditario.

Aún así, la edad es el mayor factor de riesgo para la EP, siendo la mediana de edad de inicio de 60 años. Además, existen variaciones transculturales, con una mayor prevalencia informada en Europa, América del Norte y América del Sur en comparación con los países africanos, asiáticos y árabes.

Asimismo, también se ven involucrados el consumo de tabaco, la cafeína, pesticidas y los metales pesados.

1.5 Epidemiología

Los cálculos de incidencia mundial de la EP oscilan entre 5 y 35 casos nuevos por 100000 individuos por año [10]. Las estimaciones de prevalencia varían de 1 a 2 por 1000 en determinadas poblaciones mientras que, a nivel mundial, se ha estimado que la enfermedad afecta al 1% de la población mayor de 60 años. Notablemente, la EP es una condición rara antes de los 50 años y alcanza una prevalencia del 4% en los grupos de edad más altos, demostrando la influencia crítica de la edad en la progresión de la enfermedad.

La EP es poco común en personas jóvenes, especialmente en aquellos menores de 40. Cada año se suelen diagnosticar aproximadamente unos 60000 casos en el continente americano. A nivel mundial, se estiman de 7 a 10 millones de personas enfermas de esta, aunque los hombres tienen una prevalencia de 1.5 veces más de sufrirla que las mujeres.

La incidencia aumenta de 5 a 10 veces entre la sexta y la novena década de la vida. La prevalencia de la enfermedad de Parkinson también aumenta con la edad. En un metanálisis de cuatro poblaciones de América del Norte, la prevalencia aumentó del menos del 1% de los hombres y mujeres de 45 a 54 años de edad al 4% de los hombres y el 2% de las mujeres de 85 años o más. La mortalidad no aumenta en la primera década después del diagnóstico de EP, pero aumenta a partir de entonces. Se espera que la prevalencia de la EP aumente drásticamente y se duplique en las próximas dos décadas a medida que la población mundial envejece. Esto aumentará la carga social y económica de la EP, a menos que se identifiquen tratamientos, curas o medios de prevención más efectivos [11].

Varios estudios han asociado varios factores del estilo de vida con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. La asociación más consistente se ha encontrado en los fumadores de cigarrillos y en algunos consumidores de tabaco. La duración y frecuencia del consumo de tabaco también parecen tener un efecto en la reducción del riesgo de la enfermedad. El consumo de café y cafeína también se ha asociado con un menor riesgo de EP, especialmente en hombres. Sin embargo, una mayor ingesta de productos lácteos se ha asociado con un mayor riesgo de EP. Se ha demostrado que las dietas saludables con alto contenido de frutas, verduras y granos también pueden reducir el riesgo de EP. La actividad física también se ha asociado con un menor riesgo de EP, especialmente en hombres y en particular a intensidades más altas de actividad física. Los efectos combinados de estos factores parecen ser aditivos y sugieren un enfoque para la prevención de enfermedades.

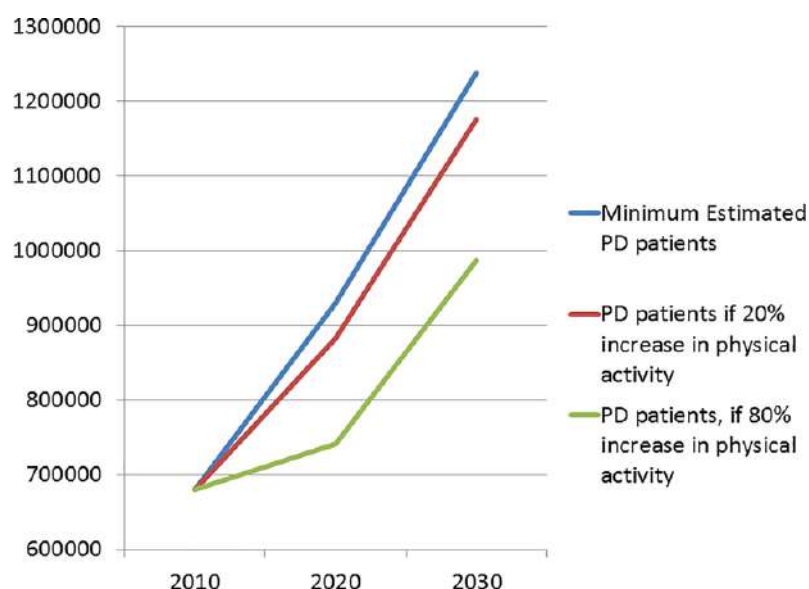


Figura 7 - Número estimado de personas con EP en los EE. UU. (línea azul) y reducción proyectada de la EP si la actividad física en adultos aumenta en un 20 % (línea roja) o en un 80 % (línea verde). Estimaciones basadas en Marras et al, 2018 [12].

1.6 Tratamiento

Actualmente, no existe una cura para la enfermedad de Parkinson y no hay un tratamiento como tal ya que cada paciente necesita un trato personalizado puesto que hay varios grados de desarrollo de esta enfermedad. El tratamiento de la EP requiere un abordaje multidisciplinar, con intervención de diferentes profesionales sanitarios y apoyo emocional y psicológico; incluyendo terapia farmacológica, medidas complementarias y en su caso, tratamiento quirúrgico u otros tratamientos invasivos.

Este también debe ser Individualizado, teniendo en cuenta en cada paciente su situación clínica (sintomatología y gravedad, comorbilidades, tratamientos concomitantes y riesgo de interacciones), características y circunstancias personales: edad, forma y calidad de vida, grado de discapacidad, funcionalidad y limitaciones en la vida diaria, interferencia de los síntomas en la actividad laboral y social, opinión del propio paciente: necesidades, preferencias y objetivos. Y por último los riesgos y beneficios potenciales de cada una de las opciones terapéuticas y riesgo de complicaciones motoras y neuropsiquiátricas.

El tratamiento farmacológico de la EP tiene como objetivo restaurar los niveles de actividad dopaminérgica cerebral para atenuar los síntomas motores y mejorar los síntomas no motores. Como se ha mencionado anteriormente, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc genera problemas motores como no motores. En relación a ello, se han desarrollado varios fármacos para tratar los síntomas basados en el reemplazo de neuronas dopaminérgicas. La terapia dopaminérgica es fundamental en el tratamiento de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson. Hay varios tipos de medicamentos que se utilizan en orden de potencia descendente: levodopa (que puede ser combinada o no con inhibidores de la catecol-O-metil-transferasa o COMT), agonistas dopaminérgicos e inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B (IMAO-B) [13].

A veces, se pueden prescribir otros fármacos, como anticolinérgicos y amantadina, junto con los anteriores. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson, especialmente aquellos de más de 65 años o con afectación funcional moderada-grave, se les prescribe levodopa como tratamiento de primera elección. Sin embargo, los pacientes menores de 65 años, con afectación funcional leve o en etapas iniciales de la enfermedad, pueden comenzar su tratamiento con agonistas dopaminérgicos o IMAO-B. En cualquier caso, la mayoría de estos pacientes necesitarán levodopa a medida que la enfermedad avanza. Si la respuesta inicial al tratamiento no es adecuada, insuficiente o errática, se debe ajustar la dosificación, combinar la levodopa con otros medicamentos y/o utilizar formas de administración alternativas.



Figura 8 - Tratamiento farmacológico de los síntomas motores en la EP (Fuente: Grupo Andaluz de Trastornos del Movimiento (GATM). Recomendaciones de práctica clínica en la Enfermedad de Parkinson. Sociedad Andaluza de Neurología. 2022) [13]

1.7 Neuromelanina

La neuromelanina juega un papel crucial cuando nos referimos a la enfermedad de Parkinson. Es un pigmento oscuro presente tanto en el interior de las neuronas como, en casos de degeneración neuronal, en el medio extracelular. A medida que las personas envejecen, la neuromelanina se va acumulando en las neuronas hasta tal punto en que su membrana no aguanta más cantidad de este pigmento y termina produciendo la muerte de la neurona.

Estudios realizados en 2019 por los investigadores del Instituto de Investigación de Vall d'Hebron (VHIR) han demostrado que modulando los niveles de neuromelanina por debajo de este umbral patológico se puede prevenir la aparición de la enfermedad en un modelo experimental. Se ha observado que cuando se acumula un determinado nivel de este pigmento en el interior de las células, las neuronas comienzan a presentar alteraciones en su funcionamiento y sufren degeneración. Esto provoca que los animales desarrollen todas las características típicas, tanto motoras como neuropatológicas, de la enfermedad de Parkinson. Los investigadores sobreexpresaron la enzima tirosinasa en la sustancia negra de roedores y encontraron que estos comenzaron a producir y acumular neuromelanina, similar a como se produce en el cerebro humano envejecido. Este es el primer modelo animal en roedores que produce neuromelanina humana. Con este modelo, los investigadores pudieron estudiar si la acumulación de neuromelanina dentro de una neurona afecta al funcionamiento normal de la célula.

De acuerdo a los resultados encontrados en las fuentes, se sabe que la neuromelanina acumulada en las neuronas puede ser efectiva para combatir la presencia de moléculas tóxicas en el cerebro. Sin embargo, cuando una neurona degenera, libera esta neuromelanina junto con otros componentes celulares normalmente tóxicos, lo que contribuye a generar una respuesta inmunitaria desproporcionada que aumenta el estrés oxidativo, y puede derivar en procesos neurodegenerativos [14].

La síntesis de la neuromelanina en las neuronas DA se considera similar a la síntesis de melanina en los melanocitos de la piel. Para la síntesis de melanina en la piel se utiliza la DOPAquinona (DQ) por la enzima tirosinasa, mientras que para la síntesis de neuromelanina en células DA se utiliza la DAquinona (DAQ) por la tirosina hidroxilasa (TH) y la L-aminoácido descarboxilasa aromática (AADC)[15]. La DA en el citoplasma es altamente reactiva y se supone que se oxida espontáneamente o por una tirosinasa no identificada a DAQ y luego se sintetiza a neuromelanina. Se ha informado que la acumulación de neuromelanina intracelular por encima de un umbral específico está asociada con la muerte de las neuronas DA y los fenotipos de EP. Recientemente se ha avanzado en la comprensión de la biosíntesis y fisiopatología de la neuromelanina en la EP.

Recientemente se ha señalado que, aunque la mayoría de las células dopaminérgicas en la SN humana contienen NM, un número considerable de células productoras de dopamina en el mesencéfalo no producen NM. Esto desafía la idea de que la producción de NM ocurre a través de la auto-oxidación de dopamina. Además, se descubrió que la deposición de NM comienza temprano en la vida humana y que esta aumenta linealmente con la edad. Los primeros estudios descriptivos mostraron que las neuronas nigrales no contienen NM al nacer y que este pigmento todavía es indetectable después de 3 años de vida.

A nivel histológico, el material citoplásmico granular comienza a desaparecer alrededor de los dos años de edad, mientras que un año después, la NM aparece primero como gránulos de color marrón claro en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas. Esto sugiere que hay un periodo improbable y excesivamente largo para la auto-oxidación o un retraso en el desarrollo del mecanismo regulador. La cantidad de pigmento aumenta constantemente hasta los 20 años, cuando casi todo el citoplasma contiene gránulos de pigmento. A partir de la segunda década de vida, el volumen celular ocupado por el pigmento se estabiliza y no aumenta más con la edad. A diferencia de esto, lo que sí sufre cambios importantes a lo largo de la vida es la concentración absoluta de NM, que aumenta linealmente desde 0.3 a 0.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido entre 10 y 20 años de edad [15] hasta 3.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido entre la quinta y la novena décadas de la vida. Este aumento en la cantidad de pigmento se acompaña de un aumento constante de la densidad óptica de NM y una modificación de la coloración del pigmento, que cambia de amarillo-marrón a marrón oscuro, consistente con la oxidación de dopamina[16].

La producción prematura de NM en la DA fetal humana en el STR del cerebro de pacientes con EP sugiere que la NM es un elemento clave para el mantenimiento fisiológico.

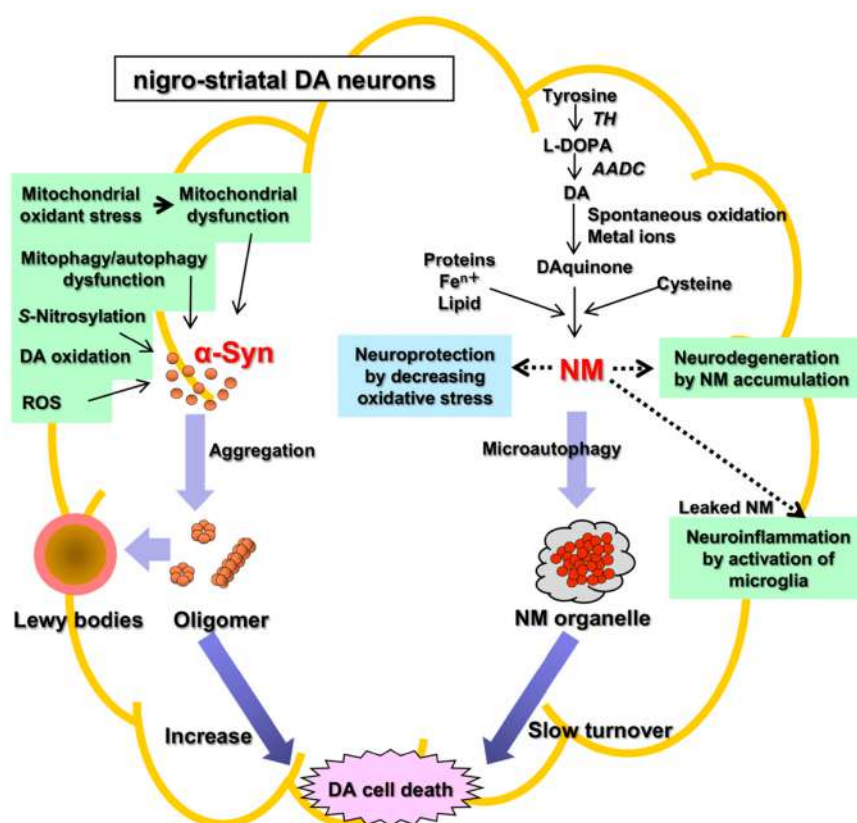


Figura 9 - Las dos características histopatológicas en la EP en el DA nigroestriatal son los oligómeros fibrilares de α -Syn producidos por plegamiento incorrecto, los cuales son neurotóxicos y provocan la muerte de las células DA, y la neuromelanina (NM), que también está relacionada con la neurodegeneración y la muerte de las células DA, debido a que atenúa el estrés oxidativo para la neuroprotección. α -Syn es α -sinucleína, NM es neuromelanina, TH es tirosina hidroxilasa, AADC es aminoácido aromático descarboxilasa y ROS son especies reactivas de oxígeno. [17]

No obstante, como ya se ha mencionado anteriormente, cabe recalcar la importancia de la enzima tirosina hidroxilasa, que promueve la síntesis de dopamina, neurotransmisor cuya función es vital para el control motor del cuerpo humano. A su vez, cataliza la conversión de L-tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), la cual se convierte en dopamina que es precursor de los otros neurotransmisores de tipo catecolamina y de hormonas en el cerebro y en los tejidos neuroendocrinos. La disminución de la TH también se relaciona con otros trastornos neuropsiquiátricos como la enfermedad maniaco-depresiva, esquizofrenia [17,18].

1.8 Inteligencia Artificial y Machine Learning: aplicaciones a las enfermedades neurodegenerativas y a la enfermedad de Parkinson

Estamos viviendo una época revolucionaria en cuanto a la tecnología y el manejo de la información supone. Hoy en día hay grandes cantidades de datos que necesitan ser administrados correctamente para su buen empleo y necesitan estar protegidos por temas de privacidad, legalidad y uso. Esta cuarta era industrial gira en torno a la inteligencia artificial (IA) y el Big Data, ya que estos avances van a suponer una optimización de tiempo, dinero y energía.

La inteligencia artificial nos permite ejercer funciones de manera mucho más eficiente y automática. El automatizar procesos cuyo software aprenda por sí mismo en base a la información que recoge facilita muchos procesos en los cuales habría que invertir mucho tiempo repitiendo siempre lo mismo. En el ámbito médico, la IA podrá proporcionar a los pacientes más seguridad a la hora de diagnosticar una enfermedad ya que tendrá menos margen de error, seguido de una mejor relación médico-paciente a la hora de empatizar ya que la inteligencia artificial sólo puede ayudar a administrar, monitorear y reducir riesgos, nunca reemplazará la parte humana del médico.

En este caso, una de las muchas aplicaciones de la inteligencia artificial en el ámbito médico aplicado a las enfermedades neurodegenerativas es la aplicación en histología.

Este trabajo muestra la validación de un algoritmo de inteligencia artificial para calcular la media de neuromelanina dentro de las neuronas en sujetos control y en sujetos enfermos de Parkinson. Esto ayuda a los médicos a medir los resultados para establecer un umbral en el cuál el sujeto puede llegar a padecer la enfermedad o incluso conocer la tasa de degeneración neuronal en relación con la edad.

Otra de las aplicaciones que puede tener es el conocimiento de parámetros en el diagnóstico por la imagen para comparar los resultados con los ya almacenados en alguna base de datos y de esta forma tener un diagnóstico rápido y eficaz.

En neurología se han estudiado la predicción de la recurrencia de eventos vasculares cerebrales isquémicos, la evaluación prequirúrgica de la epilepsia resistente a fármacos, la predicción de la enfermedad de Alzheimer y el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson[19].

Los ejemplos prácticos de la inteligencia artificial en el ámbito médico son incesables. Es realmente una herramienta útil a la hora del manejo de situaciones poco precisas y ahora que está en auge es importante hacer un buen uso de ella. Tanto la atención al paciente, como un mejor diagnóstico y almacenamiento serán de mucha mejor calidad gracias al uso de las nuevas tecnologías emergentes en pleno siglo XXI.

La inteligencia artificial (IA) ha revolucionado el campo médico con avances significativos, pero también presenta desafíos y cuestiones éticas. En términos de ventajas, la IA puede analizar grandes cantidades de datos médicos para identificar patrones y diagnosticar enfermedades de manera más precisa y rápida que los médicos humanos. Además, puede ayudar en la gestión de registros médicos, la optimización de tratamientos y la identificación de posibles riesgos para la salud. Sin embargo, sus limitaciones incluyen la falta de empatía y comprensión del contexto humano, lo que puede llevar a diagnósticos erróneos o a decisiones clínicas inapropiadas.

Las desventajas de la IA en el campo médico también incluyen preocupaciones sobre la privacidad y la seguridad de los datos de los pacientes, así como la posibilidad de sesgos algorítmicos que podrían afectar de manera desproporcionada a ciertas poblaciones. Además, la dependencia excesiva de la IA podría llevar a la pérdida de habilidades clínicas en los profesionales de la salud, lo que a su vez podría afectar la calidad de la atención.

Los usos más frecuentes de la IA en medicina incluyen la interpretación de imágenes médicas, la personalización de tratamientos, la predicción de resultados clínicos y la asistencia en la investigación médica. Sin embargo, la población puede tener dudas sobre la confiabilidad de los diagnósticos basados en IA, la seguridad de sus datos médicos y el impacto en la relación médico-paciente. Es crucial abordar estas inquietudes a través de la transparencia, la educación pública y la regulación adecuada para garantizar que la IA en el campo médico se utilice de manera ética y beneficiosa para todos.

Existen varios softwares que utilizan inteligencia artificial en el campo de la salud. Por ejemplo, Watson for Oncology es un software desarrollado por IBM y utiliza inteligencia artificial para ayudar a los médicos en el tratamiento del cáncer. Analiza una gran cantidad de información médica, como historias clínicas y estudios científicos, para proporcionar recomendaciones de tratamiento personalizadas.

DeepMind Health es una división de la empresa DeepMind, propiedad de Google, que se dedica a mejorar la atención médica mediante el desarrollo de inteligencia artificial. Han creado aplicaciones como Streams, que ayuda a los médicos a detectar y tratar enfermedades como la insuficiencia renal aguda.

También la imagenología médica asistida por IA utiliza IA para software de análisis de imágenes médicas, como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM), para ayudar a los médicos a detectar y diagnosticar enfermedades. Estos sistemas pueden identificar patrones y anomalías en las imágenes, lo que mejora la precisión del diagnóstico.

Los asistentes virtuales, como Siri de Apple o Alexa de Amazon, también se utilizan en el ámbito de la salud. Estos asistentes pueden proporcionar información médica básica, recordatorios de medicamentos y ayudar a los pacientes a programar citas médicas.

Actualmente, refiriéndonos a tratar imágenes médicas y el análisis de patrones, los investigadores han encontrado un software prometedor llamado Aiforia que ayuda al diagnóstico por imagen en histología.

Aiforia Cloud es una plataforma de software de análisis de imágenes médicas basada en inteligencia artificial que se destaca por su capacidad para trabajar con una amplia variedad de tipos de imágenes y ofrecer herramientas avanzadas para la interpretación y el análisis de datos. Algunas de estas herramientas incluyen la segmentación precisa de estructuras de manera automática, el análisis de texturas e identificación de patrones, la personalización de entrenamientos, la optimización de procesos y su flexibilidad y escalabilidad, entre otras.

Además, utiliza una interfaz en la que todos los investigadores del mismo grupo puedan analizar varios tipos de imágenes médicas, incluyendo radiografías, tomografías, imágenes histológicas...etc.

Una de las muchas ventajas que ofrece es su precisión en la interpretación de imágenes, ayudando a la detección de anomalías con gran exactitud, también destaca por su colaboración y compartición de datos entre investigadores del mismo grupo. Sin embargo, este requiere también de datos de alta calidad porque la falta de información puede afectar a la exactitud de las interpretaciones al igual que la necesidad de validación clínica por parte de profesionales para verificar que los datos son correctos.

Aiforia Cloud, como muchas otras plataformas de IA en salud, no deja de evolucionar y mejorar la precisión de sus algoritmos, al igual que sus funciones de interpretación y diagnóstico.

Asimismo, existen sistemas de análisis de datos de salud, donde la inteligencia artificial se utiliza para analizar grandes cantidades de datos de salud, como registros médicos electrónicos y datos genómicos. Esto ayuda a identificar patrones y tendencias que pueden ser útiles en la investigación médica y en la toma de decisiones clínicas.

Profundizando más en el estado del Parkinson frente a la inteligencia artificial, además de la aplicación frente a modelos predictivos como podrían ser muchas plataformas de software, la IA se encuentra también presente en la detección de cambios de algunos parámetros que indiquen claros síntomas de la enfermedad como puede ser la voz, los patrones de movimiento o los patrones de sueño. También se ha probado que los modelos informáticos que usan inteligencia artificial pueden simular la interacción molecular de medicamentos para ver su reacción.

Estos son solo algunos ejemplos de cómo se utiliza la inteligencia artificial en el campo de la salud. La inteligencia artificial tiene el potencial de mejorar la precisión del diagnóstico, agilizar la atención médica y ayudar en la investigación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la inteligencia artificial no reemplaza la experiencia y el juicio clínico de los profesionales de la salud, sino que los complementa y apoya en la toma de decisiones.

2 Modelos humanos y animales

Para este proyecto se han utilizado muestras de pacientes post-mortem sanos y pacientes post-mortem enfermos de Parkinson del banco de tejidos neurológicos del Hospital Clínic de Barcelona.

Más allá del análisis hecho con muestras humanas, se han utilizado también muestras de animales, concretamente de rata y ratón. Las muestras de ratón han sido con dos modelos diferentes del animal: un tipo de muestras eran de ratón transgénico, los cuales presentaban neuromelanina y los otros modelos eran los Wall-Type, donde no se había hecho ninguna modificación genética, por lo cual no presentaban coloración de este pigmento.

En el caso de las ratas, utilizamos también dos modelos: los VMAT2 y los Tyr-Veh. Ambos han sido modificados para conseguir que presenten neuromelanina en sus neuronas. El modelo Tyr-Veh, como bien indica su nombre, ha sido sobreexpresado con la enzima Tirosinasa para que presente síntomas parkinsonianos.

3 Hipótesis y objetivos

El objetivo principal de este proyecto es crear un algoritmo de inteligencia artificial basado en el modelo *YOLOv8* de *Ultralytics* para contar la cantidad de neuronas que presentan las imágenes histológicas de las muestras humanas con tinción de hematoxilina-eosina, además de aprender nuevas herramientas de *Machine Learning* y enseñar al algoritmo cómo distinguir los componentes neurológicos ya sea con procesado de imagen o con IA. Por último, comprender la evolución de la enfermedad con la edad a partir de la información neuronal que nos dará el análisis de datos a partir del procesado de imágenes.

El modelo *YOLOv8* puede tener diversas aplicaciones al tratar los datos de este proyecto. En concreto, detecta anomalías médicas y analiza patrones en microscopía así como el seguimiento de movimiento.

A diferencia de *YOLOv8*, Keras no es un modelo sino una interfaz que permite construir redes neuronales en *Tensorflow*, por lo tanto se entiende que *YOLOv8* es un modelo de detección de objetos específico[26].

El modelo utiliza una arquitectura de red neuronal profunda y técnicas avanzadas de procesamiento de imágenes para lograr una detección rápida y precisa de objetos en imágenes y videos. Una gran ventaja del *YOLOv8* es su velocidad[26].

Además de su velocidad, el *YOLOv8* también se destaca por su precisión. El modelo ha sido entrenado con conjuntos masivos de datos y ha sido afinado para lograr una alta precisión en la detección de objetos en diversos escenarios. En comparación con *TensorFlow*, el *YOLOv8* ofrece varias ventajas. Esto se traduce en un rendimiento superior y mayor eficiencia a la hora de detectar objetos.

La elección del modelo ha sido gracias a la información importante y detallada que ofrece y la precisión que presenta. Además de la fácil implementación y la detección de múltiples objetos.

La hipótesis de este trabajo es que el algoritmo es válido para cuantificar de manera automática la cantidad de neuronas para diagnosticar y obtener información sobre el paciente y su estado de salud frente a la enfermedad de Parkinson.

No obstante, también se han realizado pruebas inmunohistoquímicas en modelos animales sin tinción de hematoxilina-eosina, es decir, sin *background* para que sólo se vean proyectados en la imagen las tinciones que se han logrado conseguir con anticuerpos.

Esto sería una posible mejora para procesar las imágenes sin tener que filtrar la coloración magenta que presenta este tipo de técnica inmunohistoquímica y hacerlo más preciso.

4 Materiales y métodos

4.1 Anticuerpos

Para realizar las pruebas sobre las muestras de tejido animal buscábamos un anticuerpo que fuera de tipo monoclonal, es decir, son anticuerpos homogéneos creados en el laboratorio, donde a diferencia de los policlonales, estos no pueden reconocer y unirse a muchos epítopos diferentes de un solo antígeno.

Además de monoclonales, buscamos que fueran compatibles con tejido de rata y ratón y fueran aptos para realizar una técnica inmunohistoquímica.

Seleccionamos varios candidatos para la marcación del componente celular que nos interesaba, que en este caso eran la membrana plasmática y el núcleo de la neurona. Observamos que había varios marcadores que podrían ser ideales.

Para la marcación del núcleo de las neuronas vimos que la Na/K ATPasa, el MAP2 y Lamin B, pero ya se realizaron previamente varias pruebas inmunohistoquímicas en otros proyectos con el anticuerpo Lamin B y resultó ser muy efectivo, por lo cual este fue el seleccionado para realizar la tinción. Utilizamos el mismo anticuerpo de dos casas comerciales diferentes, las distribuidoras eran Abcam y Santa Cruz.

Para el anticuerpo Lamin B de la casa comercial Abcam, estas fueron sus especificaciones:

Product name

Anti-Lamin B1 antibody [EPR8985(B)] - Nuclear Envelope Marker

[See all Lamin B1 primary antibodies](#)

Description

Rabbit monoclonal [EPR8985(B)] to Lamin B1 - Nuclear Envelope Marker

Host species

Rabbit

Tested applications

Suitable for: IP, ICC/IF, WB, IHC-P [▶ more details](#)

Species reactivity

Reacts with: Mouse, Rat, Human

Figura 10 - Especificaciones del anticuerpo Lamin B de Abcam [20].

Para la casa comercial Santa Cruz estas fueron sus especificaciones:

- Lamin B1 Anticuerpo (B-10) es un **monoclonal** de ratón IgG₁ κ, ver las **251 publicaciones**, proporcionado como **200 µg/ml**
- específico para un epítipo localizado entre los amino ácidos 559-586 en el C-terminus de Lamin B11 de origen mouse
- Lamin B1 Anticuerpo (B-10) es recomendado para detectar Lamin B1 de mouse, rat y human origen, mediante WB, IP, IF y ELISA
- Lamin B1 Anticuerpo (B-10) es disponible conjugado a **agarosa** para IP; **HRP** para WB, IHC(P) y ELISA; y tanto a **phycoerythrin** como a **FITC** para IF, IHC(P) y FCM

Figura 11- Especificaciones del anticuerpo Lamin B de Santa Cruz (sc)[21]

Para la marcación de la membrana plasmática decidimos usar el anticuerpo KCC2.

Las pruebas inmunohistoquímicas se realizaron tanto por separado para ver la funcionalidad de cada uno de los anticuerpos, como de manera doble para ver como sería el resultado final marcando tanto núcleo como membrana.

4.2 Tinción hematoxilina-eosina

La mayoría de las células y matrices extracelulares carecen de pigmentación, lo que hace imposible su identificación directa a través del microscopio óptico. Para poder apreciar sus características morfológicas es necesario emplear colorantes, sustancias que tienen un color determinado y que se adhieren de manera específica a ciertas estructuras tisulares.

Por lo general, estas tinciones combinan más de un colorante. La tinción más común es una que combina una sustancia como la hematoxilina y el colorante ácido eosina.

El procedimiento parte de unas muestras que han sido previamente fijadas e incluidas en parafina y se han cortado a escala micrométrica y adheridas a un portaobjetos.

Este ha sido el procedimiento utilizado para obtener la coloración en muestras humanas de este proyecto:

DESPARAFINAR		
1.	Xileno	5 minutos
2.	Xileno	6 inmersiones rápidas
HIDRATAR		
3.	Alcohol 100°	6 inmersiones rápidas
4.	Alcohol 100°	6 inmersiones rápidas
5.	Alcohol 96°	6 inmersiones rápidas
6.	Alcohol 70°	6 inmersiones rápidas
7.	Alcohol 50°	6 inmersiones rápidas
8.	H ₂ O _d	2 minutos
TINCION		
9.	Hematoxilina de Harris	según preparación
9 A.	H ₂ O _c	5 minutos
DIFERENCIAR HEMATOXILINA		
10.	Alcohol ácido*	2 minutos
10 A.	H ₂ O _c	5 minutos
AZULAR		
11.	NaHCO ₃ **	1 minuto
11 A.	H ₂ O _c	5 minutos
CONTRATINCION		
12.	Alcohol 96°***	3 minutos
13.	Eosina	según preparación
DESHIDRATAR		
14.	Alcohol 96°	6 inmersiones rápidas
15.	Alcohol 96°	6 inmersiones rápidas
16.	Alcohol 100°	6 inmersiones rápidas
17.	Alcohol 100°	6 inmersiones rápidas
ACLARAR		
18.	Xileno****	hasta que las preparaciones queden claras

* El alcohol ácido se hace echando 0,3 ml de HCl en 250 ml de alcohol de 70°

** Se echará una cucharada de NaHCO₃ en 250 ml de H₂O_d.

*** Después de cada paso se secará en papel de filtro.

**** Se dejará en xilol hasta su montaje.

Tabla 1 - Protocolo de tinción hematoxilina-eosina

El procedimiento debe finalizar mostrando unos resultados con núcleos azules/morados y el citoplasma y las fibras de colágeno de un color rosa pálido o rojo.

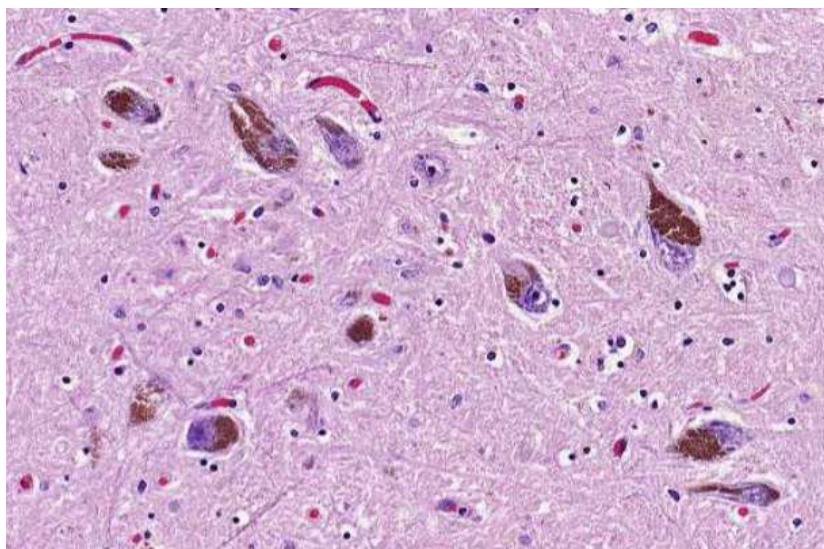


Figura 12 - Tinción hematoxilina-eosina en un paciente humano del grupo control.

4.3 Técnica inmunohistoquímica en parafina

A diferencia de la tinción con hematoxilina-eosina donde necesitábamos distinguir todos los cuerpos celulares del tejido a estudiar, el protocolo utilizado en muestras animales es completamente distinto ya que no realizaremos una tinción completa de la muestra, sino de ciertos componentes que nos interesa visualizar como la membrana y el núcleo. Esto se consigue gracias a la aplicación de los anticuerpos mencionados anteriormente en el apartado 6.1.

La parafina no es miscible con agua, lo que presenta un problema dado que los tejidos están compuestos principalmente de agua. Además, muchos de los fijadores utilizados son soluciones acuosas. Esto implica que para que la parafina líquida pueda penetrar completamente en el tejido se debe sustituir el agua por un solvente orgánico. Este proceso se logra deshidratando gradualmente el tejido en alcoholes, normalmente etanol, de graduación creciente hasta llegar al alcohol de 100°. Es importante que la deshidratación sea completa para evitar que afecte a la posterior infiltración de la parafina. Asimismo, es fundamental que sea gradual y lenta para evitar retracciones del tejido. Si se deshidrata demasiado, las muestras pueden volverse quebradizas, mientras que una deshidratación insuficiente impide que los agentes aclarantes y el medio de inclusión penetren adecuadamente en los tejidos.

La inmunohistoquímica es una técnica basada en la especificidad y afinidad de los anticuerpos. Estos anticuerpos son producidos por los linfocitos B durante la respuesta

inmune, donde pasan al suero sanguíneo para ser posteriormente extraídos y utilizados en este tipo de técnica.

Cuando usamos anticuerpos monoclonales como los que necesitamos para realizar esta tinción, se cultivan en el laboratorio los clones de linfocitos B activados durante la respuesta inmune y cada cultivo producirá sólo un anticuerpo que reconocerá sólo un antígeno.

Los anticuerpos primarios se unen directamente a antígenos específicos, con alta especificidad, para detectar los antígenos. Los anticuerpos secundarios se unen a los anticuerpos primarios y se usan para detectar y visualizar un anticuerpo primario, que está unido a su proteína de interés. Varios anticuerpos secundarios pueden unirse al mismo anticuerpo primario, aumentando la sensibilidad y amplificando la señal.

La especie del anticuerpo secundario dependerá de la especie huésped del anticuerpo primario utilizado. Los anticuerpos secundarios se desarrollan contra una clase o subclase de inmunoglobulinas de una especie específica. Por lo tanto, se debe seleccionar un anticuerpo secundario que se haya generado en una especie diferente contra la especie huésped y el isotipo del anticuerpo primario utilizado .

Por ejemplo, si se utilizó un anticuerpo primario policlonal que se generó en una cabra, se necesitará un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra creado en una especie diferente.

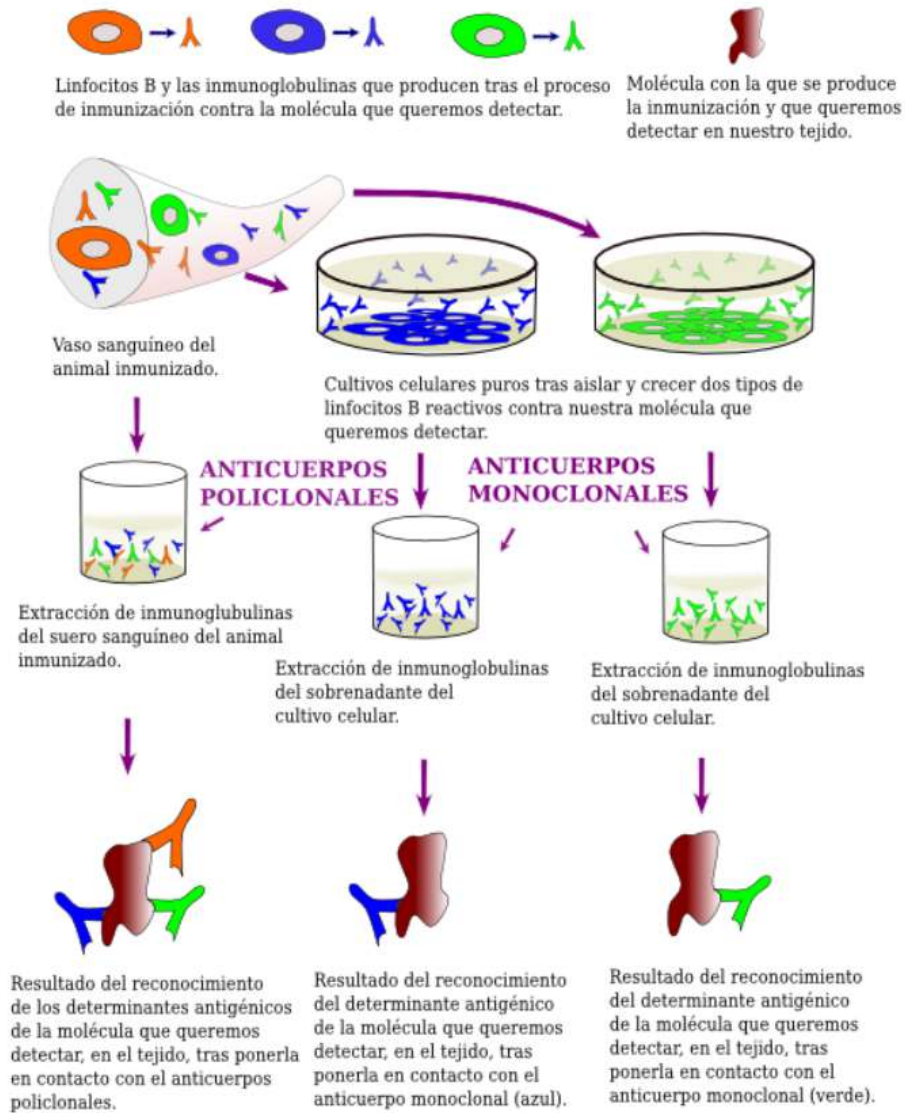


Figura 13- Esquema de diferenciación entre anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales [22]

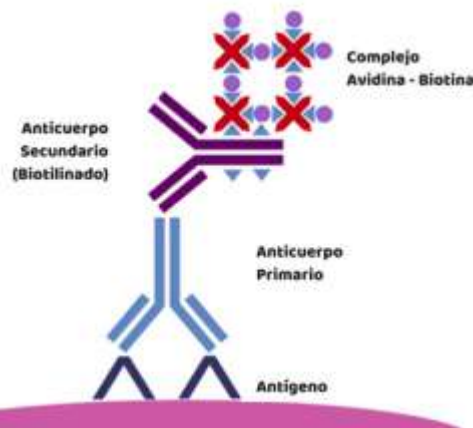


Figura 14- Esquema de reconocimiento antígeno-anticuerpos [23]

El protocolo para realizar una técnica inmunohistoquímica en tejido parafinado es el siguiente:

Reactivos:

- Xileno
- Etanol: 100%, 95%, 70%
- Tampón desenmascaramiento de epítomos: solución citrato 10 mM pH6.0
- Tampón de bloqueo: 5% NGS en TBS 1X
- Antiguo primario: Pool de los anticuerpos primarios a utilizar en la dilución deseada en 2% NGS-TBS1X.
- Anticuerpo secundario: Pool de los anticuerpos secundarios a utilizar en la dilución deseada en 2% NGS-TBS1X.
- Medio de montaje (DPX, Sigma)

- Desparafinado y Rehidratación:

Mantener en la estufa durante 30 min a 60°C o o/n a 37°C

Lavar 3 veces, 3 min cada vez, en xileno.

Lavar 2 veces, 5 min cada vez, en etanol 100%.

Lavar 2 veces, 5 min cada vez, en etanol 95%.

Lavar 1 vez, 5 min cada vez, en etanol 70%.

Lavar 3 veces, 5 min cada vez, en tampón TBS.

Preparación tampón TBS 10x → H₂O + NaCl + triso base.

Preparación tris base → NaCl 90g/1L + tris (121,1g) + H₂O (disolver hasta pH=7,4, es necesario HCl para conseguirlo usando el pHmetro)

Bloqueo peroxidasa endógena

Mantenemos las muestras durante 10 min en solución 3% peróxido de hidrógeno y 10% Metanol (por 200 ml de solución: 6ml peróxido y 20 ml Metanol).

Utilizaremos un tampón TBS 1x para lavar las muestras. Para pasar de 10x a 1x se añade H₂O hasta llegar a 1L.

- Lavados: tres lavados de 5 min cada uno en tampón TBS 1X.

Desenmascaramiento de epítomos:

Es el procedimiento por el que se despliega la estructura de las proteínas de la muestra para que reaccionen con nuestro anticuerpo primario (queda libre y visible la zona de unión).

Por eso ponemos las muestras en un recipiente de plástico donde añadimos aproximadamente 300 ml (hasta cubrir todas las muestras) de tampón citrato (sal) 10 mM a pH 6.0 y añadimos agua hasta llegar a los 300ml.

$300\text{ml} \times (10\text{mMols}/1000\text{mL}) \times (1\text{mol}/1000 \text{ moles}) \times (210,13\text{g}/ 1\text{mol}) = 0,63\text{g}$ citrato (medido en balanza analítica porque pesa menos de un gramo).

Como queremos que nuestra muestra esté en pH 6, una vez realizada la muestra, calibramos el pHmetro añadiendo primero una solución de pH 7 y después una solución de pH 4 y seguidamente, la secamos con agua y la ponemos dentro de la solución de tampón citrato. Medimos el pH obtenido y, en nuestro caso, nos daba un pH= 2,4, por tanto, teníamos que añadir hidruro sódico para basificar el pH utilizando una pera para medirlo gota en gota con una pipeta pasteur.

Lo ponemos en el baño de agua 20 min a 95°C y cuando haya terminado, 20 minutos fuera a temperatura ambiente.

Bloqueo:

Es el proceso por el que promoveremos la especificidad del anticuerpo, bloqueando los puntos de unión de la muestra para favorecer la unión y especificidad del anticuerpo.

Utilizaremos *normal goat serum* (igual en las especies donde está hecho nuestro anticuerpo secundario que evita reacciones cruzadas) al 5% con TBS.

5ml a 5% NGS-TBS= $5 \times 5/100=0,25\text{ml}$ de solución NGS+TBS

La solución final se inyecta en las muestras de las puertas (150 microlitros por muestra) y con el rotulador *ImmEdge* (Vector H-4000) se dibuja un círculo alrededor de cada sección de tejido para hacer una barrera hidrofóbica (vigilar no tocar el tejido) sin dejar que se sequen.

Se mantiene 1 hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda.

Anticuerpo primario:

Se quita el tampón de bloqueo de las muestras, se seca el exceso de líquido con un pañuelo de papel y se pone volumen suficiente de la solución de anticuerpo o anticuerpos primarios (en solución TBS-2% NGS) para cubrir todas las muestras. Se deja en el cuarto húmedo durante el tiempo estipulado por cada anticuerpo (24h en el cuarto frío).

Anticuerpos empleados para nuestro procedimiento:

Lamin B (m-20) goat polyclonal SANTA CRUZ (SC-6217) a 4°C

Lamin B rabbit polyclonal ABCAM a -20°C (ab16048)

Preparamos concentraciones distintas para las dos muestras del portamuestras. (2ml cada muestra, total 8ml TBS-NGS 2%).

Las concentraciones para los anticuerpos primarios han sido las siguientes:

[Lamin B abcam]: 1:1000 (2µl/2000µl) - 1:2000 (1µl/2000µl)

[Lamin B santacruz]: 1:1000 (2µl/2000µl) - 1:500 (4µl/2000µl o 2µl/1000µl)

[KCC2] : 1:300 (1µl/300µl) - 1:500 (2µl/1000µl)

[KCC2 + Lamin B]: 1:300(1µl/300µl) - 1:1000(1µl/1000µl) y 1:500 (2µl/1000µl) - 1:1000 (1µl/1000µl)

Se lava 3 veces con TBS 1X, 5 minutos cada vez.

Anticuerpo secundario:

Se secan los portaobjetos evitando que se sequen las secciones y se añade la solución de anticuerpo secundario suficiente, se incuba durante 1h a temperatura ambiente en un recipiente opaco.

Preparamos solución de 3ml totales NGS+TBS 2% con una concentración 1:1000 siempre.

Añadiremos 1000µl (1ml) de la solución 1 al tubo y añadiremos también 1µl del anticuerpo correspondiente. (primero añadimos NGS+TBS y después los anticuerpos con pipeta micrométrica).

Por las muestras con ABCAM añadiremos anti-rabbit y por las muestras santa cruz añadiremos anti-goat. En el caso de KCC2 usaremos un anticuerpo secundario anti-mouse.

Se deja en temperatura ambiente 1h.

Se lava 3 veces con TBS 1X, 5 minutos cada vez.

NOTA: en este momento se prepara la solución ABC (debe prepararse como a mínimo 30 min antes de utilizar).

Incubación con Standard Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit (32050 Pierce)

Es el proceso que amplifica la señal. Se debe utilizar un reactivo ABC biotinilado.

1h en RT con solución ABC (4 gotas de cada componente en 10ml de TBS o 2 gotas de cada en 5ml de TBS).

Revelado por técnica vector-SG

Proceso con elementos tóxicos.

Se debe utilizar un papel aluminio para dejar las muestras y se debe tapar con una caja de cartón porque es una reacción fotosensible.

El kit de revelado se compone de un reactivo 1 (3 gotas) + reactivo 2 (3 gotas) + 5ml PBS. El reactivo 2 es el que comienza la reacción. Se deja actuar unos 10 minutos (o hasta que se vea una coloración) y se lava 3 veces con TBS 5min cada vez.

Deshidratación y montaje

Incubar durante 1 min en etanol 70%

Incubar durante 1 min en etanol al 95%.

Incubar durante 1 min en etanol al 100%

Incubar dos veces en chileno 1 min cada vez.

Se añaden 100 µl de medio de montaje (DAKO S3023) sobre el cubre previamente limpio en etanol para que queden enganchados y se deja secar hasta el día siguiente.

4.4 Técnica inmunohistoquímica con muestras flotantes

A diferencia de la técnica con parafina, las muestras flotantes son tejido congelado que no está cubierto de parafina, por lo tanto, no se desparafinan las muestras ni se hace el desenmascaramiento de epítomos.

El procedimiento es el siguiente:

- Lavar los tejidos 3 X 5 min en solución TBS 0,1 M
- Incubar los tejidos 5 min en TBS + 10% metanol + 3% H₂O₂ 1ml H₂O₂ 30% + 1ml metanol en 10ml de TBS. 20ml TBS + 10% MIOH + 3% H₂O₂ = 2ml MIOH + 2ml H₂O₂ y el resto (16ml) TBS
- Lavar los tejidos 3 X 5 min en TBS
- Incubar los tejidos durante 60 minutos en suero de cabra normal TBS+ 5% (si el Ab secundario se realiza en cabra).
- Incubar los tejidos durante 24 horas a 4°C en agitación, con anticuerpos TH en TBS+ 2% NGS

Preparación anticuerpo primario:

Antigoat (st.cruz) y Anti-rabbit (abcam)

4ml/tubo de TBS + 2%NGS = 80µl NGS + 20ml TBS

Separamos los 4 tubos:

1er tubo: Abcam [1:1000] → como tenemos 4ml, serán 4µl de anticuerpo

2º tubo: Abcam [1:2000] → 2µl de anticuerpo

3er tubo: Sta. Cruz [1:1000] → 4µl anticuerpo

4º tubo: Sta. Cruz [1:500] → 8µl de anticuerpo

Se deja a 4°C en la cámara fría hasta el día siguiente.

Preparación **anticuerpo secundario**

Una vez sacados de la cámara fría, se lavan 3x5min y se prepara el secundario.

Para el Abcam utilizaremos un anti-rabbit y para Santa Cruz un anti-goat.

Preparamos 16ml de solución TBS+NGS al 2% = 0,32ml (320µl)NGS + 16ml TBS y possum 8ml de la solución a cada tubo, donde añadiremos el anticuerpo a continuación.

Añadimos 8µl de anticuerpo anti-rabbit al primer tubo y 8µl de anticuerpo anti-goat al segundo tubo. Hacemos un vortex y con una pipeta tomamos 1ml de solución y los ponemos en las correspondientes muestras. Se deja 1h agitando

Solución **ABC** → se deben poner 4 gotas cada 10ml de TBS, como tenemos 8 muestras de abcam y 8 de santa cruz, prepararemos 20ml de TBS y añadiremos 8 gotas de cada tubo. Se deja agitando 30 minutos

Lavados 3x5min

Añadir muestras en solución ABC y dejar actuar 1h.

Lavados 3x5min

4.5 Resultados inmunohistoquímicos

Los resultados inmunohistoquímicos realizados en el laboratorio se distribuyen en cuatro pruebas para probar la eficacia de dos anticuerpos. Se realizaron primeramente en muestras animales y, una vez comprobamos su eficacia, pasamos a probarlas con muestras humanas.

Prueba 1 → Lamin B (abcam i SC) parafina i free floating.

Prueba 2 → KCC2 simple (parafina i FF)

Prueba 3 → KCC2 + Lamin B abcam doble (parafina i FF)

Prueba 4 → Lamin B Abcam en Rata Vmat-Tyr, ratón TG y humanos control (1:500/1:1000) parafina.

En esta última prueba realizada con humanos, no resultó ser efectiva ya que mostraba toda la muestra con un *brightfield* aparentemente. No obstante, se pudo comprobar la efectividad de los anticuerpos en muestras animales en las demás pruebas.

Estos han sido los resultados obtenidos.

Prueba 1 → Lamin B muestra los mejores resultados en cuanto a marcación nuclear en tejido parafinado con los anticuerpos de Abcam a mayor concentración. Las pruebas se realizaron con dos concentraciones diferentes: a 1:1000 (la más concentrada) y a 1:2000 (la más diluida).

Los anticuerpos de Santa Cruz (sc) apenas resultaron ser efectivos independientemente de la concentración. Sin embargo, los de Abcam mostraron una marcación diferenciada. La tinción se realizó con colorante azul gracias al uso de Vector SG.

Los mejores resultados se ven reflejados en tejido de ratón transgénico, donde se ve una marcación respecto a la neuromelanina muy clara para identificar las neuronas. En el tejido de rata no se observa tan bien esta expresión del pigmento.



Figura 15- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (ABCAM) a una concentración 1:1000

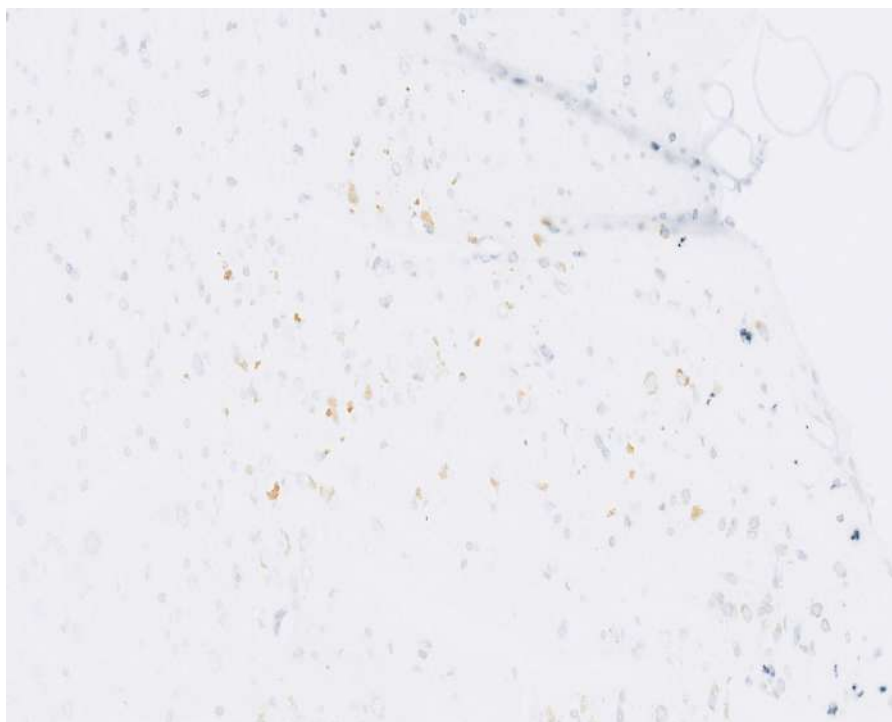


Figura 16- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (ABCAM) a una concentración 1:2000



Figura 17- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de rata VMAT2 (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (ABCAM) a una concentración 1:1000.



Figura 18- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de rata VMAT2 (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (SANTA CRUZ) a una concentración 1:500.

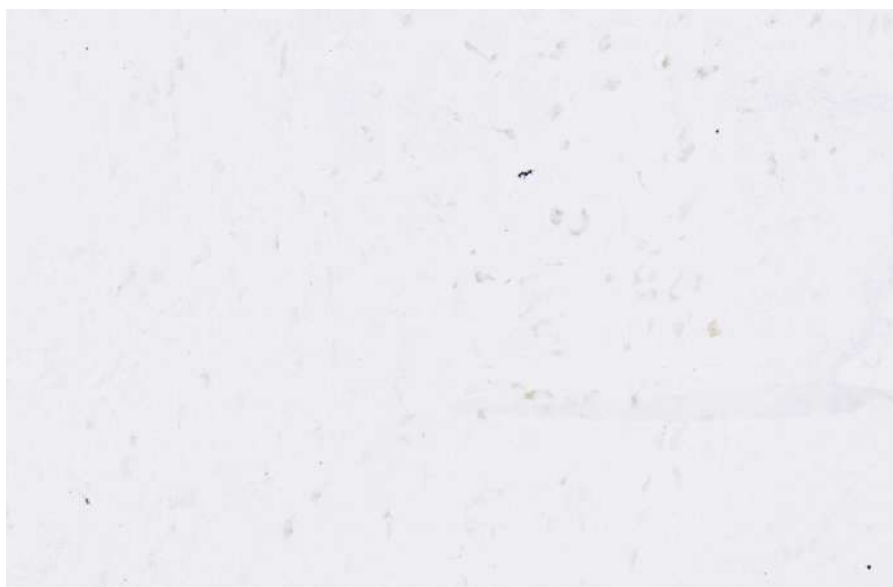


Figura 19- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de rata VMAT2 (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (SANTA CRUZ) a una concentración 1:1000.



Figura 20- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (SANTA CRUZ) a una concentración 1:500.



Figura 21- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (SANTA CRUZ) a una concentración 1:1000.

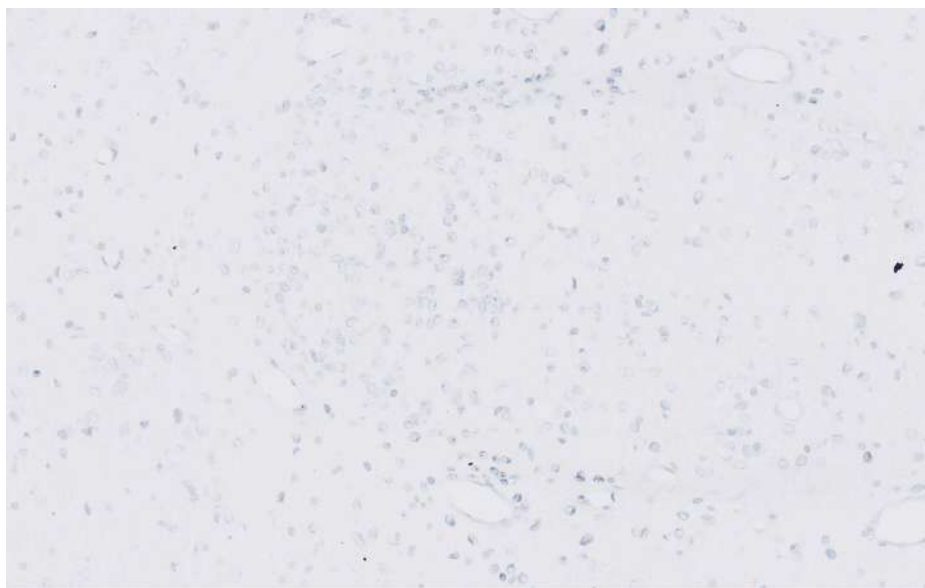


Figura 22- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón WT (sin expresión de neuromelanina) del anticuerpo Lamin B (ABCAM) a una concentración 1:1000.

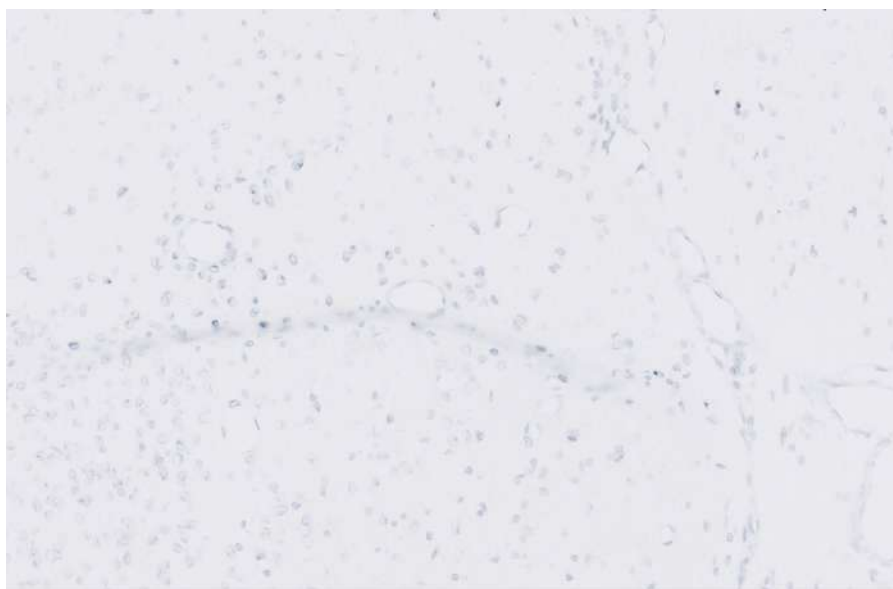


Figura 23- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón WT (sin expresión de neuromelanina) del anticuerpo Lamin B (ABCAM) a una concentración 1:2000.



Figura 24- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón WT (sin expresión de neuromelanina) del anticuerpo Lamin B (Santa Cruz) a una concentración 1:500.

Llegados hasta aquí, sacamos las conclusiones de que a mayor concentración, mejor funcionaban los anticuerpos de Abcam al menos en parafina, estos han sido los resultados en tejido congelado:



Figura 25- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Abcam) a una concentración 1:1000.

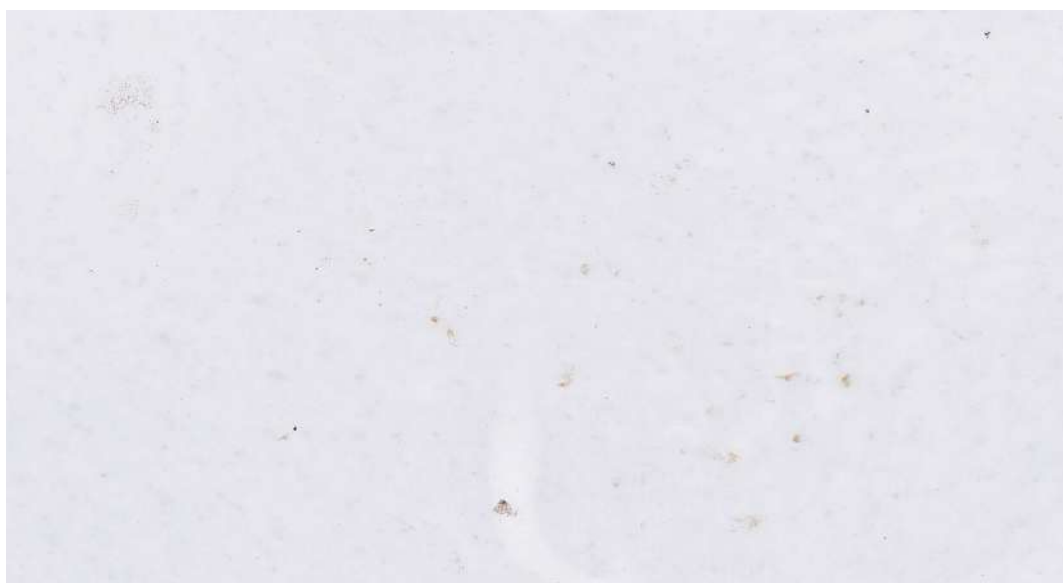


Figura 26- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Abcam) a una concentración 1:2000.



Figura 27- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de rata VMAT2 (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Abcam) a una concentración 1:1000.



Figura 28- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de rata VMAT2 (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Santa cruz) a una concentración 1:500.



Figura 29- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Santa cruz) a una concentración 1:500.

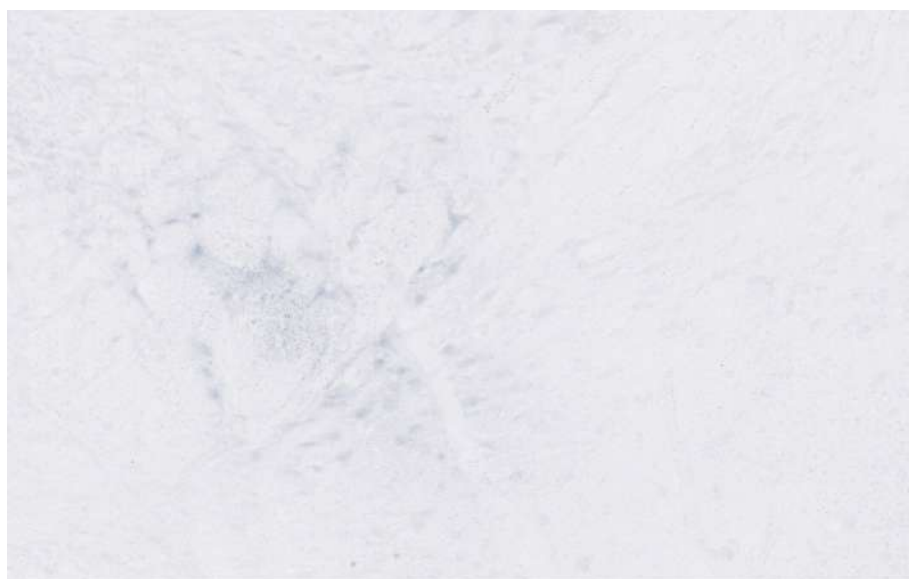


Figura 30- Resultado de marcación nuclear neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo Lamin B (Santa cruz) a una concentración 1:1000.

Conclusiones Prueba 1:

- En tejido congelado y parafinado el anticuerpo ideal es el abcam, aunque en parafina funciona mucho mejor.
- Independientemente de las concentraciones, en tejido congelado el anticuerpo Santa Cruz presenta la misma densidad de núcleos (el abcam sigue siendo el óptimo).
- En tejido congelado con el abcam, sale una mayor densidad de núcleos en concentración [1:1000]
- A mayores concentraciones, mejor visualización en todos los casos → por abcam [1:1000] y por SC [1:500].
- El abcam muestra una mayor afinidad por los núcleos neuronales mientras que el SC no muestra tanta especificidad.

Prueba 2 → KCC2 simple (parafina i FF) realizado a concentraciones [KCC2] : 1:300 (1 μ l/300 μ l) - 1:500 (2 μ l/1000 μ l) tanto en tejido de rata Tyr-Veh como en ratón transgénico.



Figura 31- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido congelado de rata Tyr-Veh (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:300.

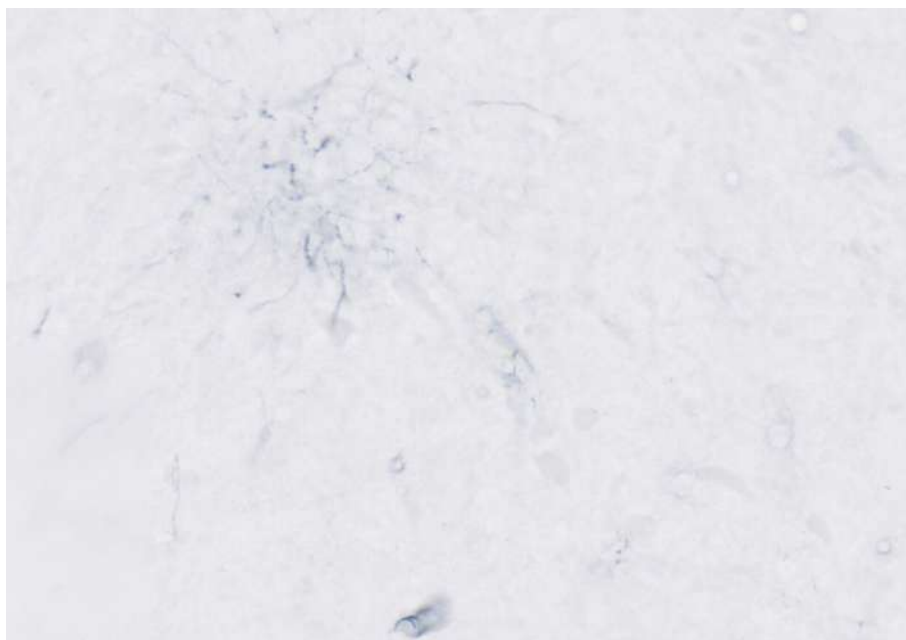


Figura 32- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido congelado de rata Tyr-Veh (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:500.



Figura 33- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:300.



Figura 34- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido congelado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:500.



Figura 35- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido parafinado de rata Tyr-Veh (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:300.



Figura 36- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido parafinado de rata Tyr-Veh (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:500.

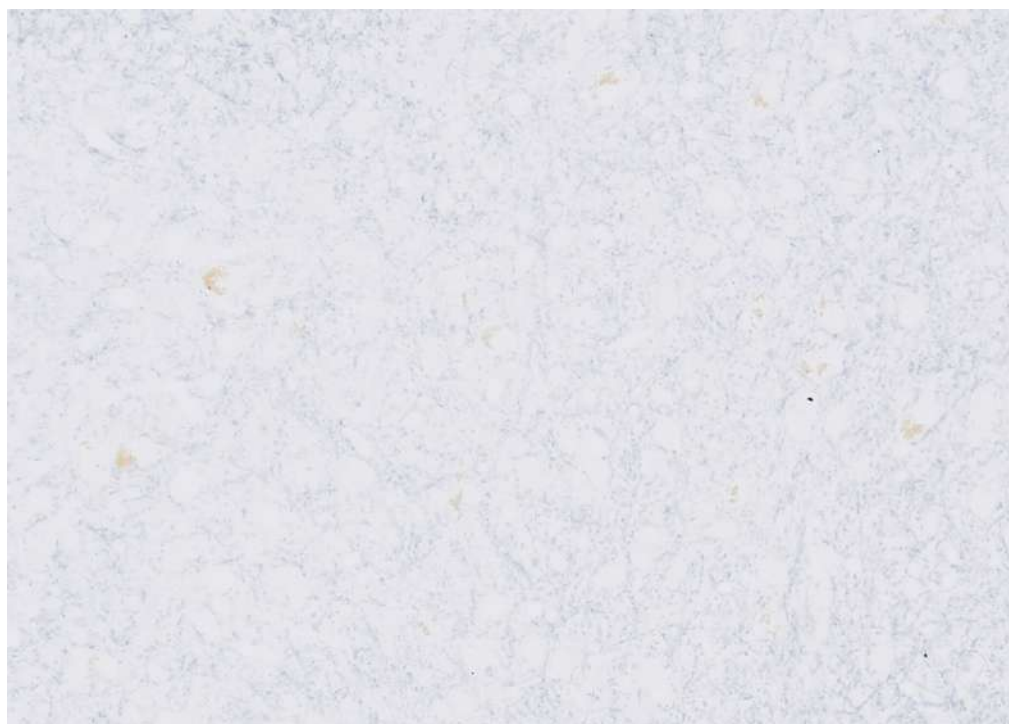


Figura 37- Resultado de marcación de membrana neuronal (azul) en tejido parafinado de ratón transgénico (neuromelanina expresada en marrón) del anticuerpo KCC2 a una concentración 1:500.

Prueba 3 → KCC2 + Lamin B abcam doble (parafina i FF).

Esta prueba se realizó con tejido congelado y parafinado de ratón transgénico y rata Tyr-Veh con concentraciones de 1:300/1:500 para el anticuerpo KCC2 y con una concentración de 1:1000 para el anticuerpo Lamin B de Abcam. Hicimos dos tipos de tinciones: una donde se veía claramente la marcación neuronal y la de membrana/citoplasma del mismo color, en azul, y otra donde se distinguían los núcleos de las neuronas y su membrana/citoplasma (azul y rojo). Estos han sido los resultados obtenidos:

TEJIDO CONGELADO → RATA 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-BLUE)



Figura 38- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido congelado (FF) de rata Tyr-Veh a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-blue.

TEJIDO CONGELADO → RATA 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-RED)



Figura 39- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido congelado (FF) de rata Tyr-Veh a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-RED

TEJIDO CONGELADO → RATÓN 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-BLUE)



Figura 40- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido congelado (FF) de ratón transgénico a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-blue.

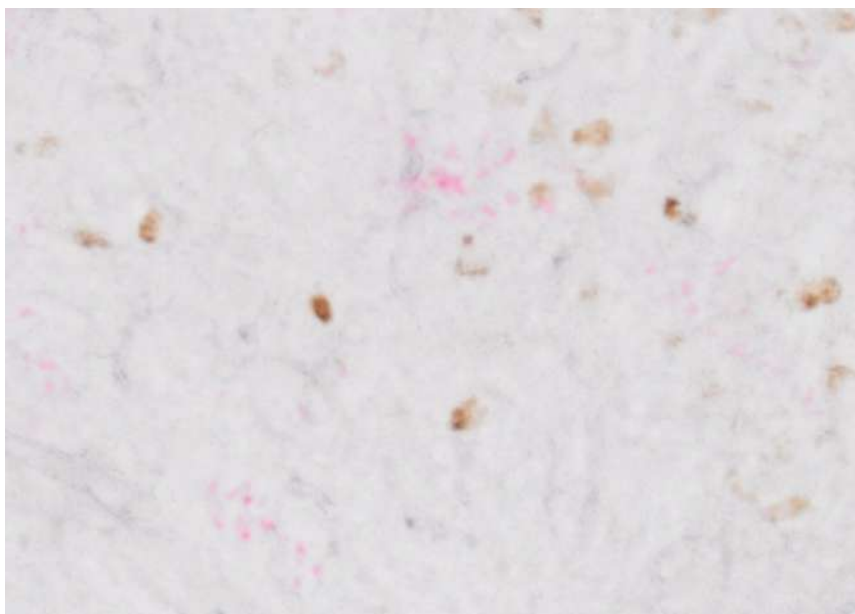


Figura 41- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido congelado (FF) de ratón transgénico a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam blue-red.

TEJIDO PARAFINADO → RATA 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-BLUE)

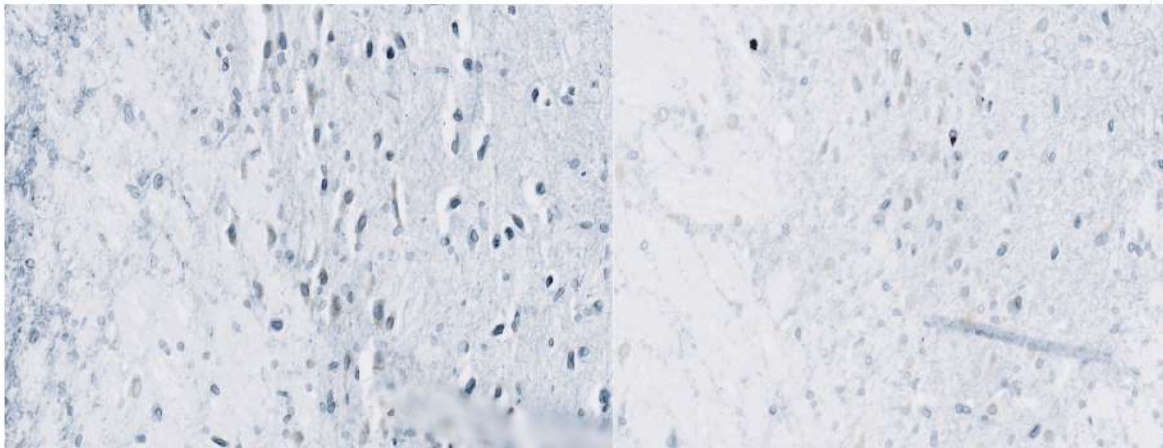


Figura 42- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido parafinado de rata Tyr-Veh a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-blue.

TEJIDO PARAFINADO → RATA 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-RED)

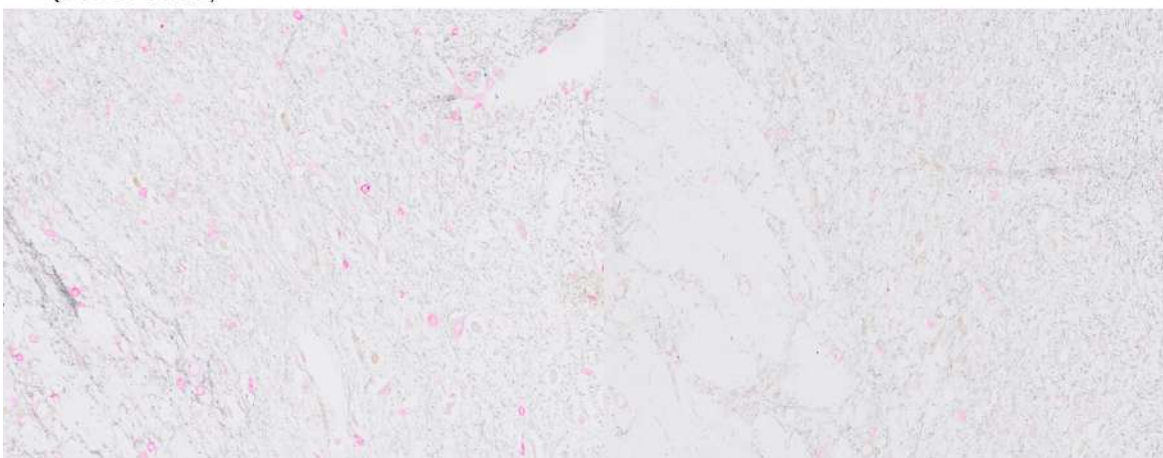


Figura 43- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido parafinado de rata Tyr-Veh a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-red.

TEJIDO PARAFINADO → RATÓN TG 1:300 /1:500 KCC2 1:1000 LAMIN B
(BLUE-BLUE)

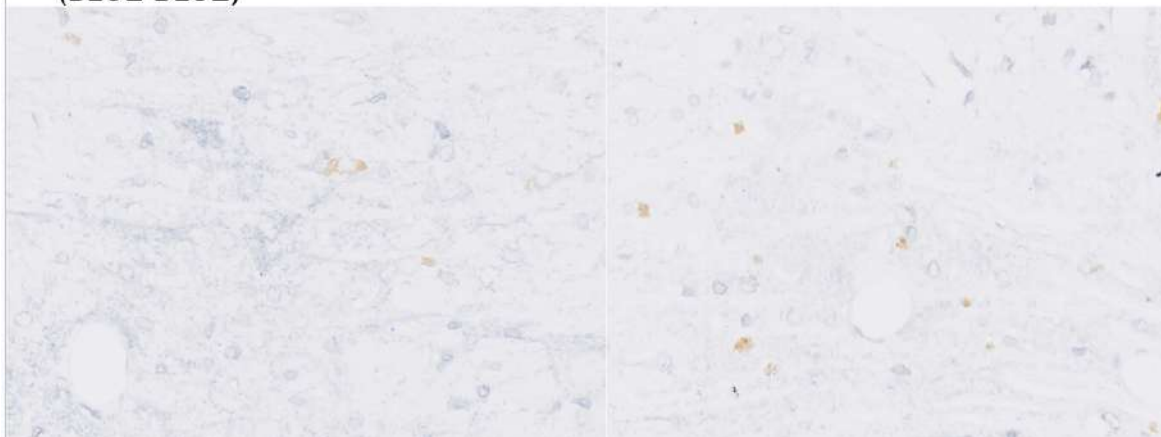


Figura 44- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido parafinado de ratón transgénico a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam(izquierda) y 1:500 KCC2/ 1:1000 Lamin B Abcam(derecha) blue-blue.

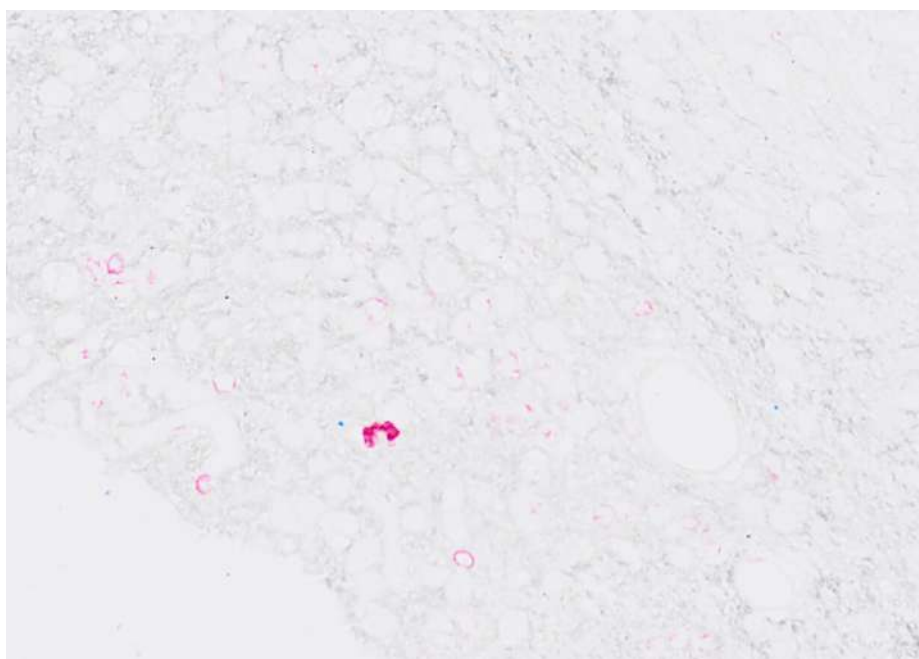


Figura 45- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido parafinado de ratón transgénico a concentraciones 1:300 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam blue-red.

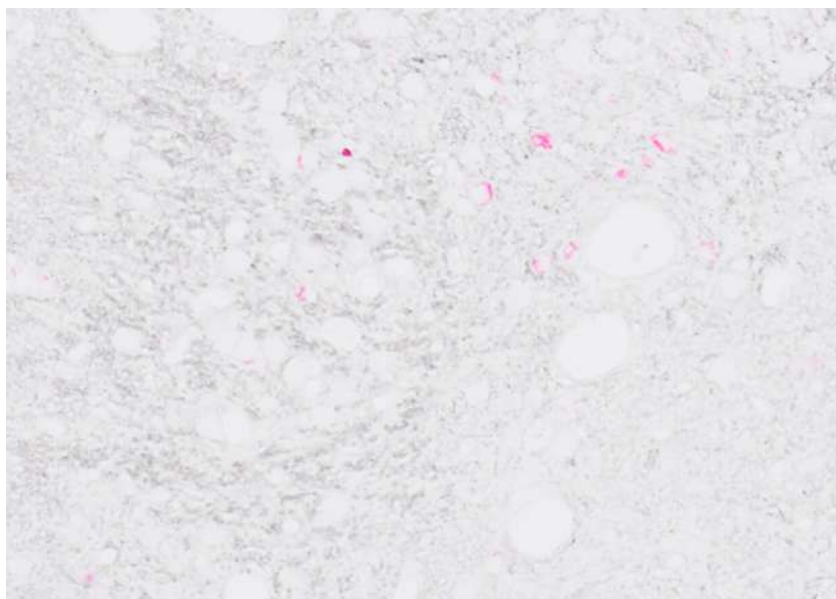


Figura 46- Resultado de la doble tinción de KCC2 y Lamin B Abcam en tejido parafinado de ratón transgénico a concentraciones 1:500 KCC2 /1:1000 Lamin B Abcam blue-red.

Conclusiones Pruebas 2 y 3:

- El anticuerpo Lamin B abcam funciona mejor usando Vector SG que Impact Red para la marcación nuclear.
- En todos los casos, tanto para KCC2 como para Lamin B, cuanto más concentración haya, mejor será la tinción.
- KCC2 es un anticuerpo muy inespecífico y no marca correctamente la membrana de las neuronas, sino que tiene también una marcación citoplasmática, lo que podría suponer un problema a la hora del reconocimiento celular.
- En todos los casos se ven mejor marcados los anticuerpos en parafina que no con muestras congeladas.

4.6 Análisis en Software Aiforia Cloud e ImageJ

Aiforia Cloud es una plataforma donde los científicos, médicos, investigadores y patólogos pueden subir imágenes previamente escaneadas (en el caso de este proyecto han sido escaneadas con un escáner Olympus para muestras histológicas de alta calidad) y almacenarlas para crear algoritmos de inteligencia artificial y así hacer más ameno lo que con un programa se haría de manera manual. Esto supone un ahorro de tiempo muy grande ya que desde *Aiforia* se entrena al algoritmo para cumplir una funcionalidad y así traducir las imágenes en decisiones clínicas y nuevos descubrimientos

Por otro lado, antes de que llegara *Aiforia*, lo más comúnmente usado era ImageJ para hacer análisis en muestras histológicas de pacientes y animales. No obstante, *Aiforia* tiene la limitación de que, aun siendo muy preciso con sus resultados, no proporciona código abierto con el cual se pueda ver cómo hace la detección de estos parámetros.

Ahora bien, en ImageJ al ser un programa que te muestra resultados a partir de un área concreta que el usuario dibuja, supone una limitación ya que hay que ir célula por célula y sólo funciona con fotos tomadas de una región, en este caso, del cerebro. En *Aiforia* te permite subir la imagen de toda la muestra y tiene una gran capacidad de aumento, por lo que se puede seleccionar toda una misma área de la muestra y de esta manera tiene un margen de pérdida de información mucho menor que ImageJ.

ImageJ ofrece una amplia gama de herramientas para el procesado de imágenes así como la segmentación, medición, análisis espacial y el uso de operaciones morfológicas para modificar la estructura de una imagen. En el caso del análisis de imágenes histológicas lo que se busca es invertir los colores de las imágenes para el fácil reconocimiento de las áreas que hay que seleccionar minuciosamente. Una vez hecho eso, aparecen los valores útiles para el control de la enfermedad ya que nos puede decir la densidad de pigmento y área de una región de interés.

Aún así, después del resultado se debe mantener almacenada esa información para ser modificada posteriormente haciendo su correspondiente normalización y teniendo en cuenta la pigmentación de fondo de la imagen.

El análisis de datos en ImageJ funciona de la siguiente manera:

- Se sube la imagen y desde Freehand Selections seleccionamos la siguiente forma ovalada:

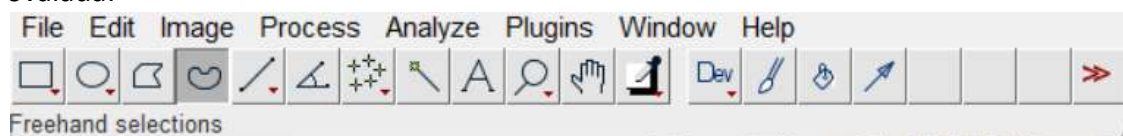


Figura 47 - Freehand Selections de ImageJ

- Invertimos la escala de colores de la imagen presionando las teclas Ctrl+Shift+I
- Dibujamos el área de la cual queremos extraer la información
- Presionamos Ctrl+M para que aparezcan los valores del análisis

La extracción de parámetros en ImageJ se hace de la siguiente manera:

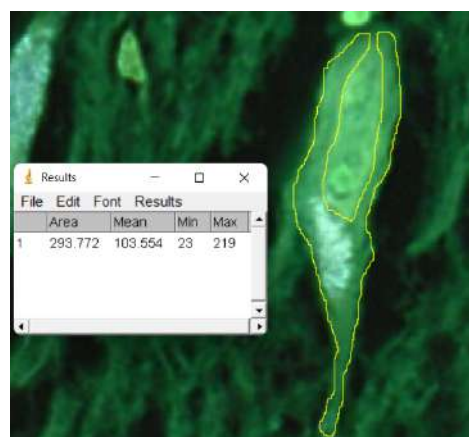


Figura 48 - Análisis del área y la media de neuromelanina de una célula aislando el núcleo en ImageJ.

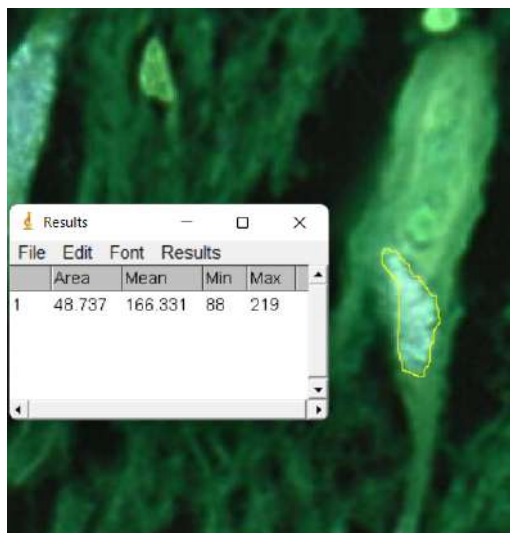


Figura 49 - Análisis del área y la media de neuromelanina de la región acumulada de una célula en ImageJ.

El porcentaje de área ocupada se calcula dividiendo el área de la región acumulada de neuromelanina entre el área total de la célula excluyendo el núcleo y multiplicando por 100.

En la normalización de los valores, sólo hay que modificar aquel relacionado con la media del pigmento ya que estamos haciendo un análisis en muestras teñidas con hematoxilina-eosina, por lo tanto, hay que tener en cuenta en background. Para eso, dibujamos una pequeña región de interés el cual no tenga células por medio para poder restarlo a la media del pigmento en ambos casos ya que se sobrepone la pigmentación de la neuromelanina con la pigmentación de la tinción. Al restarlo, sólo obtenemos lo que realmente nos importa: la cantidad media de neuromelanina.

Por ejemplo, en una de las muestras a analizar (caso control 1408) hemos obtenido los siguientes valores:

	NM Densit. (Total cell area) HE					NM Densit. (occupied area) HE				Occupied area (%)
	Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max	
N1	2761	135,823	20	194		2414	143,881	27	194	87.432

Tabla 2 - Valores sin normalizar de una neurona en ImageJ.

Normalized data										
NM Densit. (Total area) HE					NM Densit. (occupied area) HE				Density	
Area	Mean	Min	Max		Area	Mean	Min	Max		
2761	59,481	20	194		2414	67,539	27	194	27.978	

Tabla 3 - Valores normalizados de una neurona en ImageJ.

En este caso, la media del parámetro “Blank” que hemos generado en ImageJ y exportado a nuestro excel ha sido de 76342, por lo que la “Mean” de la información normalizada corresponde al resultado de la resta.

Para el último parámetro, la neuromelanina extracelular, hay que hacer lo mismo. Seleccionar un área de interés donde aparezca neuromelanina fuera de cualquier neurona y hacer la media de este pigmento.

En Aiforia, una vez se ha subido la imagen o el batch de imágenes para su entrenamiento, se deben usar las anotaciones para clasificar los diferentes parámetros a estudiar.

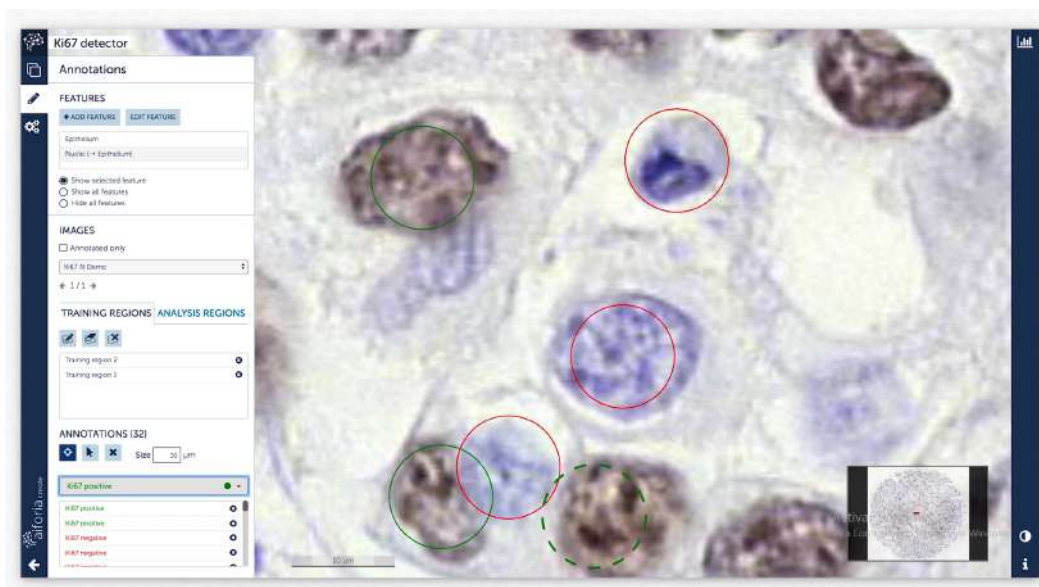


Figura 50 - Anotaciones de diferentes clases en Aiforia Cloud para su entrenamiento.

En el caso de *Aiforia*, el algoritmo generado permite localizar todos los parámetros ya que ha sido previamente entrenado para ello y al seleccionar un área de interés de toda la muestra nos genera automáticamente un Excel donde queda toda la información recopilada por clases.

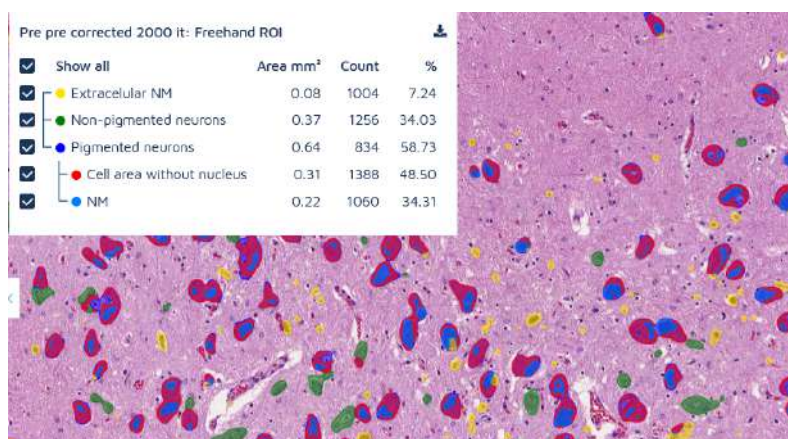


Figura 51 - Generación de información del algoritmo de IA en el software Aiforia Cloud.

4.7 Procesado de imagen y algoritmo YOLOv8

Este apartado se dividirá en dos módulos: el primero es el procesado de imagen en escala de grises para finalmente lograr un blob analysis, y el segundo consta del proceso del algoritmo *YOLOv8* para la detección y conteo de neuronas con sus correspondientes métricas.

- Blob analysis

Para el procesado de imágenes con tinción de hematoxilina-eosina hay que tener varias cosas en cuenta: el background y la coloración de los componentes.

Para poder empezar a hacer el análisis necesitamos aislar regiones de la *Whole Slide image* con el código 2 del anexo. Una vez seleccionada la región, el código 1 proporciona el análisis completo.

En este tipo de técnicas inmunohistoquímicas, el citosol de la muestra se ve de un color rosado-magenta, lo cual puede ser identificado como ruido a la hora de hacer un análisis filtrando por coloración. Por lo tanto, para intentar procesar una imagen de este tipo, lo más fácil es recurrir a una coloración la cual podamos seleccionar la intensidad de los componentes a identificar y esta es la escala de grises.

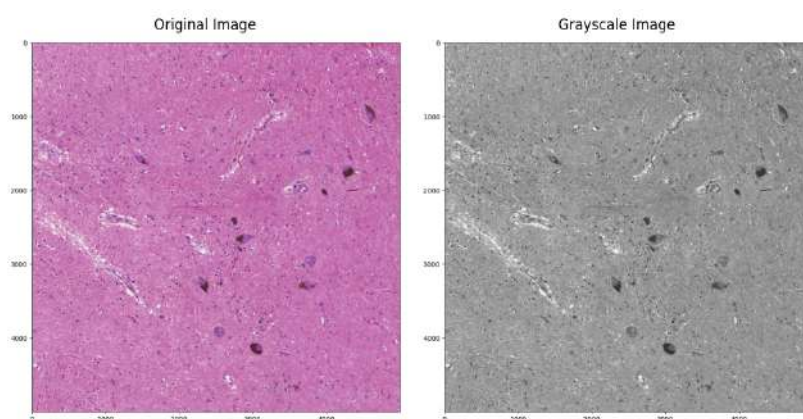


Figura 52 - Imagen original e imagen en escala de grises de la muestra Parkinson 1082.

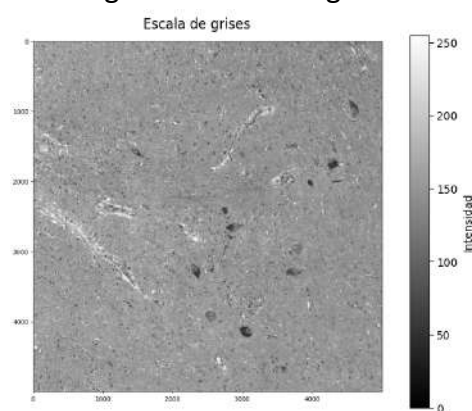


Figura 53 - Imagen en escala de grises de la muestra Parkinson 1082 con leyenda de intensidad.

Hay que convertir la imagen original a escala de grises y añadirle una leyenda para poder ver cuáles son los componentes neurológicos los cuales estamos interesados en aislar y contar. Este valor será diferente dependiendo de la intensidad con la que haya salido la tinción. En algunos casos, se ven de color magenta más intenso y morado menos intenso, por lo tanto hay que adaptar el rango de valores según la muestra a analizar.

Una vez hecho esto, hay que hacer la máscara con la que se aislarán los componentes que correspondan con los rangos establecidos. Esto se consigue con la función `cv2.threshold` de OpenCV [24] en Python que se utiliza para convertir una imagen en una imagen binaria, es decir, una imagen en la que los píxeles solo pueden tener uno de dos valores posibles: blanco o negro.

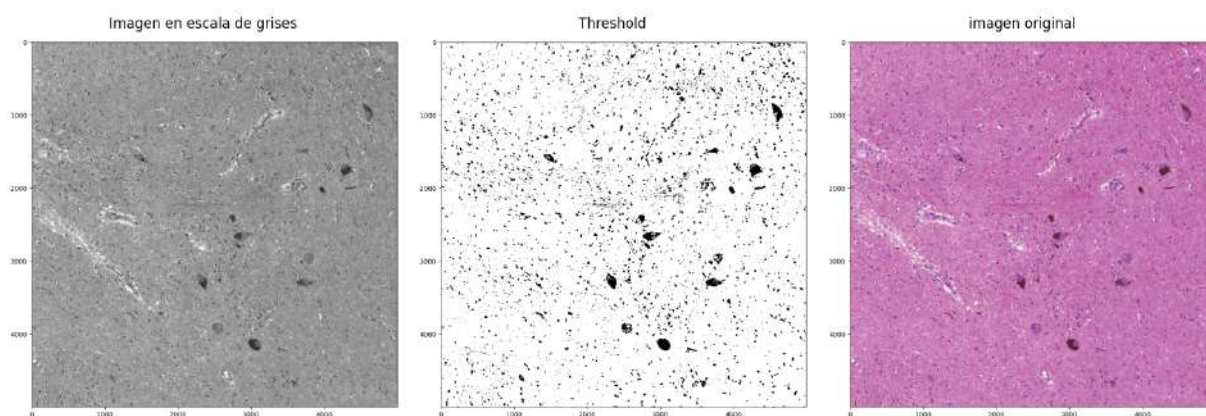


Figura 54 - Imagen procesada en escala de grises y después de haberle aplicado la función `cv2.threshold`.

En la imagen se puede observar que se han detectado correctamente las neuronas como esos puntos negros más grandes y compactos. Sin embargo, los puntos más pequeños son del mismo color que las neuronas, pero corresponden a células gliales, las cuales son irrelevantes para nuestro análisis.

La manera de deshacerse de ellas es filtrándolas como si fueran ruido a través de operaciones morfológicas. En todos los casos se ha comprobado que usando las operaciones de `cv2.MORPH_CLOSE` y `cv2.MORPH_OPEN` se procesan bien estos puntos. *Close* es una operación morfológica en OpenCV que combina dos operaciones: la dilatación seguida de una erosión. La dilatación amplía las regiones blancas en una imagen binaria (píxeles blancos), mientras que la erosión las reduce. Por otro lado, *open* es otra operación morfológica en OpenCV que implica dos pasos: una erosión seguida de una dilatación.

En el ámbito de la morfología de imágenes, la erosión disminuye las áreas blancas en una imagen binaria, mientras que la dilatación las expande[24].

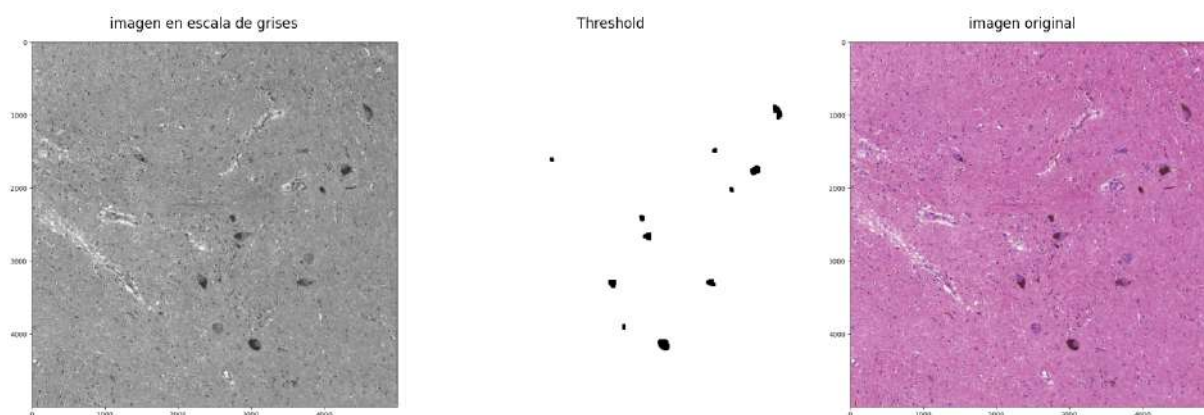


Figura 55 - Imagen procesada en escala de grises y después de haberle aplicado la función `cv2.threshold` con operaciones morfológicas.

Para acabar, una vez ya tenemos aislada nuestra máscara con las neuronas identificadas, hemos de proceder a dibujar los círculos sobre cada punto detectado y establecer un contador. Para ello, se ha usado la función `cv2.findContours` [24] y recorriendo la imagen con un bucle para detectar los componentes. Además se pueden extraer las coordenadas de cada neurona detectada en el mismo bucle teniendo en cuenta su radio, centro de x y centro de y. De esta manera podríamos verificar la ubicación de las neuronas cuando se haya implementado el algoritmo de IA y contrastar informaciones.

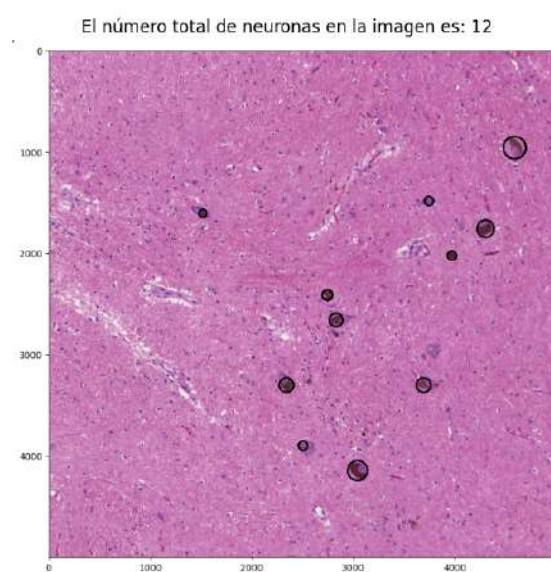


Figura 56 - Imagen original con círculos dibujados sobre cada neurona detectada y con el resultado del contador en el título.

- Algoritmo YOLOv8 para detección de objetos

En cuanto al algoritmo de inteligencia artificial para la detección y el conteo neuronal automático se han usado diferentes imágenes para el entrenamiento y la validación ya que después de varias pruebas, resultó ser mayor la precisión en la detección de objetos de mayor tamaño que no en las imágenes donde había mayor concentración de objetos a detectar, como pueden ser las imágenes del *blob analysis*.

En este caso, se han usado 300 imágenes como base de datos. El 70% de las imágenes han sido destinadas a realizar el entrenamiento del algoritmo, el 20% han sido usadas para la validación y el 10% restante para el testeo. Las imágenes han sido obtenidas gracias a los cortes de cerebros humanos con tinción hematoxilina-eosina proporcionados por el instituto de investigación de Vall d’Hebron (VHIR).

El primer paso para poder tener los datos listos y empezar a trabajar con ellos es empezar con las anotaciones. Las anotaciones son herramientas que nos ayudan a ubicar objetos en el espacio. En nuestro caso, las neuronas de cada fotografía del dataset tienen que ser etiquetadas para que el algoritmo entienda los patrones de detección que debe seguir.

Las anotaciones se hacen a través de un programa llamado *LabelImg*. Este programa proporcionará un fichero “.txt” al procesar cada imagen donde cada línea del fichero es información sobre las neuronas que se encuentran en la imagen y cada línea tiene información sobre: (id_objeto , centro_x, centro_y, ancho, alto), de manera que se puedan ubicar los componentes[25].



Figura 57 - Proceso de etiquetado de imágenes con *LabelImg*. El primer paso indicado con el número 1 es cambiar el formato a YOLO, posteriormente (2) seleccionamos “*Create Rectbox*” para cada neurona donde queremos dibujar su *bounding box* , finalmente en el paso 3 tenemos los objetos identificados.

Una vez tenemos todas las imágenes etiquetadas, empieza el desarrollo del código que entrena, valida y testea el algoritmo.

El algoritmo consta de 7 archivos: el preprocesado de datos, el archivo donde entrenamos el conjunto de datos, otro donde se realiza la prueba después del entrenamiento y la validación, un archivo que indica el conteo de *bounding boxes* y que guarda las coordenadas en un csv y otros 3 archivos de configuración con estructura similar a un archivo .json donde nos indica los parámetros que utilizaremos para el modelo como puede ser el nombre de la clase a identificar, el modelo pre-entrenado que usaremos, tamaño de imágenes, número de *epochs*, *batch size*...etc.

Para poder dar una visión general y resumida de todo el algoritmo que se encuentra en los códigos 3,4 y 5 del anexo, la explicación de esta se dividirá en 4 módulos:

Preprocesado de datos

Una vez tenemos todas las imágenes y sus correspondientes etiquetas, vamos a necesitar pre-procesar estos datos de manera que haya suficientes imágenes para el entrenamiento, la validación de este y el posterior testeo.

Primero se crean los directorios necesarios para poder tener organizada la distribución de datos, después se hace una lista de todas las imágenes para elegir algunas al azar y dividir las en los paquetes que se han comentado al principio.

Un 70% de esas imágenes se usarán para el entrenamiento, mientras que el 20% se usará para validación y el 10% restante para el testeo, donde se medirán los niveles de precisión. Una vez procesados estos porcentajes, se definirá una función para copiar los archivos y añadirlos a los directorios que hemos creado al principio. El código se puede encontrar comentado en más detalle línea por línea en el anexo.

Módulo 2: Entrenamiento de datos

En este módulo se trabajará con dos archivos: el archivo de entrenamiento donde tendremos la función principal para analizar los datos y hacer que el modelo pre-entrenado aprenda en base a estos y a sus correspondientes etiquetas, y luego otro archivo de configuración donde hay información importante así como el modelo pre-entrenado, la ruta al archivo de base de datos donde se encuentra el nombre y el identificador del objeto a detectar...etc., el cual será llamado por el archivo de entrenamiento para obtener su información.

El archivo `config_train.yaml` contiene los parámetros para el entrenamiento, como el nombre del proyecto, modelo preentrenado, ruta de los datos, épocas, tamaño de imagen, tamaño del lote (*batch size*), etc. El código carga estos parámetros desde el archivo YAML usando la librería `yaml`.

El proyecto se llama "cell_train". Este nombre representa la tarea específica para la que se está entrenando el modelo, como detectar células en una imagen. El modelo preentrenado se llama "yolov8l.pt". Esto indica que se está utilizando un modelo YOLOv8 con arquitectura "l" (*large* o grande) como punto de partida para el entrenamiento.

Se entrenará durante 100 épocas. Cada época representa un pase completo a través de todo el conjunto de datos durante el entrenamiento. También, el tamaño del lote (*batch size*) es de 16 y durante el entrenamiento, se procesarán y actualizarán los pesos del modelo después de procesar conjuntos de 16 imágenes a la vez.

El tamaño de las imágenes durante el entrenamiento será de 640x640 píxeles. Esta es la resolución a la que se redimensionarán las imágenes antes de ser alimentadas al modelo.

La ruta de los datos se encuentra en "C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset.yaml". Esta ruta apunta a un archivo YAML que probablemente contiene información sobre las imágenes, etiquetas y la estructura del conjunto de datos a utilizar para entrenar el modelo.

Se realizará validación durante el entrenamiento. Esto implica evaluar periódicamente el rendimiento del modelo en un conjunto de datos separado que no se utiliza para entrenar. Ayuda a controlar el sobreajuste y evaluar el rendimiento general. Además, los gráficos y las métricas de rendimiento se generarán y guardarán durante el entrenamiento

Además de haber hecho el modelo predictivo, este módulo también nos genera automáticamente información como curvas de precisión, *training batches*, *validation batches* y resultados en formato .csv para su exploración con más detalle.

Módulo 3: Testeo de datos

Este módulo, al igual que el segundo, trabajará con un archivo de configuración similar. Tiene una estructura muy parecida al entrenamiento de datos, pero en este caso la única diferencia es que aquí cambiará la ruta de modelo por el que ya ha sido entrenado y usará la función `model.predict` que, junto con el archivo de configuración, guardará los resultados del proceso. Se le ha establecido un umbral para la detección de objetos del 70%, de manera que solo mostrará los resultados de igual o mayor predicción.

Módulo 4: Detección de bounding boxes para la extracción de sus coordenadas.

En este último punto del código, se selecciona una imagen y se carga el modelo ya entrenado para hacer la predicción neuronal sobre esta. Se define además un *dataframe* donde se guardaran las coordenadas de las bounding boxes que haya encontrado en la imagen a través de la predicción del modelo.

Además, itera a través de las clases que encuentra, en este caso solo hay una clase a identificar, y actualiza el contador a medida que los va encontrando.

Una vez encuentra las neuronas, es decir, los objetos pertenecientes a la misma clase, dibuja los correspondientes rectángulos a su alrededor y modifica el texto del rectángulo para que, en vez de que salga la predicción, salga el número de neurona que está encontrando. Así, cada neurona identificada con un *object_id* es más fácil de reconocer en el *dataframe* creado anteriormente para poder ver sus coordenadas en la imagen. Finalmente, muestra por consola el resultado del conteo neuronal de la imagen.

5 Resultados del análisis en Python

Aquí se muestran los primeros resultados del código donde se procesa la imagen por colores y en escala de grises para obtener las neuronas aisladas en círculos junto con el recuento de estas. Las siguientes imágenes corresponden a los casos control, donde la enfermedad de Parkinson no está presente.

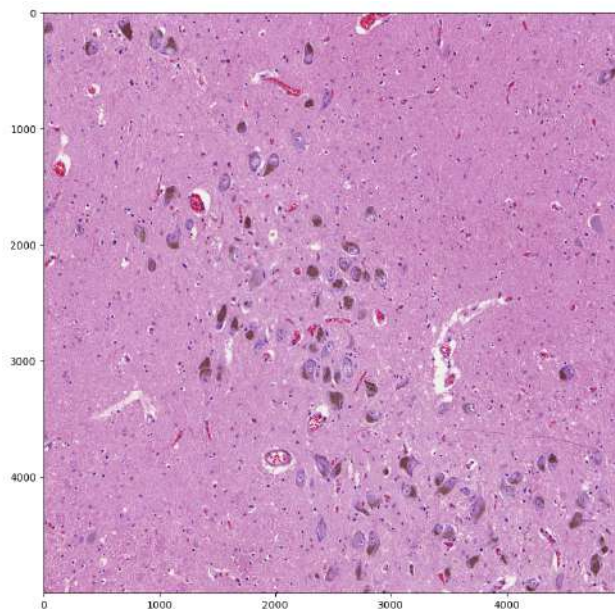


Figura 58 - Imagen original de la región seleccionada para la muestra 1408

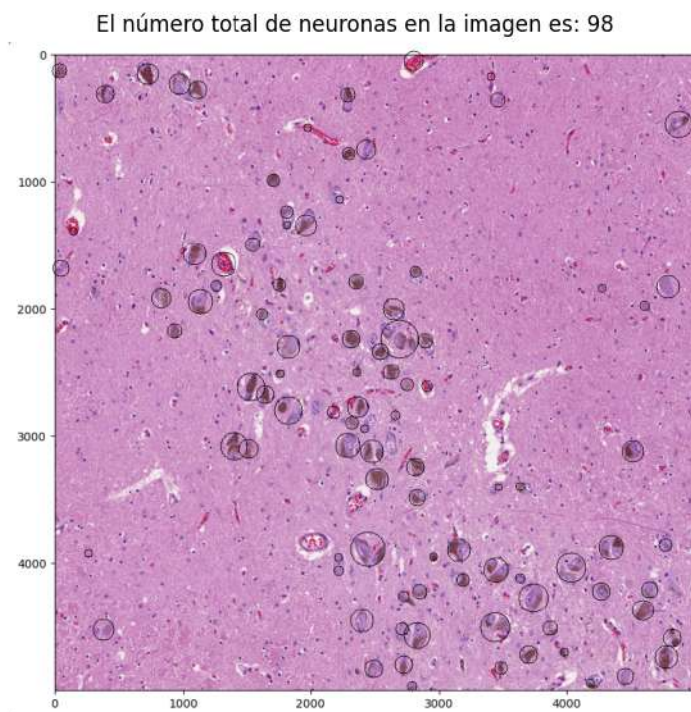


Figura 59 - Resultado del recuento neuronal para la muestra control 1408 donde se ve el recuento neuronal en el título de la imagen y círculos redondeando cada neurona detectada.

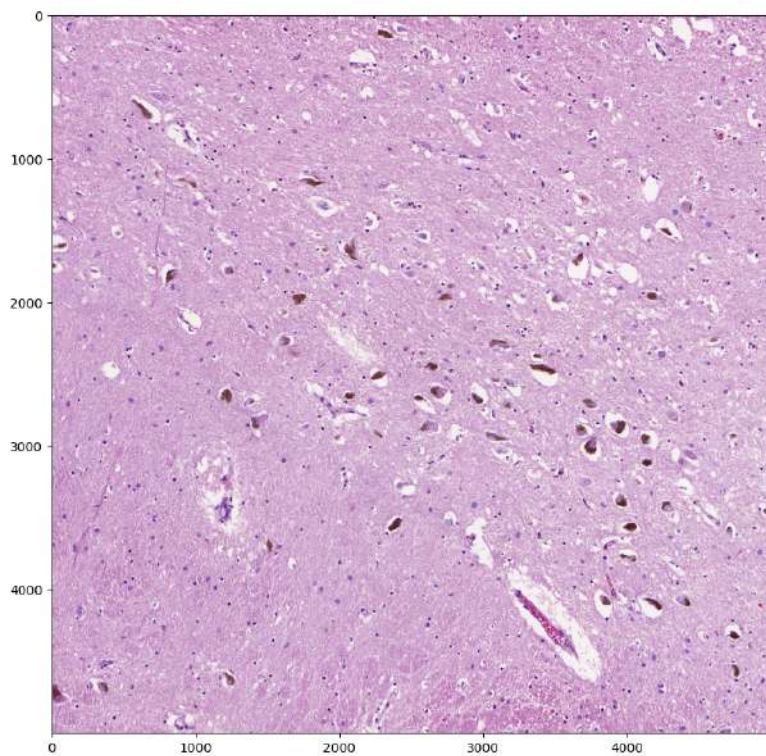


Figura 60 - Imagen original de la región seleccionada para la muestra 1541

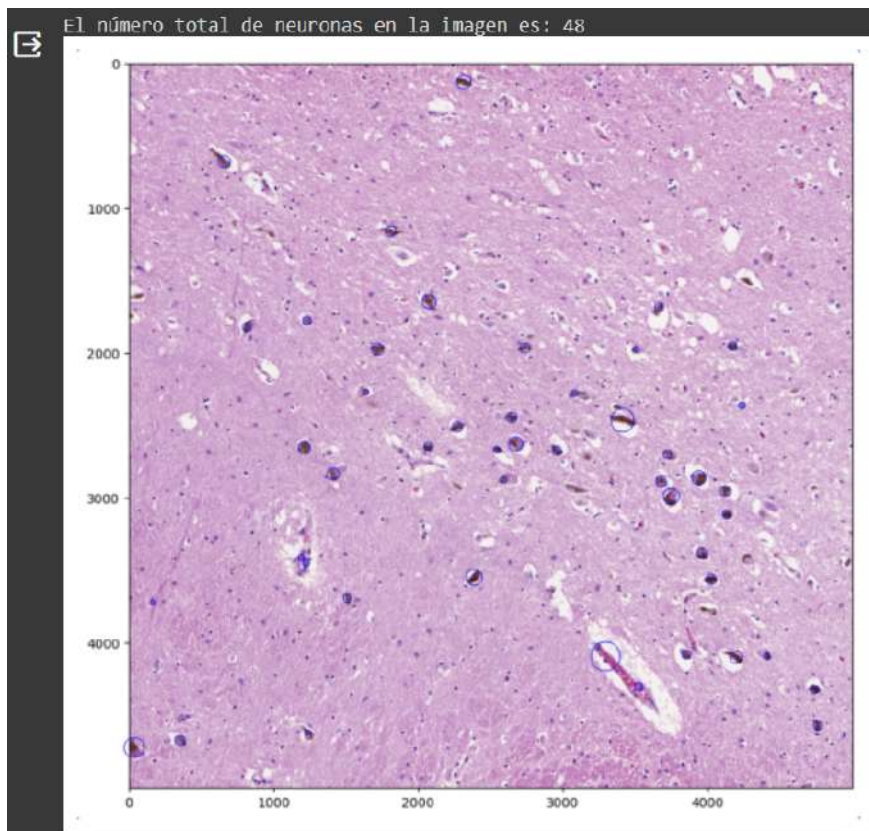


Figura 61 - Resultado del recuento neuronal para la muestra control 1541 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

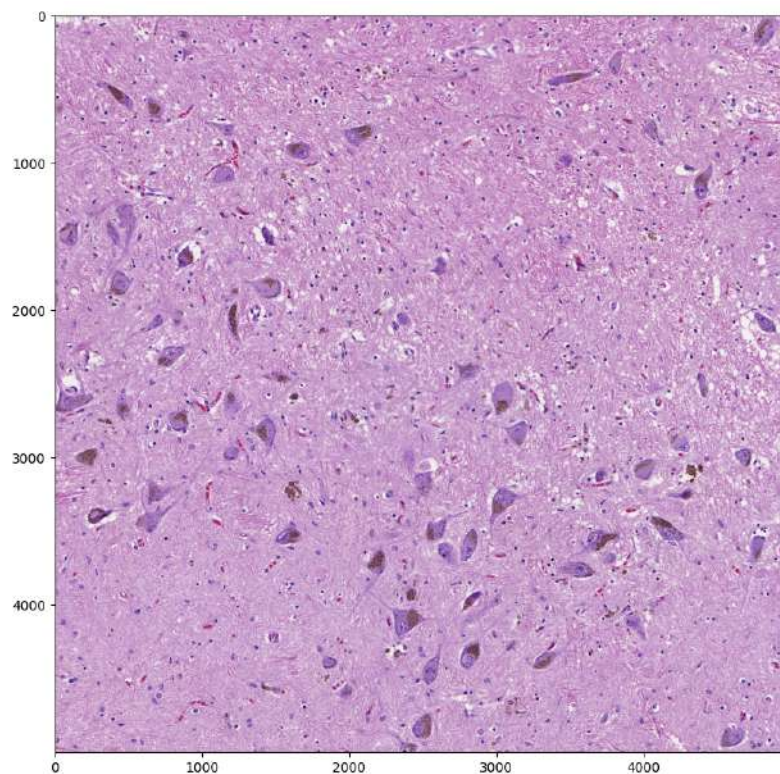


Figura 62 - Imagen original de la región seleccionada para la muestra 1679

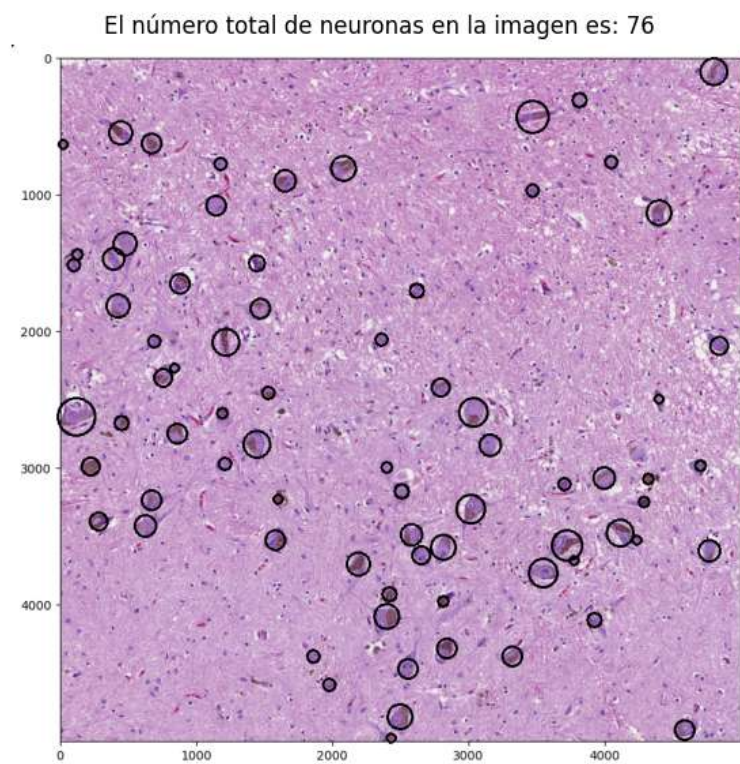


Figura 63 - Resultado del recuento neuronal para la muestra control 1679 donde se ve el recuento neuronal en el título de la imagen y círculos redondeando cada neurona detectada.

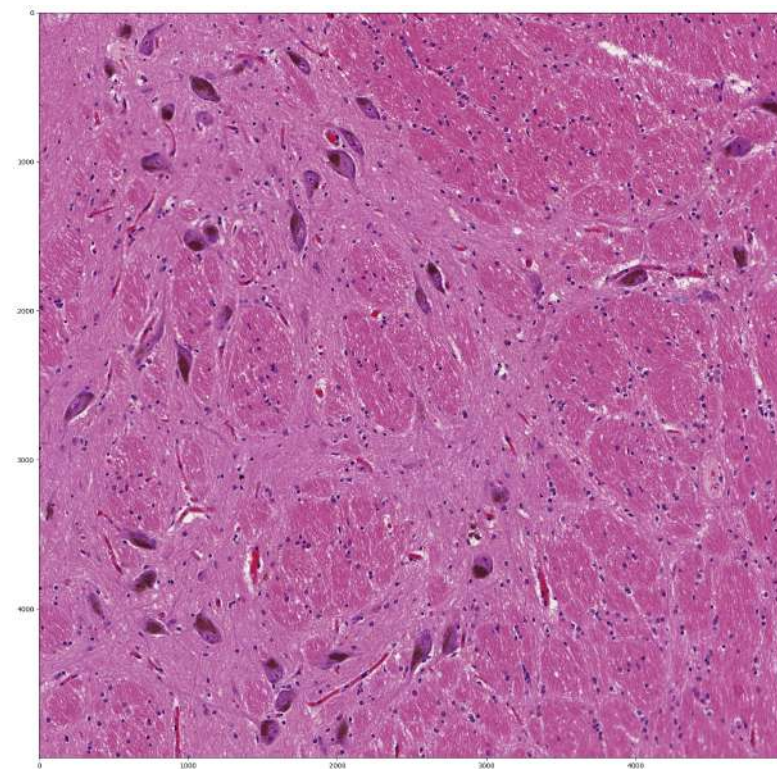


Figura 64 - Imagen original de la región seleccionada para la muestra 1937

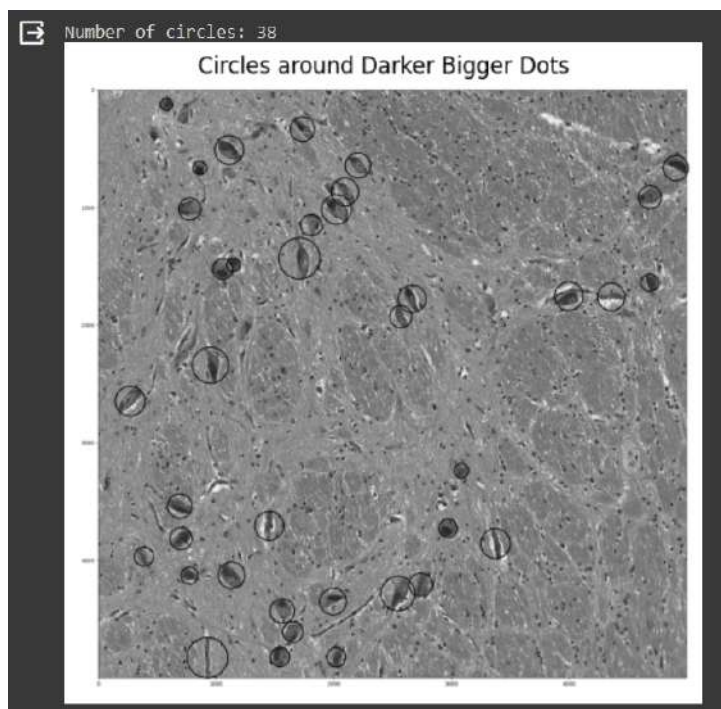


Figura 65 - Resultado del recuento neuronal para la muestra control 1937 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

A continuación, se muestran los resultados del mismo análisis en muestras de enfermos de Parkinson:

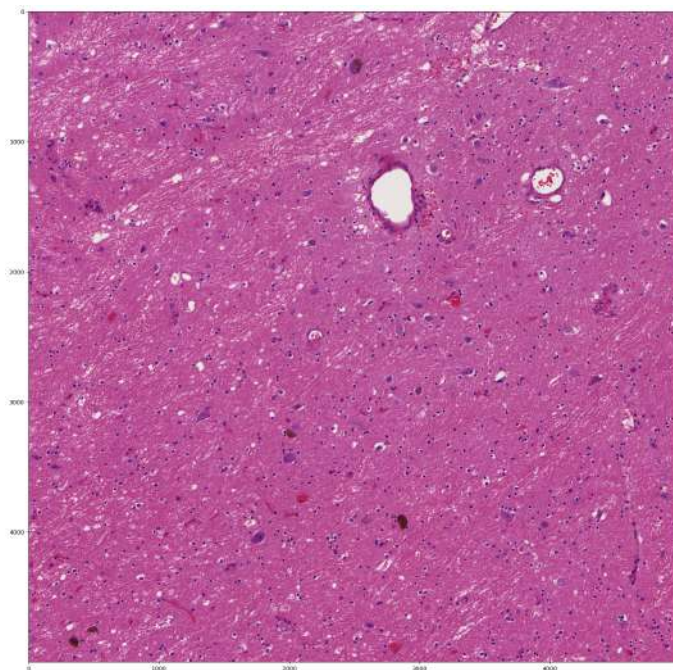


Figura 66 - Imagen original de la muestra Parkinson 930.

El número total de neuronas en la imagen es: 16

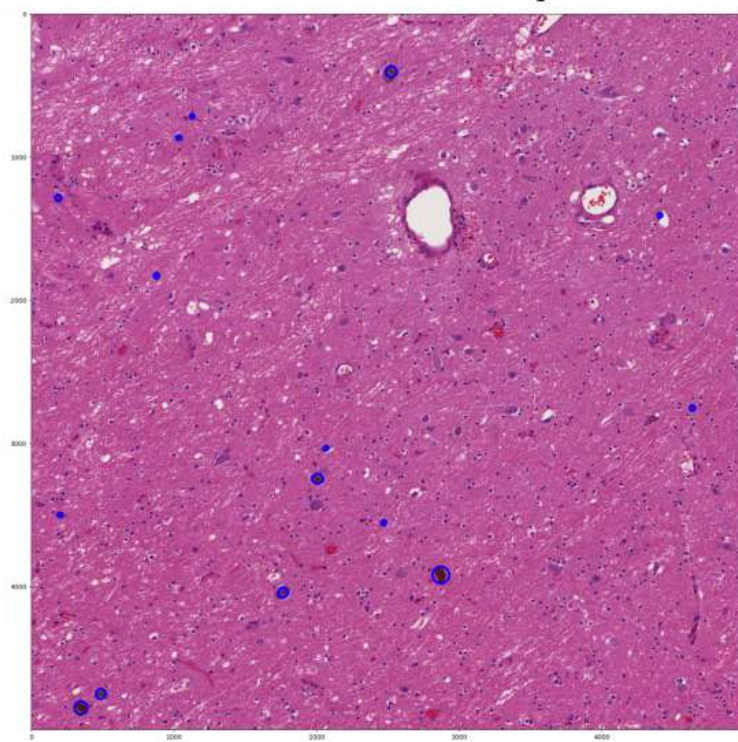


Figura 67 - Resultado del recuento neuronal para la muestra Parkinson 930 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

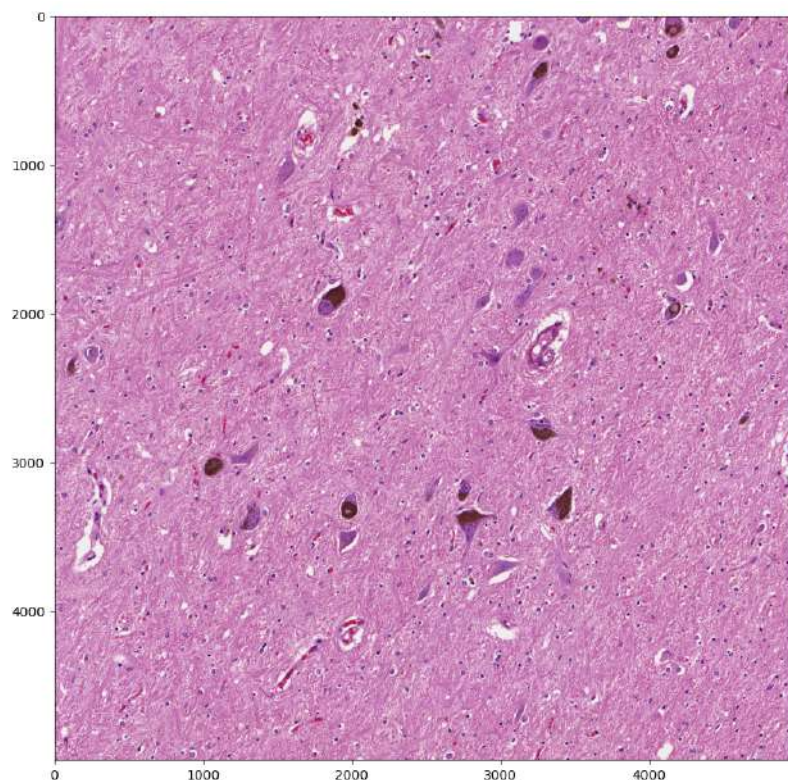


Figura 68 - Imagen original de la muestra Parkinson 962.

El número total de neuronas en la imagen es: 39

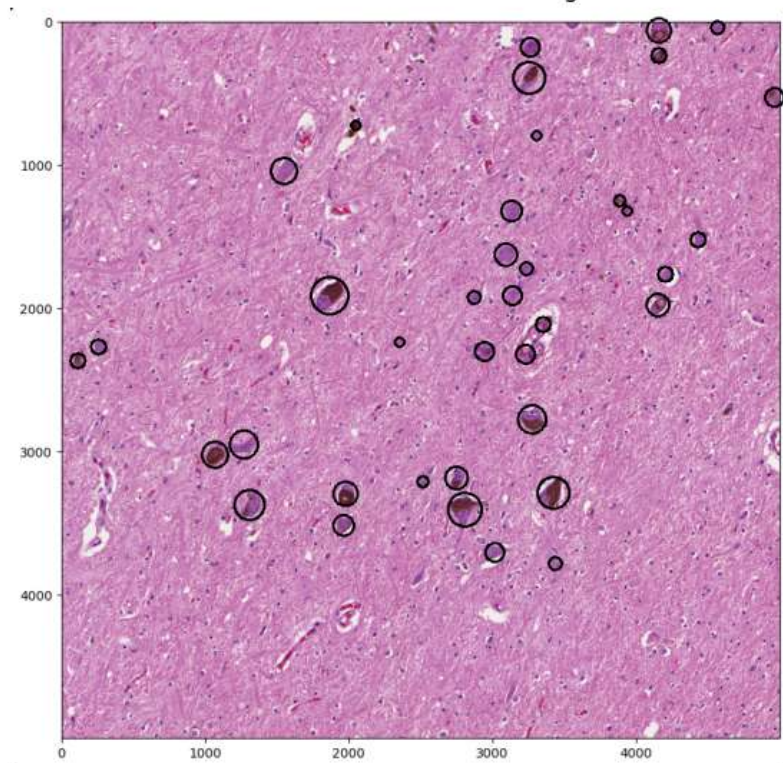


Figura 69 - Resultado del recuento neuronal para la muestra Parkinson 962 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

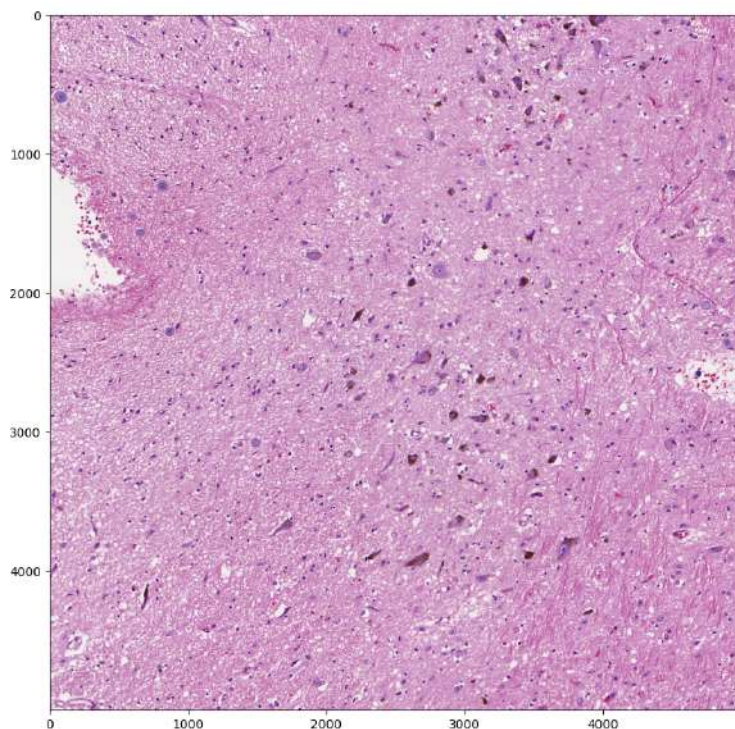


Figura 70 - Imagen original de la muestra Parkinson 1006.

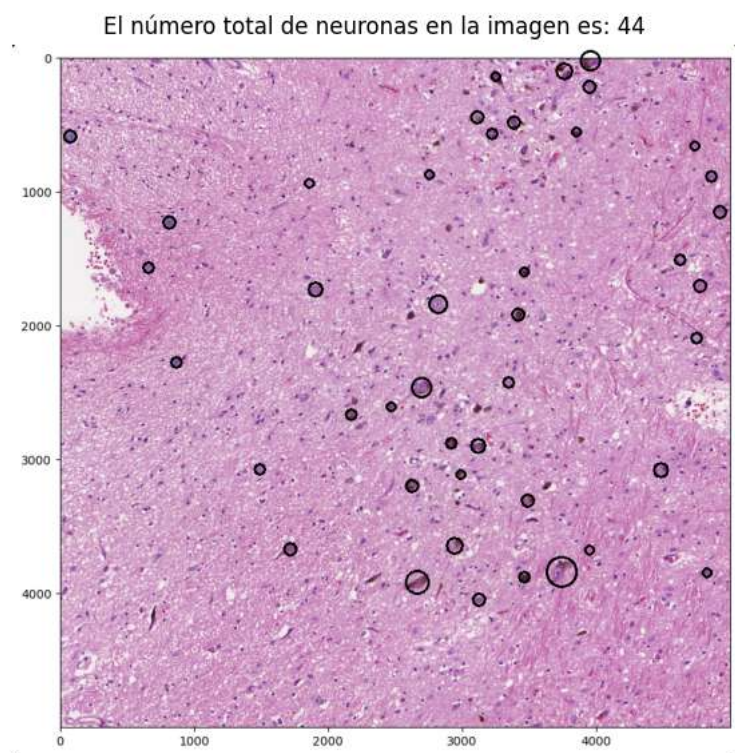


Figura 71 - Resultado del recuento neuronal para la muestra Parkinson 1006 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

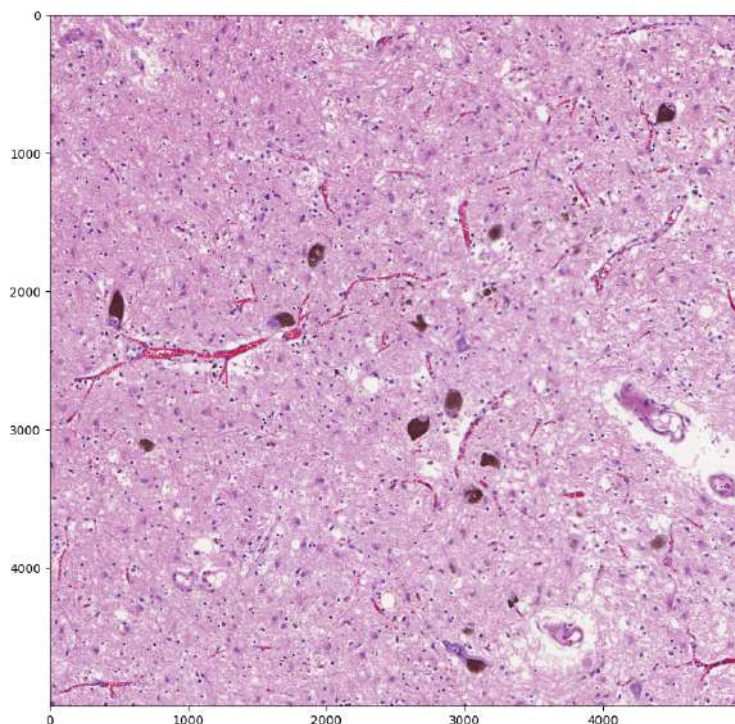


Figura 72 - Imagen original de la muestra Parkinson 1027.

El número total de neuronas en la imagen es: 14

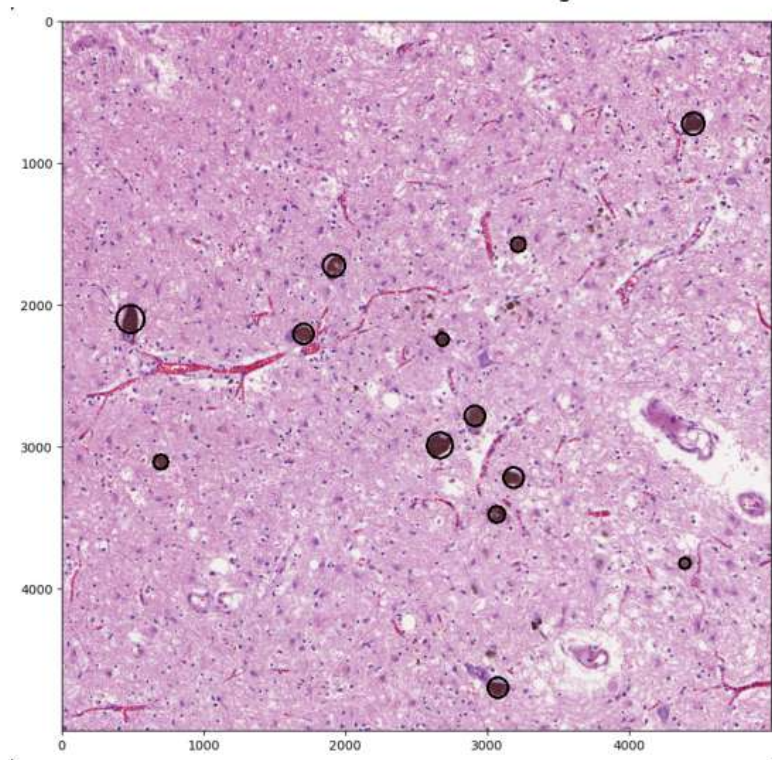


Figura 73 - Resultado del recuento neuronal para la muestra Parkinson 1027 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

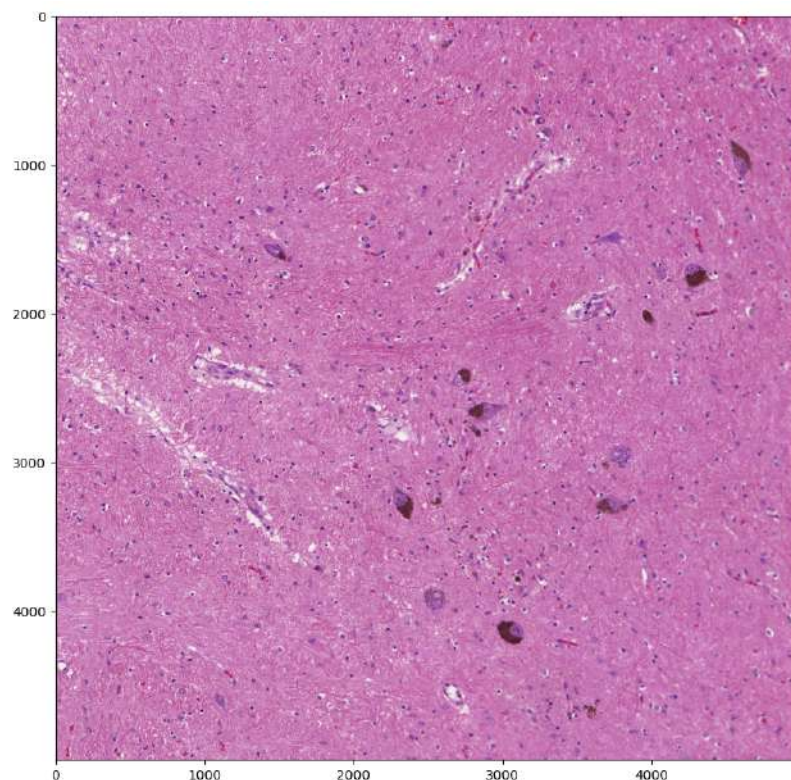


Figura 74 - Imagen original de la muestra Parkinson 1082.

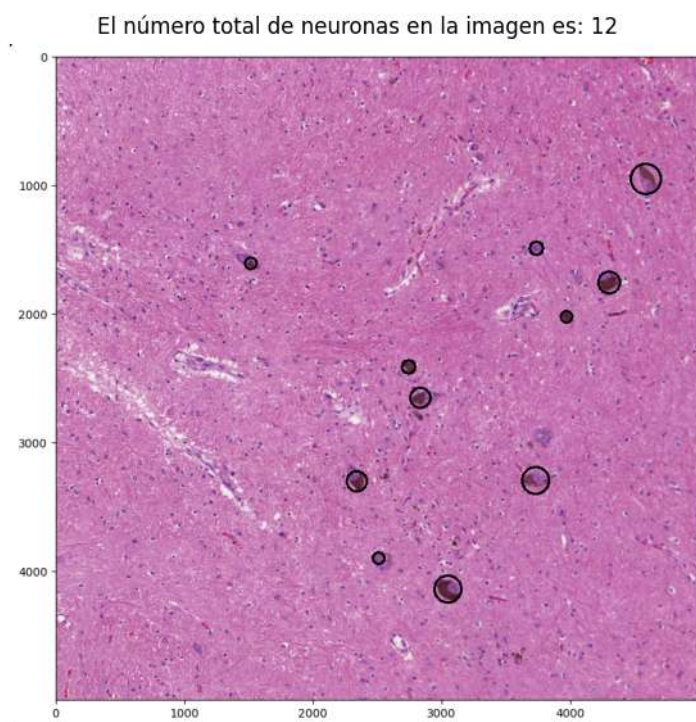


Figura 75 - Resultado del recuento neuronal para la muestra Parkinson 1082 donde se ve el recuento neuronal y círculos redondeando cada neurona detectada.

Circulo	Centro_x	Centro_y	Radio
Circulo 1	162	1508	14
Circulo 2	205	1478	11
Circulo 3	598	1260	11
Circulo 4	939	1222	18
Circulo 5	816	1109	5
Circulo 6	117	1093	5
Circulo 7	673	1015	11
Circulo 8	691	949	5
Circulo 9	1482	863	6
Circulo 10	325	578	6
Circulo 11	1412	448	5
Circulo 12	113	411	7
Circulo 13	373	281	5
Circulo 14	402	235	5
Circulo 15	832	139	12
Circulo 16	801	794	1128

Figura 76 - Coordenadas extraídas de la muestra Parkinson 930 (16 neuronas en la imagen).

Como podemos observar, el recuento final de las neuronas en cada imagen nos puede dar una información muy relevante a la hora de predecir el estado del paciente frente a la enfermedad.

Se observa una clara desigualdad a la hora del recuento ya que en los casos control, donde no se manifiesta la enfermedad, existe un mayor número de neuronas. Sin embargo, en los casos Parkinson donde la enfermedad se encuentra presente, el número de estas disminuye drásticamente debido a que la acumulación de neuromelanina en las neuronas que habían ha hecho que su membrana neuronal estallara y se produjera la muerte de la célula.

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de la generación del algoritmo de inteligencia artificial con el modelo *YOLOv8* de *Ultralytics*. Esta primera imagen corresponde al resultado del primer batch de validación, donde el algoritmo relaciona las imágenes con sus correspondientes etiquetas y las va ubicando.

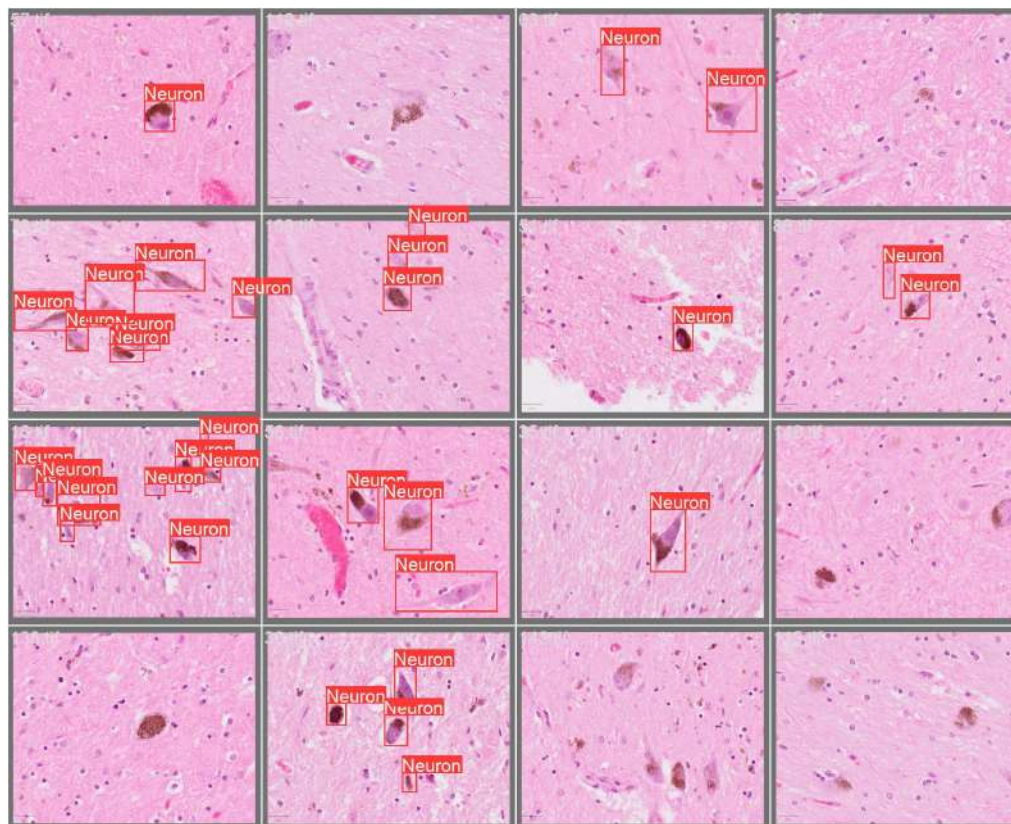


Figura 77 - Batch de validación del algoritmo creado a partir de *YOLOv8*.

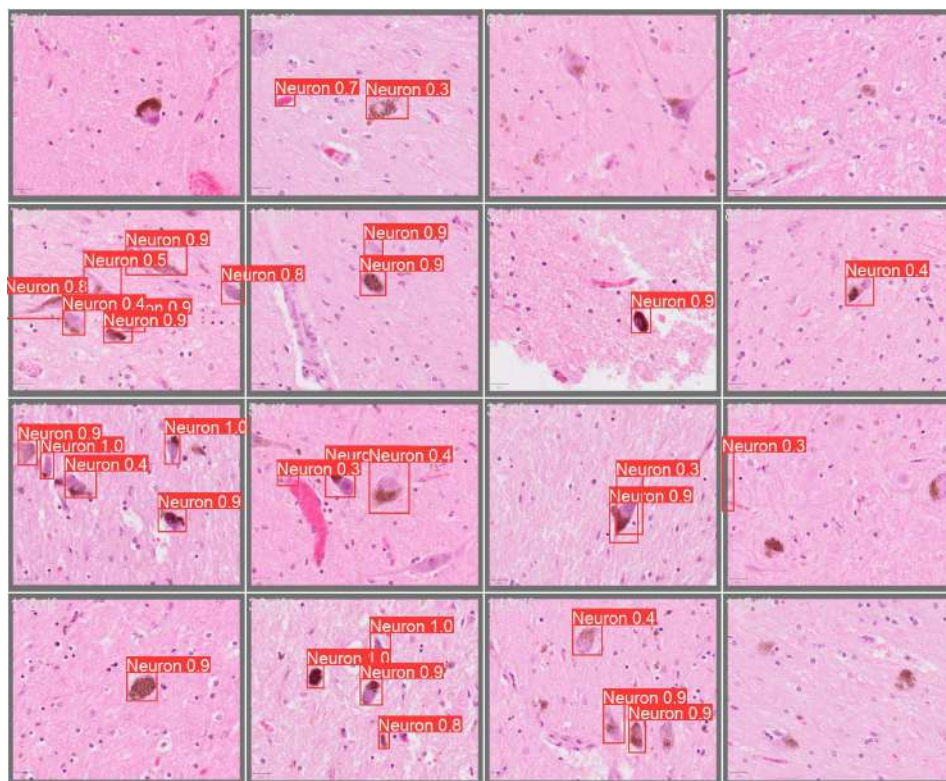


Figura 78 - Segundo *batch* de validación del algoritmo creado a partir de *YOLOv8* con porcentaje de acierto sobre cada neurona detectada.

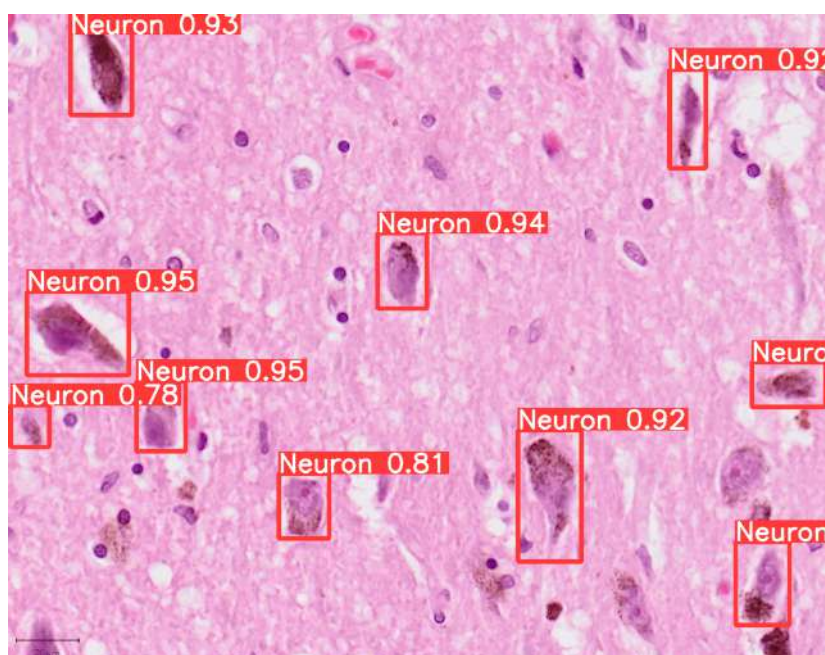


Figura 79 - Neuronas detectadas en una imagen de la carpeta de testeo con su porcentaje de confianza sobre cada una.

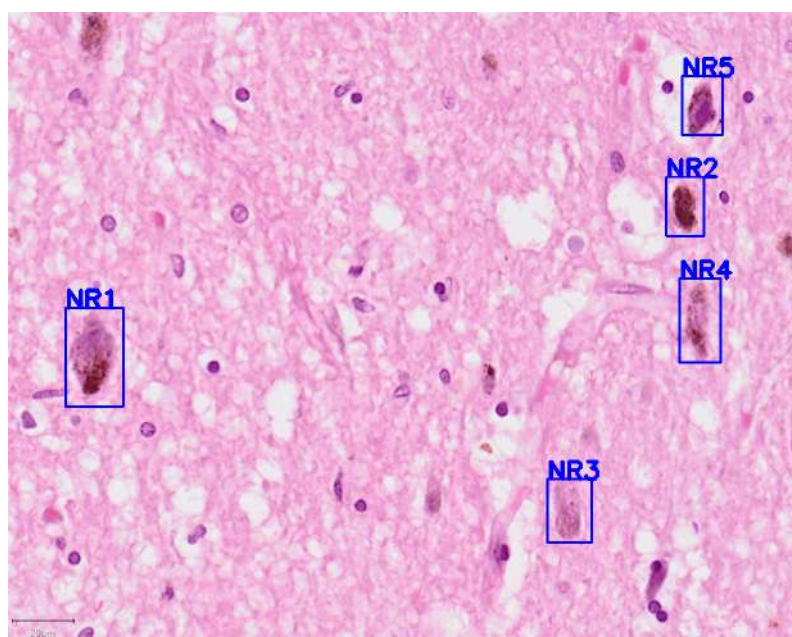


Figura 80 - Neuronas detectadas renombradas para su fácil identificación antes de la extracción de coordenadas.

	id	left	top	right	bottom	class
1	1	71	357	140	476	neuron
2	2	789	200	834	271	neuron
3	3	647	563	700	639	neuron
4	4	805	322	854	423	neuron
5	5	808	79	856	150	neuron

Figura 81 - *Dataframe* con las coordenadas extraídas de las neuronas detectadas en la misma imagen.

La extracción de coordenadas se podría utilizar para contrastar la información de la ubicación en ambos casos: tanto en el procesado en escala de grises como en el algoritmo de IA.

La única limitación encontrada ha sido la poca separación entre objetos a la hora de etiquetar imágenes con neuronas tan concentradas y tan pequeñas. Esta comparación se debe hacer con imágenes y objetos de mismas dimensiones para ver la precisión de ubicación espacial que consiguen extraer ambos códigos.

A continuación, se muestran los resultados de las métricas del algoritmo guardadas de manera automática una vez se ejecuta:

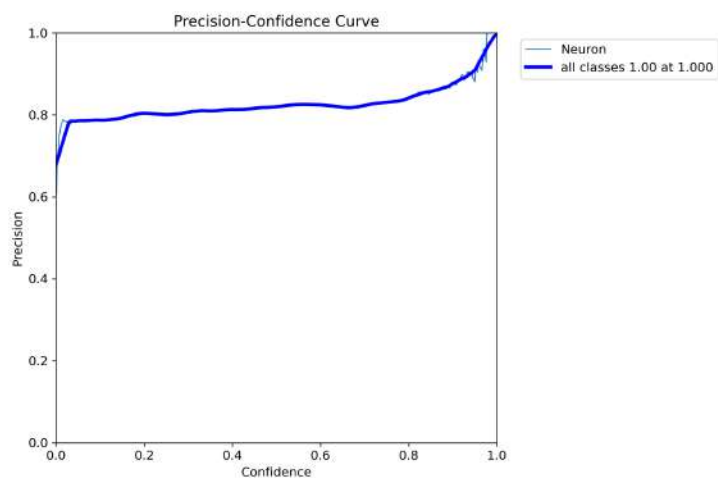


Figura 82 - Curva de precisión del algoritmo

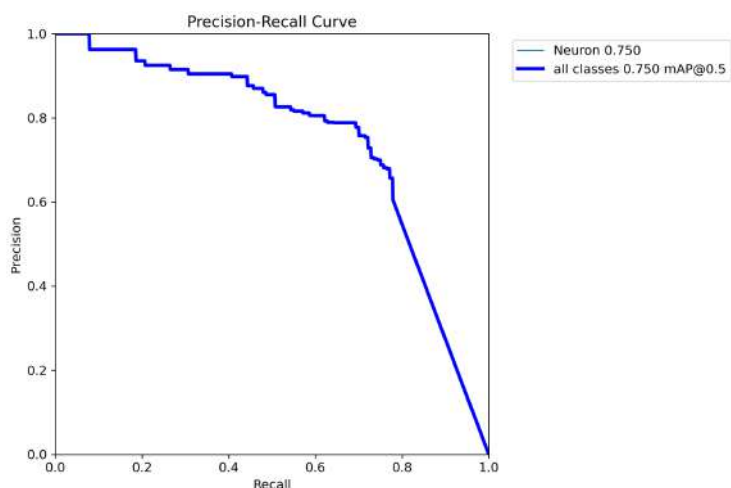


Figura 83 - Curva Precision-Recall

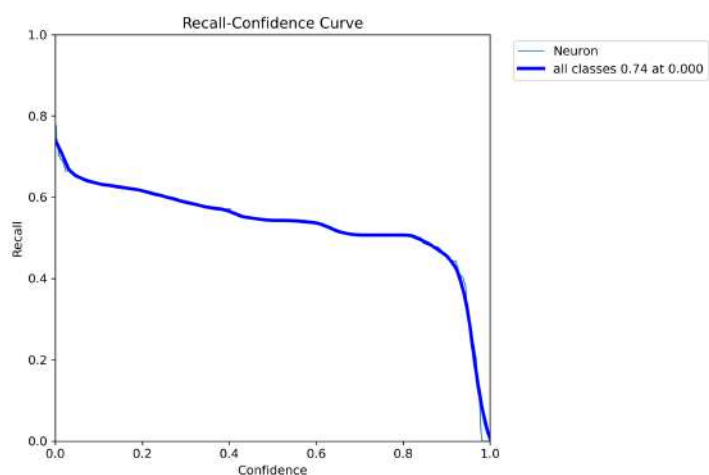


Figura 84 - Curva Recall

6 Conclusiones

De este trabajo se pueden sacar muchas conclusiones, aspectos a mejorar, obstáculos encontrados en el camino y nuevos retos.

Podemos concluir en este proyecto gracias al *blob analysis* realizado con Python en Google Colab, que el rango máximo-mínimo del recuento neuronal en los casos control se encuentra entre 98 y 38, mientras que los casos Parkinson oscila entre 44 y 12, por lo que se puede observar un gran cambio en cuanto a cantidad de neuronas detectadas, ya que en los casos Parkinson se produce una degeneración neuronal. Este programa de análisis de imagen filtrado por coloración puede ser funcional para realizar detección de objetos de menor tamaño.

Para realizar un buen análisis de inteligencia artificial basado en detección de objetos de mayor tamaño, se puede validar la hipótesis de que el modelo *YOLOv8* de *Ultralytics* funciona, no solo para la detección, sino para visualizar el porcentaje de acierto y predicción, el conteo y la extracción de coordenadas.

En cuanto a la interpretación de gráficos, podemos extraer las siguientes conclusiones: la figura 82 nos muestra la precisión y la confianza en cuanto el acierto del modelo entrenado, el cual muestra resultados superiores al 70%, siendo su mayoría el 80% y 90%.

Por otro lado, la curva PR muestra la compensación entre precisión y *recall* para diferentes niveles de umbral. Un área grande bajo la curva indica tanto un alto nivel de *recall* como una alta precisión, donde la alta precisión se refiere a una baja tasa de falsos positivos y el alto *recall* se refiere a una baja tasa de falsos negativos.

Por último, la curva *recall* muestra frecuencia con la que un modelo de aprendizaje automático identifica correctamente los *true positives* de todas las muestras positivas reales en el conjunto de datos.

Gracias a los buenos resultados que nos confirman las curvas extraídas de las métricas del algoritmo podemos confirmar que, no sólo proporciona una buena precisión, sino que cumple con las expectativas acordadas con el umbral establecido.

Si es cierto que se podrían haber extraído varios parámetros más para hacerlo más similar a *Aiforia* pero eso requiere de un análisis más exhaustivo con más horas de investigación acerca de la documentación de librerías necesarias y más código. Otros parámetros podrían haber sido extraídos usando librerías, por ejemplo, para crear anotaciones que ocupen cualquier trazo a mano alzada y no sólo rectángulos, como bien podría ser el área ocupada por el pigmento marrón de la neuromelanina.

La única desventaja que se ha encontrado es que se podría haber validado el algoritmo si funcionase para detectar objetos de menor tamaño, como ha sido en el caso del programa de procesamiento de imagen en escala de grises. De haber sido así, se hubieran comparado las coordenadas de cada muestra ya que en ambos casos se han extraído.

No obstante, un futuro reto consiste en dividir las imágenes originales en segmentos más pequeños para que se pueda ejecutar el algoritmo de IA y después comparar contadores neuronales ya que las coordenadas quedarían descartadas por la reducción del tamaño de la imagen.

Por último, se podría desarrollar un algoritmo parecido y seguramente con resultados muy prometedores sobre muestras donde sólo se utilice un anticuerpo para la membrana plasmática neuronal como los análisis realizados en el Instituto de Investigación de Vall d'Hebron (Barcelona). Así se establece un contorno de detección sin ninguna tinción de fondo que pueda repercutir como ruido en la imagen y la precisión aumentaría más.

8 Referencias

- [1] Carmen Gil, Ana Martínez, "El Parkinson."
- [2] Alberto E. Pereda, "Electrical Synapses and Their Functional Interactions with Chemical Synapses," (Las sinapsis eléctricas y sus interacciones funcionales con las sinapsis químicas). *Nature Reviews Neuroscience* 15 (2014): 250-263,
- [3] Hugo Juárez Olguín, David Calderón Guzmán, Ernestina Hernández García, and Gerardo Barragán Mejía, "The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress".
- [4] Harold W. Gordon, "Laterality of brain activation for risk factors of addiction." (Lateralidad de la activación del cerebro ante factores de riesgo adictivos)
- [5] Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med.* 2020 Feb;36(1):1-12. doi: 10.1016/j.cger.2019.08.002. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31733690; PMCID: PMC6905381.
- [6] Herbert Renz-Polster, Marie-Eve Tremblay, Dorothee Bienzle, and Joachim E. Fischer, "The Pathobiology of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: The Case for Neuroglial Failure"
- [7] Antonina Kouli, Kelli M. Torsney, and Wei-Li Kuan, "Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis" NIH.
- [8] Jenner P, Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology.* 2006 May 23;66(10 Suppl 4):S24-36. doi: 10.1212/wnl.66.10_suppl_4.s24. PMID: 16717250.
- [9] Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990 Mar;54(3):823-7.
- [10] Moon HE, Paek SH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2015 Jun;24(2):103-16.
- [11] Twelves, D., Perkins, K. S. M. & Counsell, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 18, 19-31 (2003).
- [12] Marras C, Beck JC, Bower JH, et al. Prevalence of Parkinson's disease across North America. *NPJ Parkinsons Dis.* 2018;4:21.
- [13] Grupo Andaluz de Trastornos del Movimiento (GATM). Recomendaciones de práctica clínica en la Enfermedad de Parkinson. Sociedad Andaluza de Neurología. 2022
- [14] Moreno-García, A.; Kun, A.; Calero, M.; Calero, O. The Neuromelanin Paradox and Its Dual Role in Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Antioxidants* **2021**, *10*, 124.
- [15] Zecca, L. et al. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 510, 216-220 (2002).
- [16] Halliday, G. M. et al. Evidence for specific phases in the development of human neuromelanin. *J. Neural Transm.* 113, 721-728 (2006).
- [17] Nagatsu, T.; Nakashima, A.; Watanabe, H.; Ito, S.; Wakamatsu, K. Neuromelanin in Parkinson's Disease: Tyrosine Hydroxylase and Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4176.
- [18] European Commission, CORDIS: UE investigation results. Neurotransmitter synthesis disorders: towards a therapeutic correction. [Cordis.europa.eu](http://cordis.europa.eu) .
- [19] Busnatu Ș, Niculescu AG, Bolocan A, Petrescu GED, Păduraru DN, Năstăsăi, et al. Clinical applications of artificial intelligence —an updated overview. *J Clin Med.* 2022;11:2265.
- [20] Abcam. (s.f.). Lamin B1 Antibody [EPR8985(B)] - Nuclear Envelope Marker (ab133741). -
- [21] Santa Cruz Biotechnology. (s.f.). Lamin B1 Antibody (B-10).
- [22] Universidad de Vigo. (s.f.). Técnicas histológicas - Inmunohistoquímica.
- [23] Labclinics. (2018, 18 de junio). Decálogo para principiantes en inmunohistoquímica.
- [24] OpenCV. (s.f.). Image Processing in OpenCV — OpenCV documentation.
- [25] HumanSignal. (s.f.). Labellmg. GitHub. <https://github.com/HumanSignal/labellmg>

[26] Ultralytics. (s. f.). Documentación. Recuperado de <https://docs.ultralytics.com/>

9 Anexo

Código 1: Blob analysis y procesado de imagen en Python 3.11

```
import cv2
from matplotlib import pyplot as plt
imagen=cv2.imread('C:\\Users\\alba\\Desktop\\Finalimg\\Parkinson\\1082.png')
gris = cv2.cvtColor(imagen, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
plt.figure(figsize=(10, 5))

# Original
plt.subplot(1, 2, 1)
plt.title('Original Image')
plt.imshow(cv2.cvtColor(imagen, cv2.COLOR_BGR2RGB))
plt.axis('off')

# Grayscale
plt.subplot(1, 2, 2)
plt.title('Grayscale Image')
plt.imshow(gris, cmap='gray')
plt.axis('off')

plt.tight_layout()
plt.show()

import numpy as np

plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.imshow(gris, cmap='gray')
plt.colorbar(label='Intensidad')
plt.title('Escala de grises')
plt.axis('off')
plt.show()
min_purple = 125
max_purple = 255 #valores a modificar según escala de grises del código
                anterior

_,threshold = cv2.threshold(gris, min_purple, max_purple, cv2.THRESH_BINARY)

plt.figure(figsize=(15, 5))
```

```
# Gris
plt.subplot(1, 3, 1)
plt.title('Imagen en escala de grises')
plt.imshow(gris, cmap='gray')
plt.axis('off')

# Aislada zonas moradas
plt.subplot(1, 3, 2)
plt.title('Threshold')
plt.imshow(threshold, cmap='gray')
plt.axis('off')

# Original image
plt.subplot(1, 3, 3)
plt.title('imagen original')
plt.imshow(cv2.cvtColor(imagen, cv2.COLOR_BGR2RGB))
plt.axis('off')

plt.tight_layout()
plt.show()

# Filtrar ruido
kernel = np.ones((5, 5), np.uint8)
threshold = cv2.morphologyEx(threshold, cv2.MORPH_CLOSE, kernel)
#Filtrar más el ruido
threshold = cv2.morphologyEx(threshold, cv2.MORPH_OPEN, kernel)
kernel = np.ones((7, 7), np.uint8)
threshold = cv2.morphologyEx(threshold, cv2.MORPH_CLOSE, kernel)

plt.figure(figsize=(15, 5))

plt.subplot(1, 3, 1)
plt.title('imagen en escala de grises')
plt.imshow(gris, cmap='gray')
plt.axis('off')

plt.subplot(1, 3, 2)
plt.title('Threshold ')
```

```
plt.imshow(threshold, cmap='gray')
plt.axis('off')

plt.subplot(1, 3, 3)
plt.title('imagen original')
plt.imshow(cv2.cvtColor(imagen, cv2.COLOR_BGR2RGB))
plt.axis('off')

plt.tight_layout()
plt.show()

contours, _ = cv2.findContours(threshold, cv2.RETR_LIST,
                               cv2.CHAIN_APPROX_SIMPLE)

original_circulos = imagen.copy()
contador = 0

for contorno in contours:
    (x, y), radio = cv2.minEnclosingCircle(contorno)
    centro = (int(x), int(y))
    radio = int(radio)

    original_circulos = cv2.circle(original_circulos, centro, radio, (0, 0, 0),
                                   2)
    contador += 1

print(f"El número total de neuronas en la imagen es: {contador}")

plt.figure(figsize=(7, 7))
plt.title(f"El número total de neuronas en la imagen es: {contador}")
plt.imshow(cv2.cvtColor(original_circulos, cv2.COLOR_BGR2RGB))
plt.axis('off')
plt.show()
import pandas as pd

coordenadas = []
```

```
for contorno in contours:
    (x, y), radio = cv2.minEnclosingCircle(contorno)
    centro = (int(x), int(y))
    radio = int(radio)
    coordenadas.append((centro, radio))

data = {
    'Circulo': [f"Circulo {idx + 1}" for idx in range(len(coordenadas))],
    'Centro_x': [centro[0] for centro, _ in coordenadas],
    'Centro_y': [centro[1] for centro, _ in coordenadas],
    'Radio': [radio for _, radio in coordenadas]
}

df = pd.DataFrame(data)

# Save DataFrame to Excel file
file_name = '1027_coords.xlsx'
df.to_excel(file_name, index=False)

display(df)
```

Código 2: Abrir imágenes wholeslide desde la librería OpenSlide y seleccionar una región.

```
import numpy as np
import os
import PIL
import PIL.Image
import tensorflow as tf
# The path can also be read from a config file, etc.
OPENSLIDE_PATH =
    r'C:\Users\alba\AppData\Local\Programs\Python\Python311\Lib\site-packages\o
    penslide\openslide-win64-20231011\bin'

import os
if hasattr(os, 'add_dll_directory'):
    # Windows
    with os.add_dll_directory(OPENSLIDE_PATH):
        import openslide
else:
    import openslide
```

```
import pandas as pd
from glob import glob
from openslide import OpenSlide
from pprint import pprint
import matplotlib.pyplot as plt

train_images = glob("C:\\Users\\alba\\Desktop\\Final
img\\Parkinson\\1082_Wholeslide_Default_Extended.tif")

len(train_images)

slide = OpenSlide("C:\\Users\\alba\\Desktop\\Final
img\\Parkinson\\1082_Wholeslide_Default_Extended.tif")

print(slide.dimensions)
print(slide.level_count)
print(slide.level_dimensions)
print(dict(slide.properties))

region = (25500, 82000)

level = 0

size = (5000, 5000)

region = slide.read_region(region, level, size)

plt.figure(figsize=(10, 10))

plt.imshow(region)
```

Código 3: Preprocesado de datos del algoritmo de IA hecho con YOLOv8.

```
import os
import shutil
import random
from tqdm import tqdm

# crear directorio
def create_directory(path):
    if not os.path.exists(path):
        os.makedirs(path)

# Crear directorio para cada elemento
for data_type in ["train", "valid", "test"]:
    create_directory(os.path.join("dataset", "images", data_type))
    create_directory(os.path.join("dataset", "labels", data_type))

image_files = [f for f in os.listdir("imagenes_labelimg") if not
f.endswith('.txt')] #para cada elemento en el directorio, llamado f, agrega
f a la lista
```

```
random.shuffle(image_files)

train_split = int(0.7 * len(image_files))
valid_split = int(0.2 * len(image_files)) + train_split

train_files = image_files[:train_split]
valid_files = image_files[train_split:valid_split]
test_files = image_files[valid_split:]

# Función para copiar imágenes
def copy_files(files, data_type): #Aquí, data_type toma cada valor de la
    lista ["train", "valid", "test"] sucesivamente en cada iteración del ciclo.
    for file in tqdm(files, desc=f'Copying {data_type} files'): #crea una barra
        de progreso para el bucle que itera sobre la lista de archivos. Descripción
        basada en la variable data_type, que indica qué tipo de archivos ("train",
        "valid" o "test") se están copiando actualmente.
        # Copiar imagen
        shutil.copy(os.path.join("imagenes labeling", file),
                    os.path.join("dataset", "images", data_type, file))

        # Copiar etiqueta
        label_file = file[:-3] + ".xml.txt" #crea el nombre del archivo de
        etiqueta relacionado con el archivo de imagen actual que se está
        procesando. Extrae el nombre del archivo excluyendo los últimos tres
        caracteres. Luego, agrega ".xml.txt" a este nombre de archivo extraído.
        if os.path.exists(os.path.join("imagenes labeling", label_file)):
            shutil.copy(os.path.join("imagenes labeling", label_file),
                        os.path.join("dataset", "labels", data_type,
                        label_file[:-7] + ".txt")) #elimina la extensión ".xml.txt" y agrega ".txt"

copy_files(train_files, "train")
copy_files(valid_files, "valid")
copy_files(test_files, "test")
```

Código 4: Extracción de coordenadas y conteo de neuronas.

```
import os
import cv2
import pandas as pd
from ultralytics import YOLO
```

```
def create_directory(path):
    if not os.path.exists(path):
        os.makedirs(path)

if __name__ == "__main__":
    model_path = r"C:\Users\alba\Desktop\cell\cell_train\train\weights\best.pt"
    iou = 0.5
    conf = 0.5
    imgsz = 640
    device = "0"

    image_path = r"C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset\images\test\19.tif"
    #ejemplo
    saved_folder = "output"

    create_directory(saved_folder)
    model = YOLO(model_path)
    results = model(image_path, device=1, verbose=False) # predict
    count = 0 # counter a cero
    bboxes = pd.DataFrame(columns=["id", "left", "top", "right", "bottom",
    "class"])
    for result in results:
        boxes = result.boxes.data
        cls = boxes[:, 5] #clases
        left, top, right, bottom = boxes[:, 0], boxes[:, 1], boxes[:, 2],
        boxes[:, 3] #coordenadas
        orig_img = result.orig_img
        for i in range(cls.shape[0]):
            if cls[i] == 0:
                count += 1
                cv2.rectangle(orig_img, (int(left[i]), int(top[i])),
                (int(right[i]), int(bottom[i])), (255, 0, 0), 2) #rectangulo
                cv2.putText(orig_img, f"NR{count}", (int(left[i]), int(top[i])),
                cv2.FONT_HERSHEY_SIMPLEX, 1, (255, 0, 0), 3) #texto
                bboxes = pd.concat([bboxes, pd.DataFrame([[count, int(left[i]),
                int(top[i]), int(right[i]), int(bottom[i]), "neuron"], columns=["id",
                "left", "top", "right", "bottom", "class"])] # bounding box to dataframe
                cv2.imwrite(os.path.join(saved_folder, os.path.basename(image_path)),
                orig_img)
            bboxes.to_csv(os.path.join(saved_folder, os.path.basename(image_path)[:4]
            + ".csv"), index=False)

    print(f"Found {count} neurons")
```

Código 5: Código de entrenamiento del modelo

```
import wandb
import yaml
from ultralytics import YOLO

wandb.init(mode="disabled")

if __name__ == "__main__":
    with open("config_train.yaml", "r") as f:
        config = yaml.load(f, Loader=yaml.FullLoader)

    project_name = config['project'] # Project name
    pretrained_model = config['model'] # Pretrained model
    data = config['data'] # Data path
    epochs = config['epochs'] # Epochs
    imgsz = config['imgsz'] # Image size
    batch = config['batch'] # Batch size
    workers = config['workers'] # Workers
    device = config['device'] # Device
    val = config['val'] # Validation
    plots = config['plots'] # Plots
    resume = config['resume'] # Resume

    model = YOLO(pretrained_model)

    # Train model
    results = model.train(data=data, epochs=epochs, imgsz=imgsz,
batch=batch, workers=workers, device=device,
                        project=project_name, val=val, plots=plots,
resume=resume, hsv_h=0, hsv_s=0, hsv_v=0,
                        translate=0, scale=0, shear=0, perspective=0,
flipud=0, fliplr=0, mosaic=0)
```

Código 6: Código de testeo del algoritmo

```
import yaml
from ultralytics import YOLO

if __name__ == "__main__":
    with open("config_test.yaml", "r") as f:
        config = yaml.load(f, Loader=yaml.FullLoader)

        project = config['project']
        model_path = config['model']
        source = config['source']
        imgsz = config['imgsz']
        device = config['device']
        conf = config['conf']
        iou = config['iou']
        save = config['save']
        save_txt = config['save_txt']
        show = config['show']
        show_labels = config['show_labels']
        show_conf = config['show_conf']
        show_boxes = config['show_boxes']

        model = YOLO(model_path)
        model.predict(project=project, source=source, imgsz=imgsz,
device=device, conf=conf, iou=iou, save=save, save_txt=save_txt,
                    show=show, show_labels=show_labels, show_conf=show_conf,
show_boxes=show_boxes)
```

Código 7: Archivo de configuración “dataset.yaml”

```
train: C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset\images\train
val: C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset\images\valid
test: C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset\images\test

nc: 1 # numero de clases
names: ['Neuron'] # nombre de 1 clase
```

Código 8: Archivo de configuración “config_train.yaml”

```
project: cell_train
model: yolov8l.pt
data: C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset.yaml
device: 0
epochs: 100
batch: 16
imgsz: 640
workers: 1
val: True
plots: True
resume: False
```

Código 9: Archivo de configuración “config_test.yaml”

```
project: cell_test
model: C:\Users\alba\Desktop\cell\cell_train\train\weights\best.pt
source: C:\Users\alba\Desktop\cell\dataset\images\test
device: 0
conf: 0.7 # object confidence threshold for detection
iou: 0.7 # intersection over union (IoU) threshold for NMS
imgsz: 640
save: True
save_txt: False
show: False
show_labels: True
show_conf: True
show_boxes: True
```