



Universidad de Oviedo

Departamento de Morfología y Biología Celular
Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES
MELANOPSÍNICAS EN LA RETINA DEL RATÓN (*Mus musculus*).
DESARROLLO DE SOFTWARE PARA SU ANÁLISIS.

TESIS DOCTORAL
FELIPE CONTRERAS GARCÍA
2016

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES MELANOPSÍNICAS EN LA RETINA DEL RATÓN (<i>Mus musculus</i>). DESARROLLO DE SOFTWARE PARA SU ANÁLISIS	Inglés: REGULATION OF MELANOPSIN-CONTAINING GANGLION CELLS ACTIVITY IN MOUSE (<i>Mus musculus</i>) RETINA. DEVELOPMENT OF SOFTWARE FOR ITS ANALYSIS

2.- Autor	
Nombre: FELIPE CONTRERAS GARCÍA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR (Interdepartamental)	
Órgano responsable: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	

RESUMEN (en español)

Los seres vivos han evolucionado adaptándose a los cambios ambientales cíclicos, para lo que han desarrollado ritmos fisiológicos que preparan el organismo para tales cambios. Los más estudiados son los circadianos (con un periodo de alrededor de un día) y se manifiestan en ciclos de actividad/reposo, que se sincronizan con los ciclos externos de 24 horas, principalmente por la señal lumínica transmitida a través de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (ipRGC). Las ipRGC integran las señales que reciben de conos y bastones con la que ellas mismas generan al captar la luz mediante el fotorpigmento melanopsina, enviándola al núcleo supraquiasmático (SCN), el reloj biológico principal. Entre las ipRGC existen subpoblaciones celulares que se definen por la cantidad de melanopsina que expresan, el tamaño de su soma, la localización de sus dendritas, así como por la expresión de las dos isoformas de la melanopsina y por su regulación.

En esta tesis doctoral se han desarrollado métodos de registro y medida de la actividad animal basados en vídeo que, combinados con diversas condiciones experimentales, permiten deducir características del funcionamiento de las ipRGC y del SCN. Los resultados obtenidos evidencian que la ausencia de conos y bastones en ratones con degeneración retiniana *rd* podría afectar al desarrollo del SCN. Asimismo, se ha observado que el tiempo de postefectos (demora en manifestar el ritmo endógeno) aumenta con la diferencia entre el periodo endógeno del animal y el fotoperiodo ambiental previo. Se ha puesto de manifiesto igualmente la capacidad de la melanopsina para regenerar su propio sustrato, al observarse que en ratones *rd* la luz azul provoca una modificación progresiva del patrón circadiano. Además, mediante la delección dirigida de células dopaminérgicas en la retina se ha observado un retraso en su actividad bajo condiciones normales de iluminación, lo cual refuerza la idea de un rol crucial de la dopamina en la fisiología de la retina y, en particular, de las ipRGC.

Por otro lado, con el propósito de objetivar las observaciones al microscopio se han construido herramientas informáticas para el estudio avanzado de las preparaciones histológicas. Se ha

desarrollado software para la fusión de imágenes obtenidas manualmente en 3 dimensiones en un microscopio de campo claro y para la fusión por capas celulares de imágenes procedentes de un microscopio confocal. También se ha creado un programa para la detección y medida automatizada de células mediante la combinación de técnicas de análisis de imagen, inteligencia artificial y arquitectura de software. Todo este conjunto de herramientas se ha utilizado para medir la cantidad de fotopigmento en más de 10000 ipRGC, cuantificándose el inmunomarcaje, en unos casos, de la melanopsina total y, en otros, de sus isoformas. El análisis de los datos, empleando técnicas de *data mining*, ha permitido describir varias subpoblaciones celulares en función del diámetro de su soma y de la intensidad de inmunomarcaje, que fueron posteriormente confirmadas mediante la observación de las dendritas de células de cada una de ellas. Se ha creado un modelo probabilístico de clasificación sin precedentes para categorizar los tipos de ipRGC en función de los parámetros mencionados. Este modelo ha permitido cuantificar la expresión *in vivo* e *in vitro* (en cultivo organotípico de retina) de cada tipo celular en diferentes momentos circadianos y combinaciones de iluminación. Nuestros resultados muestran la existencia de un gran grupo de ipRGC no descrito previamente, así como de subpoblaciones con diversa regulación dentro los tipos de ipRGC.

Estas herramientas informáticas, desarrolladas para atender el propósito de la investigación presentada en esta tesis, además de haber sido fundamentales para la obtención de los resultados de la misma, por su carácter innovador y su amplia aplicabilidad, pueden revelarse de gran utilidad en otros campos de investigación.

RESUMEN (en Inglés)

Living beings have evolved and adapted to cyclic environmental changes, developing physiological oscillations that prepare their organism for such changes. Among these physiological rhythms, those of about one day, circadian rhythms, may be the most widely studied ones. The most observable expression of such rhythms are the sleep/wake cycles, which are synchronized with the external 24-hour cycles mainly due to the luminance signal transferred through the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs). ipRGCs integrate the signal they receive from cones and rods with the one they generate themselves when they capture light thanks to the melanopsin photopigment, sending this signal to the suprachiasmatic nucleus (SCN), the main biological clock and regulator of circadian rhythms. Amidst ipRGCs several subpopulations exist. These are defined, among other characteristics, by the amount of melanopsin they express, their soma size, their dendrite location, as well as the expression of both melanopsin isoforms and their regulation.

During this PhD thesis, we have developed video-based animal activity registry and measurement methods which, combined with diverse experimental conditions, enable the

deduction of how ipRGC and SCN features work. Our results show that the absence of cones and rods in retinally degenerate (*rd*) mice may affect SCN development. Likewise, we have noticed that adaptation time to their own endogenous rhythm, i.e. the duration of post-effects, increases with the difference between the endogenous period of the animal and the previous environmental photoperiod. We have also shown the relevance of the capability of melanopsin to regenerate its own substrate through the observation of the modification of the circadian pattern of *rd* mice under blue light. Besides, targeted deletion of dopaminergic cells in the retina has resulted in a delay of activity under normal illumination circumstances, which reinforce the idea of a decisive role for dopamine in the physiology of the retina and, particularly, of the ipRGCs.

Furthermore, in order to standardize microscope observations, we have developed computing tools for an advanced study of histological preparations. We have developed software to manually stitch images obtained in 3 axes in a bright-field microscope as well as in cellular layers of images originated in confocal microscopy. We have also created a program for automated cell detection and measurement with a combination of techniques from image analysis, artificial intelligence and software architecture. We have used this whole set of tools to measure the amount of photopigment in over 10000 ipRGCs, measuring immunolabelling of whole melanopsin in some cases and its isoforms in others. Data analysis employing *data mining* techniques has allowed us to describe various cell subpopulations based on their soma diameter and melanopsin immunolabelling intensity. We have confirmed these subpopulations later on in our research through the observation of dendrites from representative cells. With this, we have created an unprecedented probabilistic classification model that has allowed us to categorize ipRGCs based on the aforementioned parameters. This model has allowed us to quantify the expressions *in vivo* and *in vitro* (in retinal organotypic culture) of each cellular type in different circadian moments and illumination combinations. Our results show the existence of a large ipRGC group which had not been previously described, as well as subpopulations with diverse regulation inside each ipRGC type.

The computing tools we have developed were fundamental in order to achieve the research purposes of this PhD thesis. Moreover, thanks to their innovative nature and broad applicability, they may be of great utility to many other research fields.

La presente tesis doctoral ha sido elaborada en el Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo y adscrita al programa de doctorado interdepartamental "Neurociencias" y posteriormente adaptada al programa de doctorado de "Biología Molecular y Celular" del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Felipe Contreras García fue beneficiario del programa "Severo Ochoa" de ayudas predoctorales para la formación en investigación y docencia de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT).

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto de investigación "Desarrollo postnatal y organización del sistema de fotorrecepción no visual de la retina de mamíferos" del Ministerio de Ciencia y Tecnología con referencia BFU2006-15576/BFI.

Agradecimientos

Aprovecho esta ocasión para intentar mostrarles mi agradecimiento a todos aquellos de los que he aprendido y me han ayudado en estos años predoctorales.

Gracias a la Universidad de Oviedo, a la FICYT, al MICINN y a mis padres por financiar esta tesis.

Gracias al personal del Departamento de Morfología y Biología Celular y el programa de Doctorado de Neurociencias por vuestra amabilidad y buena predisposición.

Gracias a José por apostar por mí, por introducirme a la investigación, por compartir sus extensos conocimientos de neurociencia y por su visión curiosa, inquisitiva y valiente sobre el conocimiento científico.

Gracias a Rafa por sus conocimientos y habilidades sobre la retina y la histología, por su certeza y minuciosidad literaria, por pedir siempre una evidencia más y por su incansable e infinito apoyo y trabajo.

Gracias a Irene por enseñarme la técnica estrella de esta Tesis, la inmunohistoquímica y por introducirme a la cultura académica.

Gracias a Eva Correia, Silvia y Raquel por vuestras preguntas, fuente del conocimiento.

Gracias a Nacho, Bea y Covi por enseñarme los secretos del Western Blot, que indujo en mí un profundo conocimiento de la técnica. Gracias a Marina por tu ayuda en el manejo de animales.

Gracias a Mayo, Rosa, Aida y Pedro por vuestra imprescindible ayuda con los cultivos y a David y Henar por vuestra inestimable ayuda con el HPLC y la purificación de compuestos.

Gracias a Eva Pinilla por tu ayuda con el recuento de axones y a Eva Del Valle por tu ayuda y guía para la impartición de prácticas.

Gracias a los alumnos de los distintos grados de los que he aprendido que la inteligencia colectiva sobrevive en el tiempo y a los que con suerte habré transmitido algún conocimiento.

Gracias al personal técnico del IUOPA de la sexta planta de Medicina por vuestra gran disposición y el escaneo de portaobjetos.

Gracias al personal del animalario por vuestra ayuda, consejo y gestión.

Gracias a Marta del servicio de microscopía confocal, porque ojalá todos fuésemos un poco más como ella.

Gracias a Pedro de la Villa por sus enseñanzas y entrenamiento en el terreno de las inyecciones intraoculares.

Gracias a David Webster por sus esfuerzos en la pupilometría.

Gracias a Laurent Porrier por su interminable ayuda con Gemvid.

Gracias a Anne Carpenter y su equipo de CellProfiler por su gran predisposición.

Gracias a Thomas Boudier por absnake, y al equipo de ImageJ por su increíble trabajo.

Gracias a Maica de Seresco por sus grandes capacidades profesionales y docentes y cuyos consejos son tangibles en el desarrollo de CellFinder.

Gracias a David Avilesinus, a David Vascuencis, a Celia, a Edu y Cris, a Bea Jr...por los cafés, copas y por vuestra ética científica.

Gracias a los compañeros de formación de Sistemas, Programación Web y Java, Seguridad y Negocios, a los compañeros de piso, idiomas, tenis, batería y ensayos. Vuestras diversas historias, experiencias, conocimientos y perspectivas son la mejor escuela.

Gracias a todos mis amigos de antes, de ahora, de siempre, vosotros sabéis quienes sois y me habéis ayudado a saber quién soy.

Gracias a mis papis y hermanitas. A Anita por ser la persona más cariñosa del mundo. A Juli por sus continuos consejos en el camino de la investigación y seguro que futuros caminos viajeros. A Luci por sus correcciones políglotas y personalidad sin censura. A mi Papi, Juanito, biólogo y cultureta y a mi Mami, Mari, filóloga y multimañosa, que seguro algo tienen que ver con el devenir de esta Tesis y de mi persona. Gracias a todos por ayudarme a entender el valor del apoyo incondicional y hacerme sentir arropado y querido en todo momento. El sentimiento es mutuo.

Gracias Natalia, con tu mejilla anudada a la mía nos encontramos, viajamos.

A Rafa, Natalia y mi Familia que me empujaron hasta la meta cuando me fallaban las fuerzas.

Peter Brian Medawar

“El investigador que desee efectuar descubrimientos importantes habrá de estudiar problemas importantes para la ciencia en general o para la humanidad”

Ayn Rand

“El rebelde, está en el primer capítulo de cada leyenda que la humanidad ha registrado desde sus comienzos”

Harold Kroto

“Tenemos que dirigir la sociedad y la investigación hacia criterios de interés humanitario”

Índice de figuras

Fig. 1.1. El eje de sincronización circadiana.

Fig. 1.2. El reloj circadiano molecular intracelular.

Fig. 1.3. La actividad en un animal nocturno.

Fig. 1.4. El ritmo circadiano, el sueño, las variables fisiológicas y salud.

Fig. 1.5. Estructuras reguladas por melatonina en el organismo.

Fig. 1.6. Estructura de la melanopsina.

Fig. 1.7. Fototransducción y biestabilidad de la melanopsina.

Fig. 1.8. Los tipos celulares de ipRGC y sus funciones.

Fig. 1.9. Conceptos clave en la estadística clásica.

Fig. 1.10. *Data mining* y *big data*.

Fig. 1.11. Protocolo manual y de análisis de imagen para la determinación de prognosis en base a preparaciones histológicas.

Fig. 1.12. Procedimientos de distintas etapas del análisis de imagen.

Fig. 1.13. Procedimientos de *data mining* aplicados en la última etapa del análisis de imagen; la búsqueda de patrones e identificación de los objetos.

Fig. 1.14. Fases en la gestión de desarrollo de software.

Fig. 1.15. Dos paradigmas modernos de uso general en el desarrollo de software.

Fig. 1.16. Los componentes mínimos de la programación: estructuras y funciones.

Fig. 1.17. Importancia del análisis automatizado en un modelo de medicina intervencionista.

Fig. 1.18. Relación de la visión artificial con otros campos.

Fig. 4.1. Actograma generado por *Circadian Control Center*.

Fig. 4.2. Detalle del periodo de oscuridad constante del actograma generado por *Circadian Control Center*.

Fig. 4.3. Distribución de los desfases de Tau respecto a 24 horas por cepa.

Fig. 4.4. Correlación entre los días de post-efectos y el Tau de los ratones.

Fig. 4.5. Actividad bajo luz azul.

Fig. 4.6. Actividad bajo luz blanca.

Fig. 4.7. Evolución del ritmo circadiano bajo luz azul durante 66 días.

Fig. 4.8. Evolución del ritmo circadiano bajo luz azul durante 42 días.

Fig. 4.9. Evolución de la amplitud del periodo de actividad bajo luz azul y bajo luz blanca.

Fig. 4.10. Diagramas puntuales y de cajas de la distribución de la evolución de distintos momentos del ritmo circadiano.

Fig. 4.11. Tablas de valores y estadísticos de los momentos del ritmo circadiano de luz azul frente a luz blanca.

Fig. 4.12. Grado de desplazamiento según individuo y orden.

Fig. 4.13. Actividad de ratones Swiss inyectados con anticuerpo antiDAT-SAP.

Fig. 4.14. Influencia del número de inyecciones en el ritmo circadiano de los ratones.

Fig. 4.15. Representación de la distribución de frecuencias de las células según la ratio intensidad/diámetro de cada célula.

Fig. 4.16. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al buscar dos *clusters* por el ratio intensidad/diámetro.

Fig. 4.17. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al buscar dos *clusters* por diámetro.

Fig. 4.18. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al formar *clusters* libremente por intensidad y diámetro.

Fig. 4.19. Representación en diagrama de cajas de la intensidad y el diámetro de los *clusters* obtenidos mediante distintas estrategias de *clustering*.

Fig. 4.20. Tabla de los valores de intensidad, diámetro e intensidad percentil de los *clusters* según la estrategia de *clustering*.

Fig. 4.21. Células representantes de los distintos puntos de los *clusters*.

Fig. 4.22. Árbol de decisión para predecir el clúster de pertenencia de una célula según su diámetro y su intensidad.

Fig. 4.23. Árbol de decisión para predecir el clúster de pertenencia de una célula según su diámetro y su intensidad en escala percentil.

Fig. 4.24. Tabla de los valores de diversas variables morfológicas de los distintos *clusters*.

Fig. 4.25. Capturas de los distintos tipos dendríticos

Fig. 4.26. Distribución de los tipos dendríticos en los *clusters* obtenidos por intensidad y diámetro.

Fig. 4.27. Distribución conjunta para las 4 retinas de los tipos dendríticos en los *clusters* obtenidos por intensidad y diámetro.

Fig. 4.28. Composición de los tipos dendríticos de los *clusters* M1, M2 y Mx.

Fig. 4.29. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en base a todos los *clusters* por diámetro e intensidad.

Fig. 4.30. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en base a los *clusters* M1 y M2, excluyendo el cluster Mx, por diámetro e intensidad.

Fig. 4.31. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en base exclusivamente al *cluster* M2 por diámetro e intensidad.

Fig. 4.32. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y NS_ND en base exclusivamente al *cluster* Mx por diámetro e intensidad.

Fig. 4.33. Árbol de decisión según los tipos dendríticos M1, M2 y NS_ND en base a todos los *clusters* por diámetro e intensidad.

Fig. 4.34. Árbol de decisión según los tipos dendríticos M1, M2 y NS_ND en base a todos los *clusters* por diámetro e intensidad percentil.

Fig. 4.35. Búsqueda de cuatro *clusters* por intensidad y diámetro para cada retina. A-D) Los *clusters* detectados para las retinas 1-4.

Fig. 4.36. Búsqueda de dos *clusters*, por intensidad y diámetro, dentro de cada *cluster* M1, M2, Mx.

Fig. 4.37. Las poblaciones celulares LS y L.

Fig. 4.38. Expresión de las isoformas L y S de melanopsina en los tipos LS y L a las 7h y a las 11h, a 200lx y a 2000lx.

Fig. 4.50. Creación de un análisis de *CircadianControlCenter*.

Fig. 4.51. La medición de actividad en *CircadianControlCenter*.

Fig. 4.52. *Stitch & Focus*.

Fig. 4.53. *ConsecRenamer*.

Fig. 4.54. Selección de los resultados de *LayerMaker*.

Fig. 4.55. El hyperstack de *LayerMaker*.

Fig. 4.56. Esquema a alto nivel de la arquitectura de *CellFinder*.

Fig. 4.57. Esquema a nivel medio de la arquitectura de *CellFinder*.

Fig. 4.58. Principales objetos de transferencia de datos (dtos) utilizados en *CellFinder*.

Fig. 4.59. Superimágenes de retinas marcadas.

Fig. 4.60. Interfaz de *CellFinder*, pestaña de gestión de células.

Fig. 4.61. Procesos de *CellFinder* y detalle del proceso automático de búsqueda de células.

Lista de abreviaturas

****: $p \leq 0,0001$

***: $p \leq 0,001$

** : $p \leq 0,01$

*: $p \leq 0,05$

+/: ratón C3H *wildtype* para la mutación *rd*, es decir, con conos y bastones.

ABC: método de revelado por complejo avidina-biotina con peroxidasa.

antiDAT-SAP: anticuerpo contra DAT unido a SAP.

CCC: *Circadian Control Center*.

Célula L: ipRGC que solo expresa la isoforma L.

Célula LS: ipRGC que expresa las isoformas L y S.

CF: *CellFinder*.

CLAHE: contrastado por ecualización adaptiva limitada del histograma.

DAPI: marcador de ADN 4',6-diamino-2-fenilindol.

DAT: transportador reverso de dopamina.

DD: condiciones de oscuridad continua.

DOP: dopamina.

Dtos: objetos contenedor o de transferencia de datos.

IF: inmunofluorescencia.

IHC: inmunohistoquímica.

Int: intensidad.

ipRGC: célula ganglionar retiniana intrínsecamente fotosensible.

L: isoforma larga de la melanopsina.

LD12:12: condiciones de iluminación de 12 horas de luz 12 horas de oscuridad.

LL: condiciones de iluminación de luz continua.

M1: ipRGC de tipo M1.

M2: ipRGC de tipo M2.

M3: ipRGC de tipo M3.

M4: ipRGC de tipo M4.

M5: ipRGC de tipo M5.

mel: melanopsina.

MVC: modelo-vista-controlador.

MX: cluster de ipRGC pequeñas claras y con dendritas NS_ND o M1.

n: número de muestras de un grupo estadístico.

ND: ipRGC sin dendritas apreciables.

NS: ipRGC con dendritas poco definidas o de las que no se puede observar en qué subcapa arborizan.

Ns: $p > 0,05$.

NS_ND: ipRGC con dendritas NS o ND.

OPN: núcleo pretectal olivar.

p: significación asintótica bilateral.

PE: post-efectos.

PMI: instituto de gestión de proyectos.

RAL: retinaldehído.

rd/rd: ratón C3H homocigótico para la mutación *rd*, sin bastones ni conos.

rd: mutación de la fosfodiesterasa de GMPc de los bastones, que induce una degeneración de la retina en el ratón, consistente en la pérdida de bastones y conos..

REM: fase del sueño de rápido movimiento de ojos.

ret: retina.

RHT: tracto retinohipotalámico.

Roi: región de interés en una imagen.

S: isoforma corta de la melanopsina.

SAP: saporina, tóxico celular.

SCN: núcleo supraquiasmático.

SDLC: ciclo de desarrollo de software

Tau: duración del periodo endógeno

TH: tirosina hidroxilasa

μm: micrómetro

WB: western blot

ZT: *zeitgeber time*

Prefacio

Esta tesis hace uso de los recientemente descritos cuatro paradigmas de la investigación: teoría, experimentación, informática y datos [1-3]. Los dos primeros paradigmas son bien conocidos y utilizados por toda la comunidad científica. El paradigma de la informática por su capacidad de medida, cálculo y automatización es utilizado asiduamente en terrenos como la genética y la proteómica. El paradigma de la investigación orientada a datos ha cobrado protagonismo el último lustro, se basa en la obtención de grandes cantidades de información estructurada y en la búsqueda de patrones y relaciones en esta información que pasarían desapercibidos sin tal cantidad de información y los métodos apropiados para analizarla.

Los distintos capítulos de esta tesis están divididos en tres secciones. Las dos primeras se centran en la parte de esta tesis más cercana a los paradigmas de la teoría y experimentación. La primera sección se dedica a la actividad motora y la segunda a análisis celular. La tercera sección está más cercana a los paradigmas de informática y los datos.

Con el objetivo de agilizar la lectura, los detalles estadísticos del análisis de actividad motora y análisis celular han sido desplazados a un anexo. De igual manera, las explicaciones más detalladas de nuestro software también han sido desplazadas a un anexo. De esta manera, intentamos que las dos primeras secciones de cada capítulo permitan una comprensión del trasfondo biológico de esta investigación, mientras que la última sección de cada capítulo y los anexos intentan introducir al lector a los paradigmas de la informática y los datos y cómo han sido utilizados y desarrollados en esta tesis.

Nuestra investigación biológica y las herramientas desarrolladas convergen en un objetivo: conocer mejor la proteína melanopsina y las células en las que se expresa este fotopigmento. Las herramientas desarrolladas en esta tesis se centran principalmente en el análisis de datos y en el análisis de imagen, siendo esta última la principal preocupación informática de la neurociencia [4]. Las herramientas de esta tesis fueron desarrolladas con la finalidad de tratar nuestra problemática; sin embargo, durante su desarrollo siempre se mantuvo en mente que fuesen de utilidad general más allá de nuestro campo específico de estudio.

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Ritmos biológicos	1
1.1.1. El reloj biológico de los mamíferos	3
1.1.2. Relojes moleculares.....	4
1.1.3. Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos	5
1.1.4. Ritmos circadianos de los neurotransmisores y melatonina.....	6
1.1.5. Sueño y vigilia.....	6
1.1.6. Ritmos circadianos y salud.....	7
1.1.7. Técnicas de estudio del sistema circadiano.....	9
1.2. Las células ganglionares fotosensibles de la retina. La melanopsina	10
1.2.1. El descubrimiento de la melanopsina y las ipRGC	10
1.2.2. Estructura e isoformas de la melanopsina	11
1.2.3. Fototransducción en las ipRGC	13
1.2.4. Morfología y distribución de las ipRGC	15
1.2.5. Conexiones de las ipRGC en la retina.....	16
1.2.6. Proyecciones de las ipRGC	17
1.2.7. Ontogenia de las ipRGC.....	17
1.2.8. Regulación de la expresión de la melanopsina.....	18
1.2.9. Investigaciones recientes sobre las ipRGC y la melanopsina	18
1.3. Datos, imágenes y software	19
1.3.1. Análisis de datos.....	19
1.3.2. Análisis de imagen	25
1.3.3. Desarrollo de software	31

2. Objetivos.....	37
2.1. Medidas de actividad animal	37
2.2. Mediciones celulares.....	37
2.3. Desarrollo de software	37
3. Material y métodos	39
3.1. Medición de actividad animal.....	39
3.1.1 Diseño experimental.....	39
3.1.2. Animales de experimentación	40
3.1.3. Condiciones de iluminación y registro en vídeo de los animales	41
3.1.4. Deleción dirigida de células dopaminérgicas.....	42
3.2. Técnicas de biología celular	42
3.2.1. Diseño experimental.....	42
3.2.2. Inmunohistoquímica en secciones.....	45
3.2.3. Inmunohistoquímica en retina entera	47
3.2.4. Inmunofluorescencia en retina entera	48
3.2.5. Extracción y cultivo organotípico de retina	49
3.2.6. Preparación de soluciones	51
3.3. Obtención, gestión y análisis de información y desarrollo de software	52
3.3.1. Registro por video de la actividad y análisis con <i>Circadian Control Center</i>	52
3.3.2. Obtención de imágenes en el microscopio de campo claro y composición con <i>Stitch&Focus</i>	52
3.3.3. Obtención de imágenes en el escáner de portaobjetos y composición con macro	53
3.3.3. Obtención de imágenes en el microscopio de confocal y composición con <i>LayerMaker</i>	53
3.3.4. Detección y medida de células con <i>CellFinder</i>	54

3.3.5. Técnicas de análisis de datos.....	55
3.3.6. Análisis de imagen	59
3.3.7. Software de terceros utilizado	62
3.3.8. Metodología y análisis previo de desarrollo de software	64
4. Resultados.....	67
4.1. Medidas de actividad animal	67
4.1.1 Diferencias de tau entre +/+ y <i>rd/rd</i> y post-efectos.....	67
4.1.2. Efecto de la luz azul en el ritmo de los ratones <i>rd/rd</i>	70
4.1.3. Efecto de la delección dirigida de las células dopaminérgicas de la retina en ratones Swiss	80
4.2. Medidas celulares	83
4.2.1. Número de células en cortes.....	83
4.2.2. Las ipRGC según intensidad de tinción y diámetro del soma.....	88
4.2.3. La intensidad, el diámetro y las dendritas	102
4.2.4. Isoformas de la melanopsina	121
4.2.5. Variación de los subtipos de ipRGC en retinas in vitro (luz frente a oscuridad)	125
4.3. Software desarrollado	129
4.3.1. <i>Circadian Control Center</i>	129
4.3.2. <i>Stitch&Focus</i>	135
4.3.3. <i>ConsecRenamer</i>	140
4.3.4. <i>LayerMaker</i>	142
4.3.5. <i>CellFinder</i>	147
5. Discusión	169
5.1. Medidas de actividad animal	169
5.1.1. Tau más corto en animales sin conos y bastones	169

5.1.2. La duración de los post-efectos, tau y las cepas.....	172
5.1.3. Efecto de la luz azul en el ritmo de los animales <i>rd/rd</i>	176
5.1.4. Efecto de la delección dirigida de las células dopaminérgicas de la retina en ratones Swiss	180
5.2. Medidas celulares	183
5.2.1. Recuentos celulares en cortes.....	183
5.2.2. Las ipRGC según intensidad de tinción y diámetro del soma.....	185
5.2.3. Tipos de ipRGC por diámetro, proteína total y dendritas	190
5.2.4. Isoformas de la melanopsina	193
5.2.5. Efecto de la hora y luz en la melanopsina de retinas en cultivo organotípico ..	196
5.2.6. Redefiniendo los tipos celulares de ipRGC.....	198
5.3. Software desarrollado	199
5.3.1. Circadian Control Center	199
5.3.2. Stitch&Focus.....	203
5.3.3. ConsecRenamer.....	207
5.3.4. LayerMaker	207
5.3.5. CellFinder.....	209
6. Conclusiones.....	217
A. Anexos	219
A.1. Análisis estadístico.....	220
A.1.1. Medidas de actividad.....	220
A.1.2. Medidas celulares	225
A.2. Análisis inicial del desarrollo de software	241
A.2.1. Circadian Control Center	241
A.2.2. Stitch&Focus	246

A.2.3. ConsecRenamer.....	251
A.2.4. LayerMaker	253
A.2.5. CellFinder.....	257
A.3. Diseño de software a bajo nivel	269
A.3.1. Circadian Control Center	269
A.3.2. Stitch&Focus	283
A.3.3. ConsecRenamer.....	297
A.3.4. LayerMaker	301
A.3.5. CellFinder.....	313
Bibliografía.....	379

1. Introducción

La actividad de los seres vivos se manifiesta no solo como un proceso continuo sino también como un proceso con variaciones regulares. En la reproducción, el comportamiento, la respiración, el sueño y la vigilia, o cualquier otra actividad vital se puede encontrar alguna manifestación rítmica, lo que nos indica que no se trata meramente de procesos continuos. Se podría decir que la vida está llena de ritmos. De entre todos los ritmos presentes en los seres vivos los más estudiados son los ritmos circadianos, originados como adaptación del organismo a la alternancia diaria de luz y oscuridad. El avance de la técnica empuja a la ciencia hacia nuevos descubrimientos y la cronobiología es un gran ejemplo de ello, en particular, en el ámbito de la informática, que permite cada vez un análisis más riguroso de estas oscilaciones y de los eventos celulares.

Esta introducción versa tanto sobre aspectos fundamentales de los ritmos biológicos de los mamíferos y su mecanismo sincronización con los ritmos ambientales, como sobre los relativos a la creación de herramientas informáticas para el estudio de los mismos. Es por ello que, además de los capítulos correspondientes a los ritmos biológicos y sus mecanismos de sincronización, se ha incluido una parte sobre análisis de datos, análisis de imagen y desarrollo de software. En los contenidos de las dos primeras partes se fundamenta el diseño experimental de la presente tesis. El último apartado se centra en el conocimiento técnico utilizado en el análisis de la información producida en la experimentación, así como para el desarrollo de herramientas para el procesado de esta información. Estas herramientas permiten no solo llevar a cabo nuestros experimentos y obtener información de ellos, sino que además crean utilidades de uso general.

1.1. Ritmos biológicos

En la naturaleza podemos observar ritmos a nivel planetario que son la causa última de la aparición de los ritmos de los seres vivos. La propia vida de la célula se ha ido adaptando a una naturaleza externa que presenta ritmos de diversa índole. La rotación de la Tierra sobre su eje dura 24 horas y la traslación alrededor del Sol genera los años, de 365,26 días. La inclinación del eje terrestre provoca las variaciones estacionales. La traslación de la luna alrededor de la Tierra da lugar a los ciclos lunares, y combinada con la

traslación de ambas alrededor del sol, da lugar a las mareas, que también muestran un carácter cíclico.

La ciencia que estudia los ritmos biológicos se conoce como Cronobiología. En la misma se estudian los cambios periódicos y previsibles en una variable biológica. Un ritmo circadiano (de circa, cerca; y dies, día) tiene un periodo de entre 20 y 28 horas y su unidad de frecuencia es el día [5]. El sistema circadiano ofrece la posibilidad de anticipar y medir el tiempo, mejorando la probabilidad de sobrevivir, alimentarse y procrear. El sistema circadiano lo componen principalmente: un reloj circadiano central, unas vías de entrada que captan el medio ambiente y unos ritmos circadianos de salida dependientes del reloj central y de su sincronización diaria por las vías de entrada.

El reloj circadiano se encarga de generar oscilaciones de alrededor de 24 horas [6]. En vertebrados el reloj es un marcapasos central, el núcleo supraquiasmático (SCN, del inglés *suprachiasmatic nucleus*), localizado en el hipotálamo. El SCN se sincroniza con el ciclo de luz-oscuridad ambiental mediante señales provenientes de la retina a través del tracto retinohipotalámico (RHT, del inglés *retinohypothalamic tract*). El SCN se comunica con otras estructuras mediante conexiones sinápticas y no sinápticas, como secreciones humorales. EL SCN controla la glándula pineal, que libera melatonina, el principal vehículo para la sincronización de los ritmos circadianos de otros órganos, como el hígado o el riñón, en los que existen osciladores secundarios. El SCN junto con sus vías de regulación de entrada y salida componen el sistema circadiano [7]. A nivel celular el oscilador circadiano lo forman bucles retroalimentados de bloqueo de transcripción y modificaciones postranscripcionales y postransduccionales [8].

La cronobiología se relaciona con una gran variedad de disciplinas científicas, entre las que encontramos: matemáticas, ingeniería, física, informática, neurociencia, química, histología, comportamiento animal, psicología, psiquiatría, organización del trabajo, genética molecular, ecología, evolución, anatomía, patología, taxonomía, histoquímica, endocrinología, farmacología, toxicología y fisiología. Es por ello que se hace tan importante un enfoque multidisciplinar en cualquier investigación cronobiológica.

1.1.1. El reloj biológico de los mamíferos

El sistema circadiano de los mamíferos consta de un reloj central, el SCN, y de una variedad de osciladores periféricos localizados por todo el cuerpo. El SCN se sincroniza principalmente mediante la luz captada por la retina que desencadena una cascada de transducción para ajustar la fase del ciclo del SCN [9]. La luz constituye, por tanto, el más potente sincronizador o *zeitgeber* (en alemán, “dador de tiempo”). La base molecular de su funcionamiento radica en ciclos de retroalimentación mediante la regulación de los productos de los genes reloj sobre dichos genes en neuronas del SCN. Un reloj biológico es, por tanto, un sistema temporizador autosostenido con la capacidad de ajustarse según señales del ambiente [10].

En ausencia de sincronizadores un ritmo biológico expresa su componente endógeno, que responde al especificado genéticamente en el reloj. El SCN “in vitro” presenta un ritmo circadiano que se puede regular mediante el glutamato. Es más, las neuronas individuales del SCN también presentan estas propiedades, de manera que, aunque además han de sincronizarse entre ellas, la maquinaria circadiana está presente en cada célula [11].

El SCN, localizado encima del quiasma óptico,

contiene unas 20.000 neuronas fuertemente empaquetadas acompañadas de células gliales. En el SCN se pueden diferenciar claramente dos zonas, el centro y la corteza [12]. El centro recibe la regulación principal de tipo fótico de la retina mientras que la corteza recibe aferencias no fóticas moduladoras con las que poder regular la información de las aferencias que recibe de la zona central del SCN [13].

El SCN presenta vías de entrada de distintas partes del cerebro, pero su principal vía

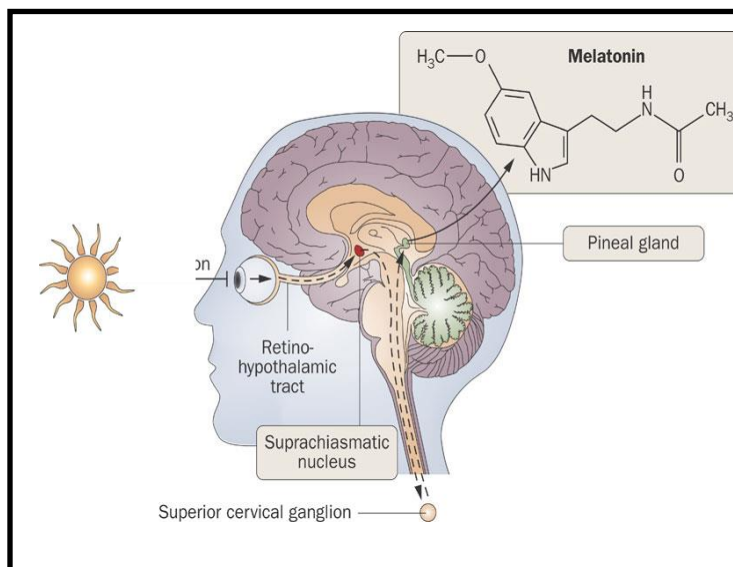


Fig. 1.1. El eje de sincronización circadiana: Luz-Retina-RHT-SCN-Pineal-Melatonina.-Cuerpo. Modificada de [17]

de entrada es el RHT formado por los axones de las células ganglionares fotosensibles de la retina (ipRGC, del inglés *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*), que liberan glutamato y PACAP en el SCN [14, 15].

El SCN muestra varias vías de salida, principalmente responsables del control endocrino y autónomo [16]. El SCN regula la glándula pineal. La pineal libera melatonina que regula el sueño y sincroniza los osciladores periféricos {Armstrong, 1980 #4}, estos osciladores periféricos pueden desacoplarse en situaciones extremas (van der Vinne, 2014: 51) (Fig. 1.1).

1.1.2. Relojes moleculares

Existen determinados genes responsables de la generación de ritmos circadianos [18]. Estos genes controlan los componentes celulares del reloj circadiano [19] y su expresión oscila tanto en el SCN como en otras áreas del sistema nervioso central y en órganos periféricos [20]. Los componentes del reloj se caracterizan porque su ausencia provoca la alteración o desaparición de la ritmicidad endógena. La ritmicidad se suele medir en el fenotipo, ya sea en organismos completos, según su actividad, o en cultivos, según distintas variables *in vitro* [21]. Todos los osciladores circadianos conocidos se basan en ciclos de retroalimentación que se encuentran dentro de la célula, en los que participan tanto elementos positivos como negativos. Además de los ciclos de retroalimentación, debe haber vías de sincronización que permitan cambiar su fase, ajustándose así a la de los ciclos del medio externo [22].

Mediante estudios bioquímicos, genéticos y moleculares se desveló progresivamente qué genes componían la maquinaria molecular del reloj circadiano de los mamíferos: *per1*, *per2*, *per3*, *cry1*, *cry2*, *clock*, *bmal1*, *rev-erba* y *ckie*. El complejo proteico CLOCK-Bmal1 es el componente positivo del reloj circadiano activando la transcripción de *per1*, mientras que el complejo proteico Cry1,2-Per1,2 es el negativo, inhibiendo su propia transcripción al actuar sobre CLOCK-Bmal1. REV-ERB α inhibe la transcripción de *bmal1* y Cry1,2-Per1,2 inhibe, a su vez, a REV-ERB α . De esta manera, se cierra el doble bucle entre el componente positivo-negativo y negativo-positivo. Para que el periodo sea cercano a las 24 horas la proteína CKIE fosforila el complejo Cry1,2-Per1,2, lo que regula su translocación al núcleo [23]. El complejo CLOCK-Bmal1 también promueve la expresión

de los denominados genes controlados por el reloj (cccg, del inglés *clock-controlled genes*), de cuya expresión se originan las señales de salida del reloj. Al expresarse dicho complejo de forma cíclica, las señales de salida del SCN también muestran un ritmo circadiano (Fig. 1.2).

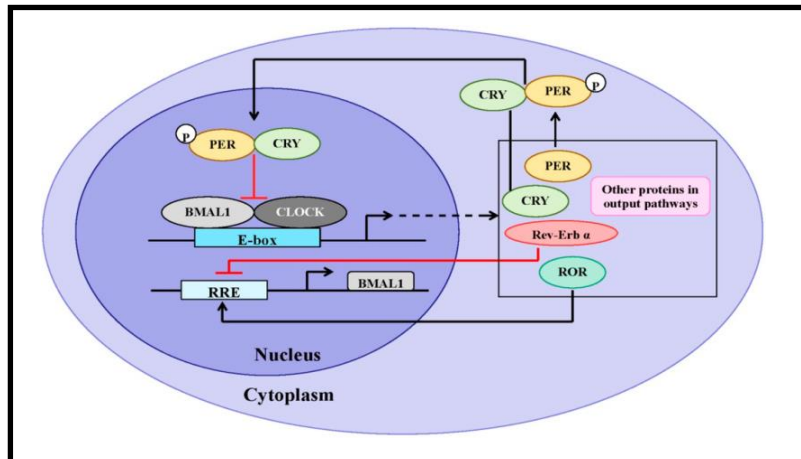


Fig. 1.2. El reloj circadiano molecular intracelular. Elementos positivos y negativos formando bucles de retroalimentación de transcripción y fosforilación. [24]

1.1.3. Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos

El reloj biológico es imprescindible para organizar la conducta y fisiología de los seres vivos. Para conseguir un buen funcionamiento, el reloj endógeno presenta dos características: carácter endógeno y capacidad de sincronización. El carácter endógeno se pone de manifiesto en condiciones constantes, como oscuridad constante. El condicionamiento genético del ritmo endógeno hace que tenga un periodo o tau ligeramente diferente a las 24 horas [25]. El día y la noche subjetivos corresponden a los periodos de día y noche según el ritmo endógeno.

La capacidad de sincronización permite encarrilar los ritmos biológicos mediante

zeitgebers. De los *zeitgebers* el ciclo luz-oscuridad es el más importante. La intensidad de la luz puede modificar tau según la regla de Aschoff y la



Fig. 1.3. La actividad en un animal nocturno. Condiciones de sincronización a LO12:12, de expresión del ritmo endógeno en oscuridad y de *splitting* (en otros casos pérdida de actividad circadiana) en luz constante. Modificada de [26].

iluminación constante producir efectos de *splitting* (partición de un ritmo consolidado en

dos o más componentes distinguibles). El enmascaramiento o “*masking*” es la modificación directa sobre ritmos biológicos sin afectar al reloj biológico y supone una respuesta instantánea a los cambios. El enmascaramiento se puede estudiar mediante la curva de respuesta de fase (CRF) que relaciona la respuesta con el tipo y hora subjetiva del estímulo. El reloj tiene un componente genético rígido pero regulado plásticamente por los *zeitgebers* [25] (Fig. 1.3).

1.1.4. Ritmos circadianos de los neurotransmisores y melatonina

El funcionamiento correcto del tejido nervioso depende de la síntesis y actividad correcta de los neurotransmisores, que presentan un ritmo circadiano. Si dicho ritmo se altera, se verán afectadas las capacidades cognitivas superiores. En el sistema nervioso central de mamíferos el neurotransmisor inhibitorio por antonomasia es el GABA, y el excitador el glutamato [27]. La melatonina tiene efectos analgésicos, hipnóticos y sedantes, potencia la transmisión GABAérgica e inhibe la transmisión glutamatérgica. La melatonina se produce en la glándula pineal y actúa como mensajero endógeno del fotoperíodo a través del líquido cefalorraquídeo y la sangre. Casi todos los tejidos son capaces de sintetizar melatonina en concentración 2 veces superior a la del suero. Esta hormona presenta un ritmo circadiano con un pico nocturno, regulando (con otras moléculas) los ritmos de neurotransmisores en el cerebro y de sus receptores. Todo ello resulta en un ritmo circadiano global de excitabilidad y actividad cerebral [28]. La melatonina además inhibe la liberación de dopamina, que se produce en antifase respecto de la melatonina [29].

1.1.5. Sueño y vigilia

El sueño tiene seis etapas reconocidas [30] a lo largo de las cuales las variables fisiológicas se modifican, entre ellas encontramos la temperatura, la respiración, la circulación, el metabolismo y el sistema nervioso autónomo {Jafari, 2010 #759}. El ciclo sueño-vigilia atiende a 4 procesos fundamentalmente: un proceso homeostático, que controla la necesidad o falta de necesidad de sueño, un proceso circadiano, que organiza el sueño-vigilia en procesos de en torno a 24 horas, un proceso ultradiano, que genera oscilaciones entre NREM y REM, y un proceso basado en factores ambientales (luz, ruido, movimientos, alimentos, etc), que facilitan o dificultan el sueño.

El SCN presenta conexiones con el núcleo ventrolateral preóptico (VLPO) y con la glándula pineal. El VLPO envía fibras a los distintos núcleos implicados en el sueño. La pineal libera melatonina que alcanza las regiones hipotalámicas y talámicas que producen GABA para la inducción del sueño.

Las patologías del sueño aumentan el número de errores que cometen las personas lo que incluye accidentes de tráfico y en el trabajo [31]. Los trastornos circadianos del ritmo sueño-vigilia se pueden agrupar en tres categorías: cambios estables en la relación con el ciclo luz-oscuridad mediante avance o retraso de fase; pérdida transitoria de la sincronización por trabajo a turnos o jet-lag; y patrones irregulares de sueño y vigilia comunes en ancianos (Fig. 1.4).

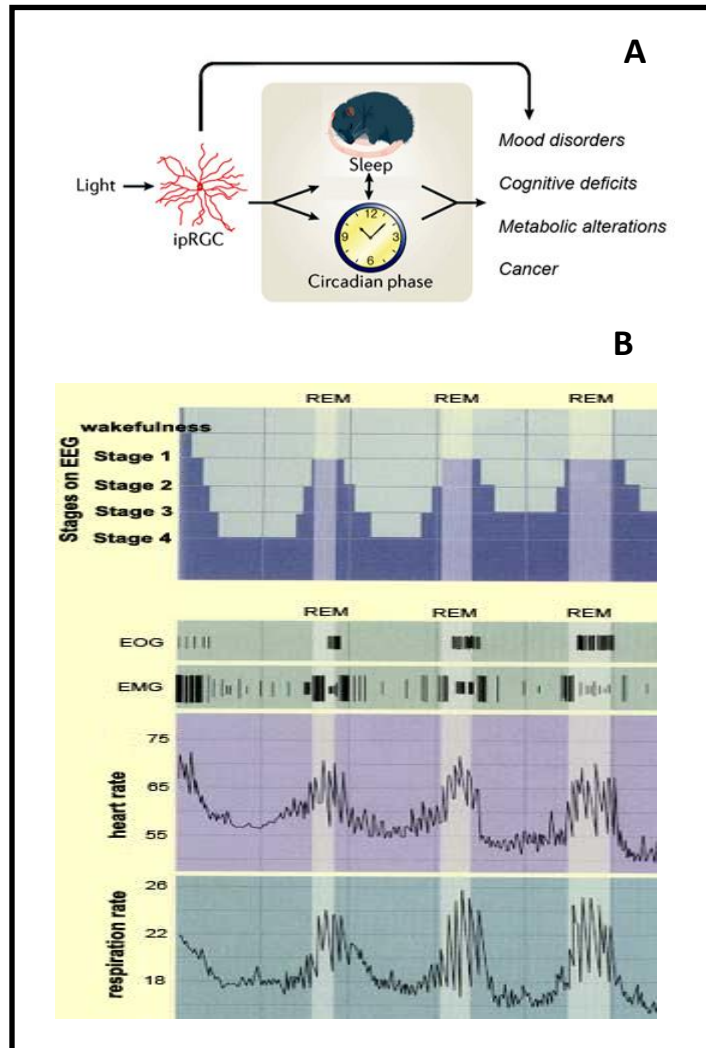


Fig. 1.4. El ritmo circadiano, el sueño, las variables fisiológicas y salud. A) Interacción del ritmo circadiano con el sueño. Su regulación por la luz y su efecto en la salud. B) Diversas variables fisiológicas que se modifican a través de las fases del sueño. Modificada de [32, 33].

1.1.6. Ritmos circadianos y salud

Los diversos aparatos y sistemas del cuerpo están sujetos a regulación circadiana. De la misma manera, alteraciones en la organización circadiana pueden dar lugar a alteraciones o patologías en estos sistemas y aparatos. Entre estos encontramos con regulación circadiana: el sistema endocrino [34], la nutrición y el metabolismo [35] [36], el estrés oxidativo [37], parámetros hematológicos e inmunológicos [38], el sistema

respiratorio {Smolensky, 2007 #9}, los sistemas cardiovascular y renal [39] [40] [41], el cáncer [42] [43] [44], el rendimiento cognitivo y el físico [45] [46], la enfermedad mental [47], el desarrollo [48] {Reiter, 2014 #729} y el envejecimiento [49]. Hoy en día estos sistemas se ven afectados por alteraciones exógenas como el jet-lag, el trabajo a turnos o la contaminación lumínica. Entre las soluciones propuestas a estas alteraciones está la modificación de la actividad de las ipRGC, que regulan el SCN, mediante cambios en el sistema de iluminación [50, 51] (Fig. 1.5).

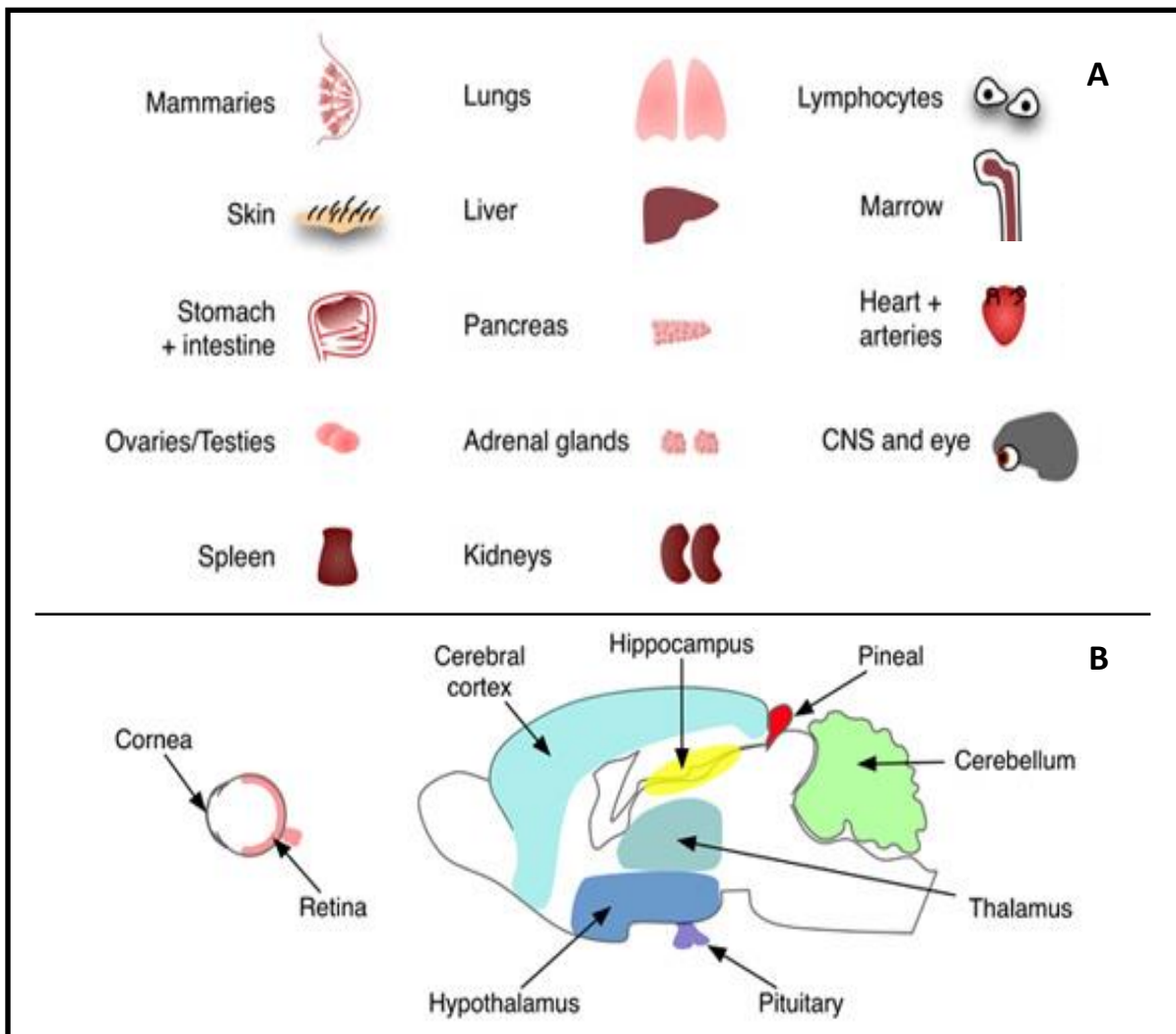


Fig. 1.5. Estructuras reguladas por melatonina en el organismo. A)Regulados en el organismo. B)Regulados en el sistema nervioso central (CNS) y ojo. Modificada de [52].

1.1.7. Técnicas de estudio del sistema circadiano

La complejidad de los problemas que aborda la cronobiología obliga a que algunas herramientas específicas deban ser ideadas y desarrolladas ya que, a menudo, no existen. Por ello, hay que pertrecharse en diversos ámbitos de conocimiento como la electricidad, la fontanería, la ingeniería, la electrónica, la informática, la carpintería, etc. Frecuentemente, la cronobiología aporta a la investigación y a la industria herramientas que, amén de servir para obtener determinados datos y poder profundizar en el conocimiento de los ritmos, pueden tener una aplicación práctica inmediata en otros campos.

Los relojes biológicos muchas veces son difíciles de medir de manera directa. Por ello, se suele recurrir a la medida indirecta de su funcionamiento. Normalmente consiste en el registro de una variable a lo largo de varios ciclos. Es decir, si no podemos medir el propio reloj medimos una de sus vías de salida. Dentro de las técnicas utilizadas en estudios cronobiológicos nos encontramos las descritas a continuación, la mayoría son aplicables tanto a humanos como a animales de experimentación.

- Medidas de comportamiento. Aquí nos encontramos con las medidas de actividad motora, de actividad alimentaria y de bebida de agua. Entre las herramientas utilizadas para estas medidas están el registro en vídeo y el análisis de imagen, que permiten determinar diversos comportamientos, como patrones de movimiento.

- Medidas fisiológicas no invasivas. Aquí se incluyen medidas de temperatura, presión arterial, frecuencia cardiaca o medias de señales bioeléctricas (ECG, EMG, EGG, EOG, etc.).

- Autorritmometría en voluntarios. Consiste en que voluntarios se midan diversas constantes a distintas horas del día. Debe incluir un diario de las actividades del voluntario. También se puede incluir la realización de test físicos y mentales.

- Medidas invasivas. Consiste en obtener muestras, normalmente de fluidos, para determinaciones hormonales mediante técnicas bioquímicas. Entre las técnicas bioquímicas más frecuentes en este caso están RIA, ELISA y HPLC.

- Medidas in vitro. Las medidas in vitro consisten en el cultivo organotípico o de células aisladas. Los más estudiados en cronobiología son SCN, glándula pineal y ojo. Se pueden realizar medidas electrofisiológicas, medir hormonas liberadas o marcar las células con técnicas como la inmunohistoquímica.

- Desenmascaramiento. Consiste en separar el componente enmascarante del componente endógeno. Comúnmente esto se realiza mediante condiciones de iluminación constantes.

- Técnicas de biología molecular. Estas técnicas permiten conocer el funcionamiento de los componentes moleculares del sistema circadiano. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran RT-PCR, hibridación in situ, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, generación de knockouts, coexpresión de GFP y búsqueda de ortólogos en bases de datos.

1.2. Las células ganglionares fotosensibles de la retina. La melanopsina

El sistema circadiano está compuesto básicamente de un mecanismo autooscilante, el SCN, de un mecanismo sincronizador con el exterior, la retina, y de distintas salidas en forma de variaciones bioquímicas, celulares, fisiológicas y de comportamiento. De los factores externos que actúan como *zeitgebers*, la luz es el más importante. En la sincronización por la luz la información lumínica es enviada por una vía monosináptica conocida como tracto retinohipotalámico (RHT) hasta el SCN [53]. Los axones que conforman el RHT pertenecen a las ipRGC [54]. Estas ipRGC integran la señal que reciben procedente de conos y bastones a través de las células bipolares con la señal que generan ellas mismas ya que son intrínsecamente fotosensibles. Las ipRGC son intrínsecamente fotosensibles gracias a que expresan la proteína melanopsina [55]. Estas células conforman una población heterogénea en lo que respecta a su morfología, sensibilidad, respuesta, fisiología, proyecciones y expresión de melanopsina [56].

1.2.1. El descubrimiento de la melanopsina y las ipRGC

El descubrimiento de la melanopsina y las ipRGC se debió a evidencias que surgieron paralelamente procedentes de investigaciones de la fotosincronización, del marcaje y electrofisiología con fotoestimulación de las células de la retina, de la búsqueda de ortólogos, y de estudios moleculares.

Karl von Frisch en 1911 sugirió la existencia de fotorreceptores extraoculares implicados en la regulación circadiana. Estos se encontraron más tarde en el sistema

nervioso central, piel y órganos periféricos en peces, anfibios, reptiles y aves [57-59]. Sin embargo, este no pareció el caso en mamíferos [60, 61].

La mutación *rd* en mamíferos produce una degeneración retiniana en la que se pierden conos y bastones. Se observó que tanto los ratones *rd* [60] como los primates *rd*, incluyendo a humanos, preservaban la regulación circadiana por la luz [62-64]. Esto sugería la existencia de otro tipo celular implicado distinto a conos y bastones que captase la luz. Para confirmarlo, se desarrolló un modelo murino de *rd* en el que se eliminaban por completo conos y bastones, esto sirvió para confirmar la existencia de un tercer tipo de fotorreceptores retinianos [65] [66-68].

En este mismo periodo se encontró una población de células ganglionares de la retina (RGC) que expresaban los reguladores del SCN, glutamato y PACAP [69] [15, 70-72]. El PACAP es exclusivo de las células cuyos axones conforman RHT que llega al SCN [73]. Estas células se demostró que eran intrínsecamente fotosensibles [54, 74], por lo que pasaron a llamarse ipRGC.

En la retina se descubrió mediante electrofisiología un fotorreceptor con máxima sensibilidad a 479 nm que usaba un cromóforo [54], por lo que se la llamó OP479 [75, 76]. Además, la regulación circadiana se sabía tenía un pico en ratones entre 450 y 480 nm [77-79] y en humanos a 483 nm [80]. OP479 se había encontrado originalmente en los melanóforos del *Xenopus laevis*, en las capas internas de la retina, iris, epitelio pigmentario, núcleo preóptico superior y SCN [81]. El ortólogo también se encontró en mamíferos, pero solo se expresaba en la retina [55]. OPN479 se encontraba en las ipRGC y por asimilación se la llamó melanopsina [55, 82] [83, 84]. La responsabilidad fotosensible de la melanopsina en las ipRGC se demostró mediante experimentos de deleción génica [76, 85, 86] y de expresión heteróloga [87-89]. A partir de estas evidencias pasó a considerarse la melanopsina el fotorreceptor de las ipRGC.

1.2.2. Estructura e isoformas de la melanopsina

La melanopsina comparte una serie de características con el resto de opsinas: tiene un extremo amino extracelular y siete pasos de membrana, presenta una lisina en el séptimo paso transmembrana y un par de lisinas en el segundo y tercer lazo extracelular. La lisina del séptimo paso es el punto de unión del cromóforo, las del segundo y tercer lazo permiten formar un enlace disulfuro responsable de la estabilidad de la estructura terciaria de la

opsina [81]. La melanopsina presenta una mayor homología con las opsinas de invertebrados que con las de vertebrados [55, 90-92]. Con las opsinas de invertebrados la melanopsina presenta una serie de similitudes: una tirosina en el tercer lazo transmembrana para la estabilización de la base de Schiff, una inserción en el tercer lazo citoplasmático que aumenta su longitud, característico de las proteínas G activadas por opsina, y un extremo C terminal muy largo (Fig. 1.6).

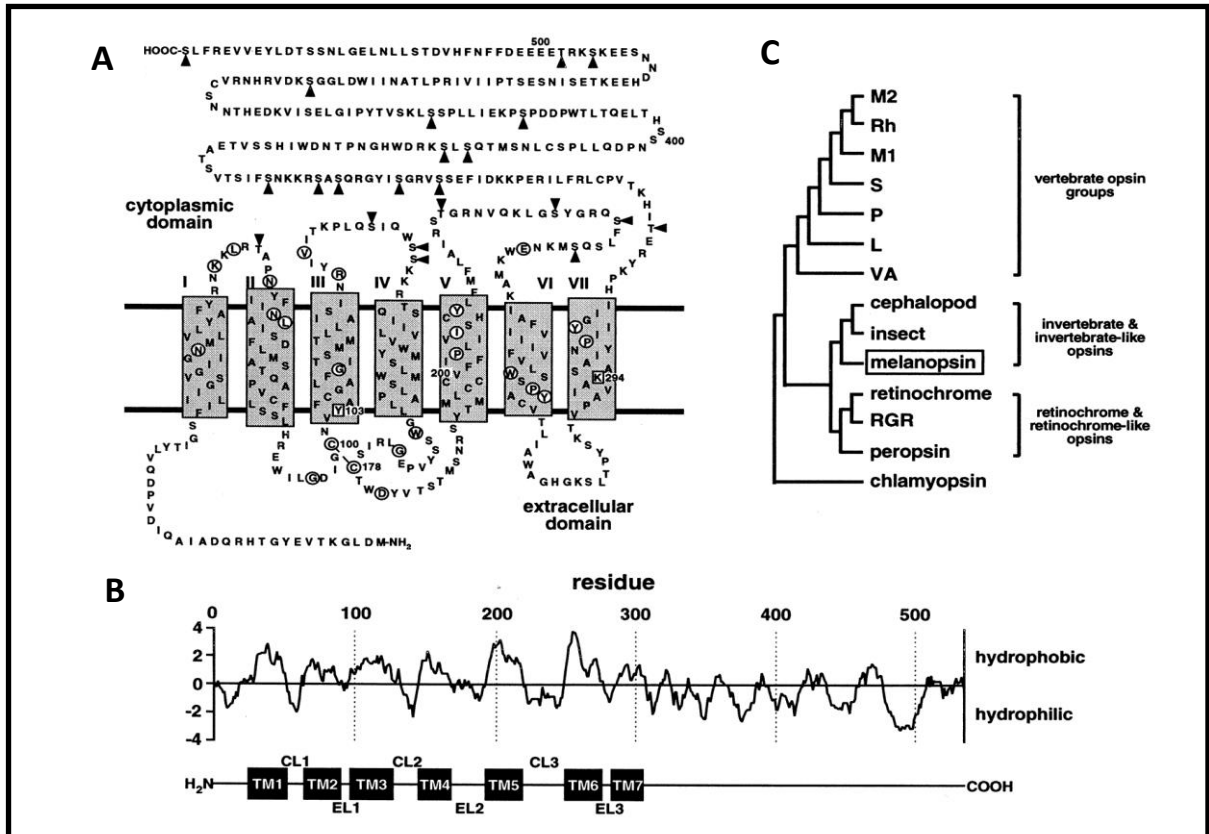


Fig. 1.6. Estructura de la melanopsina. A) Secuencia amioacídica y estructura en torno a la membrana celular. B) Posición filogenética de la melanopsina entre otras opsinas. C) Grado de hidrofobicidad de los dominios de la melanopsina. [96]

Dentro de los vertebrados se encuentran dos genes que expresan melanopsina, *opn4m* y *opn4x* (“m” de mamíferos y “x” de *Xenopus*, en los que originalmente fueron descubiertas)[93]. La proteína *Opn4m* se expresa solo en las RGCs de la retina mientras que la proteína *Opn4x* se expresa en toda la retina, cerebro, pineal y piel. Los vertebrados no mamíferos presentan tanto *Opn4m* como *Opn4x*, mientras que en los mamíferos solo se encuentra *Opn4m* [94].

En la retina de ratón existen dos isoformas funcionales de la melanopsina OPN4m, una que se denominan “larga” o “L” (del inglés *long*) y otra “corta” o “S” (del inglés *short*). Estas isoformas parecen originarse por *splicing* alternativo [95].

1.2.3. Fototransducción en las ipRGC

Los conos y bastones sufren hiperpolarización en respuesta a la luz. Por el contrario, las ipRGC al ser estimuladas por la luz sufren despolarización. En conos y bastones la respuesta es muy rápida, mientras que en ipRGC la respuesta es lenta, probablemente por la poca cantidad de fotorpigmento en cada célula [54, 97]. Las opsinas de conos y bastones se encuentran en estructuras especializadas, los segmentos externos, mientras que en las ipRGC la melanopsina se distribuye en la membrana celular de soma, dendritas y axones y en todas ellas puede desencadenar despolarización [54].

La melanopsina pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G [87, 98]. La hipótesis aceptada es que a la melanopsina se le acopla una proteína Gq/11 [88] [99]. En general, las opsinas se unen al 11-cis retinaldehído (11-cis RAL) en la oscuridad. La unión de la opsina a 11-cis RAL inhibe la interacción con la proteína G. Cuando el 11-cis RAL y la opsina se encuentran unidos, el 11-cis RAL puede captar los fotones y, al absorber un fotón, se convierte en trans-retinaldehído (todo-trans RAL). El todo-trans RAL actúa como un receptor agonista que hace que la opsina, ahora fotoactivada, se una a una proteína G. La unión a la proteína G inicia una cascada de fototransducción [92, 100]. Esta unión activa la vía inositol trifosfato/ diacil glicerol que activa los canales TRPC7. Al activarse los canales TRPC7 aumenta el calcio intracelular y se despolariza la célula [91, 101-104] (Fig. 1.7A).

Tipos de respuesta de las ipRGC

Entre las ipRGC se observan tres tipos de respuestas que corresponden a distintos subtipos de ipRGC [105] [106]:

- Tipo I: Elevada fotosensibilidad. Latencia larga tras iniciarse el estímulo. Terminación rápida de la señal al finalizar el estímulo.
- Tipo II: Baja fotosensibilidad. Latencia elevada tras iniciarse el estímulo. Terminación de la actividad al finalizar el estímulo.
- Tipo III: Elevada fotosensibilidad. Latencia corta de respuesta. Terminación muy

lenta de la actividad al finalizar el estímulo.

Biestabilidad de la melanopsina

La melanopsina, además, tiene otra propiedad en común con las opsinas de invertebrados, la biestabilidad [107]. La biestabilidad consiste en la capacidad de responder a la luz de onda corta utilizando 11-cis RAL y con luz de onda larga regenerar 11-cis a partir de todo-trans RAL [89] [87] [88]. La aportación del 11-cis RAL usado por las ipRGC se cree proviene de la biestabilidad de la melanopsina, aunque este punto aún está por demostrarse en mamíferos [108]. Se hipotetiza que el 11-cis RAL también podría proceder del epitelio pigmentario o de las células de Müller de la glía o que la biestabilidad puede constituir una vía secundaria de obtención del 11-cis RAL [96] (Fig. 1.7B).

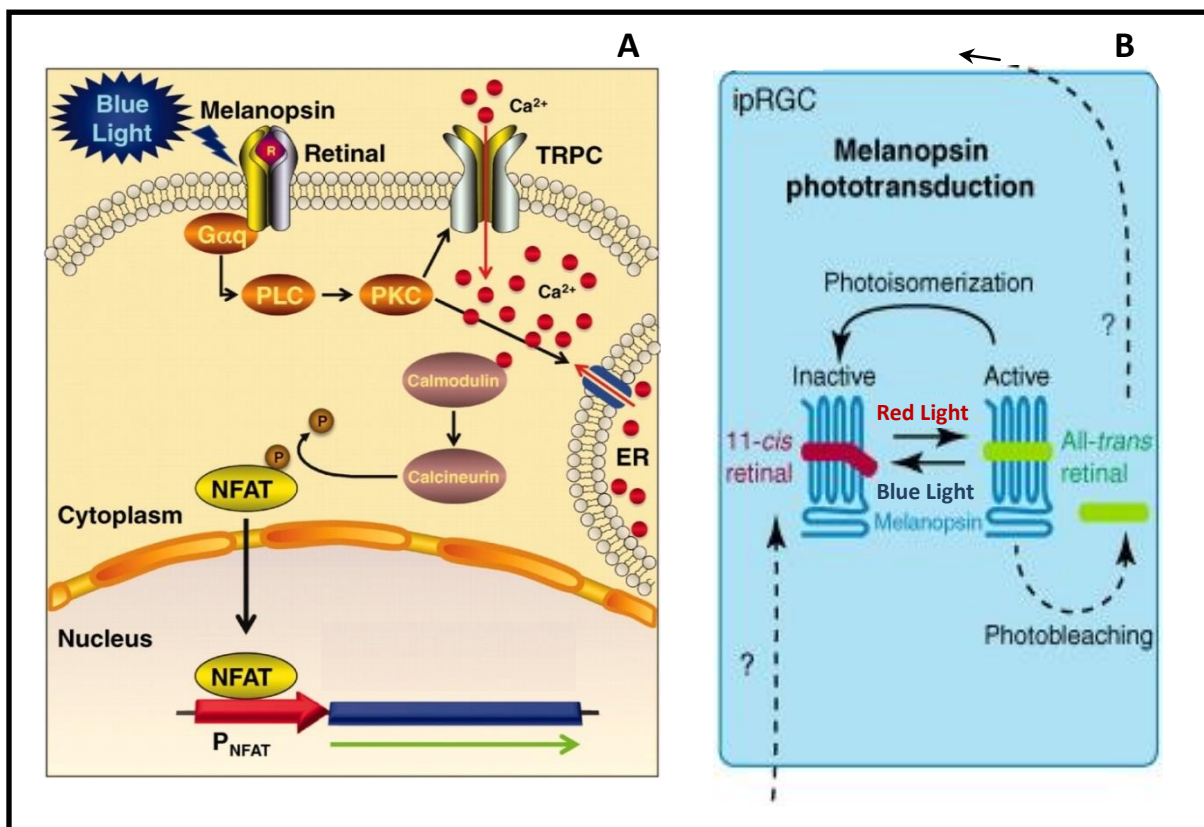


Fig1.7. Fototransducción y biestabilidad de la melanopsina. A)Fototransducción de la señal captada por la melanopsina dentro de las ipRGCs . B)Biestabilidad de la melanopsina bajo luz azul y luz roja. Modificada de [96][109].

1.2.4. Morfología y distribución de las ipRGC

Al reconocerse a la melanopsina como la responsable de la fotosensibilidad de las ipRGC, la inmunohistoquímica contra esta proteína se convirtió en la principal herramienta para el estudio anatómico de las ipRGC. La melanopsina se encontró en un pequeño grupo de ipRGC con soma en la capa ganglionar (GCL-ganglion cell layer), aunque también se detectaron somas neuronales inmunopositivos en la subcapa en la que se localizan los somas de las células amacrinas, esto es, en el margen interno de la nuclear interna (INL, del inglés inner nuclear layer). Las dendritas de las ipRGC pueden tener una longitud de cientos de micras y se solapan formando una red fotosensible que abarca a toda la retina. Esta red se extiende por la capa de la retina conocida como plexiforme interna (IPL, del inglés inner plexiform layer). En esta capa encontramos sus dendritas tanto en la sublámina OFF como en la sublámina ON [82, 110, 111] (Fig. 1.8).

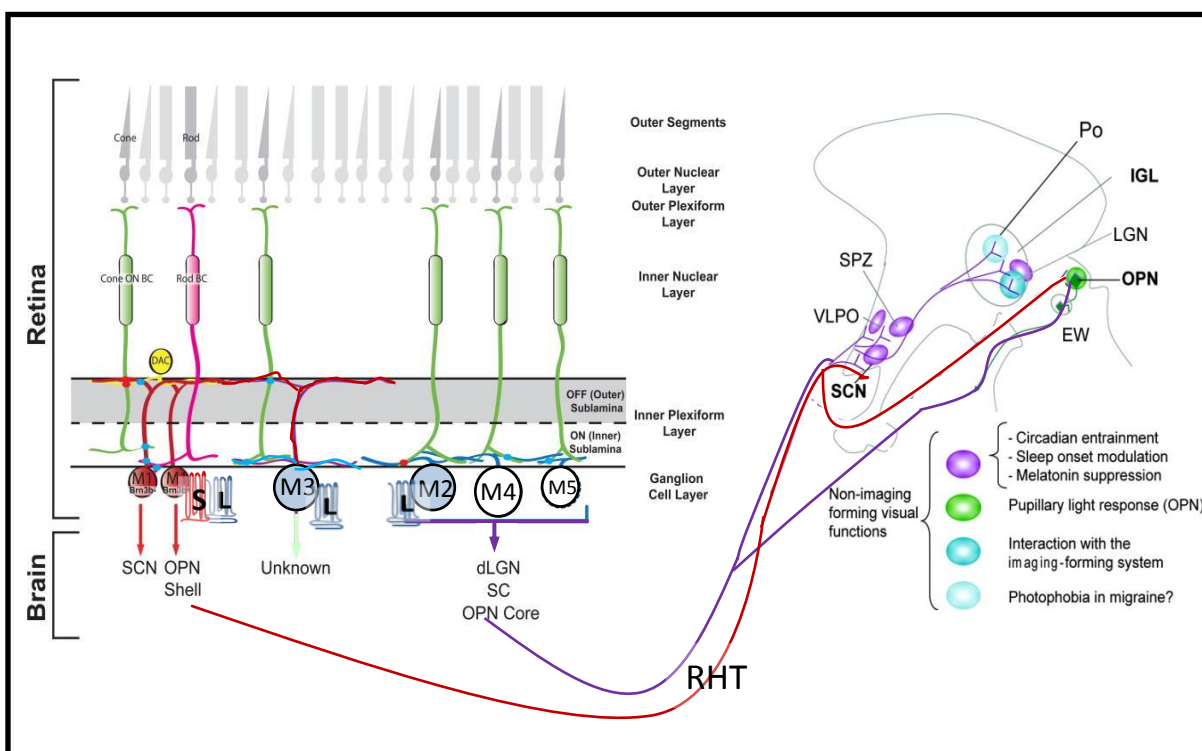


Fig. 1.8. Los tipos celulares de ipRGCs y sus funciones. Se muestran los tipos celulares diferenciados por la sublámina a la que envían sus proyecciones, por la intensidad de tinción y tamaño de sus somas, por las isoformas que expresan y por los núcleos cerebrales a los que proyectan y las funciones que regulan esos núcleos cerebrales. Modificada de [56][112].

Tipos morfológicos de ipRGC

Las ipRGC se pueden dividir por sus características en subpoblaciones. Basándose en criterios anatómicos se han encontrado cinco o seis subpoblaciones. Tres subpoblaciones son de observación relativamente fácil: M1A, M1B, M2, M3. Las poblaciones M4 y M5 fueron encontradas por métodos no inmunohistoquímicos, ya que expresan cantidades demasiado bajas de melanopsina. Estos tipos celulares se diferencian según diversos criterios morfológicos: por el tamaño y localización del soma y del plexo dendrítico [97] [113] [114] [115] [116], por la cantidad de melanopsina total que expresan [113] [95] [114], por la cantidad de las isoforma S y L que expresan [95] [117] y por los núcleos cerebrales a los que proyectan [56]. No se ha encontrado diferencias de distribución de los distintos tipos celulares en la retina [82] [114].

El soma de las M2 es mayor que el de las M1, además las M2 poseen más dendritas y con más ramificación que las M1. Por otro lado la intensidad de marcaje, es decir la cantidad de melanopsina, es mayor en las M1 que en las M2. Las células M1A presentan su soma en la capa ganglionar y las M1B, escasas, en la capa de las amacrinas. Las células M3 conforman una población minoritaria que expande sus dendritas por ambas subláminas ON y OFF de la IPL, por ello se llaman biestratificadas. Su soma se encuentra en la GCL o en la INL [95, 113, 114].

Las células M4 y M5 no tienen un inmunomarcaje apreciable en adultos por lo que es difícil observar su ramificación, aunque parece encontrarse en la capa ON y tienen su soma en la GCL de mayor tamaño que el de M1 y M2 [114, 118, 119].

Los tipos de ipRGC M1 y M3 presentan las isoformas L y S mientras que las M2 solo la L. La isoforma S aparece en mucha mayor cantidad que la L. Por ello las células M1 presentan un intensidad de marcaje mayor que las M2 [117].

1.2.5. Conexiones de las ipRGC en la retina

Las ipRGC reciben información proveniente de conos y bastones a través de células bipolares y amacrinas [115, 120-123]. Cada fotorreceptor parece contribuir según sus capacidades. Los conos y bastones responderían a intensidades lumínicas bajas o intermedias mientras que a intensidades más altas lo haría la melanopsina [75, 76, 85, 86] (Fig. 1.8).

Las ipRGC M1 reciben inputs principalmente de las células bipolares OFF [115, 122-124], aunque también se han encontrado aferencias de células bipolares ON [123, 125] [126]. Las células M2 reciben inputs de las células bipolares ON [123].

Las ipRGC también parecen ser capaces de enviar información a otras células en la retina. Entre estas están otras ipRGC y RGC no fotorreceptoras [74] y células dopaminérgicas [127, 128].

1.2.6. Proyecciones de las ipRGC

Las ipRGC mandan sus proyecciones directamente al cerebro. La diana principal de las ipRGC es el SCN [54, 82, 83]. Otros núcleos del cerebro que reciben proyecciones de las ipRGC están implicados en diversas actividades como la respuesta pupilar [82, 129], el sueño [130, 131], la actividad motora [132], la regulación reproductora [113], la regulación neuroendocrina [82, 130], la visión formadora de imágenes [97, 113], la atención y el estado de ánimo [133]. Los distintos subtipos de ipRGC comunican con mayor frecuencia con unos núcleos que con otros [56, 114]. De estos subtipos de ipRGC unos tienden a responder mejor a la señal que reciben de conos y bastones, mientras que otros parecen responder mejor a la señal originada por su propia melanopsina [106]. A su vez, el tipo de respuesta que sale de las ipRGC hacia el cerebro varía también según su subtipo celular [105] (Fig. 1.8).

1.2.7. Ontogenia de las ipRGC

El sistema de fotorrecepción circadiana se desarrolla antes que el sistema visual. La melanopsina se detecta en la retina del embrión dos días tras la aparición de las primeras RGCs, en el día embrionario E10,5 [134-136]. En la retina de ratón C3H en torno al 70% de las RGCs mueren durante los primeros días postnatales en un proceso de selección neural [137] [110], evento al que las ipRGC son altamente resistentes [138-141]. En mamíferos, desde el nacimiento, las ipRGC responden a la luz [105, 110], el RHT ya está formado [142-144] y las ipRGC pueden inducir respuesta en el SCN [145, 146]. Además, se ha descrito fototaxis negativa en edades donde las ipRGC son las únicas células fotosensibles en rata y ratón [147].

Influencia en la ontogenia del cerebro

La captación de luz por parte de conos y bastones influye en el desarrollo de los centros visuales [148]. De la misma manera, existe la posibilidad de que la detección de luz temprana por parte de las ipRGC tenga un efecto sobre el desarrollo del SCN u otros centros no visuales. Además, las ipRGC poseen uniones gap con otras RGCs que están implicadas en la visión formadora de imágenes, pudiendo afectar también al desarrollo del sistema visual [97]. De hecho, la segregación y refinamiento de aferencias en el desarrollo del núcleo visual dLGN (núcleo geniculado lateral dorsal), al que proyectan las ipRGC [56], viene determinado por las ondas espontáneas que recibe de la retina. Estas ondas, en realidad, se ven moduladas y reforzadas mediante las señales de la melanopsina [149].

1.2.8. Regulación de la expresión de la melanopsina

Se ha observado una variación diaria en los niveles de melanopsina [150, 151] [152]. Se sugirió la existencia de un ritmo circadiano endógeno de expresión de la melanopsina [151] [152], pero también de un enmascaramiento dependiente del grado de luminosidad [134, 153] [154]. Se conoce la existencia de células con capacidad de actuar como relojes circadianos en la retina de mamíferos. Estas células que actúan como relojes podrían sincronizarse con la luz ambiental. La adaptación de la expresión de la melanopsina a los ritmos ambientales puede ser debida a la regulación por parte de estas células-reloj sobre las ipRGC.

Existen evidencias que indican una regulación de conos y bastones sobre las ipRGC [155] [151] [152] [127] [156]. Sin embargo, también existen evidencias que apuntan a una independencia de las ipRGC de conos y bastones [157]. Otros estudios sugieren una regulación de la melanopsina por las células dopaminérgicas, aunque el mecanismo no está claro [158] [127] [74] [152]. A su vez, las células dopaminérgicas parecen estar reguladas según sean OFF u ON, respectivamente, por conos y bastones o por ipRGC [159] [160] [128] [128]. Las células GABAérgicas también podrían ser reguladas por las ipRGC [74] [110] [161].

1.2.9. Investigaciones recientes sobre las ipRGC y la melanopsina

Las ipRGC se han visto asociadas cada vez a más funciones. Entre estas encontramos la modulación de la función cognitiva [162], fotofobia/ fotoalodinia [163],

funcionalidad visual [164], discriminación de los niveles de brillo [165, 166] y exacerbación de las migrañas {Park, 2011 #1839}. Todavía debe comprobarse si las ipRGC carentes de melanopsina inmunodetectable (M4/M5) expresan demasiado poca melanopsina para ser detectada [167] [119], o si simplemente la isoforma que presentan no la reconocen los anticuerpos actualmente disponibles [108]. Por otro lado, en la retina de mamíferos se han encontrado nuevas proteínas fotosensibles, como OPN3 y OPN5, que parecen ser también funcionales, aunque no fotosincronizadoras del SCN [168].

El hecho de que la melanopsina sea responsable del reflejo pupilar la convierte en una muy buena herramienta de diagnóstico de la salud de la retina interna. Por otro lado, la melanopsina se ha revelado como una herramienta muy eficaz de tratamiento optogénico [109] y parece ser suficientemente sensible para regular una fotosincronización circadiana con luz artificial estándar [169].

1.3. Datos, imágenes y software

1.3.1. Análisis de datos

En esta tesis se hace un uso intensivo del análisis de datos, tanto con nuestros datos como en nuestro software, dedicamos este apartado a incidir en cómo se analizan pequeñas y grandes cantidades de datos. En el apartado material y métodos se especifica qué técnicas de análisis de datos se utilizaron y con qué propósito.

1.3.1.1. Los datos en Biología

En las últimas décadas la literatura biomédica ha evolucionado hacia un mayor rigor cuantitativo. En la literatura científica hoy en día se presenta la información como datos agregados, que puedan cuantificarse, medirse, estimarse y compararse. Esta información se utiliza para aceptar o rechazar hipótesis, realizar juicios o tomar decisiones. Para emitir un juicio cuantitativo se utiliza la estadística, que tiene en cuenta la magnitud de la observación y su variabilidad [170]. La estadística matemática desarrolla los métodos estadísticos mientras que la estadística aplicada los utiliza [171]. La bioestadística es la rama de la estadística aplicada a problemas médicos y biológicos. La bioestadística descriptiva sintetiza y resume la información, mientras que la bioestadística inferencial

busca relaciones entre las características medidas, mediante el contraste de hipótesis y la estimación de intervalos de confianza. La estadística inferencial busca obtener conclusiones de una población a partir de una muestra.

1.3.1.2. El protocolo estadístico en el análisis de datos

En el proceso de una investigación científica biológica o médica actual deben darse una serie de pasos sucesivos en el análisis de datos:

- 1) Definir el problema de investigación, sus objetivos y la técnica estadística conveniente.
- 2) Desarrollar un proyecto de análisis poniendo en práctica la técnica elegida.
- 3) Evaluación de los supuestos básicos de la técnica estadística.
- 4) Estimación del modelo estadístico y la valoración del ajuste del modelo.
- 5) Interpretación de los valores obtenidos.
- 6) Validación del modelo estadístico.

El resultado de este tratamiento estadístico da lugar a una generalización de resultados y a la obtención de conclusiones. Con este nuevo conocimiento deberían plantearse nuevas investigaciones [172].

1.3.1.3. Probabilidad, hipótesis y error

Para realizar una inferencia se utiliza un modelo de probabilidad. El modelo más asumido es el de distribución normal. [173].

Para realizar un contraste de hipótesis se deben tener en cuenta los errores sistemáticos y los aleatorios. Los errores sistemáticos se pueden producir durante la medida y no son controlados por la estadística. Los errores aleatorios sí son controlados por la estadística mediante la varianza. La probabilidad, p , obtenida en el contraste consistirá en la diferencia entre los valores observados y los esperados dividido por el componente aleatorio. Se suele elegir un valor de p para delimitar la significación estadística, pero debe evitarse presentar un resultado en función de quedar por encima o debajo de un grado de significación. Estos conceptos de probabilidad e hipótesis se extienden a través de todo el análisis de datos. (Figs. 1.9 A-D).

1.3.1.4. Tipos de análisis de datos

El tipo de análisis de datos se puede clasificar, además de como descriptivos o inferenciales, según otros criterios: el número de variables, el tipo de variables, las relaciones de dependencia, si se cumplen los supuestos paramétricos, el número de individuos, los grados de libertad y si cumple algún propósito especial.

Según el número de variables los análisis pueden ser univariantes, bivariantes y multivariantes. Las variables pueden ser categóricas, ordinales o continuas. Las variables a estudiar pueden ser independientes o presentar relaciones de dependencia. Los supuestos paramétricos deben cumplirse para aplicar los tests paramétricos, si no, deberán aplicarse test no-paramétricos. Los supuestos paramétricos más generales son: la ausencia de outliers, el ajuste a una distribución normal, la igualdad de varianzas entre grupos y la ausencia de heterocedasticidad. Cuando el número de individuos o muestras sea superior a 30, gracias al Teorema del límite central se asume una distribución normal. Los grados de libertad son una restricción matemática a la hora de aplicar técnicas de análisis de datos, aumentan con el número de muestras y disminuyen con cada parámetro que debe estimarse. Para realizar algunos tests deberán seleccionarse, eliminar o combinar algunas variables para aumentar los grados de libertad. Si se quieren estudiar datos organizados temporalmente se pueden realizar análisis de series temporales dentro de los que encuadran los análisis cronobiológicos. Si queremos obtener patrones de gran cantidad de datos se utilizan técnicas de *data mining*, y cuando los datos no son manejables en un solo ordenador, se utilizan técnicas distribuidas de *big data*.

1.3.1.5. Análisis estadístico clásico de centralidad y varianza

Los análisis bivariantes y multivariantes inferenciales permiten contrastar hipótesis y obtener un grado de significación al comparar grupos de individuos o de células para una o varias condiciones, indicando el efecto de una o varias variables independientes sobre una variable dependiente. Un análisis multivariante descriptivo puede permitir la reducción de dimensiones o variables del análisis.. (Fig. 1.9E).

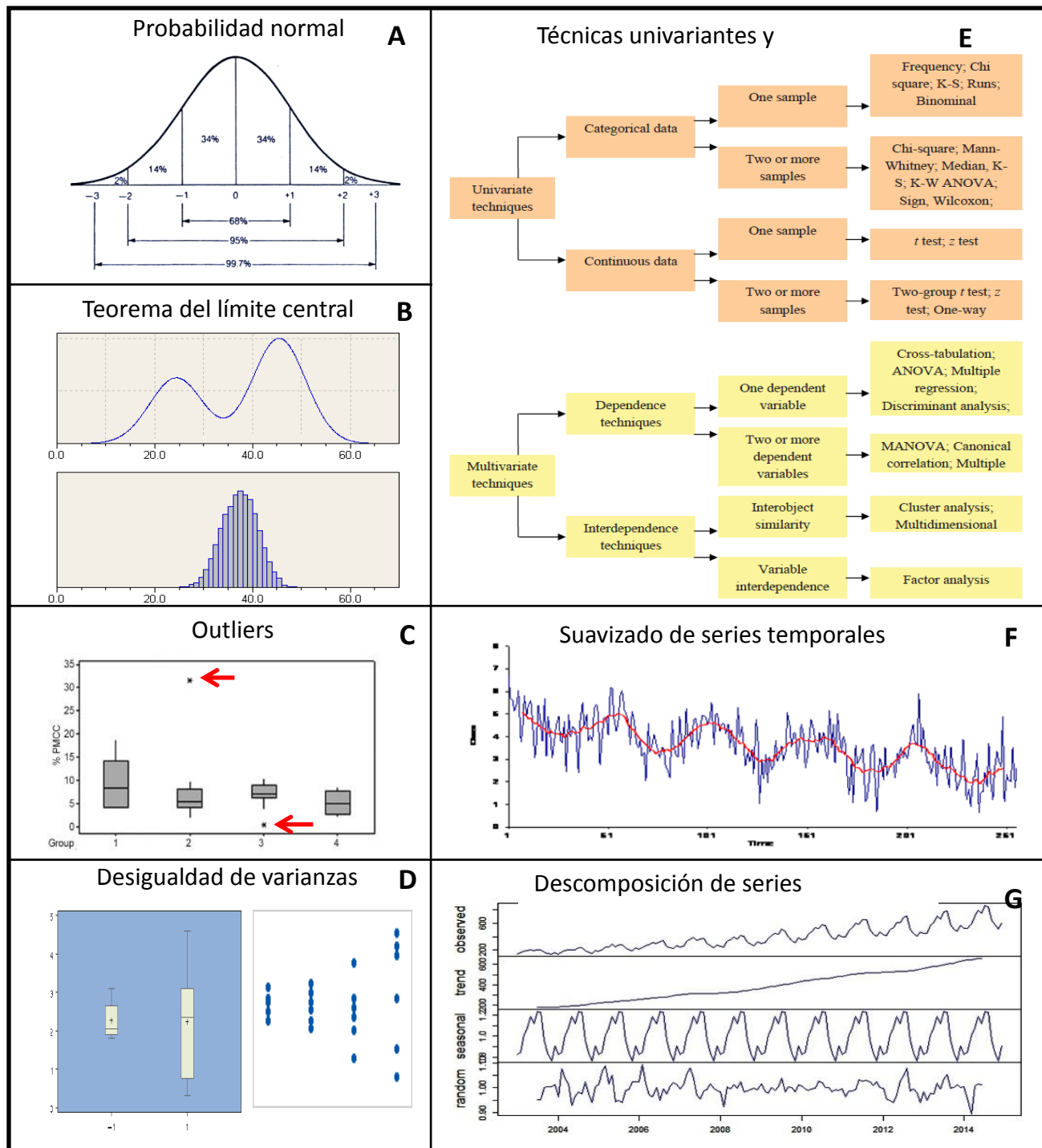


Fig1.9. Conceptos clave en la estadística clásica. A) Distribución de probabilidad en una población normal. B) Teorema del límite central, el muestreo de una población no normal grande resulta normal. C) Outliers, valores cuya distancia al primer o tercer cuartil es más de 1,5 veces la distancia entre el primer y tercer cuartil. D) Desigualdad de varianzas en diagrama de cajas y en diagrama de dispersión de puntos. E) Técnicas comunes de análisis univariante y multivariante. F) Suavizado de serie temporal G) Descomposición de serie temporal. Modificada de [174-178]

1.3.1.6. Correlación, regresión y modelización

Cuando se trata de comparar variables ordinales o escalares en vez de grupos se utilizan la correlación y la regresión entre variables. La regresión puede ser lineal o no lineal. Cuando queremos describir una relación o distribución no lineal entramos en el terreno de la modelización. Un modelo es una entidad que toma datos para clasificar objetos, hacer predicciones, estimar valores o producir algún otro tipo de resultado. La modelización va desde ajustes sencillos como el de una distribución a modelados más complejos como el de una red neural. Para determinar qué distribución presenta un mejor ajuste es común utilizar un criterio de información como el de Akaike (AIC). Es común testear varios modelos con un set de datos distintos al que formaron varios modelos para determinar qué modelo se ajusta mejor. Gracias a la modelización se han predicho, por ejemplo, estructuras biológicas circadianas [179] [180].

1.3.1.7. Análisis de series temporales

Una serie temporal es una secuencia de datos constituida por medidas sucesivas en un intervalo temporal, como son las variables comportamentales, fisiológicas o celulares de un individuo en una escala temporal. El análisis de series temporales permite realizar frecuentemente utilizando técnicas que descomponen los datos en una tendencia, un patrón repetitivo y un residuo, y aplicarle suavizado para ajustar la escala. Los análisis cronobiológicos se basan en el análisis de series temporales y en la naturaleza circular del tiempo a partir de medidas biológicas. Es común utilizar el plexograma *double-plot* para el análisis circadiano exploratorio. Las características en el dominio de la frecuencia se estudian mediante el periodograma con análisis como el de Fourier, (Fig. 1.9 F-G).

1.3.1.8. Big data y data mining

Últimamente, el mundo del análisis se ha desplazado de una aproximación dirigida a las hipótesis a una aproximación dirigida a los datos. Este cambio de paradigma incluye la investigación biomédica, los sistemas de salud, la biología molecular y desarrollo de terapias [181, 182]. *Big Data* hace referencia a gran volumen, variedad y velocidad de datos. El *Big Data* abarca el desarrollo de denominaciones estándar y el almacenamiento, procesado (manejar, fraccionar, resumir) y análisis distribuido en varios ordenadores de

gran cantidad de información a nivel de hardware y software. (Fig. 1.10C-D). En el procesado de *big data* se convierte cantidades ingentes de información en conocimiento

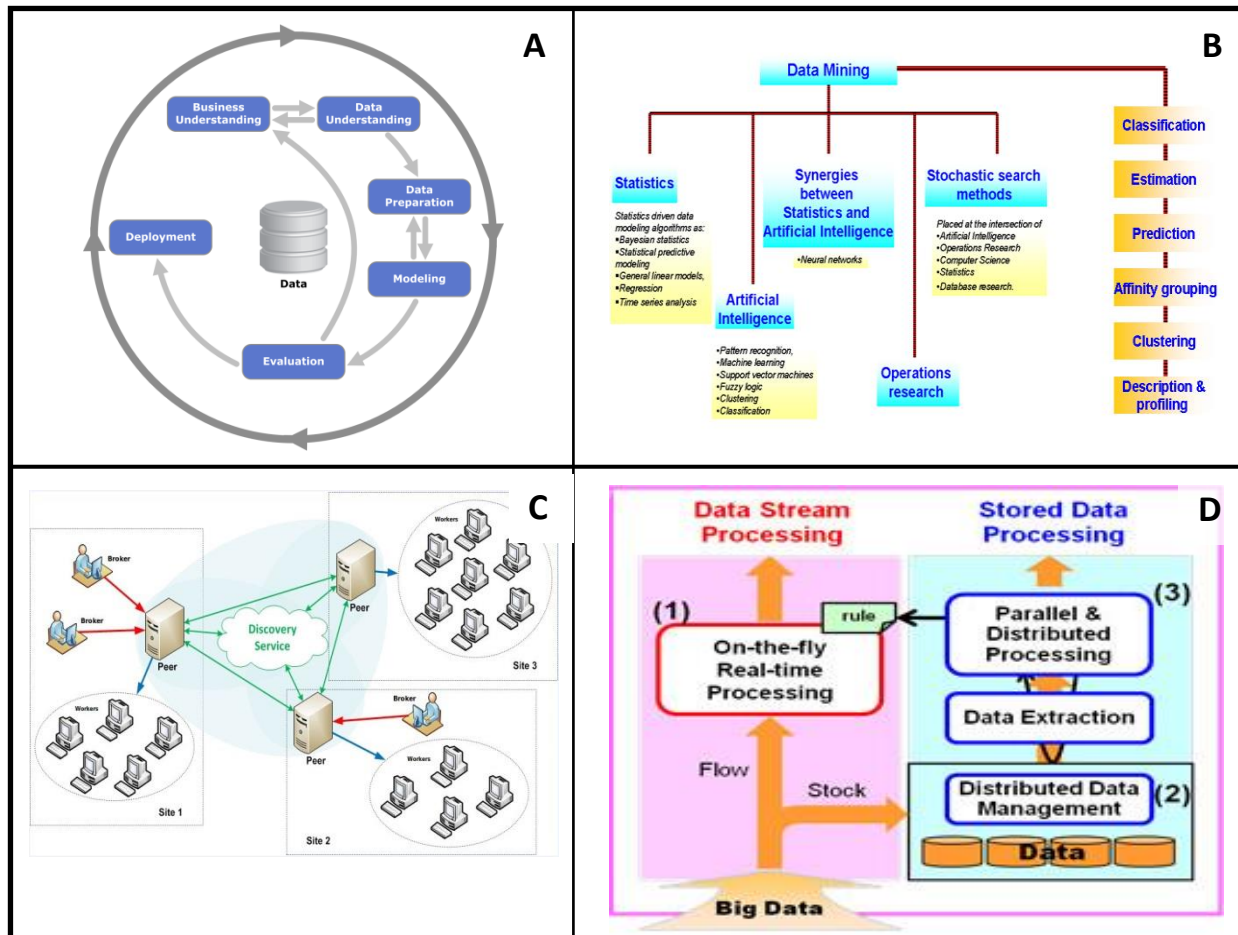


Fig. 1.10. *Data Mining* y *Big Data*. A) Protocolo estándar de *Data Mining* (CRISP-DM). B) Técnicas de *Data Mining*. C) Computación distribuida utilizada en *Big Data* D) Procedimiento de *Big Data*: almacenamiento, gestión y análisis distribuido de gran cantidad de datos para obtener rendimiento en tiempo real. Modificada de [176][183-186].

real mediante análisis con técnicas de *data mining*.

La minería de datos o *data mining* es el proceso de explorar por ordenador gran cantidad de datos para descubrir patrones y reglas. Tanto el *data mining*, como la estadística clásica, se basan en el conocimiento de las técnicas aplicables, pero especialmente en conocer cuándo y cómo aplicarlas para transformar los datos en información útil. El *data mining* tiene 3 estilos principales: *data mining* exploratorio (contraste de hipótesis) que incluye la regresión logística múltiple o el análisis discriminante, *data mining* directo que incluye los árboles de decisión y las redes neuronales y *data mining* indirecto, donde destaca

el análisis de *clusters*. Todas estas aproximaciones pueden a su vez relacionarse entre sí. En general, el *data mining* primero establece un objetivo genérico, a continuación, establece las tareas concretas que debería atacar el *data mining* y, finalmente, elige las técnicas que usará. Los proyectos de *data mining* suelen estar compuestos por tareas que encajan con algunas de las siguientes definiciones: preparar los datos para minería, análisis exploratorio de los datos, modelado de respuesta binaria, clasificación de valores discretos y predicciones, estimación de valores numéricos, encontrar *clusters* o asociaciones y aplicar un modelo a nuevos datos (Fig. 1.10A-B).

1.3.2. Análisis de imagen

En un protocolo experimental es frecuente que el investigador se encuentre en la situación de tener que realizar un trabajo de estimación visual, en este paso el análisis de imagen puede ser de gran ayuda gracias a su capacidad de automatización, estandarización y medida exacta. Las herramientas desarrolladas en esta tesis se enmarcan en el ámbito del análisis de imagen, por ello dedicamos este apartado a introducir al lector unos conceptos básicos de análisis de imagen. En el apartado material y métodos se especifica qué técnicas de análisis de imagen se utilizaron y con qué propósito.

1.3.2.1. Análisis de imagen en Biología

Los órganos de los sentidos y el sistema nervioso en general nos permiten captar y procesar información convirtiéndola, en algunos casos, en conceptos abstractos y elaborar respuestas en base a estos. La visión es el sentido de la percepción de la información fotónica del mundo que nos rodea y la comprensión de esa información. La especie humana posee una gran capacidad para el análisis de las escenas a su alrededor, reflexionar y tomar decisiones acertadas respecto a su entorno. Una máquina puede percibir estos fotones incluso con más precisión que los seres vivos, sin embargo la capacidad de procesar y analizar esta información por las máquinas representa uno de los mayores retos científicos desde hace más de 50 años. Las capacidades de captación e interpretación conforman lo que se conoce como visión artificial o visión por ordenador. Los avances en visión artificial son de gran aplicación en múltiples campos de la vida moderna, un campo de impacto incuestionable está en las ciencias biomédicas donde se ha progresado desde la simple observación de una imagen hasta la detección automática de estructuras complejas como

núcleos del cerebro, subestructuras celulares o movimientos moleculares (Fig. 1.11).

1.3.2.2. El sistema de análisis de imagen

El análisis de imagen requiere un software que implemente un sistema de análisis de imagen y un hardware con el que utilizarlo. Los componentes de hardware mínimos utilizados en un sistema de análisis de imagen son: un dispositivo de captación de imágenes, una tarjeta digitalizadora, un ordenador con alta capacidad de procesamiento y almacenamiento, y un dispositivo de salida (pantalla, impresora, etc.). El sistema de análisis de imagen tiene como principal objetivo replicar el sistema visual humano, lo que da una dimensión de la complejidad del problema que trata. El análisis de imagen y sus distintas fases son utilizados en las distintas herramientas desarrolladas en esta tesis.

En general, un sistema de análisis de imagen se puede dividir en las siguientes fases o tareas: captación y formación, mejoramiento y restauración, segmentación, morfología matemática, representación,

descripción y reconocimiento de patrones. En la captación y formación un sensor capta los fotones y un digitalizador convierte la información analógica en píxeles (del inglés *pixel*, *picture element*). En el mejoramiento y restauración se vuelve la imagen más fácilmente visible para el usuario o analizable para el ordenador. El mejoramiento es subjetivo, mientras que la restauración es objetiva. En la segmentación se divide la imagen en regiones intentando que correspondan a los objetos de interés. La morfología matemática consiste en modificar las regiones

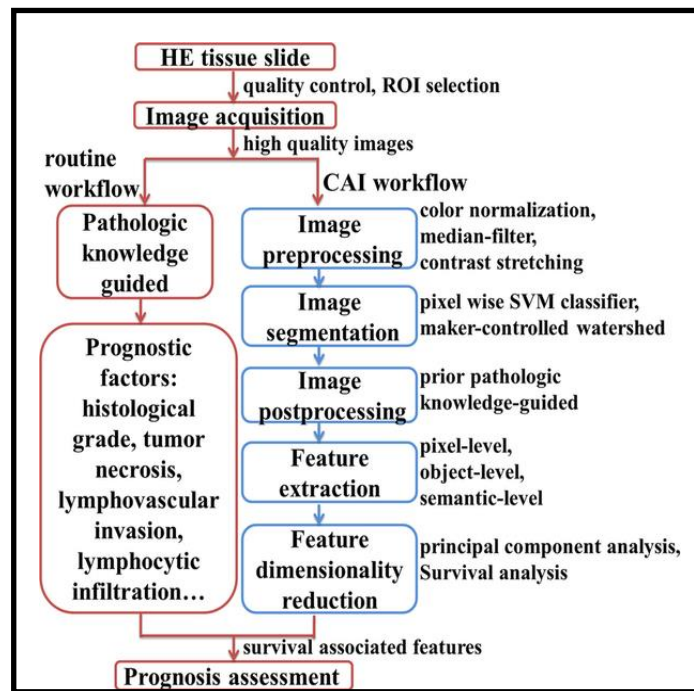


Fig1.11. Protocolo manual y de análisis de imagen para la determinación de prognosis en base a preparaciones histológicas. En rojo el procedimiento clásico manual realizado por un individuo. En azul el procedimiento realizado por ordenador mediante análisis de imagen automatizado. [187]

encontradas en la segmentación en base a criterios morfológicos. La representación consiste en obtener representaciones gráficas de los objetos, muchas veces destacando determinadas características. En la descripción se obtienen vectores de parámetros, o patrones, que definen los objetos. En el reconocimiento de patrones se agrupan los vectores o patrones que definen los objetos en clases por su similitud (Figs. 1.11 y 1.12).

1.3.2.3. Captación y formación

Los elementos implicados en el proceso de formación de una imagen son las fuentes de iluminación y el sistema óptico de formación de la imagen que incluye un captor y un digitalizador. Mediante el sistema óptico se modela la radiación de entrada en una imagen de salida [197]. En el captor la imagen de un sistema óptico es analógica y continua. Al digitalizar una imagen analógica, se hace discreta (es decir, se convierte algo continuo en discontinuo) mediante un proceso de cuantificación y muestreo. El muestreo corresponde a la reducción en la coordenadas xy, mientras que la cuantificación se corresponde con la reducción de la amplitud en niveles de grises.

1.3.2.4. Mejoramiento y restauración

Se puede mejorar digitalmente la apariencia de una imagen destacando normalmente cierta información de la misma, esto tiene cierto cariz subjetivo. Por otro lado, la restauración digital de imágenes se basa en un aspecto objetivo de las mismas. El mejoramiento digital se hacen operaciones con los valores de los píxeles para destacar aspectos como el contraste y los bordes[198]. La restauración implica restituir o reparar una imagen que se ve borrosa en relación al aspecto original que quería representar [199].

1.3.2.5. Segmentación

La segmentación parte una imagen en un conjunto de regiones no solapadas homogéneas según algún criterio, separando los objetos de interés del resto de la imagen considerado no relevante o fondo. Es un proceso crucial en cualquier sistema de análisis de imagen por su influencia en los resultados finales y su dificultad intrínseca. Existen distintas técnicas, sin conocerse una única que sirva para segmentar cualquier imagen. Entre los métodos de segmentación las principales categorías son: valor umbral del

histograma, homogeneidad de píxeles, detección de bordes y métodos avanzados como el de contornos activos[200].

1.3.2.6. Morfología matemática

La morfología matemática permite cuantificar rigurosamente aspectos geométricos de una imagen y conseguir que concuerden con la intuición y la percepción humana [197], para lo cual se crea una imagen modificada mediante transformaciones morfológicas.. Dentro de la morfología matemática se incluye la reconstrucción mediante dilatación geodésica, y la segmentación morfológica o Watershed.[201] (Fig. 1.12 E-F).

1.3.2.7. Representación

La representación debe facilitar la manipulación por el ordenador de los objetos encontrados y puede ofrecer una ayuda visual para el usuario. Una representación debe buscar que los objetos cumplan unas propiedades, como son: unicidad; invarianza ante transformaciones geométricas; sensibilidad para diferenciar objetos, y abstracción de detalles para retener las características principales (Fig. 1.12 G).La representación puede ser interna o externa. La representación interna corresponde al contenido de la región, la externa a los píxeles del contorno. Una representación externa se usa cuando se busca conocer la forma de un objeto y una interna se usa para conocer las propiedades de reflexión, color y textura de un objeto. [202, 203].

1.3.2.8. Descripción

Para que un ordenador pueda identificar y clasificar un objeto es necesario extraer unas características o rasgos de este. Estas características son medidas cuantitativas o cualitativas, obtenidas a partir del propio objeto o de una representación de este. Las características o rasgos suelen elegirse según la aplicación y el conocimiento del intérprete y según unas propiedades: poder de discriminación entre objetos, fiabilidad por poca dispersión, incorrelación entre características, invarianza a transformaciones y tiempo de cálculo. Las características conforman un vector de características o descripción de los objetos. Las características o descriptores pueden ser de forma o de regiones [197] (Fig. 1.12 H).Los descriptores de forma pueden ser básicos como el perímetro, diámetro, otros o

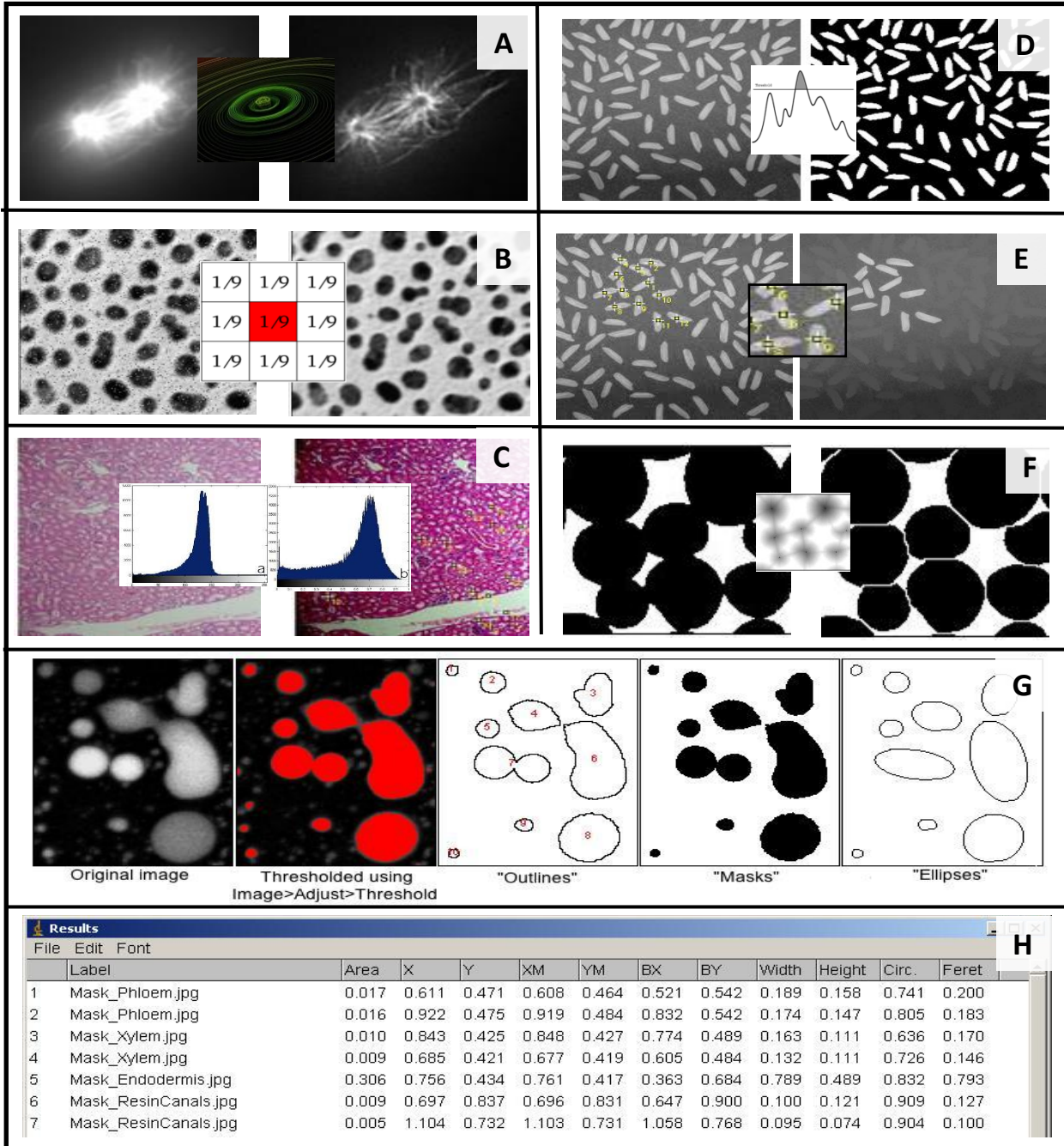


Fig1.12. Procedimientos de distintas etapas del análisis de imagen. A) Deconvolución, se revierte la pérdida de resolución causada del proceso de formación de imagen. B) Aplicado de kernel, en este caso de suavizado suavizado para retirar ruido. C) Contrastado, redistribuyendo el histograma, en este caso contrastado CLAHE. D) Umbralado o thresholding, para separar los objetos del fondo, en este caso con un solo umbral. E) Reconstrucción de objetos con puntos de partida, en este caso reconstrucción geodesica. F) Watershed, separación morfológica de partículas, en este caso binaria. G) Representaciones de objetos encontrados mediante crecimiento. H) Medidas obtenidas de cada objeto en base a sus límites detectados y a las intensidades de la imagen original. Modificada de [188-196].

más complejos como los momentos invariantes basados en momento geométricos [204] o los descriptores de Fourier [197]. Los descriptores de regiones básicos incluyen el área o intensidad media de los píxeles o factor de compacidad [205] mientras que los topológicos incluyen los invariantes como número de huecos, vértices o el número de Euler [206].

1.3.2.9. Reconocimiento de patrones

Normalmente, un análisis de imagen finaliza con el reconocimiento de los objetos de la imagen. Junto con las tareas de detección de objetos e interpretación de imágenes el reconocimiento es una de las tareas más complejas del análisis de imagen. En este momento no existe un sistema automatizado válido para todos los casos y capaz de replicar la capacidad de los centros visuales del cerebro.

Los vectores descriptores de los objetos se usan para entrenar clasificadores, los cuales, una vez entrenados, podrán reconocer objetos en otras imágenes. El resultado de este clasificador en estas imágenes será un conjunto de hipótesis de clasificación de los objetos que podrán ser comprobadas y corregidas por el usuario. Este puede ser considerado el resultado final del sistema de análisis de imagen. Para estas tareas se utilizan tanto técnicas estadísticas como técnicas de *data mining*.

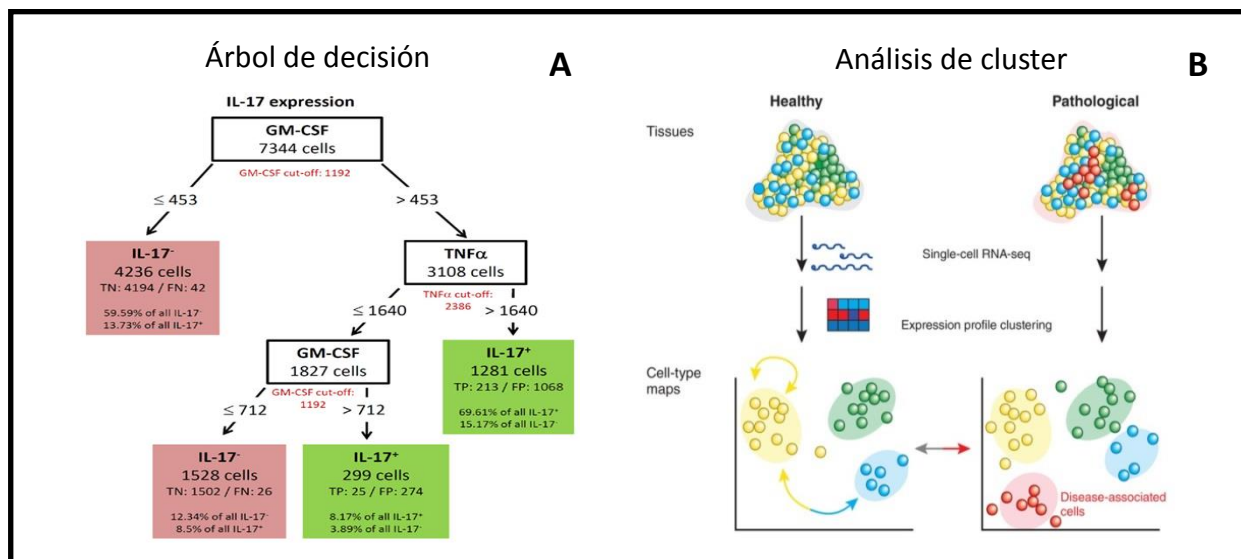


Fig1.13. Procedimientos de datamining aplicados en la última etapa del análisis de imagen; la búsqueda de patrones e identificación de los objetos. A) Identificación y clasificación de tipos celulares mediante datamining directo con un árbol de decisión. B) Descubrimiento y caracterización de nuevos tipos celulares por datamining indirecto mediante análisis de cluster. Modificada de [207, 208].

1.3.3. Desarrollo de software

Las herramientas desarrolladas para esta tesis se basan en el diseño de software, desarrollo y programación de algoritmos que resuelven nuestros problemas y pueden ser de utilidad general. El desarrollo de nuestro software utiliza los conocimientos y técnicas de los dominios de biología celular e ingeniería de software y actúa como pegamento para el análisis de datos y el análisis de imagen. En este apartado introducimos unos conceptos básicos de ingeniería de software y diversos aspectos de inteligencia artificial, *machine learning* y visión artificial, contextos en los que se coloca nuestro software.

1.3.3.1. La bioinformática

La bioinformática consiste en la aplicación de las tecnologías de la información y del software para la gestión y análisis de datos biológicos y abarca tanto la utilización como el desarrollo de técnicas de ingeniería informática. La bioinformática suele centrarse en solventar o automatizar problemas que sobrepasan las capacidades normales del ser humano. Una de sus ramas más modernas es el análisis de imagen de alto rendimiento. Las técnicas de esta rama permiten acelerar o automatizar el procesamiento, la cuantificación y el análisis de grandes cantidades de imágenes biomédicas que poseen gran cantidad de información, mejorando la precisión, la objetividad y la rapidez [209]

1.3.3.2. Las fases de desarrollo del software

Cuando la bioinformática se encarga del desarrollo de soluciones de software es recomendable que siga los procesos y metodologías testadas para el desarrollo de software. Dentro de lo posible, el software debe ser desarrollado de una manera sistematizada y estructurada. Comúnmente, este desarrollo incluye una serie de fases que pueden llevarse a cabo en uno o varios ciclos entrelazados: identificar la necesidad, planificar, diseño, implementación, testeo, documentación, despliegue y mantenimiento. Estas fases conforman lo que se conoce como ciclo de vida del desarrollo de software [210] [211].

En la fase de identificación de la necesidad se hace una descripción general de la solución a desarrollar y de su interés. En la planificación se busca descubrir y ordenar los requisitos y actividades que conformarán el proyecto y cómo gestionarlos. En la fase de diseño se crea el software desde un punto de vista teórico, localizando y resolviendo los posibles problemas. En la fase de implementación se codifica el software con el lenguaje y

paradigmas elegidos. En la fase de testeo se contrasta el cumplimiento de los requisitos y el rendimiento del mismo. La documentación permite comprender su diseño y desarrollo. El despliegue se encarga de distribución e instalación. El mantenimiento se encarga de corregir posibles errores que surjan y de estudiar añadir funcionalidad [212](Fig. 1.14A).

1.3.3.3. El software como proyecto

El proyecto de desarrollo de software frecuentemente toma los conocimientos y estándares genéricos de la gestión de proyectos como el PMBOK (del inglés *Project Management Body Of Knowledge*, Guía de los Fundamentos de Gestión de Proyectos) del Instituto de Gestión de Proyectos (PMI, del inglés *Project Management Institute*). [215].

El PMBOK describe 47 procesos a llevar a cabo en un proyecto, englobados en 5 fases y 10 áreas. Las cinco fases que identifica el PMBOK son: iniciación, planificación, ejecución, monitorización y control, y cierre. El PMI identifica 10 áreas a gestionar en un proyecto: integración, alcance, tiempo, costo, calidad, recursos humanos, comunicaciones, riesgos, adquisiciones y partes interesadas. De estas áreas destaca el triángulo formado por alcance, tiempo y costo, con la calidad en su centro. Cuando un vértice del triángulo aumenta su peso los otros 2 vértices también aumentan su peso o baja la calidad [216] (Fig. 1.14 B).

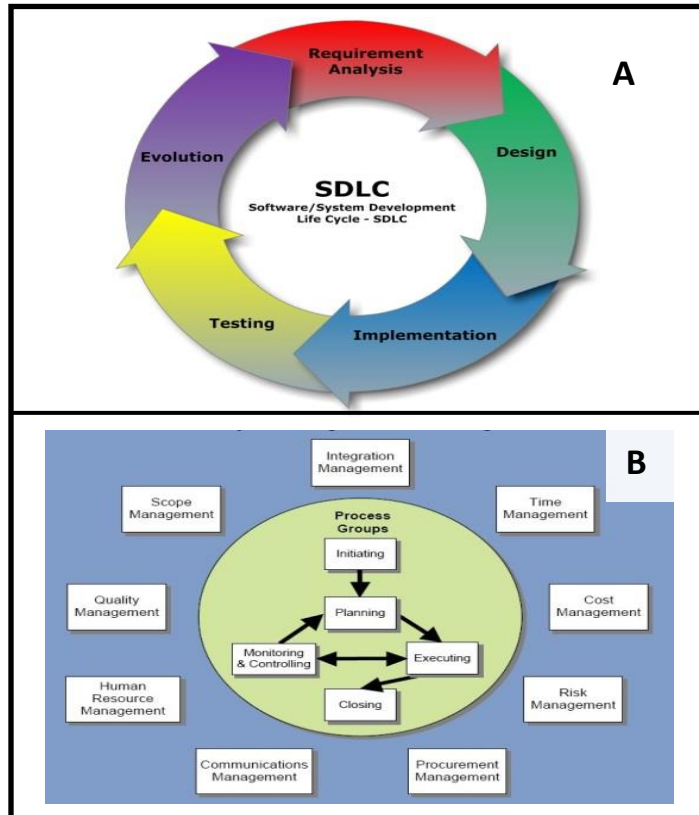


Fig1.14. Fases en la gestión de desarrollo de software. A)Ciclo de vida del software B)Fases y áreas designadas para la gestión de un proyecto según el PMI. [213, 214]

1.3.3.4. Paradigmas de programación

Dentro del desarrollo de software se utilizan diversos paradigmas de desarrollo. Estos paradigmas se pueden considerar estándares o metodologías que describen una manera de construir aplicaciones. Suelen originarse como solución a un problema recurrente en el diseño de software. Algunos paradigmas básicos son más frecuentes como la programación orientada a objetos (OOD) y la programación por capas, mientras que otros más avanzados como la Arquitectura Hexagonal o de Puertos y Adaptadores, ingeniería de software basada en búsqueda (SBSE) solo son utilizados en algunos casos[217, 218] [219] (Fig. 1.15).

1.3.3.5. Desarrollo de algoritmos y programas

Un programa, desde el punto de vista del programador, generalmente es uno o varios archivos de texto con instrucciones escritas en un lenguaje. Para que el ordenador ejecute el programa necesita traducir esas instrucciones a unos y ceros mediante compilación o interpretación. El programador normalmente no sabe leer el código binario sino que utiliza una abstracción superior de este, que es el lenguaje. El desarrollo de las instrucciones a nivel de razonamiento, el diseño, no requiere de ningún lenguaje en concreto, sino conocer los bloques básicos de construcción de programas para generar un algoritmo que resuelva nuestro problema. Este algoritmo se puede escribir en pseudocódigo, que deberá formalizarse mediante algún lenguaje para que el ordenador

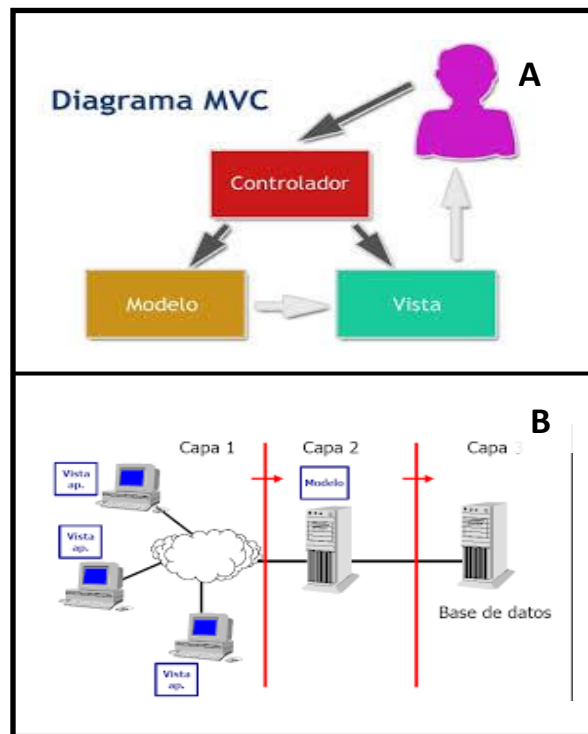


Fig1.15. Dos paradigmas modernos de uso general en el desarrollo de software. A) Paradigma MVC, se separan los datos y lógica de la presentación y el controlador gestiona la interacción entre estos y con el usuario. B) Paradigma por capas, se separan las funciones en capas, en este caso la presentación e interacción en una, la lógica y calculo en otra y los datos en la más profunda. [220, 221]

pueda entenderlo. Los programas están hechos para realizar funciones repetitivas, tomar decisiones y realizar cálculos y los bloques de construcción de los algoritmos de programación realizan estas tareas. Estos bloques son las variables, las funciones y las estructuras de control. Con unos conceptos básicos ya se pueden empezar a resolver problemas relativamente complejos. Conocer más en detalle la sintaxis y las operaciones aritméticas y lógicas posibles ayuda a ahorrar tiempo programando. Existen dos principios de gran importancia en la programación: “pensar antes de ponerse a programar” y “ser ordenado mientras se programa” [222-224] (Fig. 1.16).

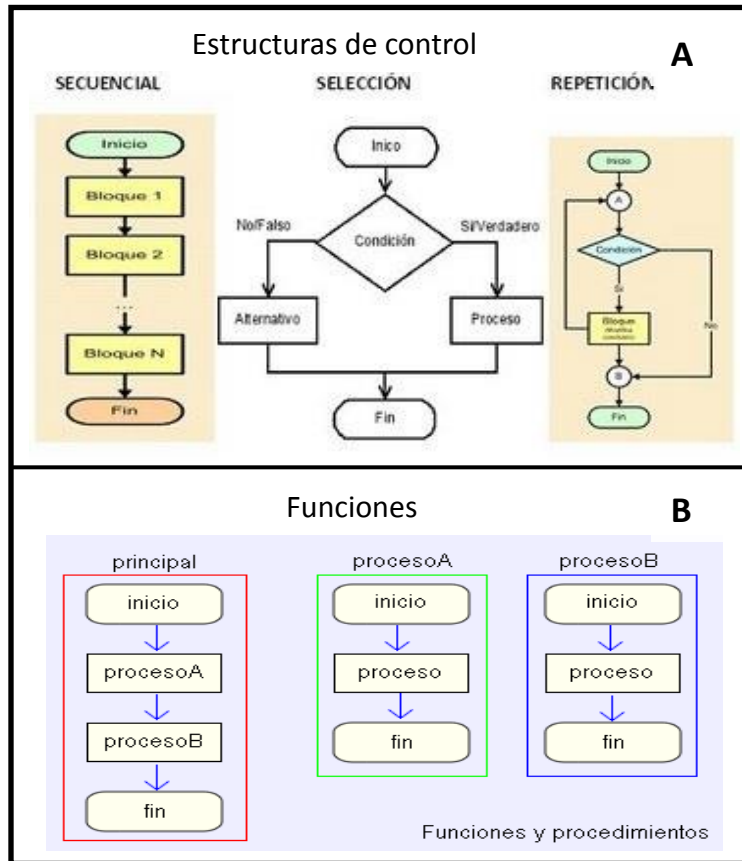


Fig1.16. Los componentes mínimos de la programación: estructuras y funciones. A) Se muestran tres estructuras básicas: ejecución secuencial, selección de una opción de ejecución y repetición de una acción. B) Ejemplo de composición de proceso principal mediante otros dos procesos o funciones. [227, 228]

1.3.3.6. Inteligencia artificial

La inteligencia artificial (IA) es un área multidisciplinar que combina computación y lógica para la creación y diseño de entidades capaces de resolver problemas por sí mismas utilizando como paradigma la inteligencia humana. Se podría resumir como la creación de máquinas capaces de pensar y de programas de cómputo inteligentes. La capacidad de razonamiento de la IA puede proceder de algoritmos genéticos, redes neuronales artificiales o de una lógica formal análoga al pensamiento abstracto humano. La IA puede incluir distintos tipos de sensores y ejecutores mecánicos manejados en un entorno de software.

Las aplicaciones de la IA atañen a campos como la economía, la medicina, la ingeniería y a gran variedad de aplicaciones de software. La Inteligencia artificial convencional se conoce como IA simbólico-deductiva, que se basa en el análisis formal y estadístico del comportamiento humano frente a diferentes problemas. La IA subsimbólico-inductiva también conocida como inteligencia artificial computacional o *machine learning* implica un aprendizaje interactivo basado en datos empíricos. Como herramientas de apoyo en la inteligencia artificial es común encontrarse la robótica, los interfaces de usuario y la visión artificial [225, 226].

1.3.3.7. Machine learning

El aprendizaje automático, aprendizaje de máquinas o *machine learning* es una rama de la inteligencia artificial cuyo objetivo es desarrollar técnicas que permitan a las computadoras aprender. Consiste en desarrollar software capaz de generalizar comportamientos a partir de casos de ejemplos en forma de datos no estructurados, por lo que se considera un proceso de inducción del conocimiento. Frecuentemente, se solapa con la estadística por depender del análisis de datos, pero el aprendizaje automático pone más énfasis en la complejidad computacional del problema. El aprendizaje automático puede verse como el intento de automatizar partes del método científico mediante métodos matemáticos. El aprendizaje automático se usa en motores de búsqueda en internet, en análisis de mercado, reconocimiento de habla y escritura, juegos, robótica, clasificación de secuencias de ADN y en diagnósticos médicos. El *machine learning* utiliza técnicas de *data mining* como *clustering* o agrupamiento y redes neurales. [229, 230].

1.3.3.8. Visión artificial

La visión artificial, también conocida como *computer vision*, es un subcampo de la inteligencia artificial cuyo propósito es programar un ordenador para que entienda una escena o las características de una imagen. Para ello, adquiere, procesa, analiza y comprende las imágenes como datos para generar una información numérica o simbólica en forma de decisiones. Gran parte del esfuerzo se centra en imitar los procesos de nuestra retina y cerebro para entender las imágenes. Para alcanzar los objetivos de la visión artificial se utiliza conocimientos de diversas áreas entre las que se incluyen: el reconocimiento de patrones, el aprendizaje estadístico, la geometría de proyección, el

procesamiento de imágenes y la teoría de grafos. La visión artificial es capaz de producir prótesis visuales y chips implantables para aquellas personas que han perdido por enfermedad conos y bastones, como en la retinosis pigmentaria. La microscopía digital es un ámbito en el cual la visión artificial ha tomado un papel central. Esto se debe a que la información de las imágenes digitales es numérica y manipulable por un ordenador, por ello gran parte de los avances en análisis de imagen proceden de la microscopía digital [230, 231] (Figs. 1.17 y 1.18).

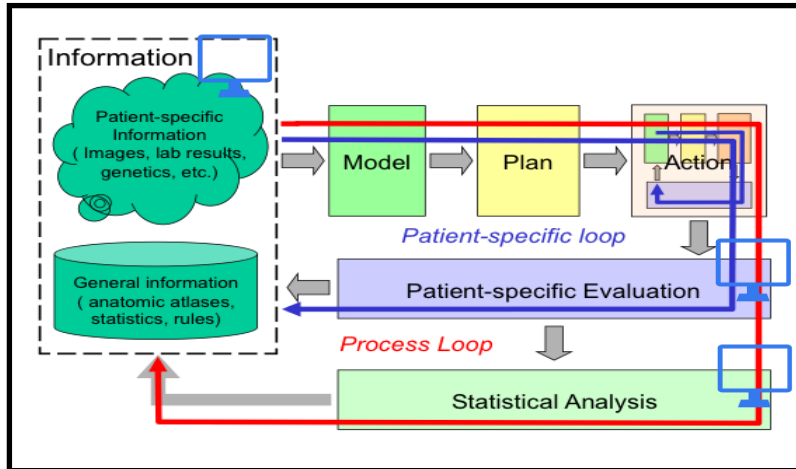


Fig1.17. Importancia del análisis automatizado en un modelo de medicina intervencional. Modificada de [232].

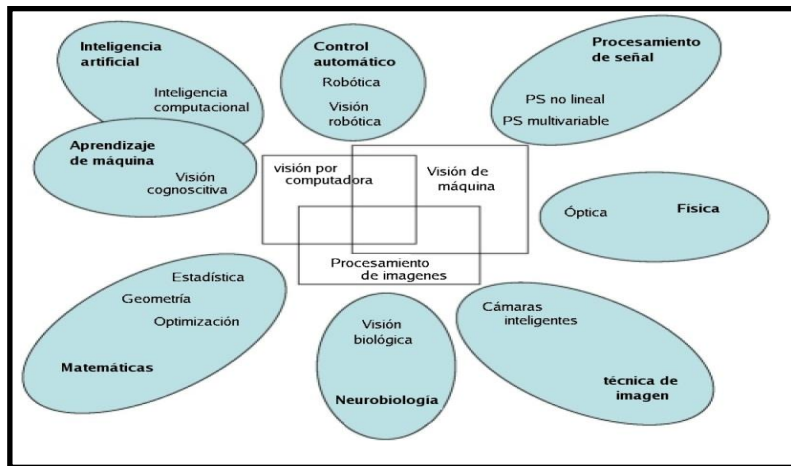


Fig1.18. Relación de la visión artificial con otros campos. [233]

2. Objetivos

En esta tesis doctoral se proponen los objetivos abajo enumerados, que se presentan agrupados en tres grandes apartados.

2.1. Medidas de actividad animal

Mediante la medición de los ciclos de actividad/reposo de los animales de experimentación se pretende:

- Determinar los efectos de la pérdida de conos y bastones (en la degeneración retiniana) o de la eliminación de las células dopaminérgicas de la retina sobre diversos parámetros cronobiológicos.
- Confirmar el fundamento de la biestabilidad de la melanopsina *in vivo*.

2.2. Mediciones celulares

Mediante la medición del inmunomarcaje de la melanopsina en las ipRGC se pretende conocer:

- Qué subpoblaciones de ipRGC existen en función de parámetros morfológicos básicos.
- Cómo afecta la ausencia de conos y bastones, la hora del día y la intensidad lumínica a la densidad de dichos tipos de ipRGC y las isoformas S y L de la melanopsina.
- Los efectos de las condiciones ambientales de iluminación sobre los niveles de melanopsina en retinas *in vitro*.

2.3. Desarrollo de software

Se pretende desarrollar programas informáticos con las siguientes funcionalidades:

- Analizar la actividad circadiana a partir de señal de vídeo en varias jaulas de animales simultáneamente y en cualquier sistema operativo.
- Fusionar micrografías obtenidas manualmente en una única gran imagen que contenga la información de interés enfocada en el mismo plano.
- A partir de imágenes de microscopío confocal, asignarles posiciones, detectar capas en la muestra y generar grandes imágenes por capa y canal.
- Encontrar células, delimitar su contorno y medir sus parámetros en imágenes histológicas.

3. Material y métodos

En este capítulo se describen los materiales utilizados y los procedimientos que se siguieron para llevar a cabo los experimentos, desarrollo de herramientas y concepción de esta tesis. Para ello, este capítulo se ha dividido en tres apartados. El primero está dedicado a los animales de experimentación, sus condiciones experimentales y de registro de actividad. El segundo se centra en el procesado de las muestras en el ámbito de la biología celular y la histología. El tercero está dedicado a toda la metodología relativa a las tecnologías de la información y a la bioinformática, y en el mismo se detalla cómo se llevó a cabo la obtención, gestión y análisis de la información y las herramientas propias y de terceros utilizadas en este proceso y en el desarrollo de software.

3.1. Medición de actividad animal

3.1.1 Diseño experimental

Medición del ritmo endógeno y post-efectos

Para comprobar si entre C3H/He sin degeneración retiniana (+/+) y C3H/He con degeneración retiniana (*rd/rd*) existen diferencias en el periodo endógeno y la duración de los post-efectos se utilizaron 5 ratones +/+ y 4 ratones *rd/rd*. Se midió la actividad de los ratones primero expuestos a condiciones de luz-oscuridad 12:12 con luz blanca y al transferirlos a oscuridad constante.

Medición de los efectos de la luz azul

Para comprobar si la exposición a luz azul (470-480 nm) resulta en un agotamiento del 11-cis RAL medimos la actividad de 5 ratones *rd/rd* en condiciones luz-oscuridad 12:12 con luz azul. Como punto de comparación utilizamos 4 ratones *rd/rd* expuestos a condiciones luz-oscuridad 12:12 con luz blanca.

Medición de los efectos de la deleción dirigida de células dopaminérgicas

Para comprobar si la deleción de las células dopaminérgicas de la retina afectaba al ritmo circadiano realizamos inyecciones intraoculares de un anticuerpo contra el transportador reverso de dopamina unido a la toxina saporina. Se realizaron las siguientes inyecciones en ratones CD1: 1 individuo sin inyección-solo con anestesia, 2 individuos con 1 inyección, 1 individuo con 2 inyecciones y 1 individuo con 3 inyecciones. A continuación medimos la actividad de los 5 ratones Swiss en condiciones luz-oscuridad

12:12 con luz blanca.

3.1.2. Animales de experimentación

En la presente tesis se utilizaron ratones (*Mus musculus*), debido al amplio conocimiento que existe de esta especie en la bibliografía relacionada con los estudios sobre la retina y, en particular, sobre la melanopsina, así como también por su disponibilidad, facilidad de cría y mantenimiento.

3.1.2.1. Animales *rd/rd* y sus retinas

Tomamos como modelo la cepa C3H/He debido a las características de su retina. Los ratones C3H/He comúnmente comercializados poseen una mutación *rd*, que induce degeneración retiniana. Esta patología provoca una ceguera progresiva en los mismos. En humanos este tipo de mutaciones tiene el mismo efecto que en los ratones, padeciendo esta patología de degeneración retiniana una de cada 4000 personas (Hartong et al. 2006). La mutación responsable en este caso afecta al gen de la fosfodiesterasa de los bastones. Debido a la actividad irregular o la falta de actividad de esta fosfodiesterasa, según la mutación, se produce un progresivo aumento citosólico del GMPc. Este aumento de GMPc citosólico acaba provocando la degeneración de los bastones [234, 235]. Los bastones, a su vez, son responsables de producir un factor de supervivencia para conos. Al degenerar los bastones se deja de producir este factor y los conos también degeneran. A la larga, esta degeneración de conos y bastones también induce la pérdida de parte de las neuronas de las capas más internas de la retina [236, 237]

Si bien esta mutación tiene efecto cuando está presente de forma homocigota y, por ello, a los ratones se les denomina *rd/rd*, con frecuencia nos referiremos simplemente a ratones *rd* cuando sufran esta patología retiniana concreta.

Debido a que existen distintas mutaciones en el gen de la fosfodiesterasa de bastones y a una coyuntura ambiental variable, la afección puede tener una progresión más o menos rápida. Por ello, se describe la mutación con las siglas *rd* seguida de una cifra que indica la progresión, por ejemplo *rd10*. Los números más bajos indican una progresión más rápida y los más altos más lenta. En nuestro caso, trabajamos con un modelo de muy rápida progresión, *rd1*, en cuya retina todos los conos y bastones y la práctica totalidad de células bipolares han desaparecido tras 3 meses [238]. Los animales utilizados tenían edades

comprendidas entre los 5 y los 18 meses.

3.1.2.2. Animales +/+ y sus retinas

También utilizamos ratones de la misma cepa que no poseían esta mutación. Al no tener esta mutación los conos y bastones de sus retinas eran completamente funcionales y su visión es normal. Esta cepa se denomina C3H/He +/+, por ser homocigota para el gen no mutado de la fosfodiesterasa. Los ratones +/+ para el locus *rd* fueron obtenidos por retrocruzamiento con ratones C57BL carentes de la mutación *rd* y amablemente cedidos por el profesor Russell Foster (Universidad de Oxford). Los ratones C3H/He +/+ carecen, por tanto, de degeneración retiniana. A estos ratones los llamaremos simplemente +/+.

3.1.2.3. Animales CD1 y sus retinas

Además de ratones C3H/He +/+ también se utilizaron ratones CD1. Al igual que los ratones C3H/He +/+ poseen unos conos y bastones plenamente funcionales y su disponibilidad y mantenimiento es mucho más sencillo que el de los C3H/He +/+.

3.1.2.4. Mantenimiento de los animales

Los animales se mantuvieron en las instalaciones habilitadas para ello en el animalario de la Universidad de Oviedo, a una temperatura de 20 ± 2 °C, con alimento y agua ad libitum. Para su sacrificio los ratones fueron expuestos a atmósfera de CO₂.

3.1.3. Condiciones de iluminación y registro en vídeo de los animales

Los ratones fueron dispuestos en jaulas individuales, que fueron situadas con su cara mayor perpendicular a una cámara de vídeo básica de consumo, de manera que se registraron un total de 9 jaulas dispuestas a razón de 3 jaulas por estantería o nivel. La cámara también grabó un reloj de agujas que se usó como control del funcionamiento de la cámara.

El foco de luz se situó de frente a la jaula central y se dispersó la luz mediante lentes de manera que la iluminación resultase homogénea en las jaulas estudiadas.

Se aplicaron distintas condiciones de iluminación para determinar la regulación de la melanopsina, las ipRGC y la actividad circadiana:

- Oscuridad (0 luxes). Bajo estas condiciones se utilizó, luz infrarroja (IR) para que

la cámara, sensible a la misma, pudiese captar la actividad.

- Luz blanca procedente de una lámpara halógena a una intensidad de 300 lx o 3000 lx, según el experimento de que se tratase.

- Luz azul en el rango 470-480 nm procedente de una fuente led a una intensidad de 100 lx.

Para la transferencia de la señal de vídeo al ordenador se utilizaron varios sistemas: por cable AV y por radio a tarjeta capturadora y por wifi a un router. En la tercera parte de material y métodos, relacionada con bioinformática y tecnologías de la información (IT), se entra más en detalle en cada uno de estos sistemas.

3.1.4. Deleción dirigida de células dopaminérgicas

Para eliminar las células dopaminérgicas de ratones Swiss realizamos inyecciones intraoculares de un anticuerpo contra el transportador reverso de dopamina unido a saporina.

Se realizó el tratamiento siempre a las ZT03 para evitar la influencia de un posible ritmo circadiano del receptor. Se dejó una semana de separación entre inyecciones.

Cada ratón fue anestesiado mediante inyección intraperitoneal de 90µl de anestésico (50µl de Ketamina y 40µl de Medetomidina).

Se diluyó 0,5 µl de la solución comercial 1:1 en 0,1 µl de PBS resultando en 1 µl con 500ng de anticuerpo anti-DAT-SAP (Advanced Targeting Systems, #IT-25).

Se realizaron inyecciones intraoculares de 1µl en el ojo izquierdo de cada ratón.

A uno de los ratones se le aplicó la anestesia pero no se le aplicó la inyección intraocular.

3.2. Técnicas de biología celular

3.2.1. Diseño experimental

El número de ipRGC según cepa, hora e intensidad lumínica

Para analizar si existen diferencias en el número de células según genotipo C3H (+/+ vs *rd/rd*), hora (ZT23 vs ZT3) e intensidad lumínica (300lx vs 3000lx), se sacrificaron ratones de cada genotipo una hora antes de encenderse la luz, así como tres horas después de encenderse la luz, bajo las dos condiciones lumínicas mencionadas (300lx y 3000lx) (n=4 para cada grupo establecido). De las 24 retinas se obtuvieron secciones de un grosor

de 16µm mediante un criotomo, de las que se utilizaron una de cada cinco obtenidas de forma seriada. Las retinas se marcaron para melanopsina total, se revelaron por el método ABC y se contó manualmente el número de células. A su vez, para cada célula se estimó visualmente la posición de su soma y la de su plexo dendrítico, así como la intensidad de su marcaje. Los datos resultantes se estudiaron mediante análisis estadístico de contraste de hipótesis.

Las ipRGC según la proteína total y el diámetro

Para describir las poblaciones celulares de ipRGCs se analizaron 4 retinas enteras de dos ratones C3H rd procedentes de dos condiciones experimentales distintas. Estas 4 retinas fueron marcadas para la melanopsina total mediante inmunohistoquímica. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia de campo claro con desplazamiento manual y captura automatizada. Con las imágenes se realizó la composición de la retina entera enfocada con *Stitch&Focus*.

Los somas de las células fueron identificados y parametrizados mediante CellFinder. Los datos resultantes se analizaron mediante técnicas de datamining indirecto para buscar poblaciones celulares.

Las ipRGC según la proteína total, el diámetro y las dendritas

Se determinó visualmente la naturaleza de las dendritas de una muestra de cada población celular descrita por intensidad de tinción y diámetro. Además, se realizó el procedimiento inverso, identificar células por sus dendritas y buscar la población a la que pertenecen según tinción y diámetro.

Los datos resultantes se analizaron mediante técnicas de datamining directo para determinar cómo se alinean las poblaciones descritas según dendritas a las poblaciones descritas según intensidad y diámetro del soma.

Las isoformas de melanopsina según la hora del día y la intensidad lumínica

Para analizar si existe una expresión diferencial de las isoformas de melanopsina y si esta depende de la hora del día, se sacrificaron 3 ratones C3Hrd a ZT23 (1 hora antes de encenderse la luz) y 6 ratones C3Hrd a ZT3 (3 horas tras encenderse la luz). Para dilucidar si influye la intensidad lumínica de los 6 ratones sacrificados a ZT3, las 3 horas antes de su sacrificio 3 estuvieron expuestos a 200lx y otros 3 a 2000lx. Se utilizó una retina de cada animal para el experimento. Las 9 retinas fueron marcadas para ambas isoformas, L y S,

utilizando anticuerpos amablemente cedidos por el profesor Russell Foster (Universidad de Oxford, Reino Unido), y estudiadas mediante inmunofluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y renombradas con *ConsecRenamer*. Con las imágenes renombradas se realizó la composición de la retina entera enfocada por capas celulares con *LayerMaker*. Las imágenes renombradas se compusieron por capas *Stitch&Focus*.

Los somas de las células fueron identificados y parametrizadas mediante *CellFinder*. Las células M1A fueron identificadas mediante el marcaje de la isoforma S en la capa ganglionar. Las células M2 fueron identificadas mediante el marcaje de la isoforma L no identificadas como M1A. Las células M1B fueron identificadas por el marcaje de S y/o L en la capa amacrina.

Los datos resultantes se analizaron mediante técnicas de datamining indirectas para buscar poblaciones celulares. Se determinó la influencia de la hora del día y la intensidad lumínica mediante análisis multivariante clásico.

Los tipos de ipRGC en cultivo organotípico en luz frente a oscuridad

Para conocer el efecto de la oscuridad frente a la luz estándar en las poblaciones celulares de ipRGC se analizaron 6 retinas enteras procedentes de 3 ratones C3Hrd. Se sacrificaron los ratones a ZT23 y se colocaron las retinas en cultivo organotípico hasta ZT3. De cada ratón se colocó en cultivo una retina a 300 lx y otra en 0 lx. En ZT3 se fijaron las retinas. Estas 6 retinas fueron marcadas para la melanopsina total mediante inmunohistoquímica. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de campo claro con desplazamiento manual y captura automatizada. Con las imágenes se realizó la composición de la retina entera enfocada con *Stitch&Focus*.

Los somas de las células fueron identificados y parametrizados mediante *CellFinder*. Las poblaciones se detectaron mediante técnicas de datamining indirecto para buscar poblaciones celulares. Se determinó la influencia de la exposición in vitro a oscuridad frente luz normal mediante análisis multivariante clásico.

Los tipos de ipRGC en cultivo organotípico según la intensidad lumínica

Para conocer el efecto de la oscuridad frente a la luz estándar en las poblaciones celulares de ipRGC se analizaron 6 retinas enteras procedentes de 3 ratones C3Hrd. Se sacrificaron los ratones a ZT23 y se colocaron las retinas en cultivo organotípico hasta ZT3.

De cada ratón se colocó en cultivo una retina a 300 lx y otra en 3000 lx. En ZT3 se fijaron las retinas. Estas 6 retinas fueron marcadas para la melanopsina total mediante inmunohistoquímica. Las imágenes fueron obtenidas mediante un escáner de portaobjetos.

Los somas de las células fueron identificados y parametrizados mediante CellFinder. Las poblaciones se detectaron mediante técnicas de datamining indirecto para buscar poblaciones celulares. Se determinó la influencia de la exposición in vitro a oscuridad frente luz normal mediante análisis multivariante clásico.

3.2.2. Inmunohistoquímica en secciones

Mediante el inmunomarcaje en secciones de retina podemos observar los subtipos celulares de ipRGC según la localización y tinción de su soma y la sublámina a la que proyectan sus dendritas.

3.2.2.1. Obtención de tejido

Los animales fueron sacrificados sometiéndoles a una atmósfera de CO₂. Los ojos fueron fijados por inmersión durante 24 horas a 4°C en paraformaldehído (PF) 4% en viales individuales. Posteriormente, se dejaron en PBS 24h a 4°C. A continuación, se pasaron por 10% de sacarosa en PBS 1h a temperatura ambiente, 20% de sacarosa 2h a temperatura ambiente y 30 % de sacarosa una noche a 4°C para crio-proteger el tejido. Tras embeber los ojos en OCT, se congelaron en una mezcla de hielo seco e isopentano. Los bloques sólidos fueron envueltos en papel de aluminio y almacenados a -20°C hasta el momento de su seccionado.

3.2.2.2 Seccionado del tejido

Los cortes se realizaron a 16 µm de grosor, siendo adheridos a portaobjetos superfrost plus. Se colocaron consecutivamente en los portaobjetos obteniéndose 5 series paralelas por cada ojo, de las que se utilizaría una para este análisis. Durante el seccionado los cortes se dejaron a temperatura ambiente y, al acabar el mismo, se almacenaron a -20°C.

3.2.2.3. Detección de melanopsina con el método ABC

Se seleccionó 1 de cada 5 series obtenidas por cada ojo y se dejó secar durante una noche. Se lavaron 30 minutos en agua destilada para eliminar el medio OCT. A continuación, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena incubando durante 30 minutos con H₂O₂ al 0,5%

en agua destilada, tras lo cual, se lavó 3 veces (5 minutos cada lavado) en PBST. A continuación, se incubó durante 1 hora con 500 µl de 1,5% suero normal de conejo (Vector) en PBS. Seguidamente, se retiró el exceso de suero y se añadieron 200 µl de una dilución 1:2000 de anticuerpo contra melanopsina (UF006) amablemente cedido por el profesor Ignacio (Universidad de Virginia, EEUU) en PBST y se incubó durante 48 horas a 4 °C. Tras este tiempo, se lavaron las secciones 3 veces (5 minutos por lavado) en PBST. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario unido a biotina y, tras 3 lavados (5 min. cada uno), se incubó con el complejo ABC (avidina-biotina-peroxidasa) del kit ABC (Vector). El revelado se realizó por incubación durante 3 minutos en diaminobencidina (Solución DAB). Por último, las secciones se lavaron dos veces en agua destilada, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en eucaliptol y se montaron con medio hidrófobo (Eukitt).

3.2.2.4. Recuento de células

Se realizó un recuento de células en 1/5 de los cortes inmunoteñidos, es decir 1/25 de cada retina. Se contabilizó un total de 1583 células entre los 24 ojos. A cada célula se le adjudicó individualmente un valor categórico dentro de las variables *soma*, *color* y *plexo*. Los valores categóricos son los expuestos a continuación, resultando en un total de 64 categorías subjetivas.

Soma: en capa ganglionar, en capa nuclear interna,

Color: Oscura, Intermedia, Clara, Clara-Dudosa.

Plexo: ON, OFF bien definido y ON dudoso, ON bien definido y OFF dudoso, OFF dudoso y ON dudoso, No se ve ninguno

\Para facilitar su estudio se formaron los siguientes grupos celulares:

- Todas (M1, M2, M3).
- Todas las localizadas en la capa ganglionar.(M1A y M2)
- Todas las localizadas en la capa de las amacrinas(M1B)
- Todas las ganglionares con plexo OFF.*(M1)
- Todas las ganglionares con plexo ON.*(M2)
- Ganglionares oscuras con plexo OFF *(M1A Oscuras).
- Ganglionares oscuras con plexo ON *(M2 Oscuras)
- Ganglionares oscuras con ambos plexos *(M3 Oscuras).

- Ganglionares claras con plexo OFF *.* (M1A Claras)
- Ganglionares claras con plexo ON *.* (M2 Claras)
- Ganglionares claras con ambos plexos *.* (M3 Claras)

*No se incluyeron aquellas con plexo dudoso. Las que tuviesen un plexo bien visible y otro dudoso fueron incluidas como si solo tuviesen el plexo bien visible.

**Entre las claras no se incluyeron las claras-dudosas

3.2.2.5. Control negativo

Como control negativo se utilizó una dilución 1:2000 de una solución 1 µg/ul de IgGs de conejo, en lugar del anticuerpo UF006 (anti-melanopsina).

3.2.3. Inmunohistoquímica en retina entera

El marcaje histológico con anticuerpos permite conocer la expresión de una proteína a nivel morfológico. En el caso de la retina podemos observar en qué tipos celulares se expresa, en qué parte concreta de la retina se encuentran esas células, y en qué cantidad se expresa la proteína estudiada.

3.2.3.1. Procesado inmunohistoquímico

Cada retina completa fue procesada inmunohistoquímicamente en un microtubo (Eppendorf) de 1,5 ml. Se realizaron incubaciones largas a 4 °C para favorecer la dispersión en el grosor de la retina sin incrementar las uniones inespecíficas que aparecen a mayores temperaturas. El inmunomarcaje se reveló con el kit de ABC de Vectorlabs.

El protocolo se realizó según los siguientes pasos:

1. Inicialmente se realizó un etapa de permeabilización en PBST 1% de 1 hora, tras la cual, se lavaron las retinas 2 veces, 10 minutos cada vez, en PBST 1%.

2. A continuación, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena de las retinas con H₂O₂ al 1% en PBS 30 minutos, tras lo cual se lavaron 2 veces, 10 minutos cada vez, en PBST1%.

3. Tras bloquear la peroxidasa endógena se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal del mismo origen que el anticuerpo secundario diluido al 30% en PBS 1 hora. En este caso, suero normal de cabra.

4. A continuación, se incubaron las retinas con una solución de anticuerpo policlonal anti-melanopsina UF006, desarrollado en conejo y amablemente cedido por el Profesor Ignacio Provencio (Universidad de Virginia, EEUU), diluido 1:10000 en PBS, durante 72 h. a 4 °C. Tras lo cual, se realizaron 4 lavados de 10 minutos en PBST 1%.

5. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario biotinado de cabra, mezclado con IgGs del mismo origen, disuelto en PBS, durante 72 h. a 4 °C; y después se realizaron 5 lavados de 10 minutos en PBST 1%.

6. A continuación, se incubaron las retinas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 72 h. a 4 °C, y, a continuación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos en PBS.

7. Posteriormente, se revelaron las retinas con una solución de diaminobenzidina (DAB), con 1 ml por retina durante 15 minutos, y se lavaron 3 veces, 10 minutos cada vez, en PBS.

8. Por último, con ayuda de una lupa binocular, las retinas fueron extendidas sobre los portaobjetos con la superficie interna de las mismas hacia arriba, montadas en glicerol y los cubreobjetos sellados alrededor con laca de uñas.

3.2.3.2. Control negativo

Una retina se incubó con una dilución 1:10000 de IgGs inespecíficas originarias de conejo en PBS en vez de con anticuerpo UF006.

3.2.4. Inmunofluorescencia en retina entera

El procedimiento de inmunofluorescencia en las retinas enteras fue similar al de inmunohistoquímica anteriormente expuesto. Las diferencias entre ambos procesos se exponen a continuación. En este caso, la inmunofluorescencia nos permitió observar la expresión de las isoformas S y L de ratón en los distintos tipos celulares. Esto habría sido más complicado con microscopía de campo claro por no poder recibir señal en distintos canales.

3.2.4.1. Procesado inmunofluorescente

El protocolo se realizó según los siguientes pasos:

1. Tras permeabilizar (1 h.) y lavar (2 x 10 min.) las retinas en PBST 1%, se

bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de burro (el mismo origen que el del anticuerpo secundario) diluido al 30% en PBS.

2. A continuación, se incubaron las retinas enteras con una combinación de anticuerpos contra la isoforma L de melanopsina, desarrollado en conejo, y contra la isoforma S de melanopsina, criado en cabra. Ambos anticuerpos fueron amablemente cedidos por el Profesor Russell Foster, de la Universidad de Oxford. Estos anticuerpos se mezclaron en PBS dando una dilución final de cada uno 1:2000. La incubación se llevó a cabo también durante 72 h. a 4 °C. Tras ella, se realizaron 4 lavados de 10 minutos en PBST1%.

3. Seguidamente, se realizó la incubación con anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos. Para detectar los anticuerpos contra las isoformas L y S de la melanopsina se utilizaron, respectivamente, un anticuerpo de burro anti-conejo marcado con Alexa488 (A21206) y uno de burro anti-cabra marcado con Alexa633 (A21082), ambos de Invitrogen. Estos anticuerpos se mezclaron en PBS dando una dilución final de cada uno de 1:200. La incubación se realizó durante 72 h. a 4 °C, tras lo cual, se realizaron 5 lavados de 10 minutos.

4. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI a una dilución de 1:1000 durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, las retinas se lavaron 6 veces en PBS (10 minutos por lavado).

5. Finalmente las retinas fueron extendidas sobre los portaobjetos con ayuda de pinzas, bajo una lupa binocular, montadas con un medio acuoso especial para retrasar la desaparición de la fluorescencia (véase anexo de recetas). Tras colocar los cubreobjetos, se sellaron los mismos alrededor con laca de uñas.

3.2.4.2. Control negativo

Se mezclaron en PBS IgGs inespecíficas de cabra y conejo dando una dilución final de cada tipo de IgG de 1:2000. Una retina se incubó con esta mezcla en vez de con los anticuerpos contra isoformas S y L de melanopsina.

3.2.5. Extracción y cultivo organotípico de retina

El protocolo de cultivo desarrollado y aquí expuesto es similar a otros protocolos estándar [239, 240]. En nuestro caso, las condiciones de cultivo organotípico de la retina

permiten analizar las variaciones de expresión de la melanopsina de forma endógena dentro de la retina y aislar dicha expresión de la regulación procedente de otros órganos.

3.2.5.1. Manejo de los animales y extracción de las retinas

Los ratones fueron sacrificados bajo atmósfera de CO₂. A continuación, se extrajeron los globos oculares con pinzas curvas. La retina fue separada de otros componentes oculares con ayuda de aguja, pinzas y cuchilla bajo lupa binocular. Este proceso se realizó sobre una placa de cultivo de 35mm con un medio específico para el cultivo de retinas, el medio Ame's suplementado con Suero Fetal Bovino y con un cocktail de fungicidas/bactericidas [239]. Cuando el momento de sacrificio coincidió con una hora del periodo de oscuridad los animales fueron manejados en condiciones de oscuridad. En este caso, las jaulas se transportaron dentro cajas opacas. La extracción se realizó bajo tenue luz roja (620-750 nm), para la cual los ratones rd/rd carecen de fotorreceptores. Los conos y bastones han desaparecido por degeneración [237] y la melanopsina carece de sensibilidad en ratón rd/rd por encima de 550nm [169]. La separación de la neuroretina se realizó también bajo luz roja tenue. Todo el material utilizado había sido esterilizado y/o autoclavado.

Las retinas se extrajeron en turnos de 2-3 ratones (4-6 retinas). La extracción del par de retinas de cada ratón duró 5-10 minutos. Se tuvo en cuenta el orden de extracción para ser utilizada en el posterior análisis de datos.

3.2.5.2. Incubación de las retinas

Una vez extraídas las retinas, fueron depositadas en una nueva placa de cultivo con 5ml de medio Ame's suplementado. Las placas con retinas a su vez fueron introducidas en una placa de 100 mm transparente u opaca según correspondiese a las condiciones experimentales.

El cultivo de retinas se realizó en el mismo medio en un incubador a 37 °C con 5% de CO₂. Las retinas pueden ser incubadas a menor temperatura, a 35 °C [241], si bien preferimos no arriesgarnos a alterar el metabolismo variando excesivamente la temperatura[239]. Es decir, buscamos asemejarnos lo más posible al modelo in vivo. Por otro lado, las retinas no pasaron más de 24 h. en la incubadora y hasta los 7 días no parece haber diferencias en la integridad de la retina entre 35 °C y 37 °C [241]. Optamos por no

reponer el medio durante el proceso, ya que se sabe que este proceso puede “resetear” el reloj circadiano de las neuronas [242-244].

En la mayoría de los casos se midieron a la vez las condiciones experimentales de luz y de oscuridad. En estos casos de cada animal se emplazó una retina en oscuridad y otra en luz. Esto permite controlar la variabilidad interindividual. La iluminación se realizó colocando dentro de la cámara de cultivo una lámpara halógena de luz blanca a intensidades de 300 o 3000 lx.

3.2.5.3. Fijación de las muestras

Transcurrido el tiempo correspondiente a cada condición experimental las retinas fueron sacadas de la incubadora. El medio de cultivo en el que estuvo la retina fue guardado para su posterior análisis. Las retinas fueron lavadas 2 veces durante 5 minutos en microtubos (Eppendorf) con PBS manteniendo las condiciones lumínicas de cada retina. Tras esto se fijó cada retina en PF 4% a 4 °C entre 24 horas manteniendo las condiciones lumínicas del experimento. Transcurridas las 24h. de fijación se lavaron las retinas 2 veces en PBS dejando las muestras listas para el procesado de inmunohistoquímica.

3.2.6. Preparación de soluciones

En la siguiente tabla se expone de forma resumida cómo preparar tampones y demás soluciones utilizadas en la presente tesis.

PB	PBS	PBST	PBST1%
Na ₂ HPO ₄ 0,1M NaH ₂ PO ₄ 0,1M Se mezclan ambos componentes hasta obtener un pH de 7,4	NaCl, 15mM PB, 10mM	NaCl, 15mM PB, 10mM Tween 20, 0,05%	NaCl, 15mM PB, 10mM Triton-X-100, 1%
PF4%	Medio de montaje Inmunofluorescencia	Medio Ame's suplementado	Solución DAB
PF, 4% PB, 0,1M	Glicerol, 90% PB 10mM pH 7,4 Propil gallato, 0,5%	Medio Ame's FBS, 10% Antibiótico- Antimicótico, 1%	DAB 0,05% H ₂ O ₂ 0,025% TrisHCl 0,05M pH 7,5

3.3. Obtención, gestión y análisis de información y desarrollo de software

3.3.1. Registro por video de la actividad y análisis con *Circadian Control Center*

El registro por vídeo de los animales se llevó a cabo de varias formas, cada una de las cuales presentó sus ventajas y desventajas. El primer método consistió en la captura con cámara CCTV por cable a una tarjeta capturadora de video a un ordenador en la sala de los ratones y la recogida de los datos manual de los datos. En el segundo método se cambió la recogida de datos manual por la sincronización del archivo de datos con otro ordenador. En el tercer método no se utilizó una conexión por cable, sino que la cámara CCTV enviaba la señal por radio a un receptor conectado a la tarjeta capturadora de video en un ordenador en el laboratorio. En el cuarto método una cámara wifi transfiere la señal de video como paquetes TCP/IP, en vez de señal de video. a un router y este router se conecta al puerto Ethernet del ordenador en el laboratorio. El quinto método es equivalente al cuarto pero incluye el uso de un amplificador wifi.

Todos los métodos servían para nuestro propósito pero fueron evolucionando para ofrecer progresivas mejoras: no entrar en la sala de los ratones, que el ordenador no esté en la sala de los ratones, no necesitar una tarjeta de video y fortalecer la señal wifi. La actividad fue inicialmente medida con el software Gemvid y desde la captura por wifi con nuestro software Circadian Control Center (CCC) (Véase apartado 4.3.1).

3.3.2. Obtención de imágenes en el microscopio de campo claro y composición con *Stitch&Focus*

Las primeras muestras fueron fotografiadas con un microscopio de campo claro, una cámara con captura programada y desplazamientos manuales. Las muestras fueron observadas con un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E400) y fotografiadas con una cámara digital (Nikon DS Fi1) y un controlador (Nikon DS-L2). El controlador DS-L2 permite tomar fotos automáticamente cada determinado periodo de tiempo. En nuestro caso, se fueron obteniendo fotos cada 10 segundos, a la vez que se movían los ejes XYZ manualmente. Esta cámara digital se acopla a una salida superior del microscopio dedicada ex profeso para ello. Para cada retina se obtuvo un total cercano a las 1000 fotos.

Para formar una composición de varias imágenes de planos xyz, o superimagen, se desarrolló el software “*Stitch & Focus*” (Véase apartado 4.3.2). En este, para conseguir nuestro objetivo se usó el solapamiento y desplazamiento entre las imágenes: siendo 0 para imágenes del mismo plano xy y distinto de 0 pero significativo cuando son imágenes con un desplazamiento en xy. La superimagen final se presenta tanto con su aspecto original como con su aspecto contrastado. Para su funcionamiento solo hubo que indicar la carpeta que contenía las imágenes y asegurarse de que el montaje final era correcto. En caso de que existiese algún mal acoplamiento el programa permite mediante un interfaz orientar al programa para que corrija el *Stitching*. Para estudiar el marcaje de cada célula desarrollamos el software “*CellFinder*” (Véase apartado 4.3.5) capaz de encontrar células de distintas intensidades en fotografías con un fondo heterogéneo.

3.3.3. Obtención de imágenes en el escáner de portaobjetos y composición con macro

Tras la obtención de fotografías con desplazamientos manuales se pasó a un método automatizado mediante un escáner de portaobjetos. Las muestras fueron escaneadas con un microscopio de campo claro multilente automatizado o escáner de portaobjetos (Leica Aperio CS2). Se programó el mismo para capturar instantáneas a un aumento 20x. Para cada retina se obtuvo un total cercano a las 4000 fotos. Cada retina en formato propietario tenía un tamaño aproximado de 3GBs y en DICOM de 1GB.

Los archivos DICOM fueron abiertos gracias a la librería Bio-Formats usado como *plugin* en ImageJ.

Para su posterior análisis se desarrolló un macro que nos permitiese analizar las retinas de una manera apropiada. Este macro selecciona secuencialmente fragmentos de 500x500 píxeles a través de Z y los enfoca en un solo plano. Tras esto los planos enfocados son agregados para conformar la retina final completa en forma de superimagen. Estas superimágenes fueron utilizadas para el análisis con *CellFinder* (Véase apartado 4.3.5).

3.3.3. Obtención de imágenes en el microscopio de confocal y composición con *LayerMaker*

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCSSP2-AOBS con y pletina motorizada El protocolo de captura mediante pletina motorizada debe ser programado en los interfaces

gráficos propios del microscopio confocal y de la pletina motorizada. Se programó esta pletina para capturar en el eje Z todo el grosor de la retina tomando una foto cada 5 μm . Teniendo en cuenta que nuestras neuronas tienen un diámetro medio estimado de 20 μm , consideramos esta una frecuencia de muestreo apropiada. Dado que utilizamos anticuerpos secundarios unidos a Alexa488 (A21206) y a Alexa633 (A21082), ambos de Invitrogen y colorante DAPI, se midieron los canales rojo lejano, verde y azul, con los láseres 633, 543, 488, respectivamente.

A pesar de que la toma de imágenes es automática, el software del microscopio confocal no incluye en el nombre de las imágenes la posición de la pletina ni canal, sino solo la fecha y hora a la que fueron tomadas. Por ello, desarrollamos el programa *Consec Renamer* (Ver apartado 4.3.3), el cual, proporcionando un esquema de toma de imágenes, renombra estas otorgándoles unas coordenadas xyzc (c es de canal, véase el apartado correspondiente a la bioinformática más adelante).

Estas imágenes provenientes de la microscopía confocal resultan de gran resolución en el eje Z, pero al dividir la señal de cada célula en muchas secciones disminuyen mucho la información acumulada en cada plano xy, por lo que detectar células resulta muy complicado. A su vez, al juntar todos los planos Z se acumula excesivo ruido. Para solucionar este problema desarrollamos el software *LayerMaker* (Ver apartado 4.3.4), el cual es capaz de formar superimágenes en las que agrega las imágenes que pertenecen a la misma capa celular y canal. Usamos como canal de referencia para generar las capas en *LayerMaker* el canal del DAPI que marca los núcleos celulares.

Sobre las superimágenes por capas y canales utilizamos *CellFinder* (Ver apartado 4.3.5) para cuantificar la señal de las células.

3.3.4. Detección y medida de células con *CellFinder*

Imágenes de IHC

Se abrieron las superimágenes procedentes de *Stitch&Focus* o del montaje procedente del escáner de portas. Se lanzó *CellFinder* quedando enlazado con la imagen. En la pestaña de muestreo seleccionamos sobre una imagen contrastada las células que observamos positivas (700-1050 por retina). A continuación la herramienta generó posibles contornos para las células y eligió un contorno que consideró más apropiado según un criterio basado en la calidad del borde. El usuario revisó los contornos y seleccionó uno

diferente si lo consideró más apropiado. Para cada célula se pidió más bordes si se consideraba necesario. A cada célula se le asignó un valor de calidad de borde y otro valor de posibilidad de positivo, o una etiqueta de descarte si fuese necesario. Finalmente, con los contornos elegidos sobre la imagen no contrastada, se obtuvieron del programa las medidas morfológicas de cada célula.

Imágenes de IF

Se abrieron los *hyperstacks* de superimágenes procedentes de *LayerMaker*. Se lanzó *CellFinder* quedando enlazado con el *hyperstack*. Primero en la pestaña de muestreo seleccionamos la capa ganglionar y el canal de la isoforma S, las células marcadas fueron asignadas como M1A. Tras esto, en la capa ganglionar se seleccionó el canal de la isoforma L, las células que aparecían en este canal y no estaban marcadas previamente por el canal S fueron consideradas M2. Tras esto se buscó en la capa amacrina células por ambos canales. En todos los casos además de buscar por el canal original correspondiente se buscó por ese canal contrastado, esto es de especial importancia para las células M2 que están débilmente teñidas. Se marcaron 400-700 células por retina, predominantemente M1.A continuación la herramienta generó posibles contornos para las células y eligió un contorno que consideró más apropiado según un criterio basado en la calidad del borde. El usuario revisó los contornos y seleccionó uno diferente si lo consideró más apropiado. Para cada célula se pidió más bordes si se consideraba necesario. A cada célula se le asignó un valor de calidad de borde y otro valor de posibilidad de positivo, o una etiqueta de descarte si fuese necesario. Finalmente, con los contornos elegidos se obtuvieron del programa las medidas morfológicas y de tinción para los canales L y S originales-no contrastados en la capa correspondiente de cada célula.

3.3.5. Técnicas de análisis de datos

En la investigación experimental y herramientas desarrolladas en esta tesis se utilizaron tanto técnicas de estadística clásica y modelización, como de análisis de series temporales, de *data mining* y metodologías de *big data*.

3.3.5.1. Análisis estadístico clásico de centralidad y varianza

Protocolo estadístico

El tratamiento estadístico clásico se utilizó cuando se querían comparar grupos con

menos de 30 representantes o muestras pocos individuos o variables. En el caso de grupos con más de 30 representantes el cumplimiento de los supuestos paramétricos no es tanta importancia ya que la distribución de la varianza se vuelve normal [245]. Este protocolo se llevó a cabo con el paquete estadístico PASW(SPSS)21.

Comprobación de supuestos paramétricos

- A nivel univariante.

La distribución normal de los datos de cada grupo fue comprobada mediante el test de normalidad de Kolmogorov–Smirnov (K-S). La homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) fue comprobada mediante el test de Levene. Se buscó la presencia de “outliers” mediante el diagrama de cajas. Cuando los grupos eran pequeños, por ejemplo de 4 individuos, no se eliminaron los *outliers*.

- A nivel multivariante.

La normalidad multivariable se realizó mediante la prueba K-S de los residuos tipificados. La homocedasticidad multivariable se comprobó por la prueba de Box. La presencia de *outliers* fue determinada mediante el diagrama de cajas como casos cuyo valor era más del doble de la desviación típica del grupo.

Utilización y prevalencia de tests para comparar grupos

Cuando se cumplieron los supuestos paramétricos, para evitar el aumento de error de Tipo I, se realizaron los análisis en el siguiente orden de prevalencia: MANOVA, ANOVA factorial, ANOVA univariante, Test t de Student.

Cuando no se cumplieron los supuestos paramétricos se procedió al análisis mediante los test de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, en ese orden.

Se utilizó el protocolo estadístico clásico descrito previamente siempre que se quisiese hacer comparaciones entre grupos categóricos. Concretamente, se utilizó en los casos que se describen a continuación.

- Para comparar la centralidad y variabilidad de tau de ratones C3H *rd/rd* frente a ratones *+/+*.

- Para comparar la evolución (la pendiente de la regresión) de distintos puntos de la actividad de ratones *rd/rd* en luz azul frente a luz blanca.

- Para comparar la evolución de la amplitud del periodo de la actividad de ratones *rd/rd* en luz azul frente a luz blanca.

- Para comparar en la adaptación regresiva del ritmo en luz azul la relación las diferencias del grado de desplazamiento tanto respecto del individuo como del orden del evento.

- Para contrastar si hay diferencias según la dosis de antiDAT-SAP en el punto medio de la actividad de cada día.

- Para contrastar la intensidad y diámetro entre los *clusters* detectados por datamining indirecto.

- Para determinar qué parámetros y en qué medida varían los parámetros entre los *clusters* detectados por *data mining* indirecto.

- Para contrastar las frecuencias de los tipos celulares y sus intensidades en cultivo en los casos de luz frente a oscuridad, de distintas intensidades de luz, de luz azul y de luz roja.

3.3.5.2. Correlación, regresión y modelización

Se utilizaron el Coeficiente de correlación de Pearson y la test F de Fisher para la regresión lineal. El grado de variabilidad explicado en regresión se estimó mediante R^2 . Se utilizó la log-verosimilitud para estimar el ajuste por modelización. Estos test se utilizaron en los siguientes casos:

- Se calculó la correlación y la regresión pasando por 0,0 para estimar la duración de los post-efectos en base a Tau.

- Se calculó la regresión lineal para estimar la evolución de distintos puntos de la actividad en luz azul de cada ratón.

- Se calculó la regresión lineal para estimar la evolución de la amplitud del periodo de actividad en luz azul de cada ratón.

- Se calculó la regresión lineal para estimar la relación entre la dosis de antiDAT-SAP con el adelanto del punto medio de la actividad de cada día de los ratones de las distintas dosis. Se contrastó el ajuste por la significación de los parámetros y por el distribución de los residuos del error.

- Se realizaron contrastes a priori para los momentos de actividad respecto a la dosis de antiDAT-SAP.

- Se realizó análisis discriminante para determinar la función de pertenencia de las células a los *clusters* determinados por *data mining* indirecto en base al diámetro y la

intensidad absoluta y en base al diámetro y la intensidad percentil.

- En *Circadian Control Center* se calculó el ajuste a un modelo lineal, a un modelo de distribución normal y a un modelo de distribución de Poisson para 24 horas y para las 12 horas del periodo de oscuridad.

3.3.5.3. Análisis de series temporales

Se utilizó el sistema *double plot* para determinación exploratoria. Se utilizó agregados percentiles para determinar distintos puntos de actividad subjetiva. Se utilizó estos procedimientos en los distintos análisis de actividad:

- Para detectar una expresión del ritmo endógeno.
- Para estimar la distribución de la actividad en el periodo de oscuridad en las medidas con luz azul, tanto por su asimetría como su amplitud.
- Se agregó la actividad diaria y del periodo de actividad para determinar el punto medio de la actividad (cuantil 50) y los cuantiles de actividad 5, 10, 20, 33, 66, 80, 90 y 95 tanto para la actividad diaria como para la actividad en el periodo de oscuridad.

3.3.5.4. Data mining indirecto

Se utilizó análisis exploratorio de frecuencias y de *clusters* para detectar grupos celulares. Estos análisis se utilizan en los siguientes casos:

- Se utilizó análisis exploratorio para discernir máximos de frecuencias según el ratio intensidad/diámetro, estos máximos pueden corresponder con tipos celulares según estos parámetros.
- Se realizó análisis de *cluster* para detectar tipos celulares. El *clustering* fue de tipo bietápico con medida de distancia por log-verosimilitud y con 15 puntos de inicio. Se buscó un número fijo de dos *clusters* para el ratio intensidad/diámetro y para el diámetro. Se buscó un número libre de *clusters* para intensidad y diámetro.
- Se realizó análisis de *cluster* para detectar tipos celulares en base al ratio de las isoformas S y L, al nivel de S, al nivel de L y al diámetro.
- En *CellFinder* se determinan agrupaciones mediante clustering de k-means y clustering difuso o de *fuzzy logic* para asignar probabilidades a estos grupos.

3.3.5.5. Data mining directo

Se utilizó como técnicas de *data mining* directo las técnicas de vecino más cercano, red neuronal y árbol de decisión. Se utilizaron en estas situaciones:

- Se realizó un árbol de decisión para determinar la función de pertenencia de las células a los clusters determinados por *data mining* indirecto en base al diámetro y la intensidad absoluta y en base al diámetro y la intensidad percentil.

- Se realizó un árbol de decisión para determinar la función de pertenencia de las células a los distintos grupos según tinción y diámetro en función del plexo de las dendritas.

- En *CellFinder* se utilizan los parámetros celulares para determinar mediante vecino más cercano, red neuronal y árbol de decisión tanto el borde más apropiado como las semillas candidatas en el proceso de búsqueda automática de cada célula en base a las selecciones del usuario, conformando un sistema de inteligencia artificial.

3.3.5.6. Big data

- En *Circadian Control Center* se realizó en tiempo real filtrado de ruido, agregado en escala temporal y segmentación en archivos en base al día. En un mes se analizan terabytes de información de imagen y gigabytes de tablas de datos con millones de filas y 10-30 columnas.

- En *Stitch&Focus* y *LayerMaker* se guardan los distintos pasos en el disco duro y se cargan y descargan de memoria para su uso.

- En *CellFinder* se utilizó una abstracción estandarizada de los objetos en base a XML, se distribuyó la información de manera estructurada no relacional con la célula como unidad de información. Los módulos están aislados en un formato de puertos y adaptadores y se distribuye el análisis de imagen y de datos mediante un *broker*.

3.3.6. Análisis de imagen

Las herramientas desarrolladas en esta tesis se enmarcan en el ámbito del análisis de imagen, en este apartado se explica qué técnicas de análisis de imagen se utilizan y donde. Las técnicas se exponen en función de la fase a la que pertenecen en el análisis de imagen.

3.3.6.1. Captación y formación

La de un microscopio provoca una dispersión de forma ondulatoria. Es común revertir esta distorsión mediante un proceso conocido como deconvolución. Esta deconvolución puede hacerse conociendo la función de dispersión puntual de la lente o sin conocerla, de manera “ciega”, estimándola sobre la imagen. La deconvolución puede conseguir de hecho mejorar la resolución hasta escala atómica en lo que se conoce como microscopia de superresolución [246]. Nosotros aplicamos deconvolución ciega para incrementar la resolución de las imágenes de las células seleccionadas en *CellFinder*.

3.3.6.2. Mejoramiento y restauración

Se aplicaron cuatro procesos de mejoramiento *CLAHE*, *despeckling*, *Z-focusing* y *Z-focusing* en capas, así como dos procesos de reconstrucción, *Stitching* y *Stitching3D*.

CLAHE es una mejora de contraste a las imágenes que permite al usuario apreciar con mayor facilidad los objetos en la imagen, esta mejora se basa en el ajuste con limitación del histograma a nivel local y se conoce como (del inglés *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization*) [247]. Aplicamos *CLAHE* en *Stitch&Focus*, *LayerMaker* y *CellFinder*. El *despeckling* retira ruido de fondo en función de su tamaño, equivale a retirar lo que se conoce como “nieve” de una imagen y lo aplicamos en *CellFinder* sobre las células seleccionadas. El *Z-focusing* consiste en enfocar la información de varios planos *z* en un solo plano y lo utilizamos en *Stitch&Focus* y en *LayerMaker*. El *Z-focusing* en capas es un procedimiento desarrollado por nosotros en el que la información de varios planos *Z* se enfoca en las capas detectadas en estos planos y es el proceso base de *LayerMaker*.

El *Stitching* consiste en juntar planos entre los que existe solapamiento y lo utilizamos en *Stitch&Focus*. El *Stitching3D* lo desarrollamos en nuestro laboratorio para juntar imágenes solapadas obtenidas en *xyz*, es decir añadiendo la dimensión profundidad y es la base de *Stitch&Focus*.

3.3.6.3. Segmentación

Los sistemas de valor umbral se basan normalmente en detectar uno o dos umbrales. Nosotros desarrollamos un sistema multiumbral que ofrece más posibles soluciones sobre los límites de los objetos, a posteriori se selecciona mediante análisis de datos un límite

concreto. Además estos distintos contornos son utilizados para buscar otros posibles contornos óptimos mediante la técnica de contornos activos. Ambos sistemas se utilizan en la búsqueda de contornos de *CellFinder* y gracias a su parametrización permiten a la inteligencia artificial alimentar educar el sistema visual de *CellFinder*. El descubrimiento un tanto fortuito del sistema multiumbral es el origen de *CellFinder*.

3.3.6.4. Morfología matemática

En nuestro caso tras aplicar cada umbral se aplican las modificaciones morfológicas de dilatación geodésica y de *watershed*, el primero es útil cuando una célula se encuentre incompleta y el segundo para separar dos células u objetos en contacto. Esto permite encontrar posibles contornos entre los que podría estar el correcto que no serían detectable sin aplicar la modificación. Ambos sistemas se utilizan en la búsqueda de contornos de *CellFinder*, al igual que los umbrales son parametrizables y educables.

3.3.6.5. Representación

En nuestro caso para definir las células y sus posibles contornos, se le muestra al usuario una imagen de cada célula con cada posible contorno sobreimpresionado. Los límites de cada célula son utilizadas por nuestro software para obtener medidas de forma y tamaño, los píxeles internos se utilizan para realizar medidas de la intensidad de marcaje de las células en *CellFinder*.

3.3.6.6. Descripción

En *CellFinder* se utilizan para la inteligencia artificial y como medidas de resultado una serie de descriptores, entre los que están los siguientes.

Descriptores de forma básicos incluyen: perímetro, diámetro o eje mayor, eje menor, ángulo del eje mayor, excentricidad del contorno, rectángulo básico, factor de forma normal circularizado, anchura, altura, elongación, radio medio, radio máximo, radio mínimo.

Los descriptores básicos basados en tinción: área, densidad, media, mediana, mínimo, máximo, píxeles sobre la media, píxeles bajo la media, factor de compacidad y factor de irregularidad.

Además, se usaron los invariantes tercero y cuarto de Hu. Además creamos un

descriptor que llamamos “Calidad de borde”, este básicamente mide la diferencia de intensidad entre el borde interno y externo de la célula. También creamos un descriptor de intensidad “Intensidad limpia” que resta a la intensidad media de la célula la intensidad media circundante.

3.3.6.7. Reconocimiento de patrones

En nuestro caso la red neuronal, la memoria asociativa y el árbol de decisión fueron utilizadas para discernir los bordes positivos de los negativos en base a las selecciones del usuario, conformando un sistema de inteligencia artificial educado. La memoria asociativa ofrece mejor rendimiento cuando hay poco *feedback* por selecciones del usuario, la red neuronal es el mejor clasificador con suficiente educación, el árbol de decisión devuelve reglas comprensibles por las personas, no como una red neuronal. La detección de *clusters* se utiliza para asignar nuevas las células a grupos (los *clusters*) que se pasan como una medida categórica más, tienen la ventaja de poder detectar subtipos dentro de un tipo celular.

3.3.7. Software de terceros utilizado

3.3.7.1. Sistemas

Sistemas operativos y ofimática

Para la mayor parte del trabajo diario se utilizaron inicialmente Windows XP y más adelante Windows 7, como sistemas operativos. Cuando se grabó la actividad mediante tarjeta capturadora con el software Gemvid se utilizó la distribución de Linux Ubuntu, versiones 6 a 9.

Para la redacción general de documentos se empleó MS Word, OpenOffice y GoogleDocs según la ocasión, y para la de protocolos y formulaciones, MS Excel. Para la redacción de esta tesis y organización de escritos se utilizó Scrivener. El maquetado y la creación de figuras se llevaron a cabo con MS Powerpoint, Coreldraw, R e ImageJ. Para el respaldo en discos duros de archivos grandes (como, por ejemplo, imágenes de retinas enteras) y medidas de actividad se usó Cobian Backup. Para respaldar el sistema operativo, así como del software instalado, para su rápida restauración en caso de fallo se crearon imágenes incrementales de la partición del sistema operativo con Acronis True Image. Para respaldar los documentos, pdfs y archivos de menos peso se usó Dropbox y GDrive.

Manejo de literatura científica y mapas mentales

Para el almacenamiento clasificación y anotación de artículos científicos se empleó Docear con PDFx-ChangeViewer. Para el almacenamiento e inserción de referencias se utilizó Endnote.

Para la elaboración de mapas mentales se utilizó inicialmente MindManager y, más adelante, Docear.

Análisis de imagen y estadístico

Para el análisis de imagen exploratorio y a nivel de usuario se utilizaron ImageJ estándar y su distribución con *plugins* Fiji (véase capítulo más adelante dedicado a este programa).

Para el análisis estadístico con fines exploratorios y estadística clásica se utilizó SPSS 15 (ahora PASW). El análisis estadístico más refinado, programado y creación de figuras se llevó a cabo con el software R.

3.3.7.2. Desarrollo de software

Análisis y diseño de software

Para el análisis y diseño de software se utilizó el *plugin* de Eclipse UML Designer y Enterprise Architect de Sparx Systems.

Lenguajes de desarrollo

Para la automatización de tareas y captura de imágenes en Linux se utilizó Shell Scripting. Para la automatización de tareas, captura y manejo de ventanas en Windows se utilizó Bash Scripting y Autohotkeys. Para el desarrollo de soluciones electrónicas y robóticas se utilizó la plataforma Arduino y el lenguaje de Arduino, basado en C, Processing.

Para programar los análisis estadísticos y la generación de gráficos se utilizó el lenguaje de programación R. Para las funciones de análisis de imagen se utilizaron el lenguaje de programación de macros de ImageJ y sus bibliotecas de Java. Para programar la estructura de *CellFinder* se utilizó Java.

Entornos de desarrollo

Para el desarrollo de *Shell Scripting*, *Bash Scripting* y *Autohotkey* se utilizó *Notepad++*. Para el desarrollo de Arduino se programó en el IDE propio de Arduino. Para

el desarrollo en R se utilizó Tinn-R. Para la programación de macros de ImageJ se utilizó el IDE de programación de macros de ImageJ. Para el desarrollo en Java se utilizó el Java Development Kit (JDK) con Eclipse en la distribución con el *framework* Spring, SpringToolSuite.

3.3.7.3. El programa ImageJ y los *plugins*

La distribución del software ImageJ estándar incluye por defecto solo el motor del programa y una serie de funcionalidades relativamente simples. La manera de aportar funcionalidades mucho más avanzadas a este programa pasa por añadirle *plugins* o macros al mismo, estos se pueden descargar normalmente de la página web de ImageJ. Para instalarlos y usarlos simplemente deben ser copiados en la carpeta correspondiente de *plugins* o macros dentro de ImageJ.

Algunas opciones de distribución de este software, como ImageJ Fiji, incluyen muchos de estos *plugins* y macros ya instalados por defecto, lo cual permite explorar muchas funcionalidades avanzadas con la instalación de serie.

El software desarrollado en esta tesis tiene cierta cualidad integradora, ya que utiliza algunos de estos *plugins*. Por ello, para el correcto funcionamiento del software, estos *plugins* o módulos deben estar instalados, ya sea manualmente, como en la distribución estándar de ImageJ, o porque vengan de serie con la distribución, como en Fiji.

3.3.8. Metodología y análisis previo de desarrollo de software

Las soluciones desarrolladas en estas tesis pasaron por las distintas fases del desarrollo de software. El desarrollo se realizó en forma de ciclos entrelazados en los que se va testeando la funcionalidad del software y se añade nueva funcionalidad. Este estilo de desarrollo se conoce como “desarrollo ágil de software”.

En el desarrollo de las herramientas se utilizaron procesos correspondientes a las cinco fases indicadas en el PMBOK en las áreas de integración, alcance, tiempo, costo, calidad, riesgos y grupos de interés.

En el Anexo 2 se describen las dos primeras fases de la gestión de proyectos: concepción e iniciación del proyecto y definición y planificación del proyecto mientras que en el apartado de resultados se describen el diseño y cualidades del software realizado. La exposición se divide en función del software que describe: *Circadian Control Center*,

Stitch&Focus, ConsecRenamer, LayerMaker, CellFinder.

En el Anexo 2 la explicación de cada software para estas dos primeras fases sigue siempre el mismo patrón. Primero se explica el objetivo o motivo del software y el interés que puede tener. A continuación se expone el alcance del proyecto en función de los requisitos recogidos. Para entender mejor la idea del software y los requisitos se utilizan dos herramientas conceptuales muy útiles. Primero, identificar las entradas que usará el software y las salidas que producirá. Segundo, los casos de uso que exponen la secuencia de pasos que realiza el usuario en cada una de las maneras en que puede usar el software. Con este nivel de comprensión ya se plantean las fases tendrá del proyecto y qué riesgos presenta que puedan afectar a su viabilidad. Finalmente, se exponen las herramientas y lenguaje/s a utilizar para el desarrollo del software, en qué plataformas o infraestructuras será utilizado y qué paradigmas de programación se utilizarán.

4. Resultados

4.1. Medidas de actividad animal

Los resultados expuestos en este apartado corresponden a medir la actividad de ratones C3H^{+/+}, C3H^{rd/rd} y CD1 bajo diferentes condiciones experimentales con Circadian Control Center. Las características de los ritmos bajo distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante contraste de hipótesis multivariable y la evolución en el tiempo de estas mediante regresión.

4.1.1 Diferencias de tau entre ^{+/+} y *rd/rd* y post-efectos

Se expone la comparación del periodo, tau, entre ratones *rd/rd* y ratones ^{+/+} al pasarlos de condiciones luz oscuridad LD12:12 a condiciones de oscuridad constante DD (Fig. 4.1), y el tiempo que tardan en expresarlo plenamente, post-efectos (Fig. 4.2).

4.1.1.1. Tau de ^{+/+} vs *rd/rd*

Los ratones *rd* tienen un tau significativamente más corto que los ratones ^{+/+}. La mediana del tau de los ratones *rd* era de 23 horas, mientras que la mediana de tau de los ratones ^{+/+} era de 23,29 horas (Fig. 4.3)

4.1.1.2. Variabilidad de Tau de ^{+/+} vs *rd/rd*

El Tau de los ratones *rd* presenta una variabilidad significativamente mayor que los ratones ^{+/+}. Los desviación estándar de los taus de los ratones *rd* era de 0,47 horas mientras y la de los ratones ^{+/+} de 0,26 horas (Fig. 4.3)

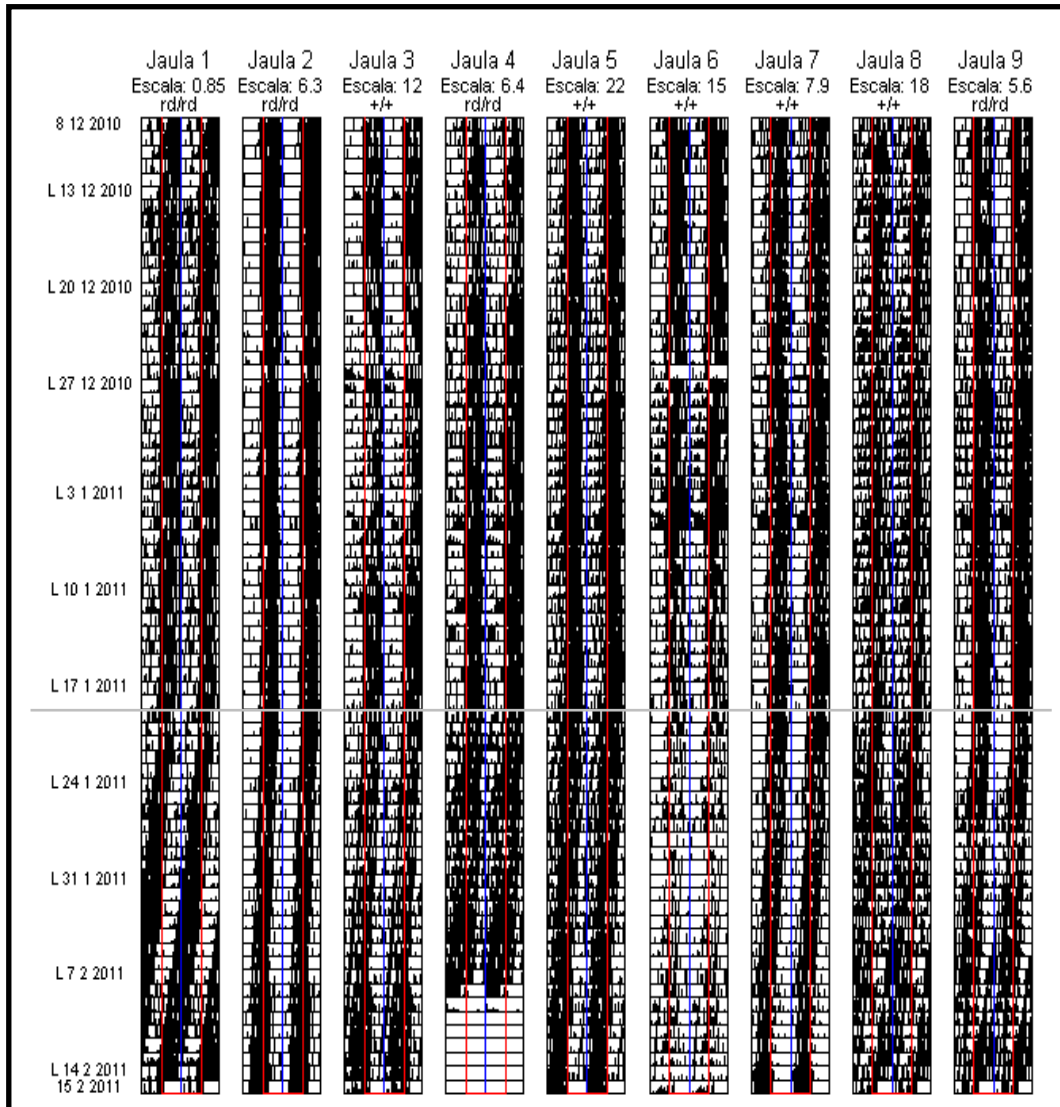


Fig.4.1.Actograma generado por Circadian Control Center. El inicio del período de oscuridad diario viene marcado por la línea roja, el inicio del periodo de luz por la línea azul. El día 19.01.2011 se cambiaron las condiciones lumínicas a oscuridad continua, la línea gris horizontal marca el inicio de la oscuridad continua. Puede observarse que en oscuridad continua cada ratón expresó un ritmo endógeno propio y único.

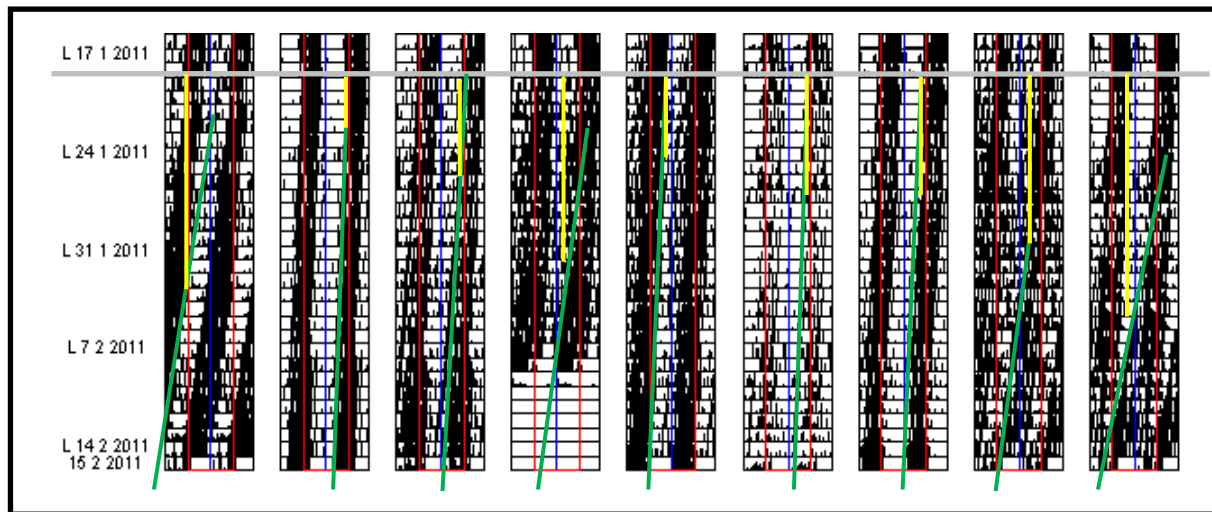


Fig.4.2. Detalle del periodo de oscuridad constante del actograma generado por Circadian Control Center. El inicio del período de oscuridad diario viene marcado por la línea roja, el inicio del periodo de luz por la línea azul, la línea gris horizontal marca el inicio de la oscuridad continua, la línea amarilla indica los días de post-efectos, la línea verde muestra el desfase respecto a 24h del tau de cada ratón.

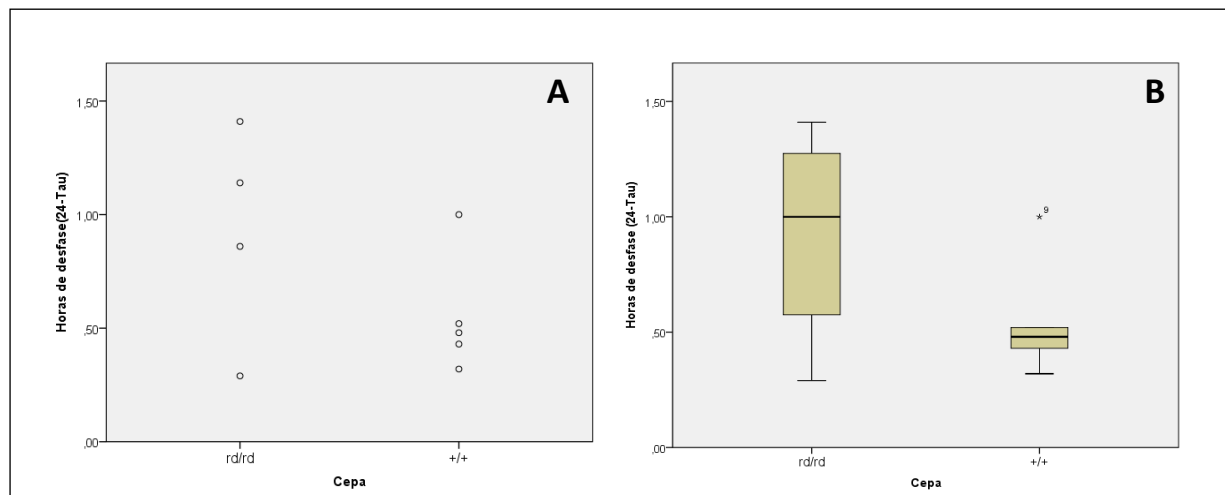


Fig.4.3. Distribución de los desfases de Tau respecto a 24 horas por cepa. A) Diagrama de dispersión de puntos. B) Diagrama de cajas.

4.1.1.3. Duración de los post-efectos y Tau

Ya que los ratones pasan por un periodo de transición en los cambios de ritmo, quisimos estudiar si la diferencia entre el periodo previo y el nuevo redonda en un periodo de adaptación más largo; es decir, si cuando se cambian las condiciones del ritmo LD

(12:12) a DD, la duración de la adaptación hasta expresar el ritmo endógeno varía según el Tau del ratón.

En efecto, la duración del periodo de post-efectos parece estar relacionada con Tau. La duración en días de los post-efectos y el Tau de los ratones estudiados correlaciona de manera altamente significativa (Fig. 4.4).

Conociendo el tau del ratón se puede predecir la duración de los post-efectos con una precisión entorno al 90%, produciéndose aproximadamente 13,36 días de post-efectos por cada hora que tau dista de 24 horas. Por supuesto también es posible realizar la predicción inversa, conociendo la duración de los post-efectos estimar con una precisión similar el tau de un ratón.

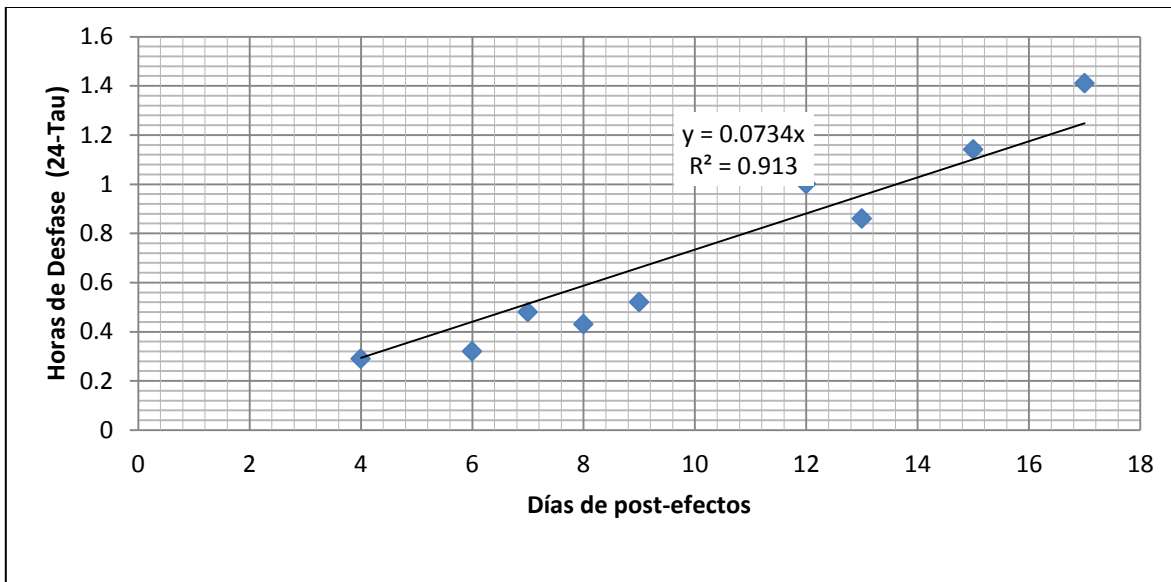


Fig.4.4. Correlación entre los días de post-efectos y el Tau de los ratones. El Tau está representado como el desfase de Tau respecto a 24 horas.

4.1.2. Efecto de la luz azul en el ritmo de los ratones *rd/rd*

Se expone a continuación el análisis del ritmo de actividad/reposo de los 5 ratones *rd/rd* expuestos a condiciones de 12 horas de luz azul- 12 horas de oscuridad para observar el efecto de retirar la luz roja que supuestamente se requiere para regenerar el retinaldehído necesario para la actividad de la melanopsina.

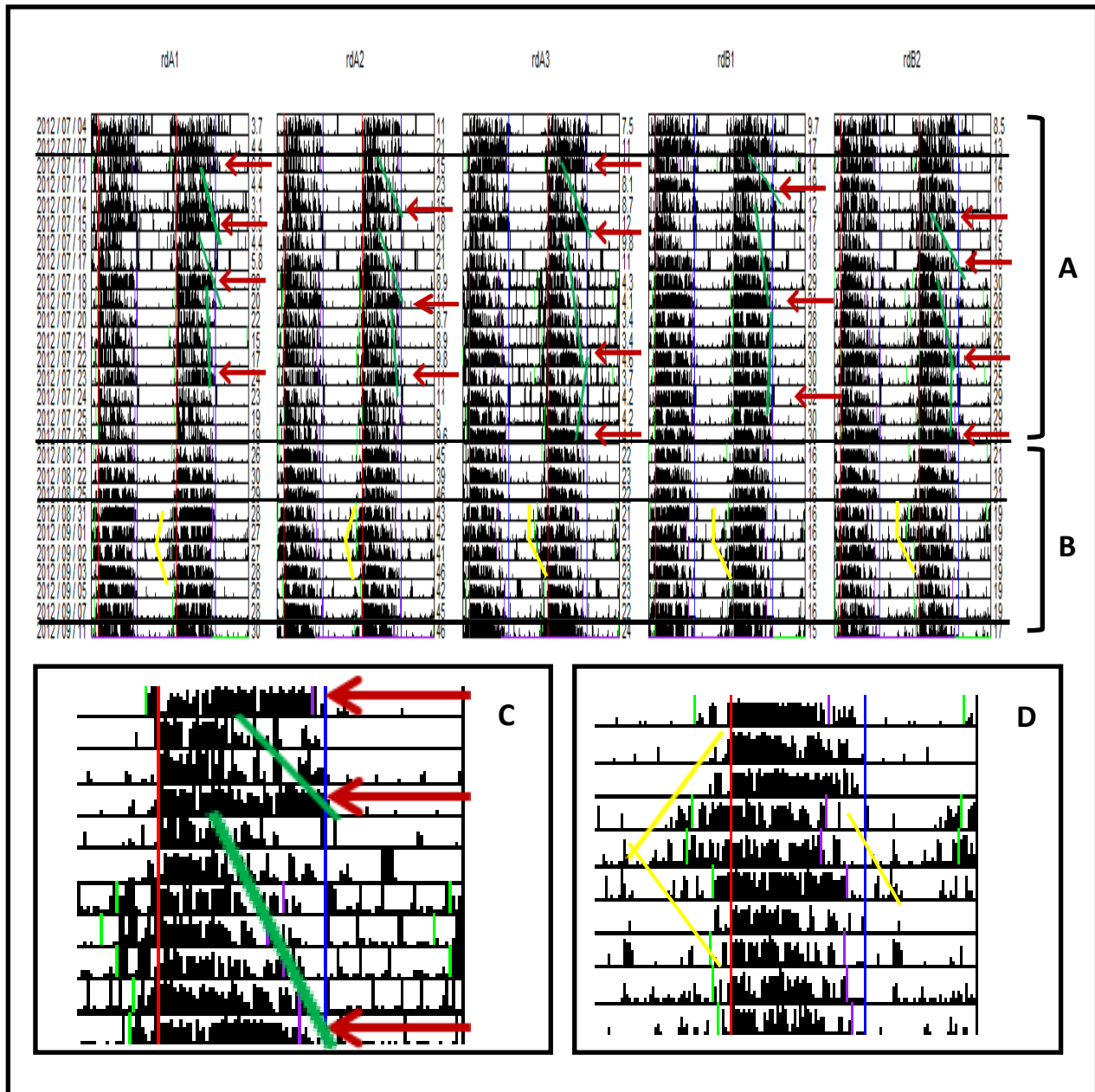


Fig.4.5. Actividad bajo luz azul. A) Segmento inicial de exposición. La luz azul provoca una deriva con retorno de la actividad hacia el final del periodo de oscuridad. Las flechas rojas señalan puntos en los que la actividad se concentra más al final del periodo de oscuridad, observándose el retorno al día siguiente. Las líneas verdes muestran el progreso desde un día de retorno a un nuevo día de concentración al final del periodo de oscuridad, se observa que cada vez el retorno es menor. B) Segmento estabilizado con distribución homogénea de la actividad. En amarillo un posible entrada de la actividad en el periodo de luz. C) Detalle de la deriva con retorno de la actividad. D) Detalle de un posible ingreso de la actividad en el periodo de luz.

4.1.2.1. Expresión del ritmo endógeno en luz azul

En contra de lo esperado, no se aprecia que el ritmo de estos animales (Fig. 4.5 A) se exprese en curso libre, como el que pudo verse en los sometidos a oscuridad constante (Figs. 4.1 y 4.2). Sin embargo, sí parece que la luz azul provoca progresivamente que se prolongue el periodo de actividad hasta ocupar por completo el periodo de oscuridad (Fig. 4.5 C).

4.1.2.2. Evolución del ritmo en luz azul

Se observa que la duración del periodo de actividad de los ratones en luz azul se fue ampliando progresivamente (Figs. 4.5, 4.7, 4.9).

Se calculó una serie de momentos diarios para definir el ritmo circadiano y se estudió como evolucionaban con el tiempo de exposición a luz azul, es decir, si se adelantaban o se retrasaban progresivamente con el paso de los días en luz azul. Estos puntos son: el momento de inicio de la actividad, el momento de fin de la actividad y el momento en que el ratón ha cumplido la mitad de su actividad diaria.

El estudio del efecto del paso del tiempo en luz azul muestra que esta provoca que la hora de final de actividad se vaya retrasando (Fig. 4.7), la hora de inicio de la actividad no se vea afectada y que el punto medio de la actividad solo se ve afectada en algunos casos (Fig. 4.7). Como punto de comparación se utilizaron ratones *rd/rd* en luz blanca (LO 12:12). En estas condiciones no se encontró ninguna evolución en momentos circadianos (Figs. 4.6, 4.8 y 4.9). La comparación luz azul-luz blanca encuentra que hay diferencias claras en la evolución del fin de la actividad, que no hay diferencias para el inicio de la actividad y que el punto medio de la actividad se encuentra en el límite de la significación como resultado de que la hora de inicio no varíe pero sí la hora de fin de la actividad (Figs.

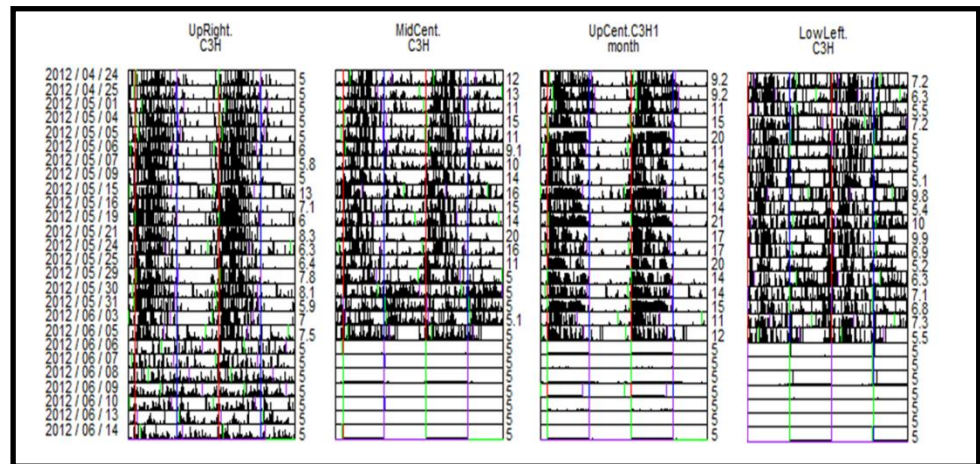


Fig.4.6. Actividad bajo luz blanca. En el día 2012/06/05 los ratones fueron sacrificados. El tercer ratón presenta momentos de retraso del final de la actividad , podría deberse a su temprana edad.

4.9, 4.10 y 4.11). Los diferentes momentos circadianos son más variables en luz azul que en luz blanca.

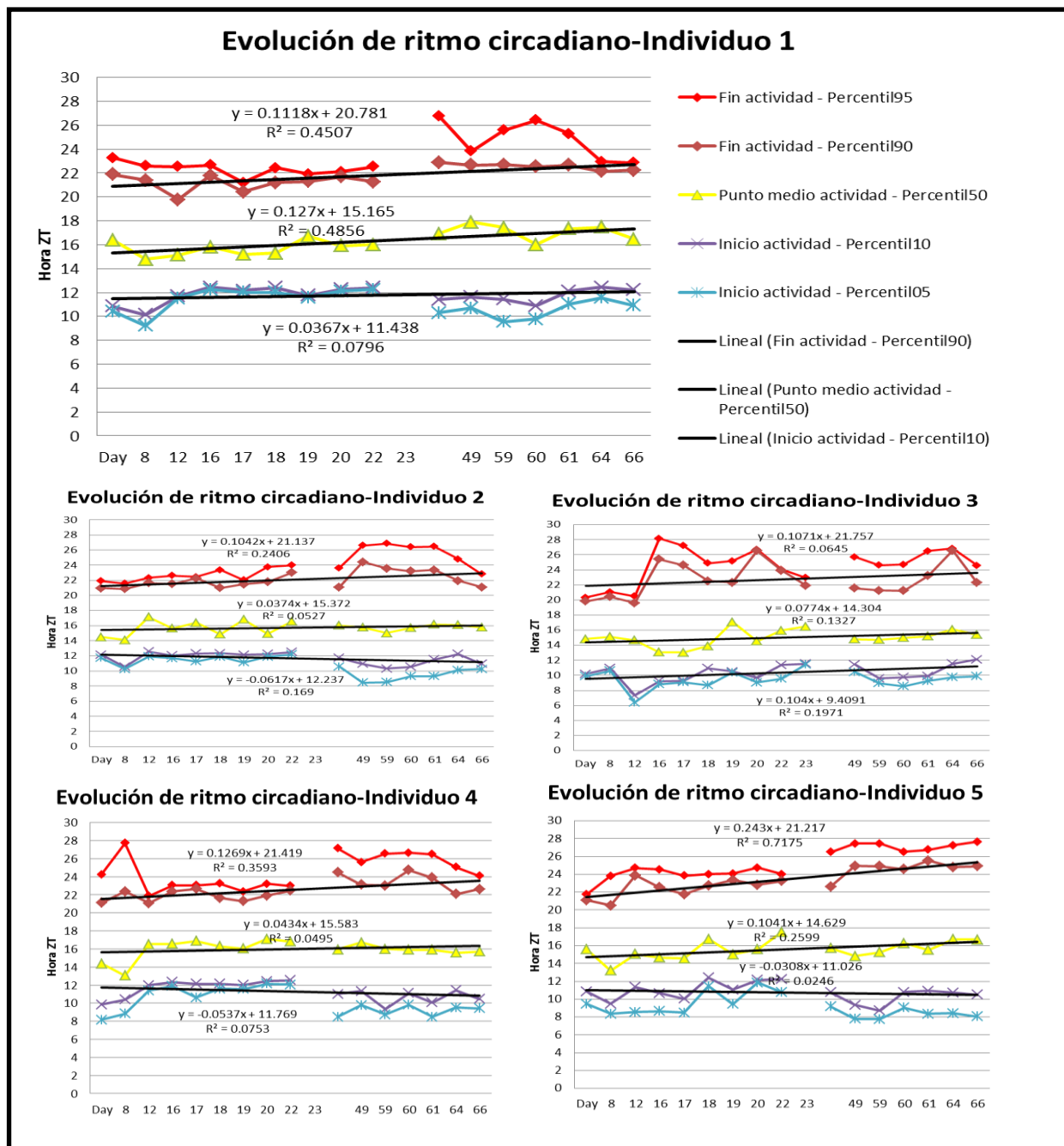


Fig.4.7. Evolución del ritmo circadiano bajo luz azul durante 66 días. En el eje de abscisas se muestran los días, en el eje de ordenadas las horas en formato ZT. La luz se enciende en ZT0 y se apaga en ZT12. Se muestran las gráficas de los cinco individuos. En azul y morado el inicio del periodo de actividad. En amarillo el momento en el que el ratón ha realizado la mitad de la actividad. En rojo el fin de la actividad.

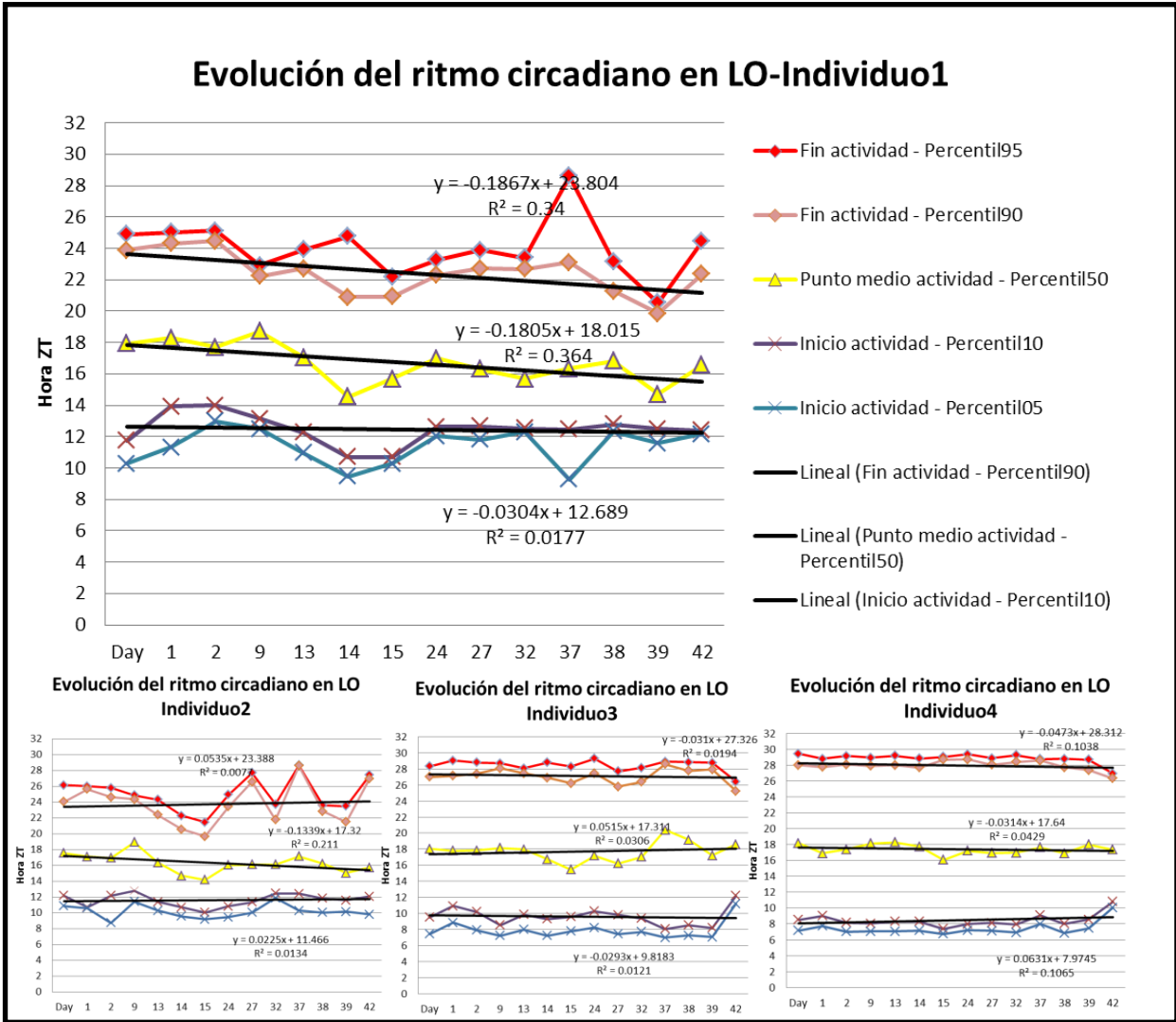


Fig.4.8. Evolución del ritmo circadiano bajo luz azul durante 42 días. En el eje de abscisas se muestran los días, en el eje de ordenadas las horas en formato ZT. La luz se enciende en ZT0 y se apaga en ZT12. Se muestran las gráficas de los cuatro individuos. En azul y morado el inicio del periodo de actividad. En amarillo el momento en el que el ratón ha realizado la mitad de la actividad. En rojo el fin de la actividad.

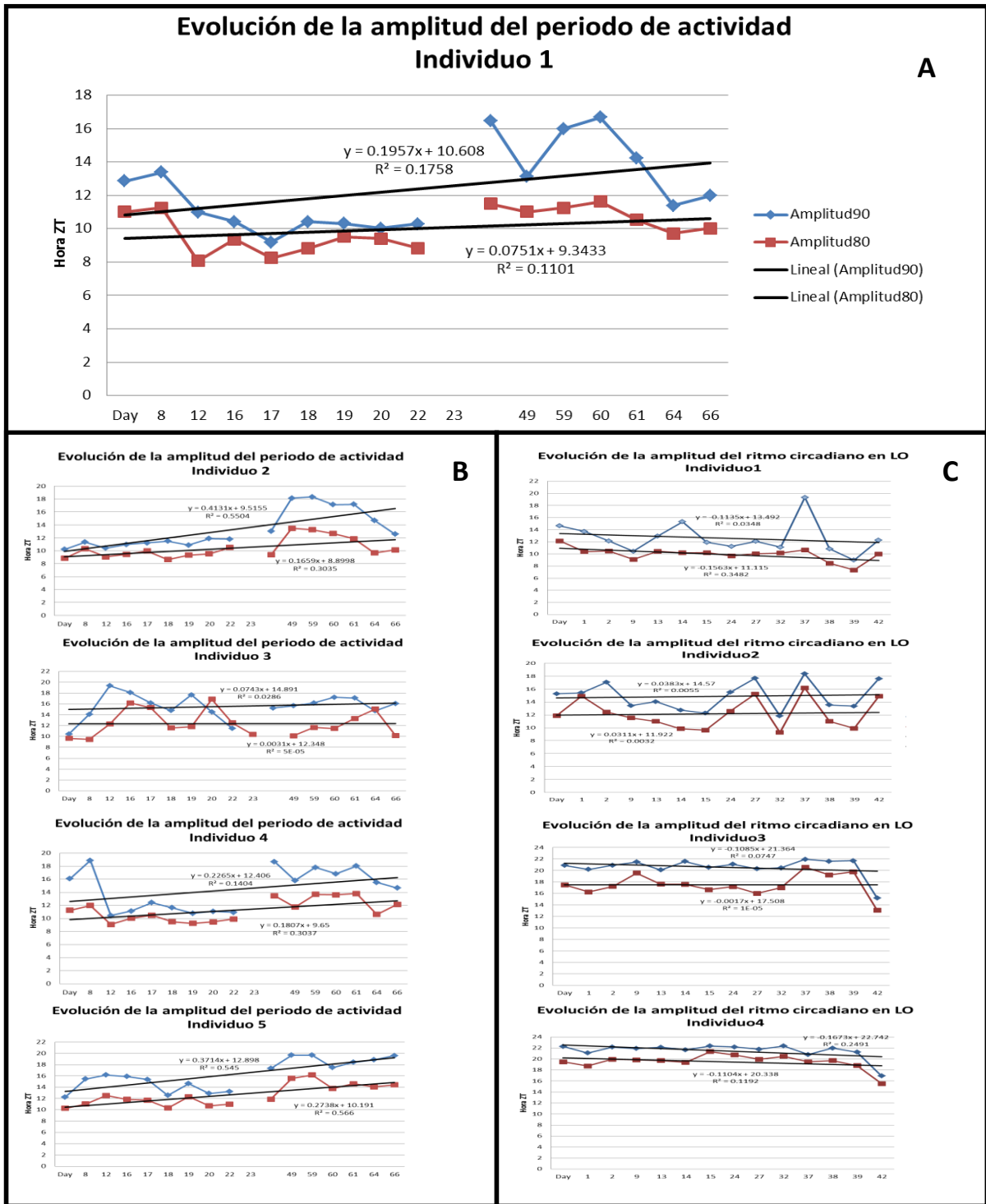


Fig.4.9. Evolución de la amplitud del periodo de actividad bajo luz azul y bajo luz blanca. En rojo la amplitud del 80% de la actividad. En azul la amplitud del 90% de la actividad. A-B) La amplitud en condiciones LO12:12 con luz azul. C) La amplitud en condiciones LO12:12 con luz blanca.

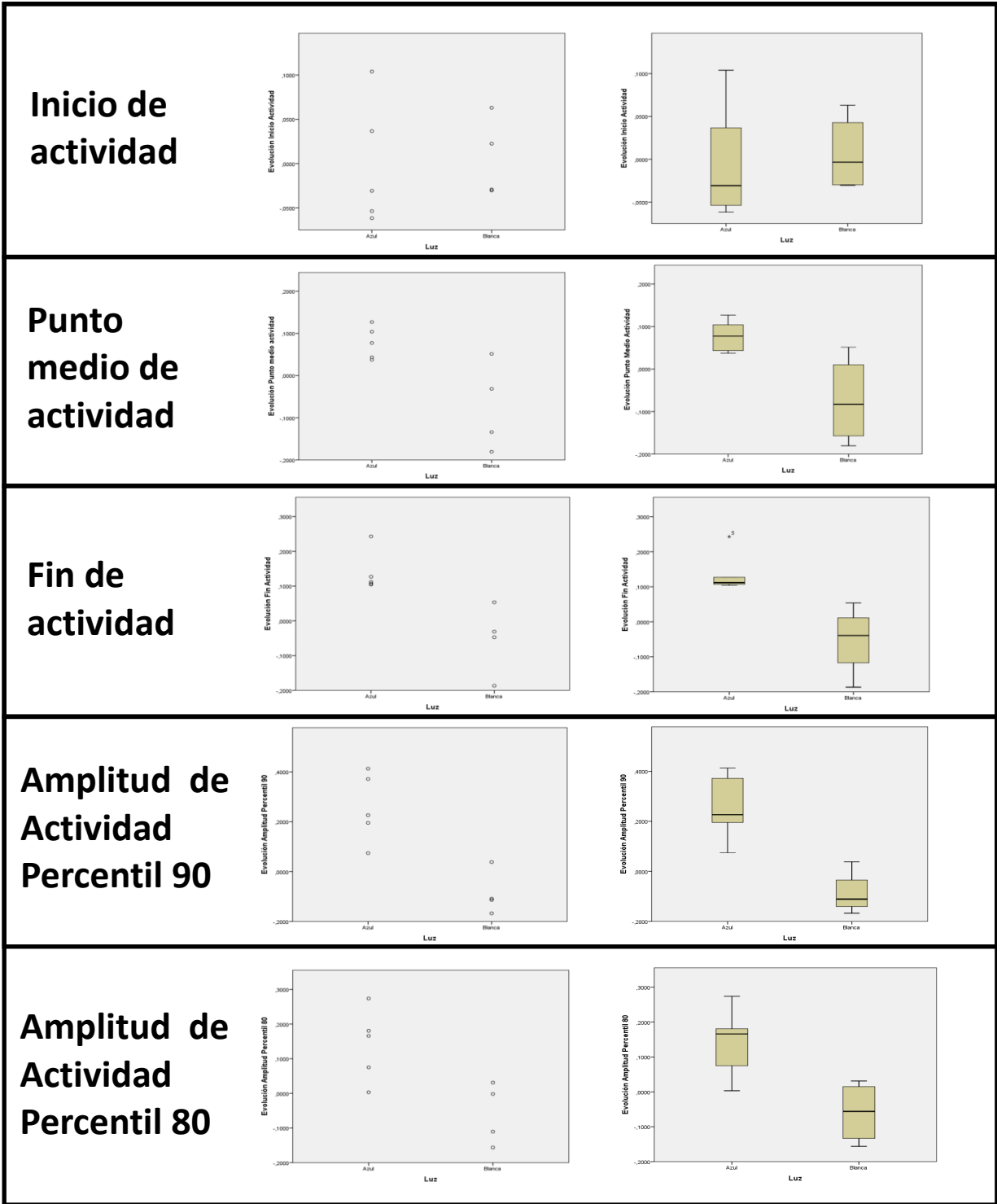


Fig.4.10. Diagramas puntuales y de cajas de la distribución de la evolución de distintos momentos del ritmo circadiano. En cada diagrama la columna izquierda corresponde a la luz azul y la columna derecha a la luz blanca.

Evolución del Ritmo Circadiano							A
Luz	Ratón	Inicio Actividad	Punto medio actividad	Fin actividad	Amplitud 90	Amplitud 80	
Azul	1	0.0367	0.127	0.1118	0.1957	0.0751	
	2	-0.0617	0.0374	0.1042	0.4131	0.1659	
	3	0.104	0.0774	0.1071	0.0743	0.0031	
	4	-0.0537	0.0434	0.1269	0.2265	0.1807	
	5	-0.0308	0.1041	0.243	0.3714	0.2738	
Blanca	1	-0.0304	-0.1805	-0.1867	-0.1135	-0.1563	
	2	0.0225	-0.1339	0.0535	0.0383	0.0311	
	3	-0.0293	0.0515	-0.031	-0.1085	-0.0017	
	4	0.0631	-0.0314	-0.0473	-0.1673	-0.1104	

Evolución del Ritmo Circadiano										B
Estadístico	Inicio Actividad		Punto medio actividad		Fin actividad		Amplitud 90		Amplitud 80	
		Azul	Blanca	Azul	Blanca	Azul	Blanca	Azul	Blanca	Azul
Mediana	-0.031	-0.003	0.077	-0.083	0.112	-0.039	0.227	-0.111	0.166	-0.056
Media	-0.001	0.005	0.078	-0.059	0.139	-0.042	0.256	-0.070	0.140	-0.047
Desviación Estándar	0.070	0.045	0.038	0.104	0.059	0.100	0.137	0.088	0.104	0.089
Normalidad	0.000	0.000	0.000	0.000	0,018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Homogeneidad	0.000		0,026		0.000		0.000		0.000	
Significación asintótica	0.000		0,05		0,014		0,014		0,027	
Rangos	4	5	6	3	7	2	7	2	6	2

Fig.4.11. Tablas de valores y estadísticos de los momentos del ritmo circadiano de luz azul frente a luz blanca. A) Valores de cada individuo. Se puede apreciar la homogeneidad del punto medio, fin de actividad y amplitudes de luz azul frente a luz blanca. B) Estadísticos descriptivos y de contraste que definen estadísticamente las diferencias de la evolución de los momentos del ritmo circadiano entre luz azul y luz

4.1.2.3. Ampliación de la duración del periodo de actividad por luz azul

Calculamos la evolución de la amplitud del periodo de actividad como el tiempo necesario para cubrir tanto el 90% como el 80% de la actividad. En los ratones bajo luz azul se observa una pendiente positiva (Fig. 4.9A y B), indicando una ampliación del periodo de actividad. En los ratones bajo luz blanca no se aprecia tal pendiente (Fig. 4.9C) indicando que no hay ampliación del periodo de actividad. La amplitud aumenta notablemente y de manera significativa en luz azul al compararse con luz blanca (Figs. 4.10 y 4.11).

4.1.2.4. Evolución de la adaptación regresiva a la ampliación del ritmo

Al analizar el ritmo bajo luz azul se observa un patrón en el que se suceden repetitivamente eventos (Fig. 4.5 B). En cada evento se va expandiendo durante varios días

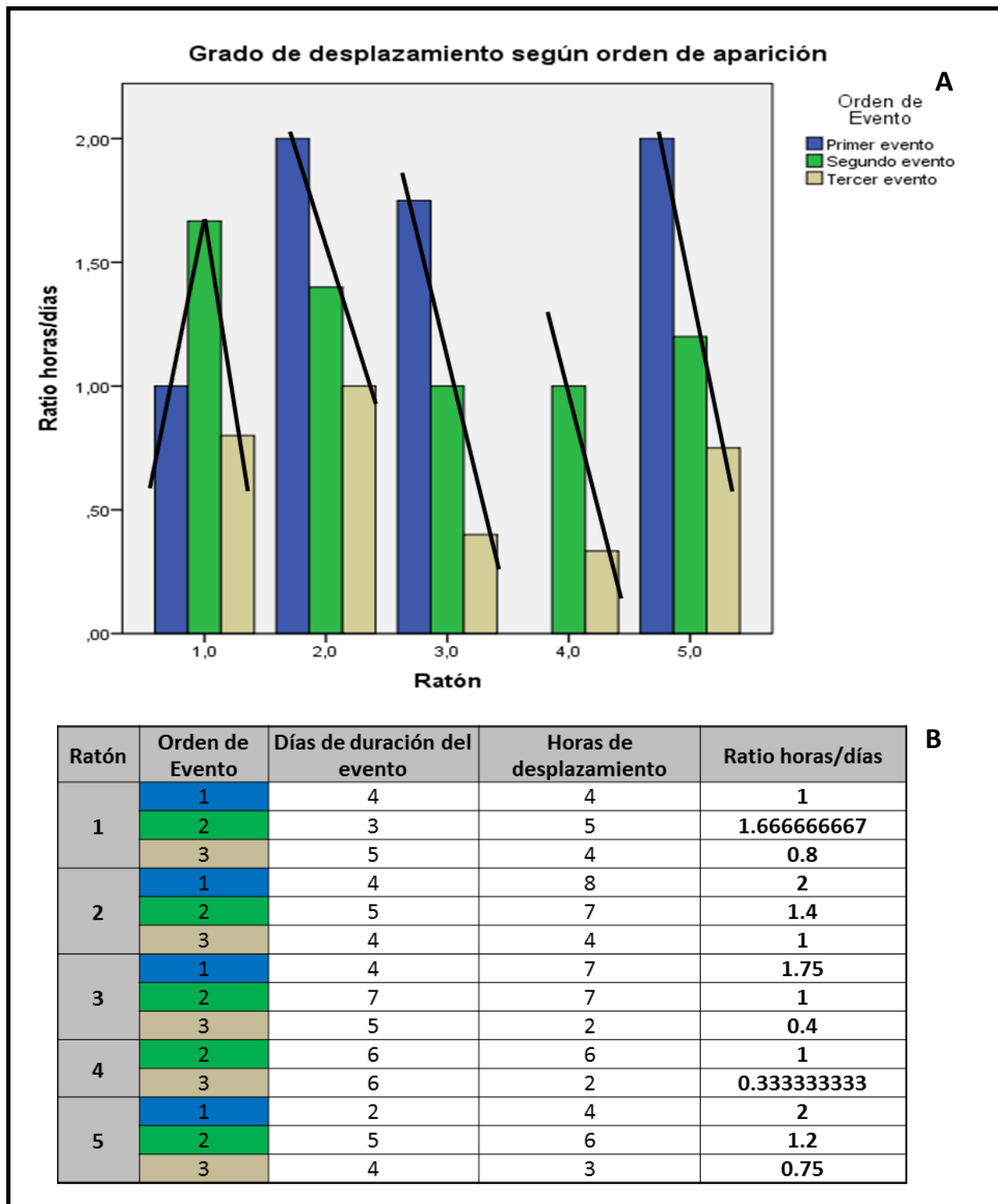


Fig.4.12. Grado de desplazamiento según individuo y orden. A) Representación gráfica del grado de desplazamiento agrupado por individuos y con color de columna según orden. B) Tabla de los grados de desplazamiento (ratio horas/días).

la duración del periodo de actividad hasta alcanzar un máximo en el que la actividad cubre prácticamente todo el periodo de oscuridad. El día siguiente a este máximo se observa una regresión en la expansión, disminuyendo bruscamente la extensión del periodo de actividad, iniciándose un nuevo evento de expansión (Fig. 4.5 A). Estos eventos se van sucediendo y cada vez esta regresión es menor, la expansión disminuye en menor medida (Figs. 4.5 A y 4.12 B), hasta llegar al punto en que ya no existen estos eventos porque el periodo de actividad cubre todo el periodo de oscuridad (Fig. 4.5 B).

Se calculó para cada evento el ratio de las horas que se expande el periodo de actividad en cada evento entre los días que dura el evento, a este ratio lo llamamos desplazamiento (Figs. 4.5 B y 4.12 B). Se puede ver que este ratio está en el rango del ritmo endógeno (Fig. 4.12 B). Se estudió si el grado de desplazamiento varía según el individuo y el orden del evento. Se encontró que el grado de desplazamiento es significativamente diferente en cada individuo, correspondiendo a distintos cronotipos. Se encontró que el grado de desplazamiento es significativamente mayor en los primeros eventos que en los últimos, indicando una adaptación progresiva de la amplitud del periodo de actividad (Figs. 4.5 A y 4.12 A).

4.1.3. Efecto de la delección dirigida de las células dopaminérgicas de la retina en ratones Swiss

Tras las inyecciones intraoculares de un anticuerpo contra el transportador reverso de dopamina unido a la toxina saporina para eliminar las células dopaminérgicas de la retina, en ninguno de los casos se observó un avance de fase progresivo (Fig. 4.13), que representase una expresión del ritmo endógeno como el que puede verse en oscuridad constante (Figs. 4.1 y 4.2).

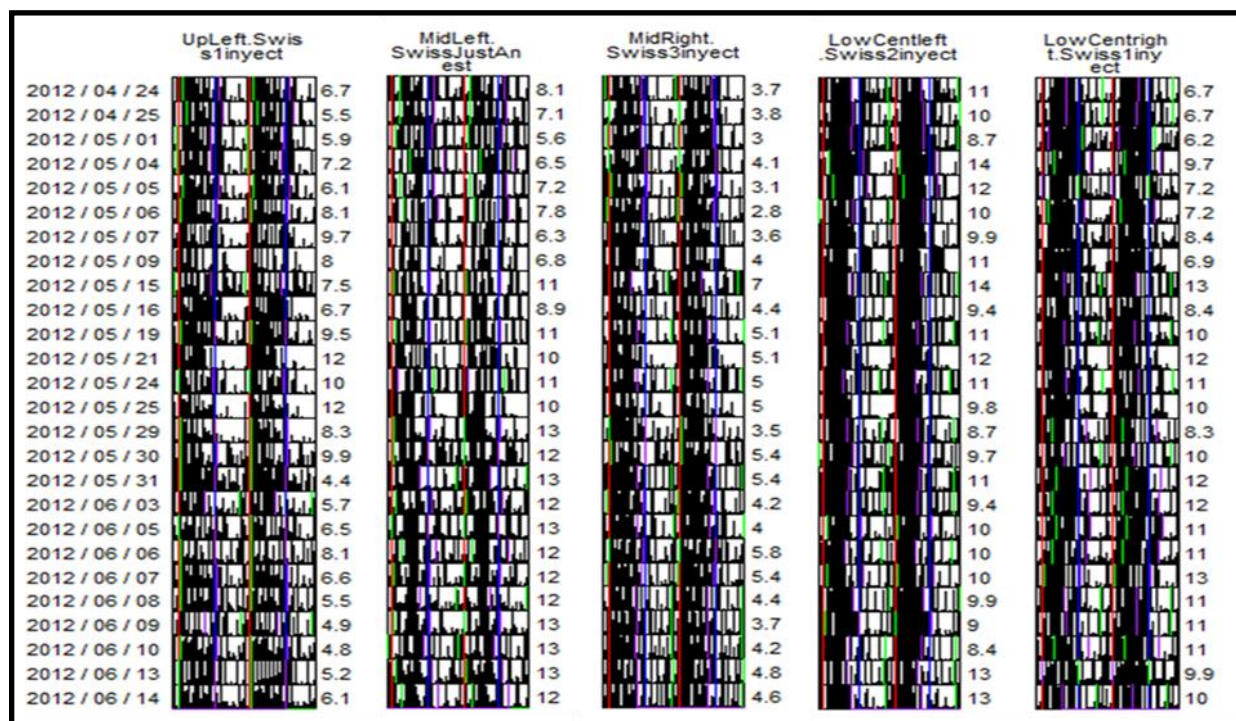


Fig.4.13. Actividad de ratones Swiss inyectados con anticuerpo antiDAT-SAP. De izquierda a derecha este número de inyecciones: 1, 0, 3, 2, 1.

4.1.3.1. Efecto de la dosis sobre el punto medio de actividad

El análisis exploratorio de diversos momentos de actividad reveló un posible adelanto del punto medio diario de la actividad en función de la dosis (Figs. 4.14 A y G). La regresión lineal muestra un adelanto medio del punto medio de actividad de 20 minutos por inyección, sin embargo solo explica un 7% de la variabilidad, quedando un 93% de la determinación del punto medio sin explicar. Al agrupar las horas del punto medio de cada día por dosis y compararlas los grupos se observó diferencias entre todas las condiciones excepto entre la ausencia de dosis y una dosis.

4.1.3.2. Efecto sobre otros puntos de la actividad

Al observar el resultado anterior, planteamos cómo afectaba la dosis a otros momentos de la actividad. Contrastamos el efecto sobre la hora en que el ratón había realizado el 33% de su actividad diaria y sobre el momento en que había realizado el 66% de su actividad diaria (Figs. 4.14 D, E y F). Se encontró que el momento del 33% de actividad se adelantaba significativamente 40 minutos con cualquier dosis respecto a la ausencia de dosis. Se encontró que el momento del 66% de actividad con una dosis se producía un retraso significativo para, a continuación, adelantarse según dosis.

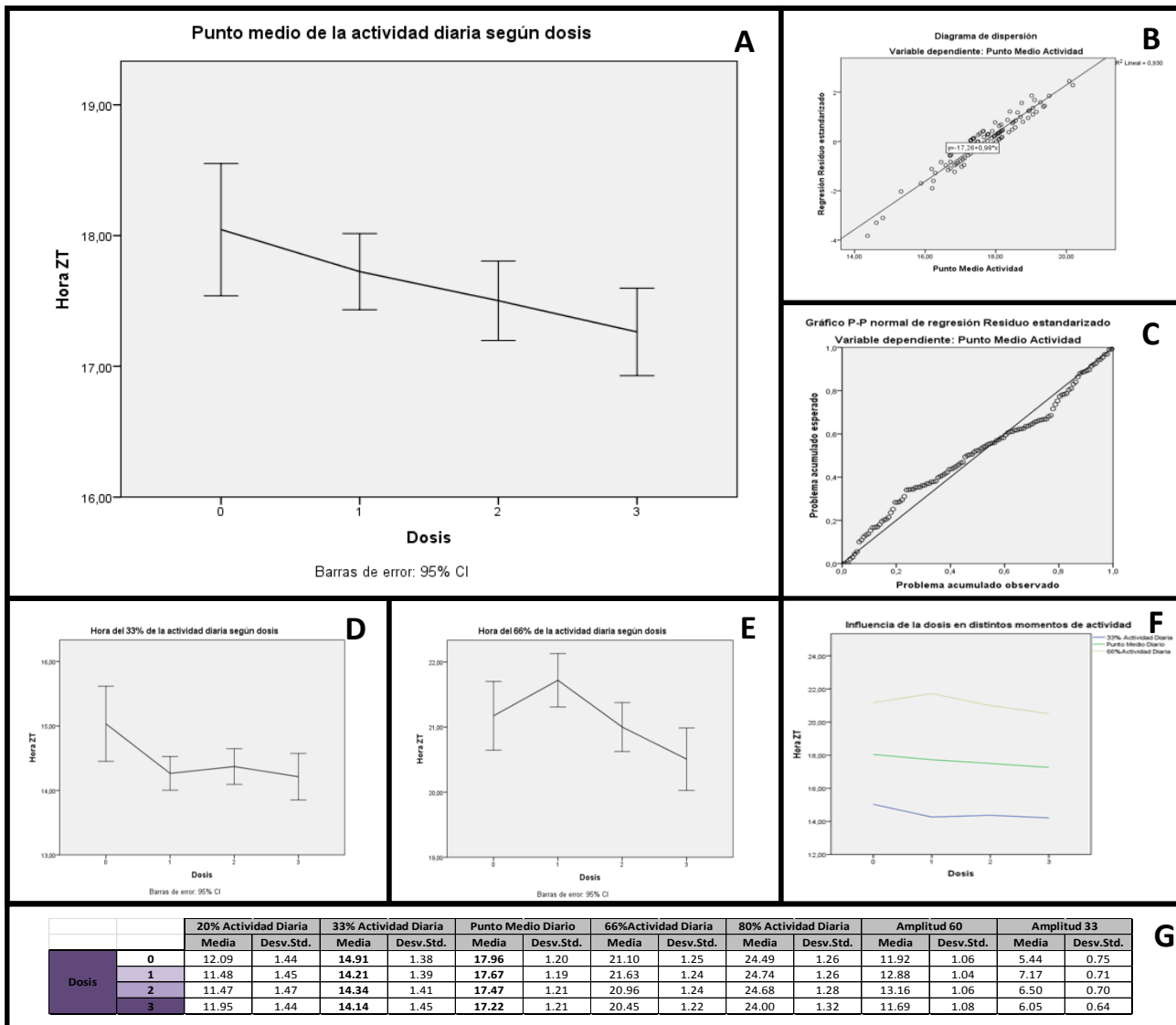


Fig.4.14. Influencia del número de inyecciones en el ritmo circadiano de los ratones. A) Hora a la que los ratones han realizado el 50% de su actividad diaria. Se observa un adelanto progresivo según dosis; de hasta los 40 minutos de diferencia entre cero dosis y tres dosis. B y C) Ajuste de los residuos de la recta de regresión de la hora del 50% de actividad frente a la dosis. Parecen confirmar la validez del ajuste. D) Hora a la que los ratones han realizado el 33% de su actividad diaria. Se observa un adelanto de los tres individuos inyectados de entorno a 40 minutos respecto al ratón inyectado. E) Hora a la que los ratones han realizado el 66% de su actividad diaria. Se observa que el final de actividad mantiene el patrón lineal visto en el 50% de actividad entre los individuos inyectados, pero no así su relación respecto del individuo no inyectado. F) Representación conjunta por dosis de los momentos del 33%, 50% y 66% de actividad. G) Diversas medidas de distintos momentos de actividad circadiana y de amplitudes entre percentiles según dosis.

4.2. Medidas celulares

Los resultados expuestos en este apartado corresponden a la realización de recuentos celulares y medidas de las características celulares con CellFinder. En el primer apartado se utilizan cortes de retinas C3H $+/+$ y rd/rd , en los demás retinas enteras de C3H rd/rd . Las imágenes de retinas enteras se montaron con Stitch&Focus o con ConsecRenamer y LayerMaker. En las retinas enteras se realizaron medidas tanto para melanopsina total como para sus isoformas bajo distintas condiciones experimentales. Los tipos celulares se discriminaron mediante clustering y se crearon reglas de clasificación mediante árboles de decisión. Los recuentos celulares y las características de las células bajo distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante contraste de hipótesis multivariable.

4.2.1. Número de células en cortes

4.2. 1.1. Influencia de la degeneración rd en el número de ipRGC

En los ratones rd/rd se produjo un descenso del número de ipRGC respecto a los $+/+$ bajo todas las condiciones (7h, 11h 200lx, 11h 2000lx) (Fig. 4.1).

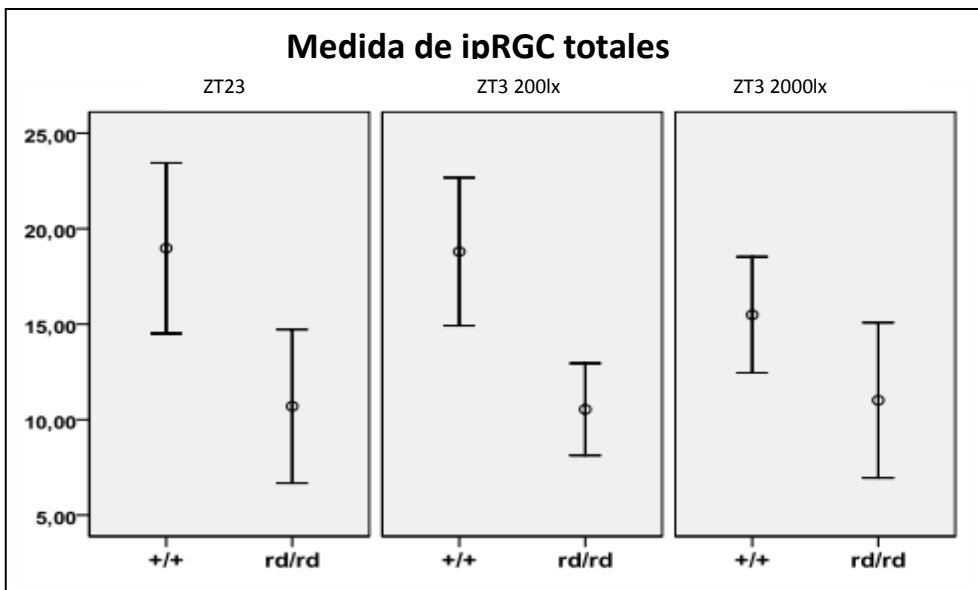


Fig. 4.1. Representación del número de ipRGC por cepa y condición.

4.2.1.2. Proporción de tipos celulares

Las células observadas correspondían en un 78% a células con el soma en la capa ganglionar y dendritas en el plexo OFF (M1A), un 13,5% a células con el soma en la capa ganglionar y dendritas en el plexo ON (M2) y un 8,5% a células con el soma en la capa nuclear interna (M1B). Se observó que en *rd/rd* había una menor proporción de M2 (9,7% vs 17,2%) y una mayor proporción de M1B (11,1% vs 5,8%) (Fig. 4.2).

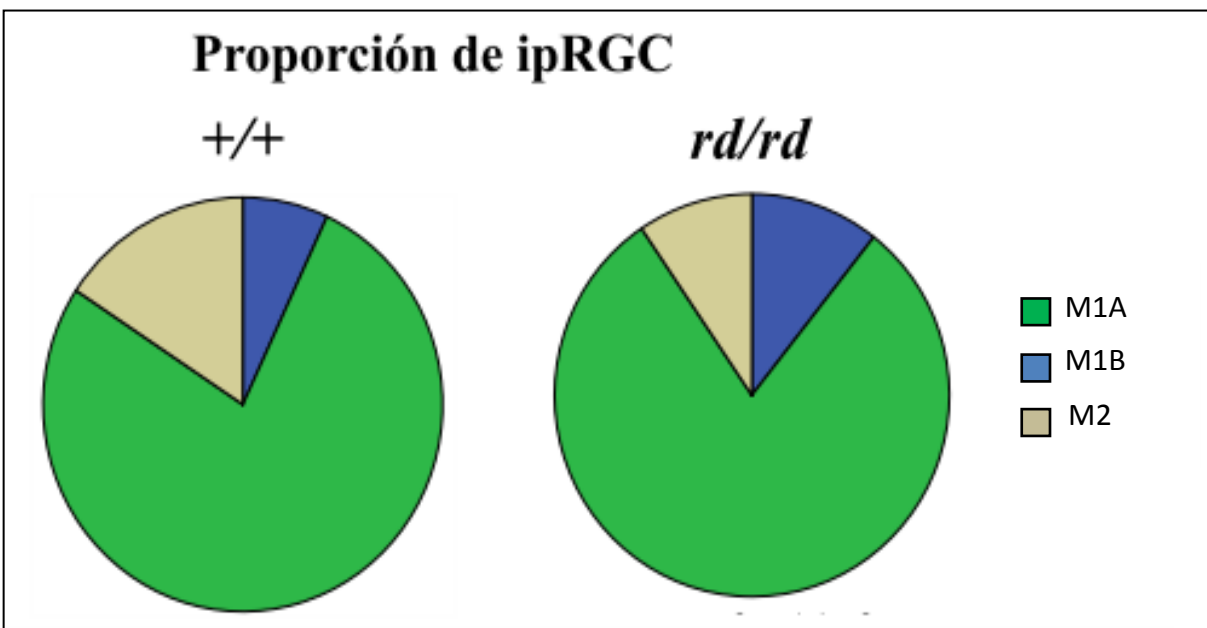


Fig. 4.2. Proporción media de ipRGC por localización del soma y plexo de las dendritas. Sumas todas horas y condiciones lumínicas en cada cepa.

4.2.1.3. Influencia de la localización del soma en el número de células

La reducción entre *+/+* y *rd/rd* se produce en el número de células con el soma en la capa ganglionar (M1A y M2) (Fig. 4.3), no así en aquellas con el soma en la subcapa de las células amacrinas (M1B) (Fig. 4.4).

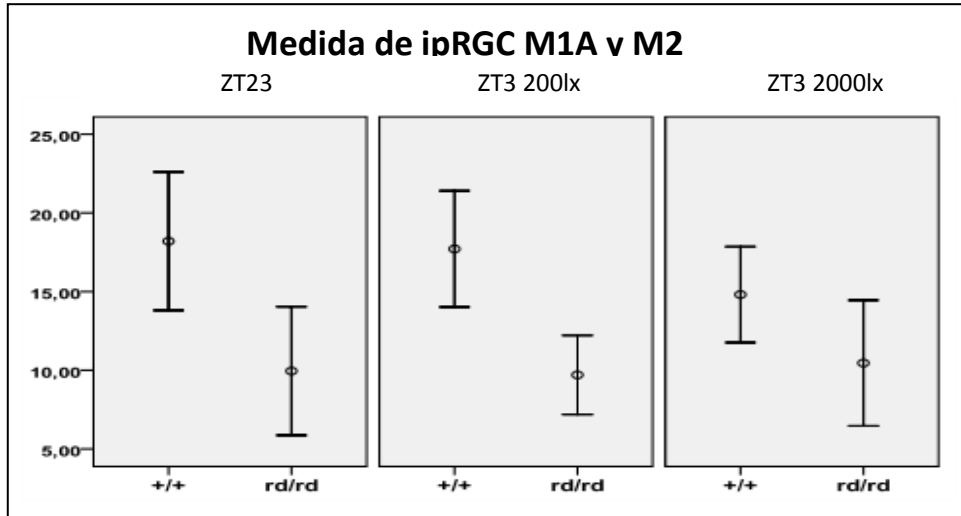


Fig. 4.3. Representación del número de ipRGC con soma en la capa ganglionar (M1A y M2) por cepa y condición.

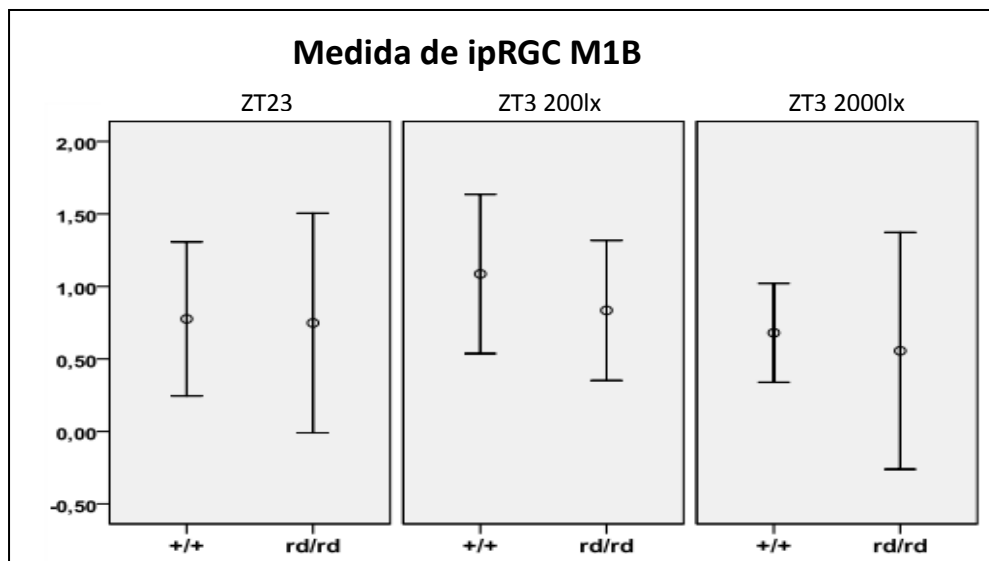


Fig. 4.4. Representación del número de ipRGC con soma en la subcapa de las células amacrinas (M1B) por cepa y condición.

4.2.1.4. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M1 en +/+

No se encontró variación en el número de células según la hora o la intensidad lumínica en las células M1 en +/+. No se encontró variación ni en el número de células M1A, con soma en la capa ganglionar, ni en el número de células M1B, con soma en la subcapa de las células amacrinas (Fig. 4.5).

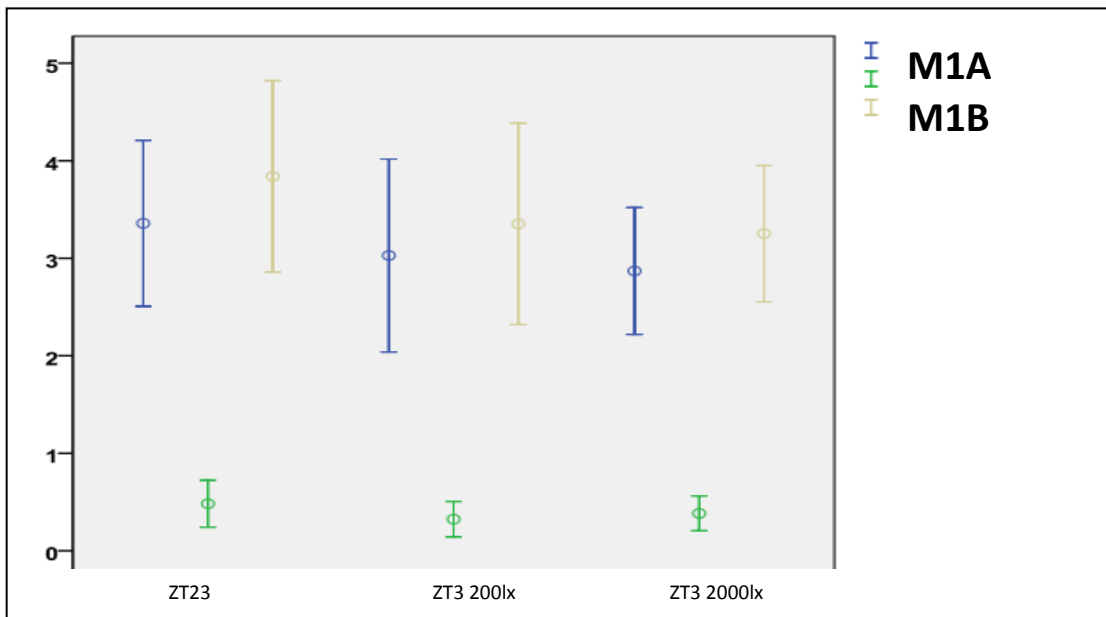


Fig. 4.5. Representación del número de ipRGC M1 (M1A y M1B) en +/+ por condición.

4.2.1.5. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M2

No se encontró variación en el número de células M2 entre las dos intensidades lumínicas en ninguna de los grupos de ratones, +/+ y *rd/rd*. No obstante, el número de células a las ZT23 (una hora antes de encenderse la luz) fue significativamente mayor que a las ZT3 independientemente del grado de iluminación (Fig. 4.6).

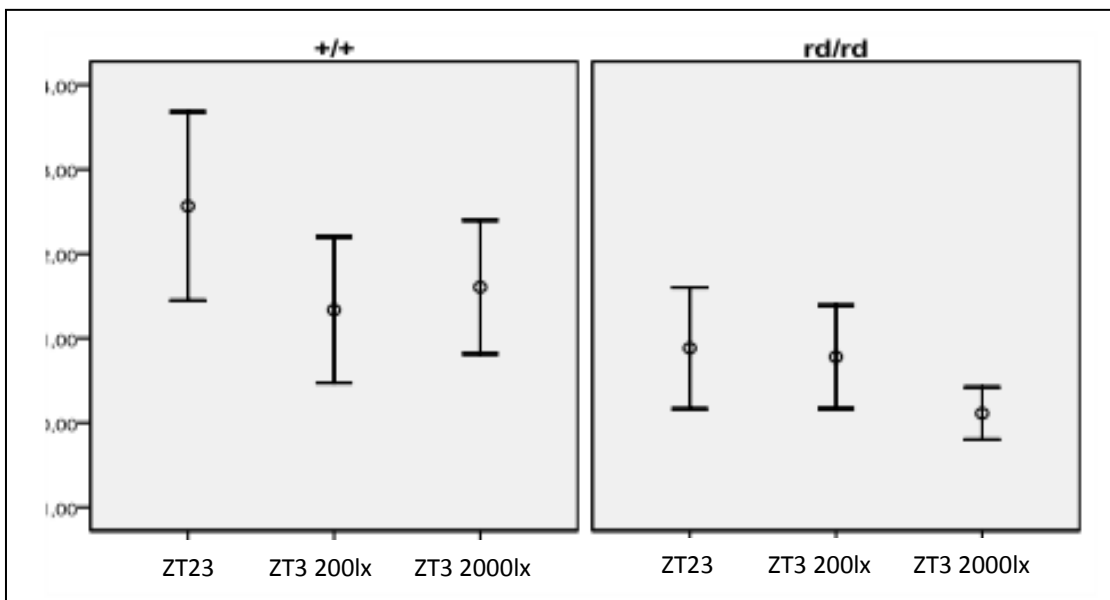


Fig. 4.6. Representación de la variación del número de M2 por cepa y condición.

4.2.1.6. El nivel de expresión y el plexo

No se encontró una asociación entre el plexo al que proyecta sus dendritas un tipo de células y su nivel de expresión de melanopsina según una evaluación subjetiva. Es decir, no encontramos que las células ganglionares con plexo OFF (M1A) tengan una intensidad mayor que las que envían su plexo a ON (M2) (Fig. 4.7), sino equilibrada.

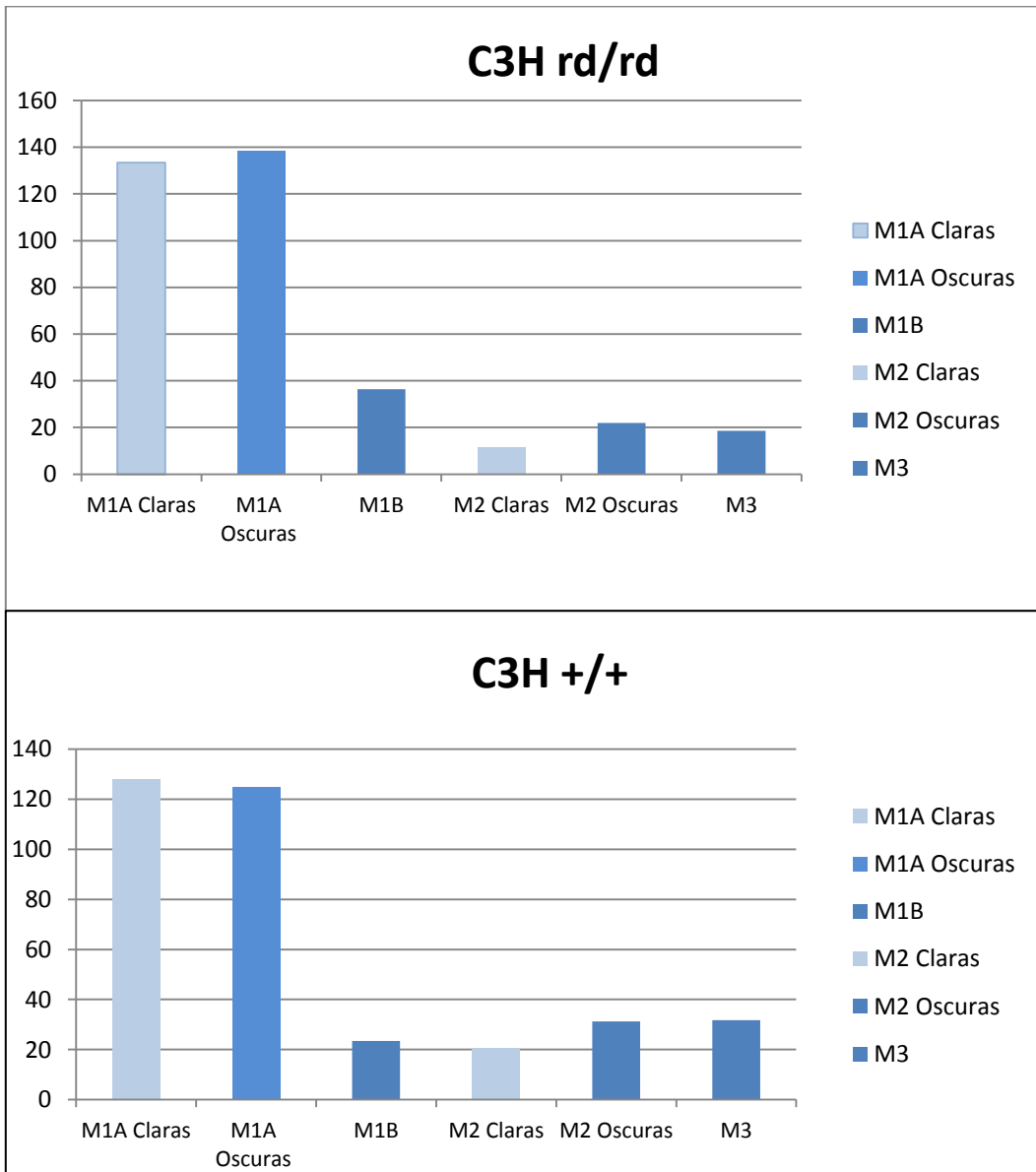


Fig. 4.7. Representación de la correspondencia entre los tipos celulares según su soma, dendritas y sus niveles de expresión

4.2.2. Las ipRGC según intensidad de tinción y diámetro del soma

En la literatura se describen tipos celulares de ipRGC según distintos parámetros. Dos parámetros utilizados recurrentemente son el tamaño del soma y la intensidad de tinción. Esta literatura indica que las células de mayor tamaño tienen menor tinción y las de menor tamaño más tinción con el anticuerpo para melanopsina total UF006. Estudiamos qué poblaciones celulares son detectadas con estas variables, diámetro e intensidad de tinción, en retinas enteras marcadas para UF006.

4.2.2.1. Análisis exploratorio de frecuencias de intensidad/diámetro

Se calculó la ratio Intensidad/Diámetro para cada célula. Las frecuencias de estos ratios, si atendemos a lo descrito en la bibliografía, deberían mostrar 2 picos: uno en el que el ratio intensidad/diámetro es alto (M1) y otro en el que el ratio intensidad/diámetro es bajo (M2). Según la bibliografía existen cantidades similares de M1 y M2, por lo que los picos deberían tener altura similar. Al observar las gráficas de las 4 retinas estudiadas, no se encontraron 2 picos de altura similar, como se podría esperar. En su lugar se observaron 2 o 3 picos que podrían indicar 3 poblaciones (Fig. 4.8).

4.2.2.2. Búsqueda de dos *clusters* por ratio intensidad/diámetro

Al realizar el análisis de cluster con un número fijo de 2 *clusters* según la ratio Intensidad/Diámetro se encontraron 2 *clusters* que coinciden parcialmente con lo descrito en la bibliografía para las ipRGC: uno, de menor diámetro con mayor tinción, y otro, de mayor diámetro con menos tinción (Fig. 4.9, 4.12 y 4.13).

El diámetro de las células de menor tamaño era de $18,25 \pm 0,96 \mu\text{m}$ y el de las células de mayor tamaño $20,5 \pm 1 \mu\text{m}$ (Fig. 4.9), que no coincide con los descritos en la bibliografía de $17 \mu\text{m}$ y $22 \mu\text{m}$.

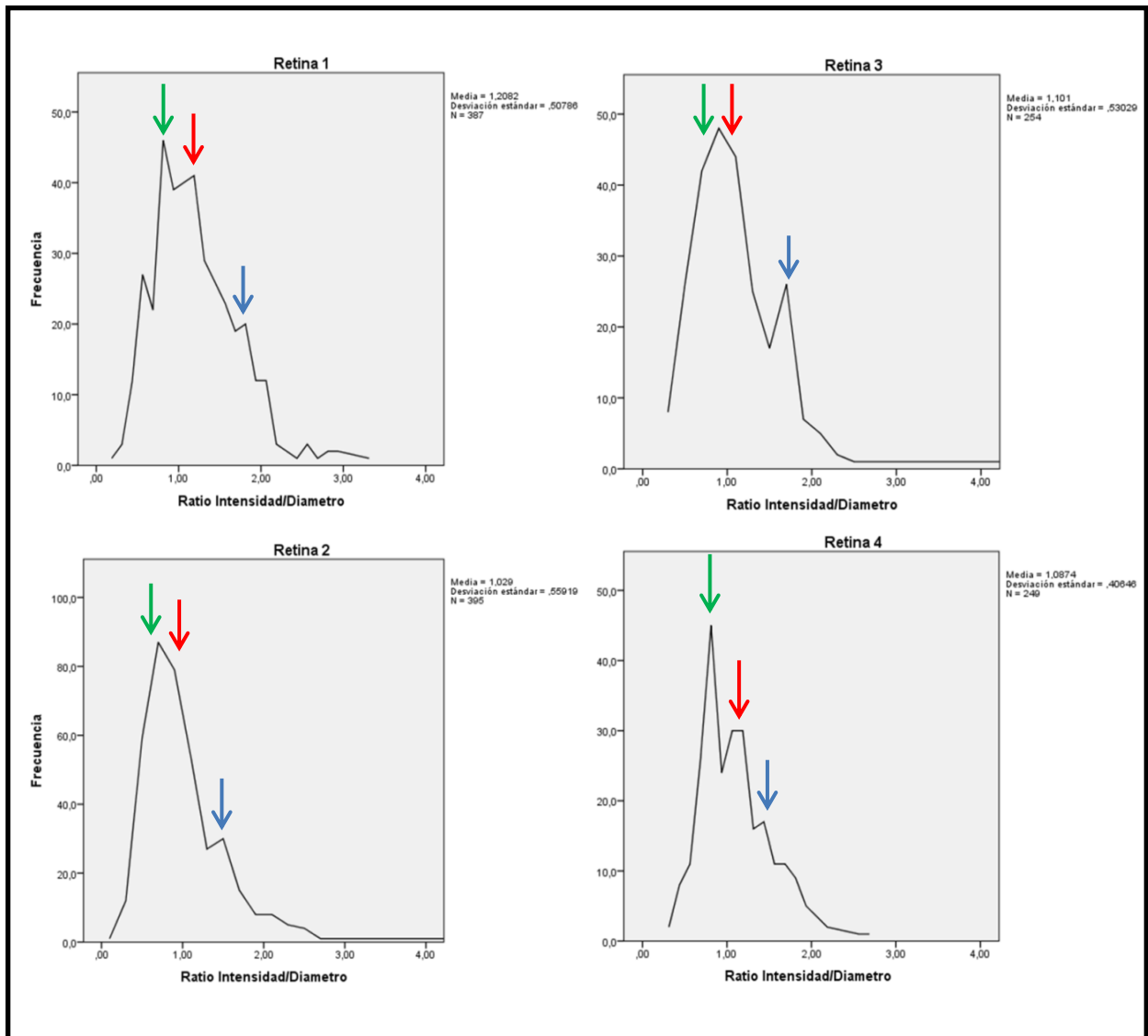


Fig. 4.8. Representación de las distribución de frecuencias de las células según el ratio intensidad/diámetro de cada célula. Se indica con flechas de color verde, rojo y azul posibles picos significativos observados en las 4 retinas. Estos picos de aumento de frecuencia pueden corresponder a poblaciones celulares, según el ratio intensidad/diámetro. En las retinas 2 y 3 los picos indicados con flechas verde y roja pueden estar fusionados en un solo pico, de ahí la pérdida de pendiente.

4.2.2.3. Búsqueda de *clusters* por dos diámetros

Al realizar el análisis de cluster con un número fijo de 2 *clusters* según el diámetro se encontraron 2 *clusters* cuyos diámetros sí parecen coincidir con lo descrito en la bibliografía, uno de 18.25 ± 1.26 y uno de 22.25 ± 0.96 μm (Fig. 4.10). Sin embargo, al comprobar las diferencias de intensidades entre los *clusters*, estas han desaparecido prácticamente (Fig. 4.12 y 4.13). De esta manera, cuando nos ceñimos al diámetro como criterio de separación de *clusters* los diámetros coinciden con lo descrito en la bibliografía, pero no así las intensidades.

4.2.2.4. Búsqueda libre de *clusters* por intensidad y diámetro

Se buscó una relación de *clusters* en base a las variables intensidad y diámetro, no a su ratio, además en vez de fijar el número de dos *clusters*, como describe la bibliografía. se permitió la determinación automática del número de *clusters*. El análisis de *cluster* encontró en las 4 retinas 3 *clusters* que tenían la misma conformación: células de un tamaño de soma intermedio y alta intensidad, células de un tamaño de soma mayor y baja intensidad, células de un tamaño de soma menor y baja intensidad (Figs. 4.11, 4.12 y 4.13) De estos tres tipos de ipRGC, las primeras, de tamaño intermedio y mayor tinción, encajan con el tipo M1, y las segundas, de menor tinción y mayor tamaño, con M2. Las células más pequeñas y claras no coinciden con ninguno de estos dos tipos morfológicos, en la figura 4.18 las denominamos Mx. La comparación entre estos tres grupos de células encuentra 2 intensidades significativas, por un lado M1 y por otro M2-Mx y tres tamaños significativos, las M2 con un soma notablemente mayor que las M1 y estas, a su vez, con un soma ligeramente mayor que las Mx (Figs. 4.12, 4.13 y 4.14).

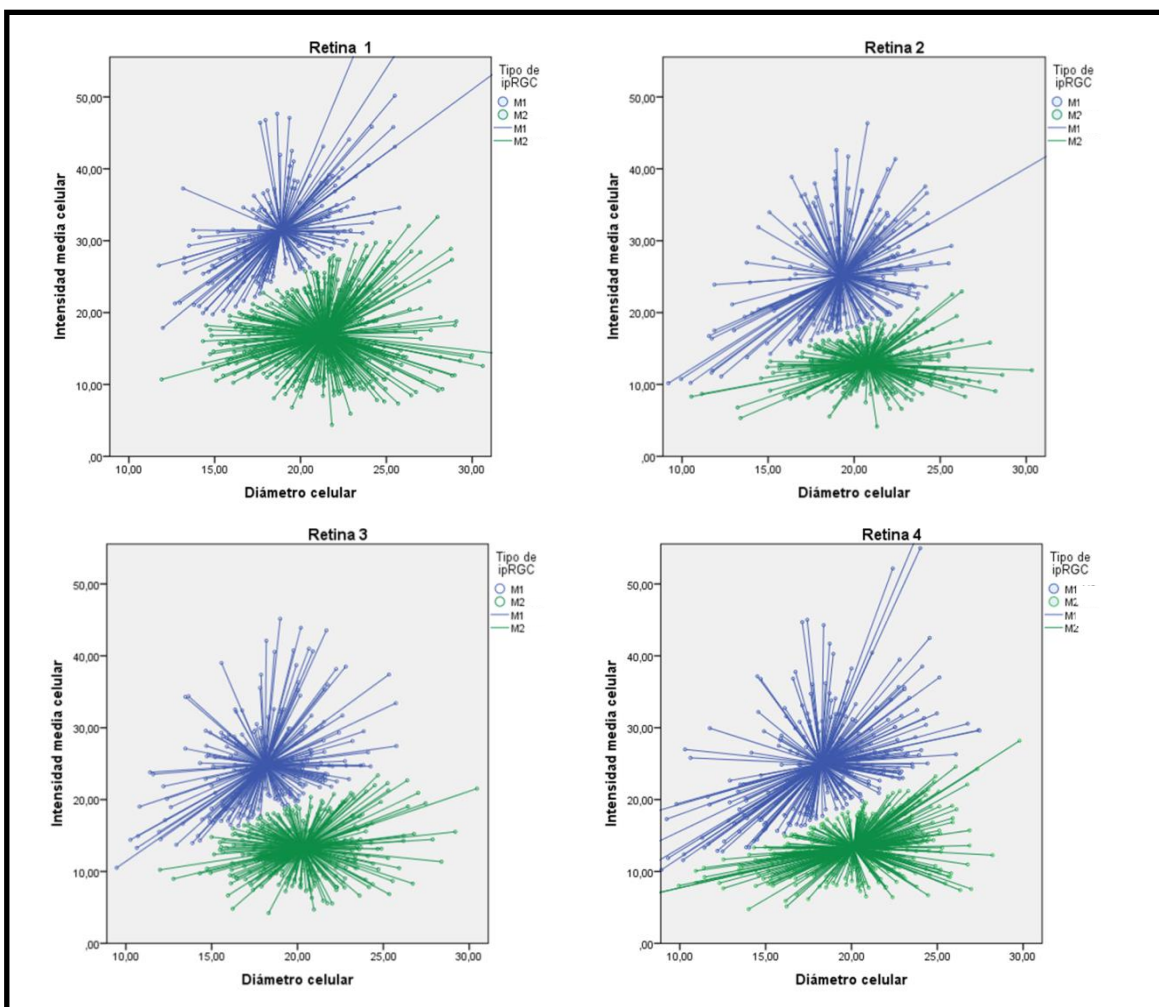


Fig. 4.9. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al buscar dos clusters por la ratio intensidad/diámetro. En azul, un cluster de mayor intensidad y menor diámetro que podría corresponder a la subpoblación M1. En verde, un cluster de menor intensidad y de mayor diámetro que se correspondería con la subpoblación M2. Se respeta la relación descrita en la bibliografía de intensidad/diámetro para M1 y M2. Se ve cómo los clusters aumentan su separación al aumentar el diámetro y la intensidad, pero tienden a perder separación a valores bajos. La relación de diámetros (18-20) no coincide exactamente con los descritos en la bibliografía (17-22).

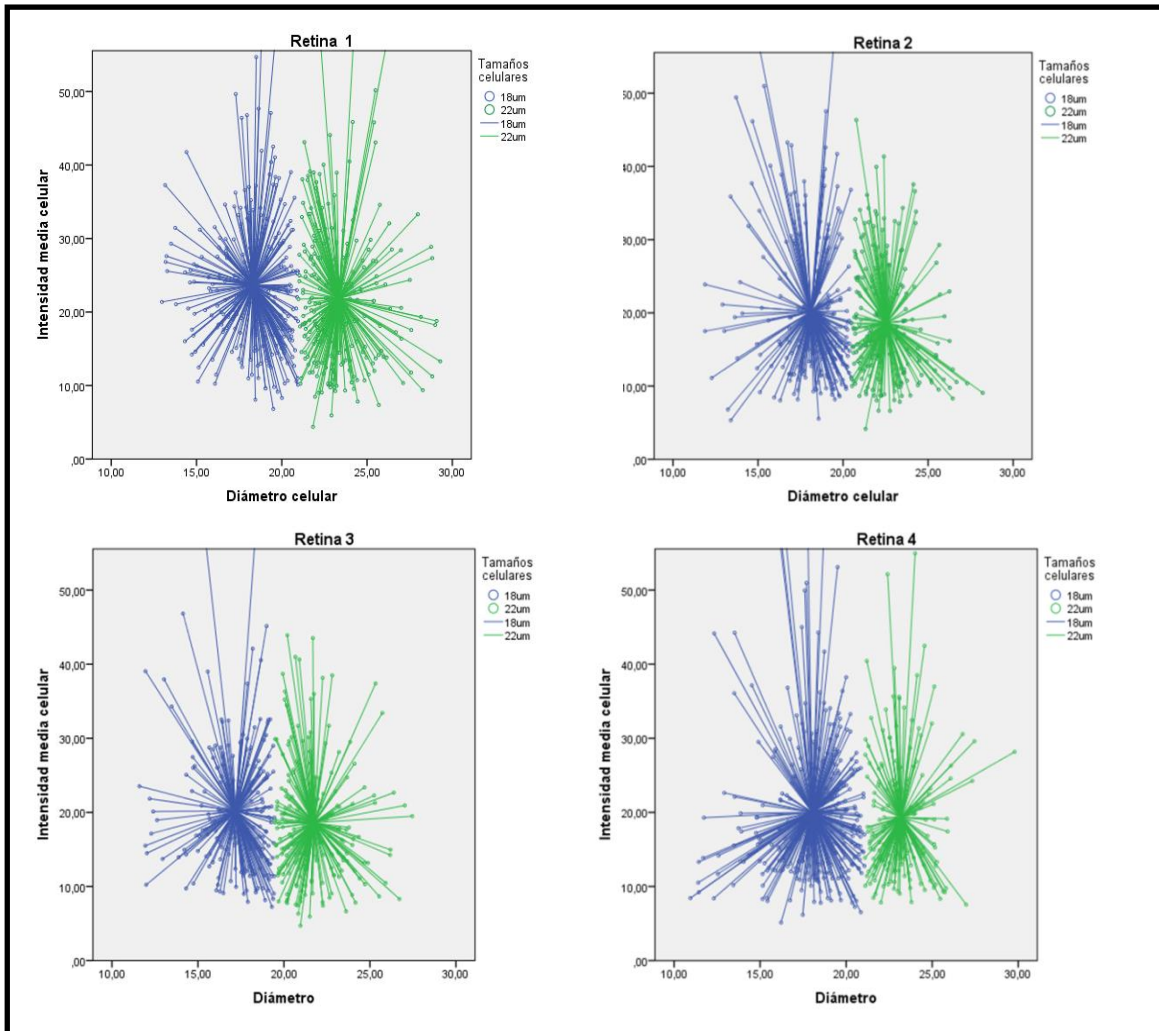


Fig. 4.10. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al buscar dos *clusters* por diámetro. En azul se representa el de menor diámetro, que constituiría el hipotético *cluster* M1. En verde se representa el de mayor diámetro, que correspondería al hipotético M2. La relación de diámetros (18-22) sí parece coincidir con los descritos en la bibliografía (17-22). Se pierde prácticamente la diferencia de intensidades entre las hipotéticas M1 y M2: percentil de intensidad 51 para M1 y 49 para M2.

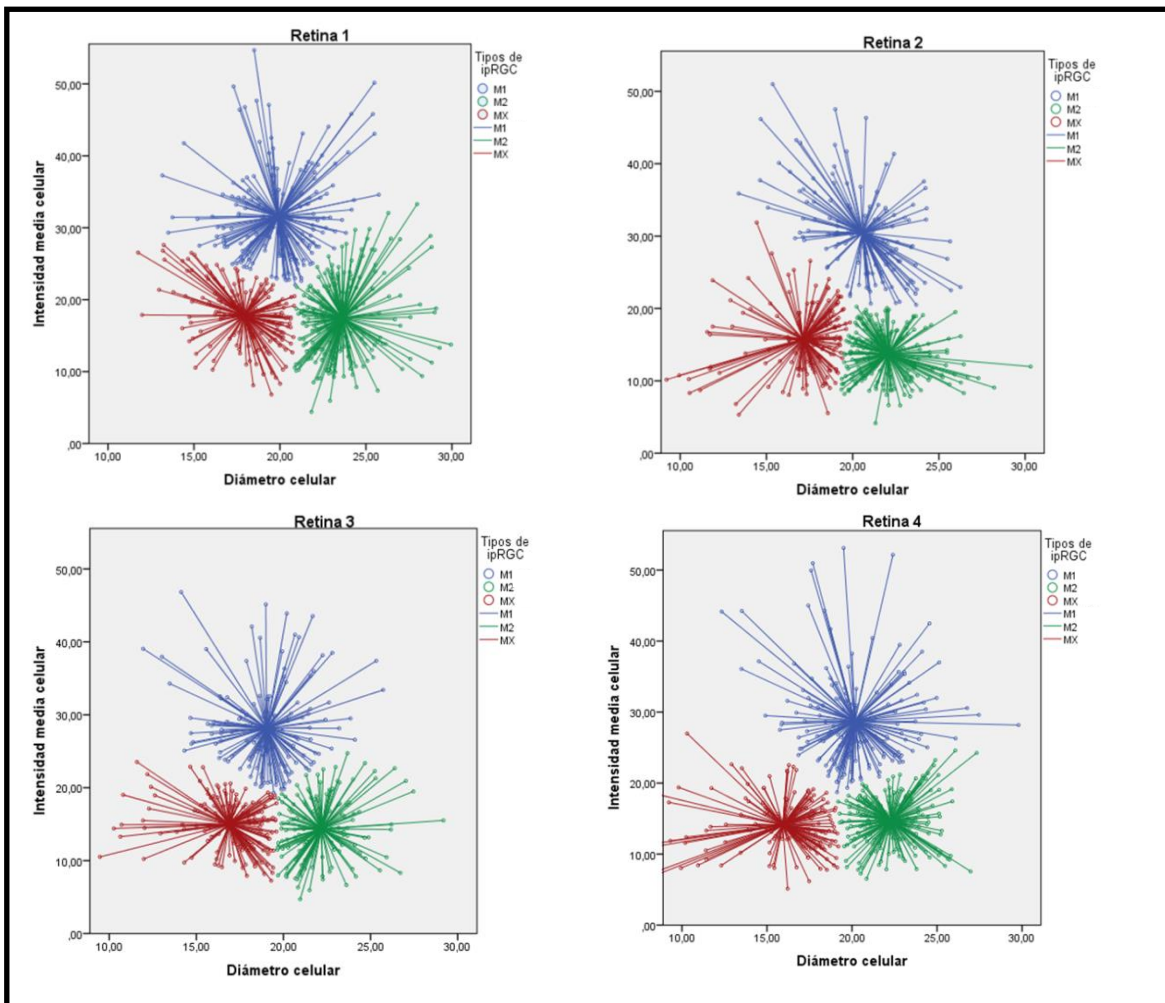


Fig. 4.11. Representación de las poblaciones celulares de las 4 retinas al formar clusters libremente por intensidad y diámetro. En azul se representa uno de menor diámetro y mayor intensidad que sería el hipotético cluster M1; en verde uno de mayor diámetro y menor intensidad, el hipotético cluster M2; en rojo, un cluster de menor diámetro y menor intensidad, aquí denominado Mx. La relación de diámetros (18-20-22) y de intensidad/diámetro $M1 > M2$ parece coincidir con los descritos en la bibliografía.

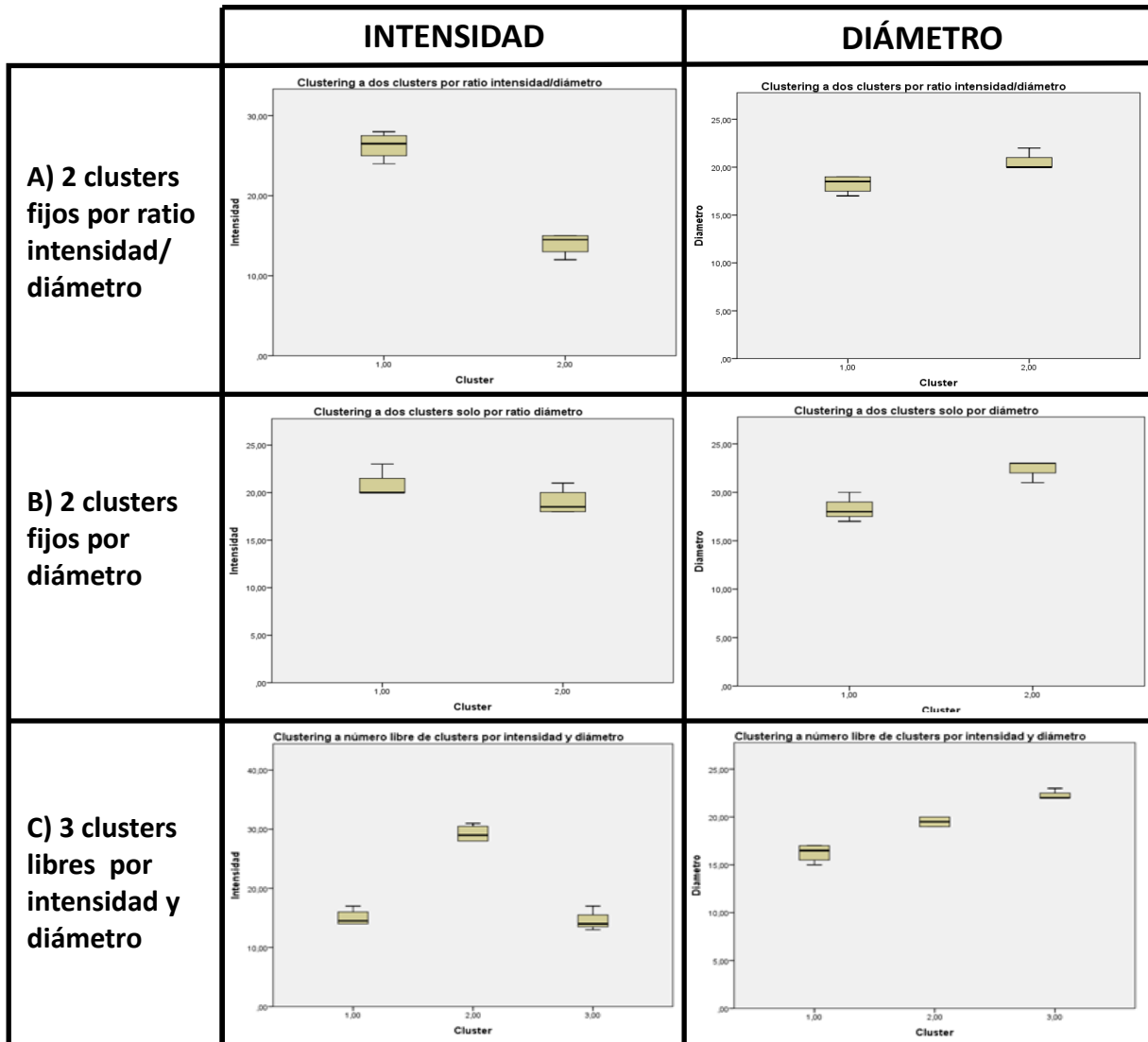


Fig. 4.12. Representación en diagrama de cajas de la intensidad y el diámetro de los *clusters* obtenidos mediante distintas estrategias de *clustering*. En la columna de la izquierda se representan las intensidades de los *clusters* y en la columna de la derecha los diámetros de los *clusters*. En las filas se representan 3 estrategias de *clustering*. A) Búsqueda con un número prefijado de dos *clusters* según la variable calculada ratio intensidad/diámetro. B) Búsqueda con un número prefijado de dos *clusters* según la variable diámetro. C) Búsqueda de un número libre de *clusters* según las variables intensidad y diámetro individualmente, no por su ratio, para las tres retinas se obtuvieron tres *clusters*.

Clustering a 2 clusters por ratio intensidad/diámetro						
	Intensidad		Diámetro		Percentil Intensidad	
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2
Retina 1	28	15	19	22	67	22
Retina 2	24	12	19	20	70	25
Retina 3	27	15	17	20	77	34
Retina 4	26	14	18	20	71	31
Media	26.25	14.00	18.25	20.50	71.25	28.00
Std	1.71	1.41	0.96	1.00	4.19	5.48

Clustering a 2 clusters solo por diámetro						
	Intensidad		Diámetro		Percentil Intensidad	
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2
Retina 1	23	21	18	23	51	48
Retina 2	20	18	18	22	50	50
Retina 3	20	18	17	21	53	47
Retina 4	20	19	20	23	50	53
Media	20.75	19.00	18.25	22.25	51.00	49.50
Std	1.50	1.41	1.26	0.96	1.41	2.65

Clustering a número libre de clusters por intensidad y diámetro									
	Intensidad			Diámetro			Percentil Intensidad		
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Retina 1	31	17	17	19	23	17	77	31	30
Retina 2	30	13	15	20	22	17	83	31	40
Retina 3	28	14	14	19	22	16	80	29	34
Retina 4	28	14	14	20	22	15	76	31	22
Media	29.25	14.50	15.00	19.50	22.25	16.25	79.00	30.50	31.50
Std	1.50	1.73	1.41	0.58	0.50	0.96	3.16	1.00	7.55

Fig. 4.13. Tabla de los valores de intensidad, diámetro e intensidad percentil de los *clusters* según la estrategia de *clustering*. A) Dos *clusters* según el ratio intensidad/diámetro. B) Dos *clusters* según la variable diámetro. C) Tres *clusters* según las variables intensidad y diámetro.

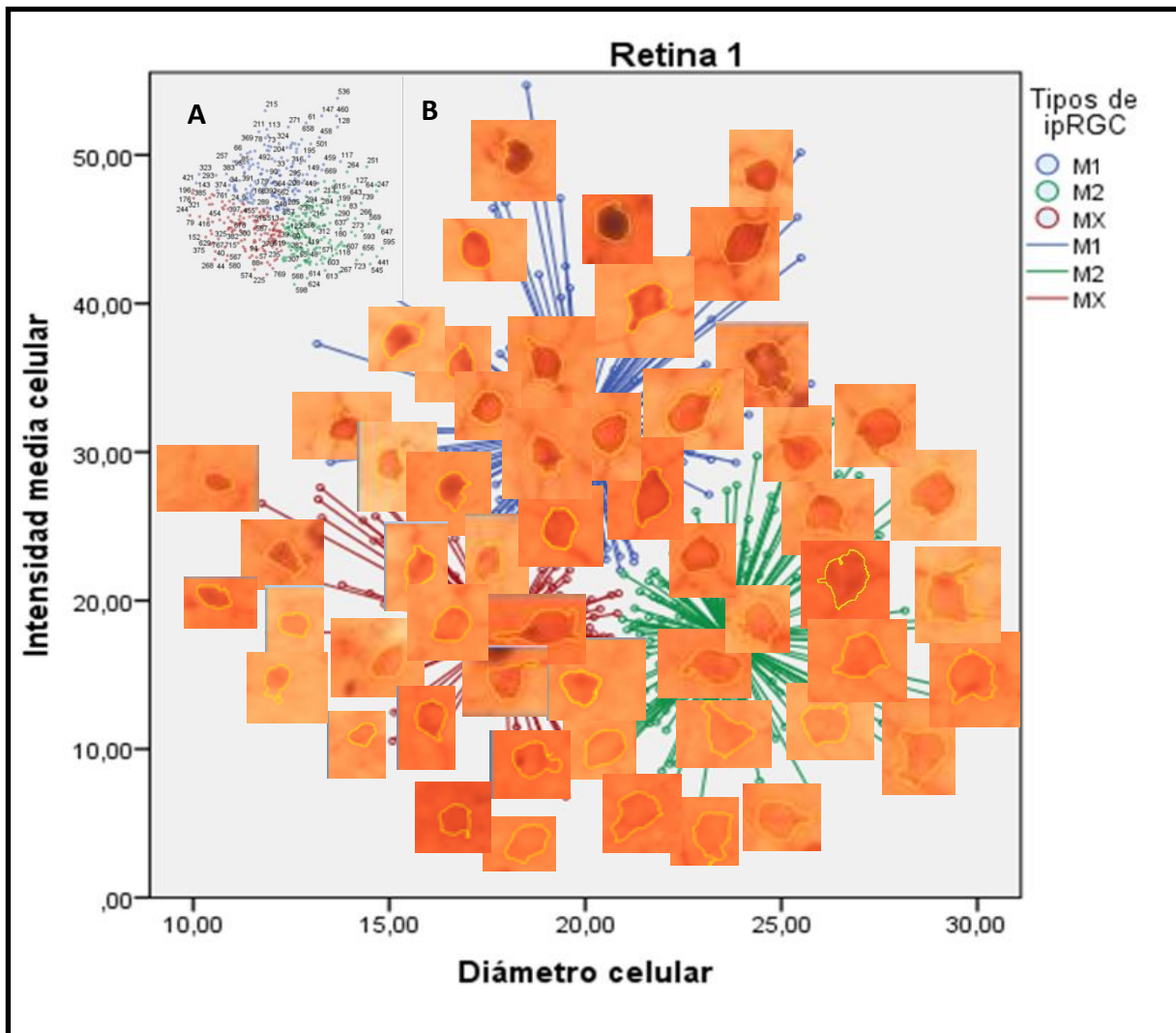


Fig. 4.14. Células representantes de los distintos puntos de los clusters. A) Representación de las posiciones en el cluster con el identificador (ID) de cada célula. B) La célula correspondiente a cada ID sobreimpresionada su localización sobre los clusters.

4.2.2.5. Predicción lineal de pertenencia de células a *clusters*

Una vez conocidos los *clusters* que permiten definir la población de células queremos conocer qué criterios seguir para asignar una célula a un tipo u otro o para asignarle una posibilidad de pertenencia a un tipo u otro. La función discriminante para asignar una célula a un tipo en base a su diámetro y su intensidad es:

$$M1: -59+4*\text{Diámetro}+1.053*\text{Intensidad}$$

$$M2: -60+4*\text{Diámetro}$$

$$Mx: -37+3*\text{Diámetro}$$

Esta función tiene una capacidad de acierto del 90,2%.

4.2.2.6. Predicción no-lineal de pertenencia de células a *clusters*

Para dar una solución no lineal para asignar las células a *clusters* basándonos en su diámetro y la intensidad realizamos dos árboles de decisión del tipo celular. Uno basado en el diámetro y la intensidad de las células en una escala en escala arbitraria con capacidad predictiva del 89% (Fig. 4.15) y otro con el diámetro y la intensidad de las células en una escala percentil con capacidad predictiva es del 84% (Fig. 4.16). Utilizar la intensidad percentil en vez de la intensidad en una escala arbitraria permite la comparación entre retinas con diferencias de procesado inmunohistoquímico.

4.2.2.7. Parámetros que varían entre tipos celulares

Comparamos distintas variables entre los distintos tipos celulares (M1, M2, Mx) para comprobar entre cuáles existían diferencias significativas. Estas variables se pueden clasificar en aquellas que ayudan a definir la forma de la célula, aquellas que ayudan a definir el marcaje de la célula y otras variables que se calculan a partir de estas (Fig. 4.17). A continuación, se comentan algunas de estas variables.

Variables de forma

- + Área: Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx
- + Perímetro, ancho y altura: Se diferencia, por un lado, M1 y Mx, y por otro, M2.
- + Variables de la elipse de mejor ajuste:
 - Eje menor de la elipse: Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx
 - Eje mayor de la elipse: Se diferencia, por un lado, M1 y Mx, y por otro, M2.
 - Ángulo: No se diferencian

- La ratio de aspecto (eje mayor/eje menor): Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx.

+ Variables relacionadas con el Feret:

- El Feret o diámetro máximo: Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx

- El Feret mínimo o diámetro mínimo: Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx.

- Ángulo del Feret, FeretX y FeretY: No se diferencian.

Variables de marcaje

+ Media, moda, mediana e intensidad máxima: Se diferencia, por un lado, M2 y Mx, y por otro, M1.

+ Intensidad mínima: No se diferencian.

+ Simetría de la distribución de niveles de grises: Se diferencia, por un lado, M2 y Mx, y por otro, M1.

+ Proyección vertical de la distribución de niveles de grises o curtosis: Se diferencia, por un lado, M2 y Mx, y por otro, M1.

Variables calculadas

+ Intensidad integrada, consiste en la suma de la intensidad de todos los píxeles de la célula. Se diferencia, por un lado, M1 y M2, y por otro, Mx.

+ Media limpia, consiste en la intensidad media de la célula tras retirar la intensidad media del fondo que la rodea. Se diferencia, por un lado, Mx y M2, y por otro, M1.

+ Diámetro, es una conversión unitaria del eje menor de píxeles a micrómetros. Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx

+ Ratio Intensidad Media/Diámetro, está calculado en base a la media limpia y al diámetro en micrómetros. Se diferencian independientemente M1, M2 y Mx.

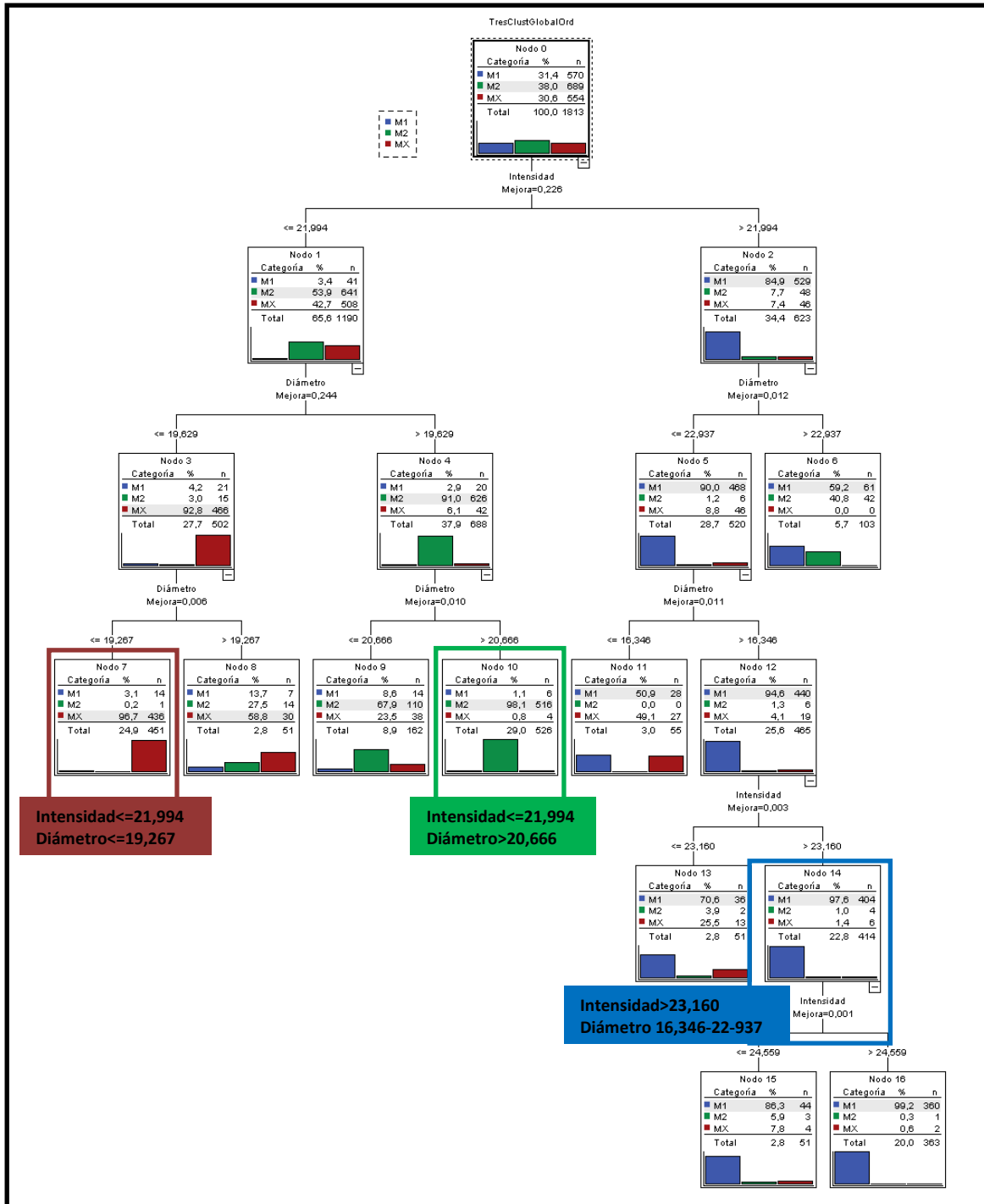


Fig. 4.15. Árbol de decisión para predecir el *cluster* de pertenencia de una célula según su diámetro y su intensidad. Se destacan aquellos nodos más significativos para cada tipo.

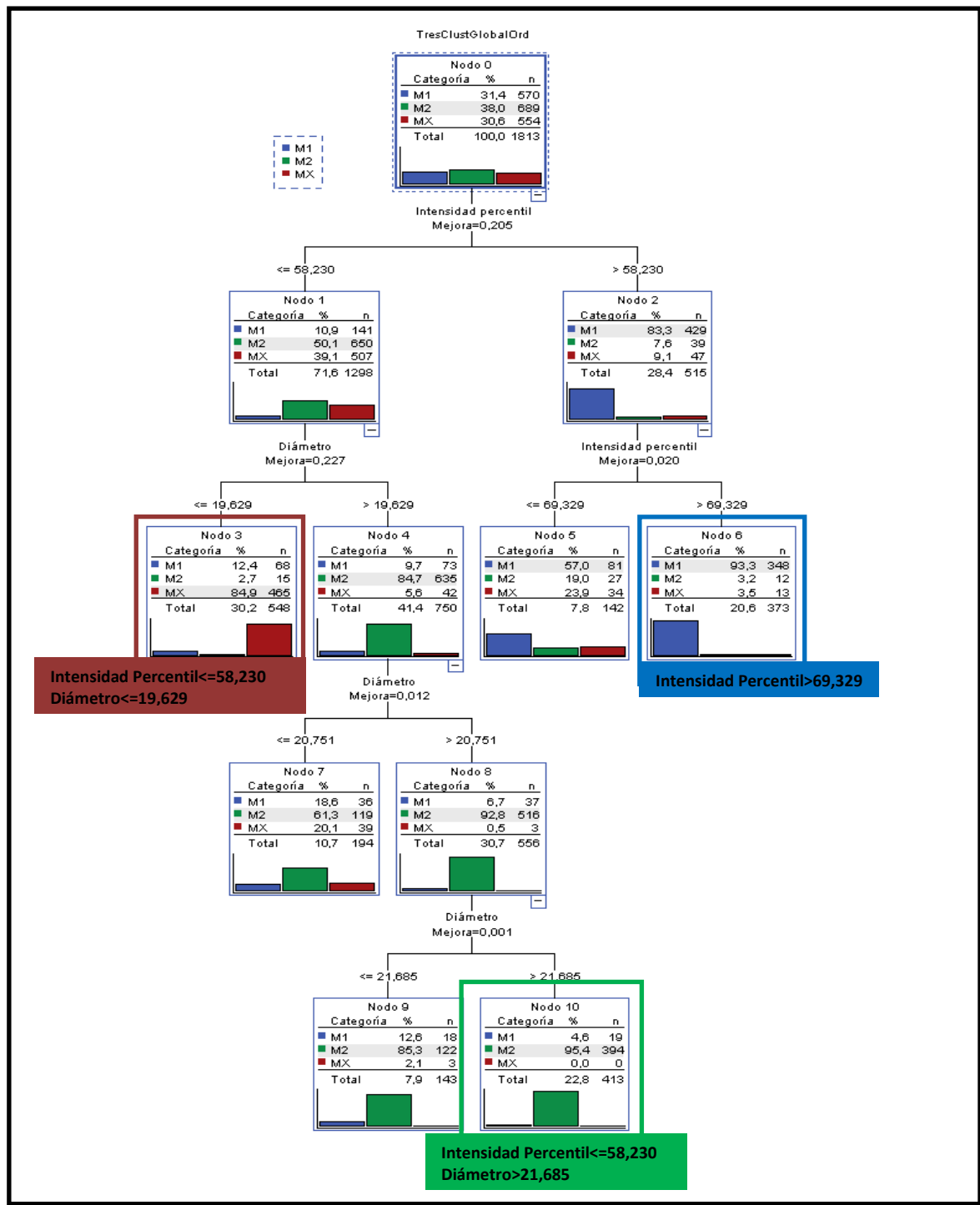


Fig. 4.16. Árbol de decisión para predecir el *cluster* de pertenencia de una célula según su diámetro y su intensidad en escala percentil. Se destacan aquellos nodos más significativos para cada tipo.

	Estadísticos descriptivos				Estadísticos de contraste				
	MX		M1		M2		MX, M1 y M2 comparados		
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Significación asintótica	Representación formal	Subconjuntos homogéneos
Area	915.54	41.09	1107.27	57.26	1317.02	26.32	0.0073	**	MX-M1-M2
Perim.	125.13	2.77	133.12	3.77	151.41	2.29	0.0125	*	(MXM1)-M2
Width	38.00	1.29	40.50	1.25	45.25	0.66	0.0119	*	(MXM1)-M2
Height	36.50	1.03	39.75	0.94	44.25	0.92	0.0088	**	(MXM1)-M2
Major	41.73	0.99	43.64	0.78	46.39	0.51	0.0125	*	(MXM1)-M2
Minor	27.69	0.66	32.18	1.15	36.01	0.35	0.0073	**	MX-M1-M2
Angle	86.69	6.20	90.18	1.61	85.18	5.22	0.0000	****	(MXM1M2)
Feret	45.93	1.11	47.77	1.09	52.28	0.66	0.0154	*	(MXM1)-M2
FeretX	17.50	1.97	18.25	1.85	19.00	2.22	0.0000	****	(MXM1M2)
FeretY	34.00	2.87	35.51	2.79	37.75	2.26	0.0000	****	(MXM1M2)
FeretAngle	87.57	3.84	89.82	1.19	84.75	1.23	0.0000	****	(MXM1M2)
MinFeret	27.34	1.18	31.08	1.28	36.36	0.36	0.0073	**	MX-M1-M2
AR	1.51	0.01	1.37	0.03	1.29	0.01	0.0073	**	MX-M1-M2
Mean	113.02	3.01	123.00	2.25	113.53	2.46	0.0231	*	(MXM2)-M1
Mode	112.49	3.30	124.25	1.72	112.99	2.50	0.0242	*	(MXM2)-M1
Min	99.75	3.68	99.00	2.08	100.75	2.48	0.0000	****	(MXM1M2)
Max	127.99	2.52	144.75	3.58	128.98	2.71	0.0235	*	(MXM2)-M1
Median	113.50	3.28	123.75	1.90	113.50	2.56	0.0233	*	(MXM2)-M1
Skew	44.50	19.88	-43.26	7.96	92.00	22.56	0.0154	*	(MXM2)-M1
Kurt	142.23	14.75	184.00	35.25	21.25	49.06	0.0154	*	(MXM1)-M2
IntDen	103479	4487	136200	7548	149686	4900	0.0154	*	MX-(M1M2)
MeanClean	15.26	1.00	28.25	0.99	14.50	0.63	0.0187	*	(MXM2)-M1
Diametro	16.75	0.47	19.75	0.47	22.25	0.12	0.0065	**	MX-M1-M2
RatIntDiam	0.91	0.05	1.43	0.04	0.65	0.03	0.0070	**	MX-M1-M2

Fig. 4.17. Tabla de los valores de diversas variables morfológicas de los distintos *clusters*. Se agrupan según hagan referencia a la forma de la célula, al marcaje de esta o sean calculadas con varias de estas. A la izquierda, se encuentran sus estadísticos descriptivos. A la derecha, los estadísticos de contraste: significación asintótica según el test de Kruskal-Wallis, a continuación su representación formal y finalmente los subconjuntos encontrados según el contraste de Scheffé. Representación formal: Ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

4.2.3. La intensidad, el diámetro y las dendritas

Se estudió la correspondencia de los *clusters* detectados por intensidad y diámetro respecto del tipo celular según la localización de sus dendritas. Se determinó visualmente la subcapa a la que la célula proyectaba sus dendritas y se contrastó con su posición en los *clusters* M1, M2 y Mx. Los tipos celulares según la arborización dendrítica son: M1: dendritas en subcapa OFF; M2: dendritas en ON; M3: biestratificadas, dendritas en OFF y ON; ND: sin dendritas visibles; NS: difícil de discernir; NC: no es una célula (Fig. 4.18).

4.2.3.1. Análisis exploratorio de los *clusters* de una retina

Seleccionamos 60 células representantes de todos los puntos de los *clusters* de la primera retina y representamos gráficamente el resultado de la observación de sus dendritas (Fig. 4.19 A y B). Se observan las siguientes características:

- El *cluster* M1 presenta células M1 con una gran pureza, sus dendritas proyectan claramente a la capa OFF y son fácilmente observables.

- El *cluster* M2 presenta una mezcla de células M1 y M2. Aunque se encuentran ambos tipos en todo el *cluster*, las células M1 se encuentran predominantemente en la zona cercana al contacto con el *cluster* M1, donde aumenta la expresión y disminuye el diámetro, mientras que las células M2 se concentran en la zona de menos expresión y más diámetro. Parece que tiene más peso el nivel de expresión que el diámetro en la correlación con el tipo dendrítico. Las dendritas de las células M2 son más complicadas de observar que las de M1 por su menor tinción.

- El *cluster* Mx está formado por células que parecen enviar sus dendritas a la capa de las M1, pero en la mitad de los casos no se puede apreciar claramente el destino de las dendritas o no se observan dendritas en absoluto, debido al escaso grado de tinción de las mismas. Las células en las que no se pueden determinar la arborización dendrítica se encuentran predominantemente en la zona de menor tamaño y menor expresión de proteína, mientras que aparecen más claramente como M1 aquellas más cercanas al punto de unión de los 3 *clusters*. En la frontera del *cluster* Mx con el M1 se observa un buen número de células para las que no se es fácil determinar el tipo dendrítico.

- Muy ocasionalmente, al analizarse con detenimiento, se encontraron algunas áreas marcadas como somas que resultaron ser artefactos de la tinción (NC). Estos se encontraron predominantemente en los extremos de los *clusters* por su diámetro e intensidad, siendo fácilmente descartables.

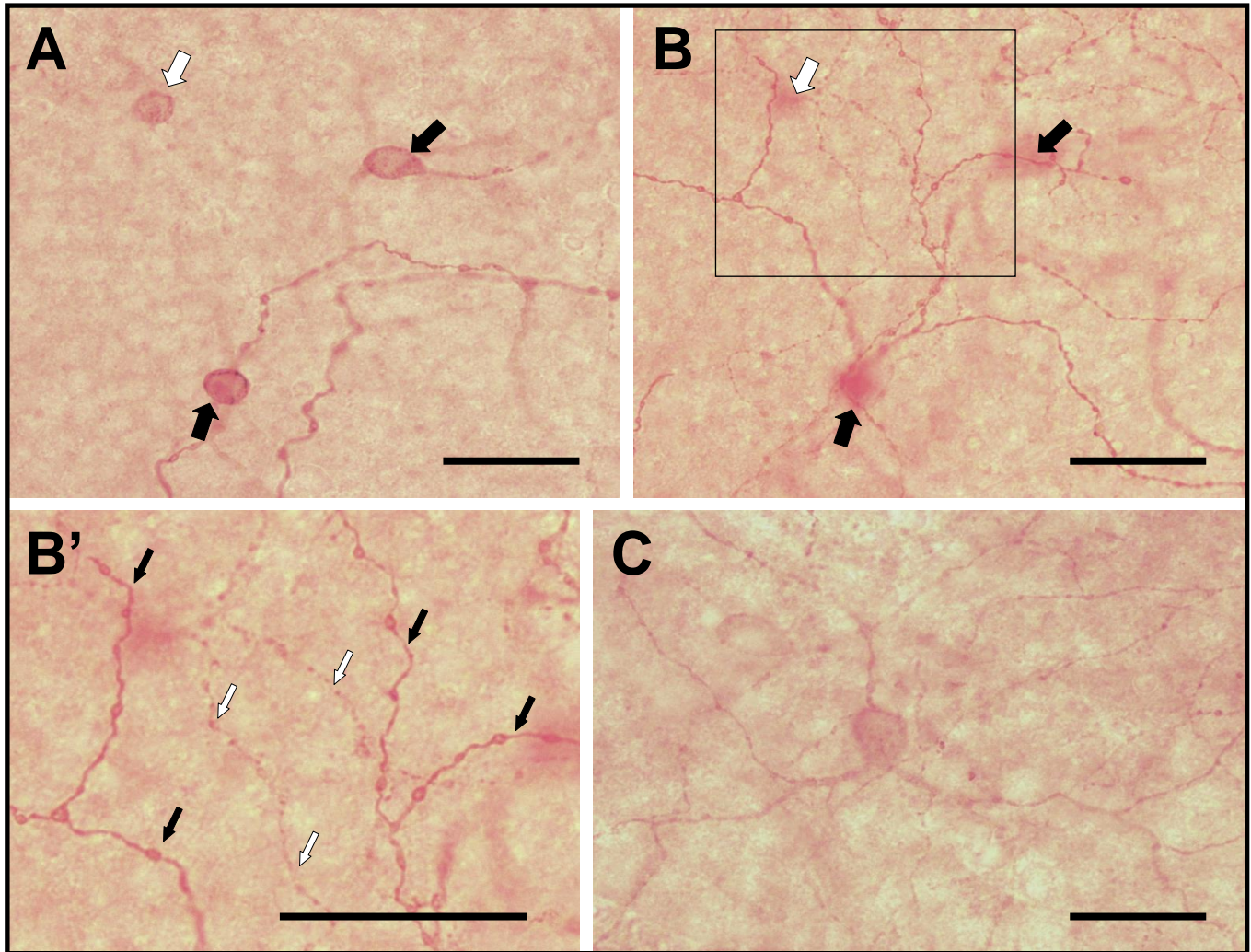


Fig. 4.18. Se muestran varios ejemplos representativos de células de los *clusters* M1, M2 y Mx. A) las flechas negras señalan somas de células M1, intensamente inmunoteñidas; y la flecha blanca, una célula Mx, con una inmunotinción más baja y tamaño de soma ligeramente inferior. B) Con la misma área de la muestra enfocada en la sublámina OFF de la plexiforme interna se observan dos tipos de ramificaciones dendríticas, más gruesas y más finas: las primeras corresponden a neuronas M1 y las segundas a Mx (las flechas señalan los somas en un plano inferior, fuera de foco). El recuadro se muestra ampliado en B', en donde se observan las dendritas gruesas (flechas negras) y finas (flechas blancas), correspondientes a las dos subpoblaciones. En C se muestra una célula M2 cuyas dendritas se ramifican en la sublámina ON de la plexiforme interna, en la que se ha enfocado la muestra para tomar la imagen. (Barra de calibración, 50 μ m)

4.2.3.2. Frecuencias de los tipos dendríticos en el centro de los *clusters*

Se seleccionaron 10 células en torno al centro de cada *cluster* para cada una de las retinas y se determinó a dónde proyectaban sus dendritas. Esta información fue utilizada para determinar los tipos celulares en función de sus dendritas que componen los *clusters* previamente detectados según la intensidad y diámetro (Figs. 4.19, 4.20 y 4.21).

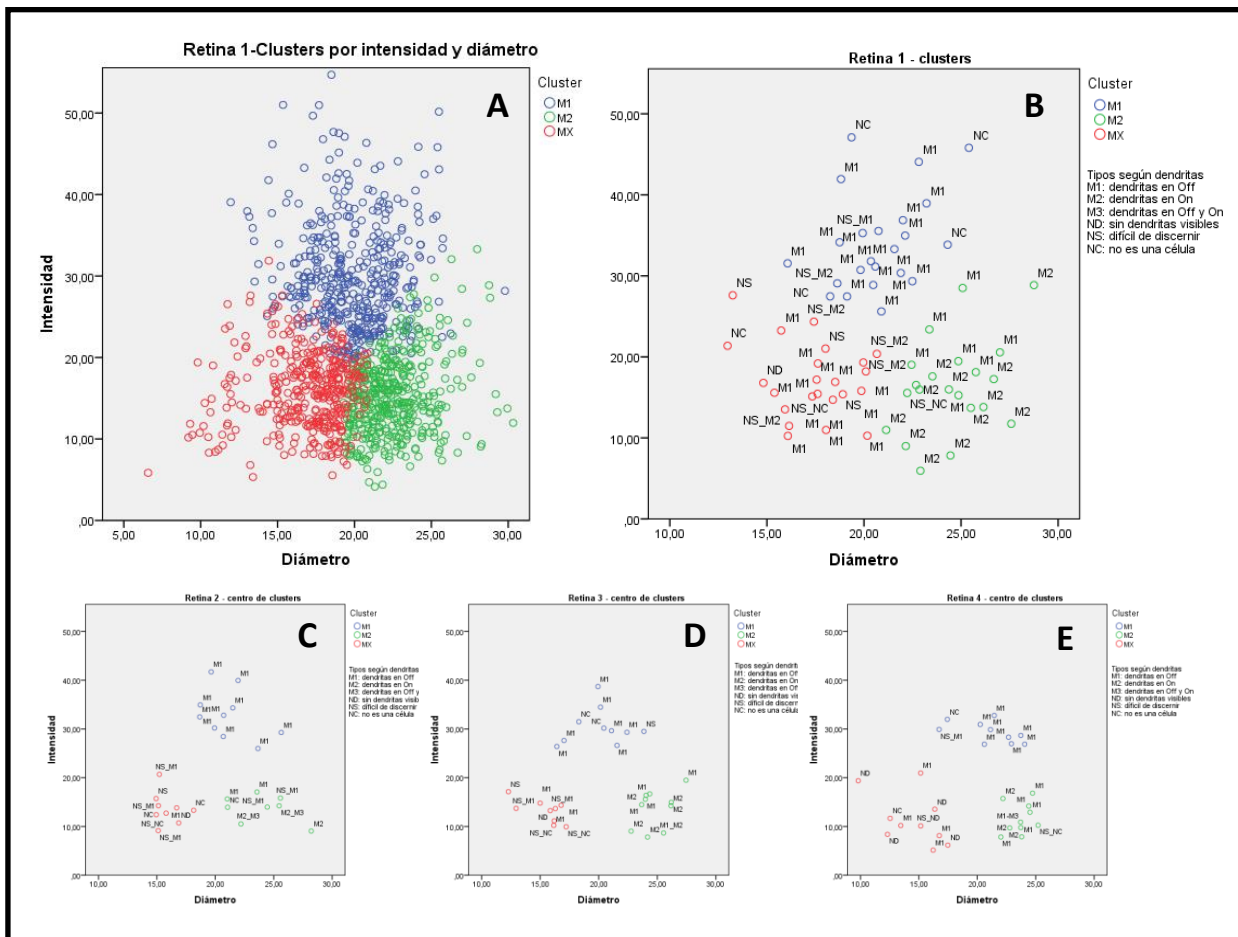


Fig. 4.19. Distribución de los tipos dendríticos en los *clusters* obtenidos por intensidad y diámetro. A) Representación de los *clusters* obtenidos por intensidad y diámetro en la retina 1. M1, en azul; M2, en verde; y Mx, en rojo. B) Distribución de los tipos dendríticos en los *clusters* en la retina 1. C-E) Distribución de los tipos dendríticos en el centro de los *clusters* en las retina 2-4.

La representación gráfica del centro de los *cluster* de las 4 retinas confirma lo observado en el estudio exploratorio de primera retina. Asimismo, los estadísticos descriptivos de los *clusters* confirman las proporciones descritas a partir de dicho análisis exploratorio. El tipo dendrítico M1 se encuentra en mayor proporción en el *cluster* designado como M1 que en los designados como M2 y Mx. El tipo dendrítico M2 se encuentra en mayor proporción en el *cluster* designado M2 que en los designados como M1 y Mx. El tipo dendrítico M3 se encuentra solo en el *cluster* designado como M2. Los tipos dendríticos ND y NS se encuentran en mayor proporción en el *cluster* designado como Mx que en los M1 y M2. La proporción de artefactos, NC, es escasa y no varía entre *clusters*.

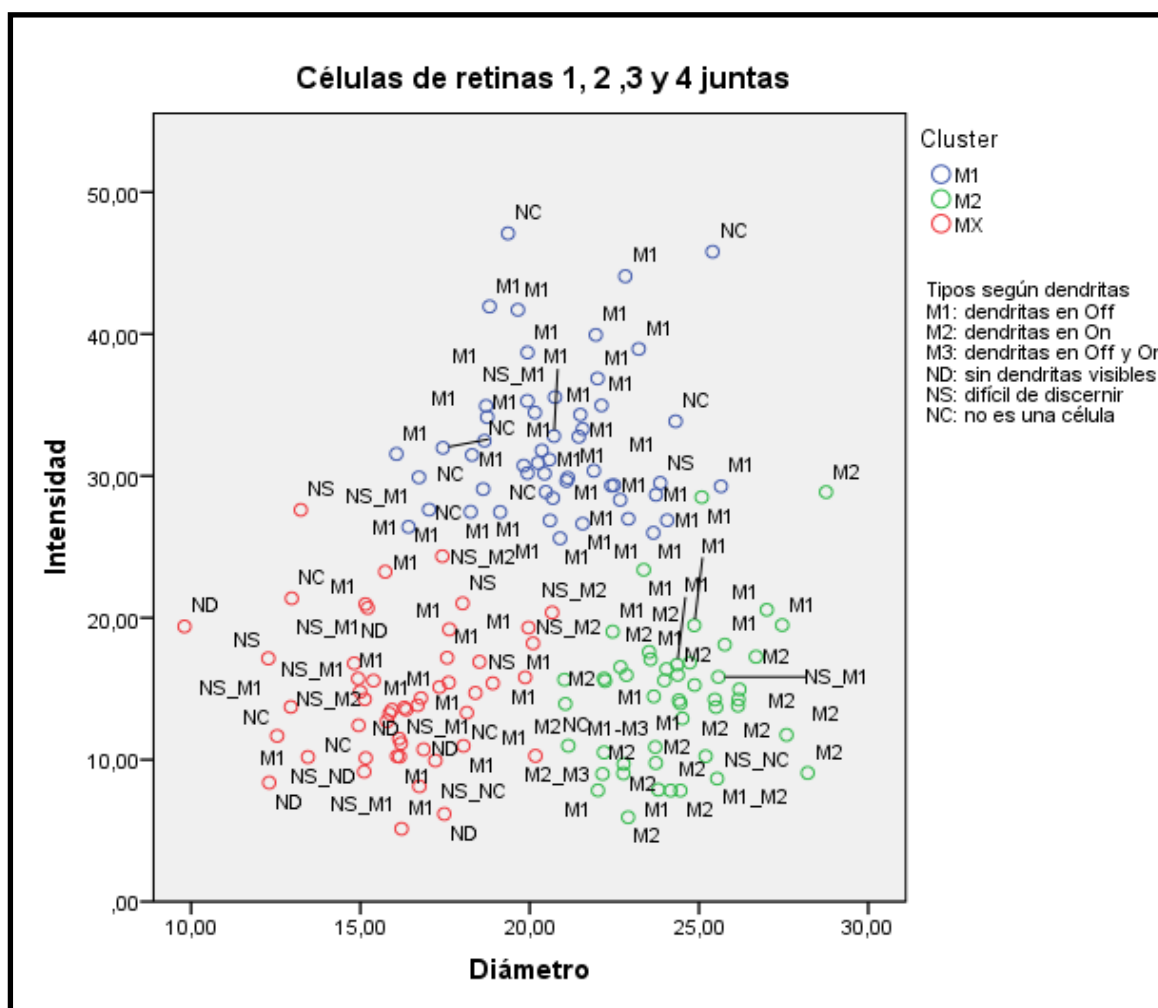
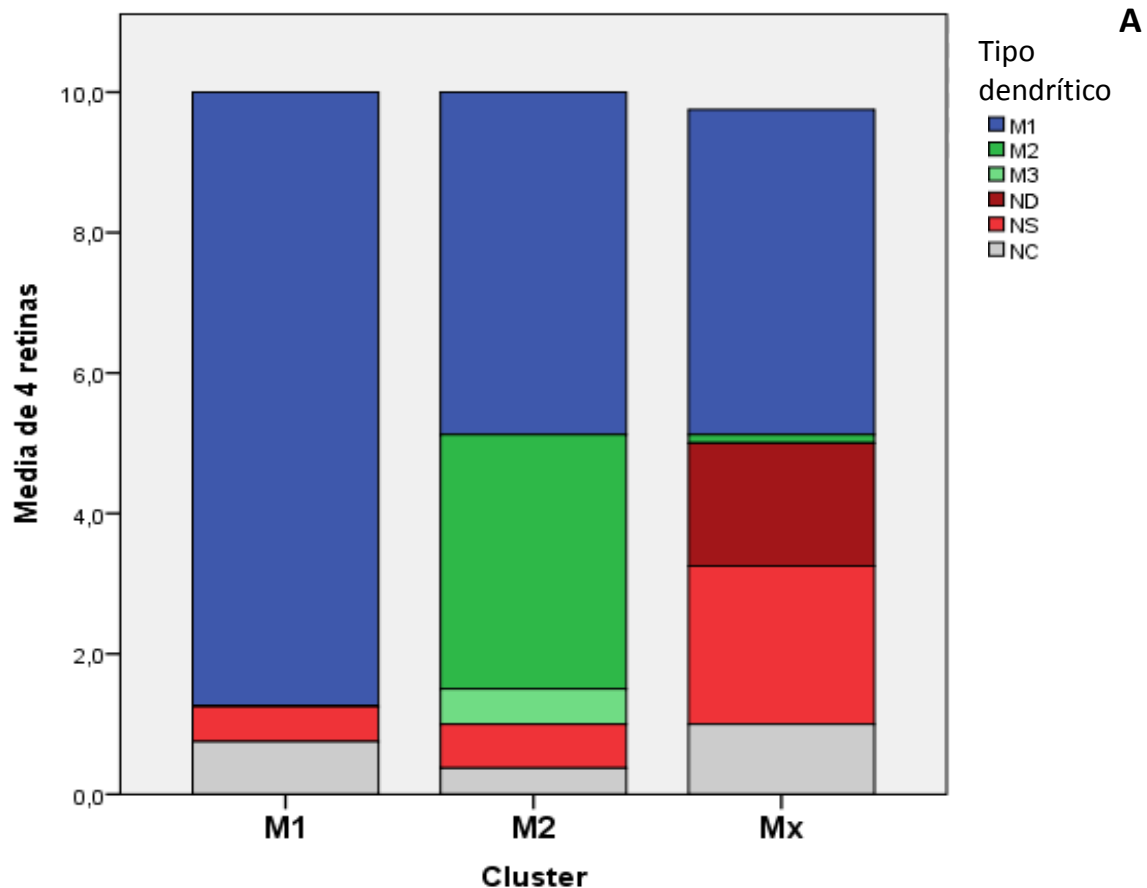


Fig. 4.20. Distribución conjunta para las 4 retinas de los tipos dendríticos en los *clusters* obtenidos por intensidad y diámetro. Se observa gran pureza de M1 en su *cluster*, mezcla de M1 y ND/NS en el *cluster* Mx, mezcla de M1 y M2 en la parte superior del *clusters* M2 y pureza de M2 en la parte inferior del *cluster* M2.

Tipos celulares dendríticos de los clusters por diámetro e intensidad



Poblaciones de ipRGC						
Tipo dendrítico	Cluster M1		Cluster M2		Cluster Mx	
	%	Desv.	%	Desv.	%	Desv.
M1	94.59	12.24	50.65	3.99	52.86	16.01
M2	0.00	0.00	37.66	12.45	1.43	2.50
M3	0.00	0.00	5.19	5.89	0.00	0.00
ND	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	18.48
NS	5.41	3.78	6.49	3.99	25.71	8.66
NC	8.11	8.86	3.90	3.99	11.43	10.80

Fig. 4.21. Composición de los tipos dendríticos de los *clusters* M1, M2 y Mx. A) Diagrama de barras apiladas de cada *cluster*. B) Porcentaje medio y desviación estándar de las 4 retinas para cada tipo dendrítico en cada *cluster*.

4.2.3.3. Separación de los tipos dendríticos M1 y M2

Se seleccionaron 10 células M2 sobre la preparación de cada retina en base a su tipo dendrítico y se buscó su posición correspondiente en los *clusters* de su retina designados por diámetro e intensidad. Se utilizaron estas células combinadas con las observadas para determinar el centro de los *clusters* y buscar la separación de los tipos dendríticos M1 y M2 según intensidad y diámetro. Como aproximación lineal, se utilizó la regresión logística, y como no lineal, el árbol de decisión

Regresión logística

Utilizando todas las células de los tipos dendríticos M1 y M2 obtenemos una ecuación de regresión logística con estos coeficientes: constante=-6.1, Intensidad*diámetro=0,003. Esta ecuación tiene una capacidad de predicción del 84% entre todas las células de tipo dendrítico M1 y M2.

Utilizando las células de los tipos dendríticos M1 y M2 solo del *cluster* designado M2 según intensidad y diámetro obtenemos una ecuación de regresión con estos coeficientes: constante=8, Intensidad*diámetro=0,023. Esta ecuación tiene una capacidad de predicción del 74% entre las células del *cluster* designado por intensidad y diámetro como M2.

Árboles de decisión

El árbol de decisión para los tipos dendríticos M1 y M2 para todas las células muestra tres tipos principales de nodos (Precisión del 86%) (Fig. 4.22):

- Por encima de cierta intensidad y debajo de cierto diámetro se encuentra la mayoría de M1. Además, M1 ocupa en exclusividad los valores extremos de máxima intensidad y de menor diámetro.

- Por debajo de cierta intensidad y encima de cierto diámetro se encuentra la mayoría de M2.

- En los valores más intermedios de diámetro e intensidad entre la mayoría de M1 y de M2 se encuentran nodos híbridos.

El árbol de decisión para los tipos dendríticos M1 y M2 limitado a las células de los *clusters* designados como M1 y M2 según su diámetro e intensidad muestra tres tipos principales de nodos (85% de precisión) (Fig. 4.23) :

- Por debajo de cierta intensidad se encuentran las M2.
- Por encima de cierta intensidad se encuentran las M1.
- Entre ambas intensidades se encuentra una mezcla de M1 y M2.

El árbol de decisión para los tipos dendríticos M1 y M2 limitado a las células del *cluster* designado M2 según su diámetro e intensidad muestra tres tipos principales de nodos (85% de precisión) (Fig. 4.24):

- Por debajo de cierta intensidad se encuentra la mayoría de M2. Las M2 también son mayoría a partir de cierto diámetro.
- Las M1 y M2 crean un *cluster* híbrido en los valores más altos de intensidad y diámetros más bajos.

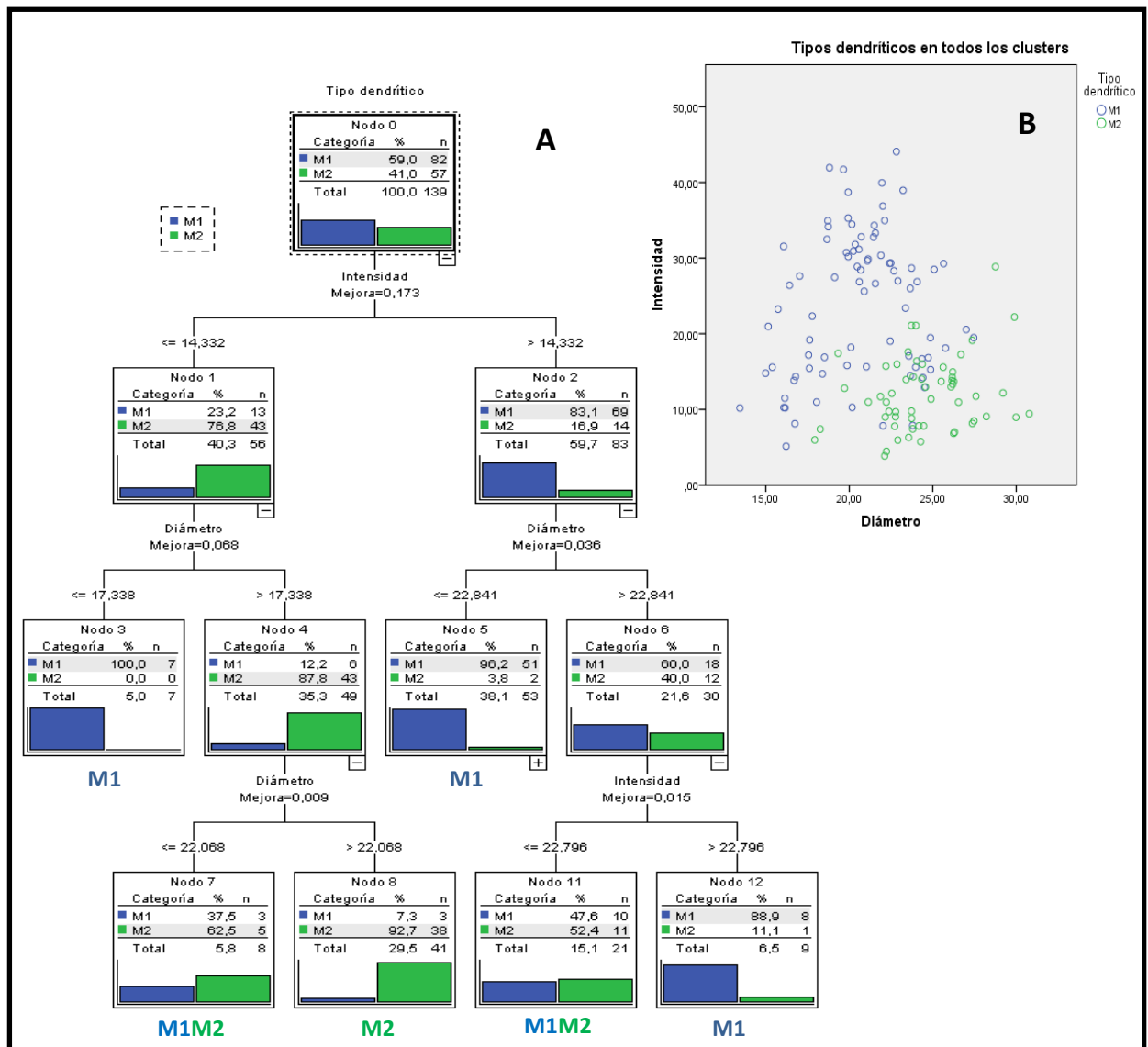


Fig. 4.22. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en función de todos los *clusters* por diámetro e intensidad. A) Árbol de decisión. Se observan tres tipos principales de nodo: M1 puro, M2 puro y M1-M2 híbrido. B) Representación en diagrama de dispersión de puntos por intensidad y diámetro. Se observa una zona de puntos azules izquierda-superior de pureza M1, una zona inferior-derecha de pureza M2 y una zona intermedia híbrida M1-M2.

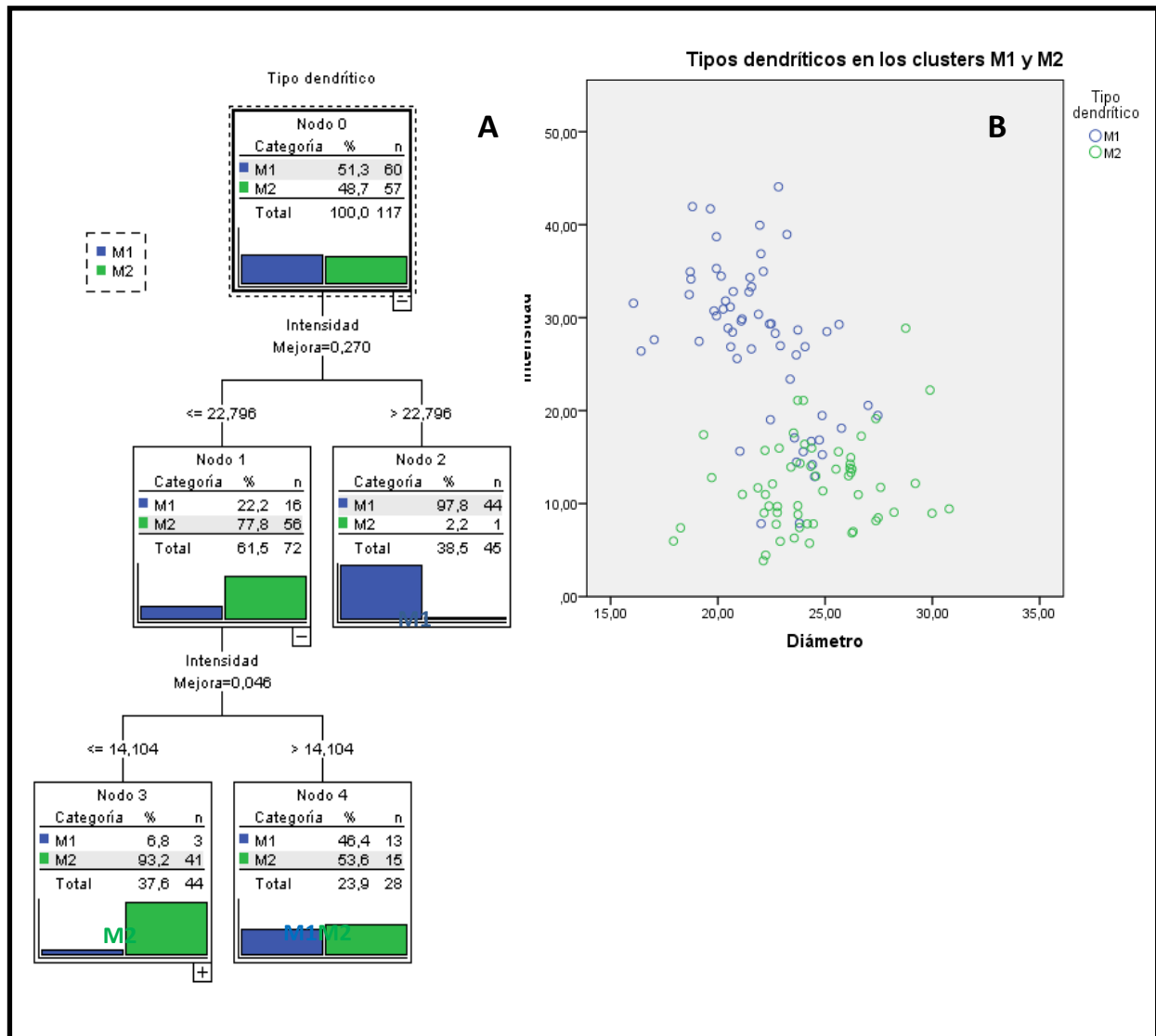


Fig. 4.23. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en función de los *clusters* M1 y M2, excluyendo el *cluster* Mx, por diámetro e intensidad. A) Árbol de decisión. Se observan tres tipos principales de nodo: M1 puro, M2 puro y M1-M2 híbrido. B) Representación en diagrama de dispersión de puntos por intensidad y diámetro. Se observa una zona de puntos azules izquierda-superior de pureza M1, una zona inferior-derecha de pureza M2 y una zona intermedia híbrida M1-M2.

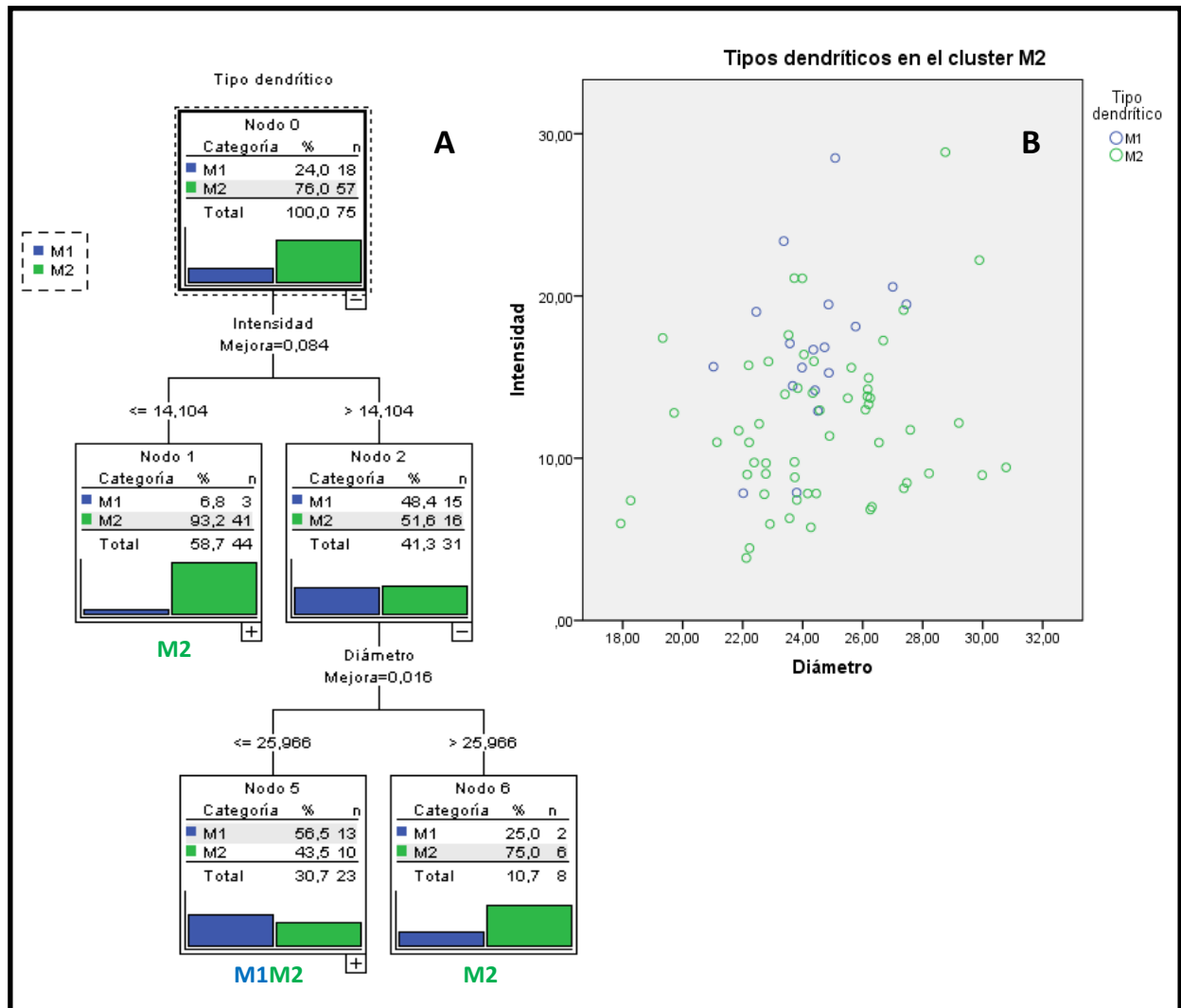


Fig. 4.24. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y M2 en función exclusivamente del *cluster* M2 por diámetro e intensidad. A) Árbol de decisión. Se observan dos tipos principales de nodo: M2 puro y M1-M2 híbrido. B) Representación en diagrama de dispersión de puntos por intensidad y diámetro. Se observa una zona inferior-derecha de pureza M2 y una zona superior-izquierda híbrida M1-M2.

4.2.3.4. Composición del *cluster* Mx

Para analizar la composición del *cluster* Mx se realizó un árbol de decisión utilizando como variable dependiente el tipo dendrítico y como posibles variables predictoras: diámetro, intensidad. En este caso, se utilizó, por un lado, el tipo dendrítico M1 y, por otro, el tipo NS_ND, que incluye aquellos casos en los que no se observaban dendritas y aquellos en los que no se podía decidir en base a estas el tipo dendrítico. Se encontraron principalmente nodos híbridos M1-NS_ND y un pequeño nodo NS_ND (Fig. 4.25) (Precisión del 65%).

El contenido del *cluster* Mx es principalmente híbrido y homogéneo entre las células en las que se aprecia arborización dendrítica M1 y las células en las que no se distinguen claramente las dendritas. Se observa que la intensidad dentro del *cluster* Mx no parece influir en que se observen o no las dendritas. De igual manera, se observa cierta tendencia al enriquecimiento en M1, según aumenta el diámetro, al acercarse al diámetro de M1.

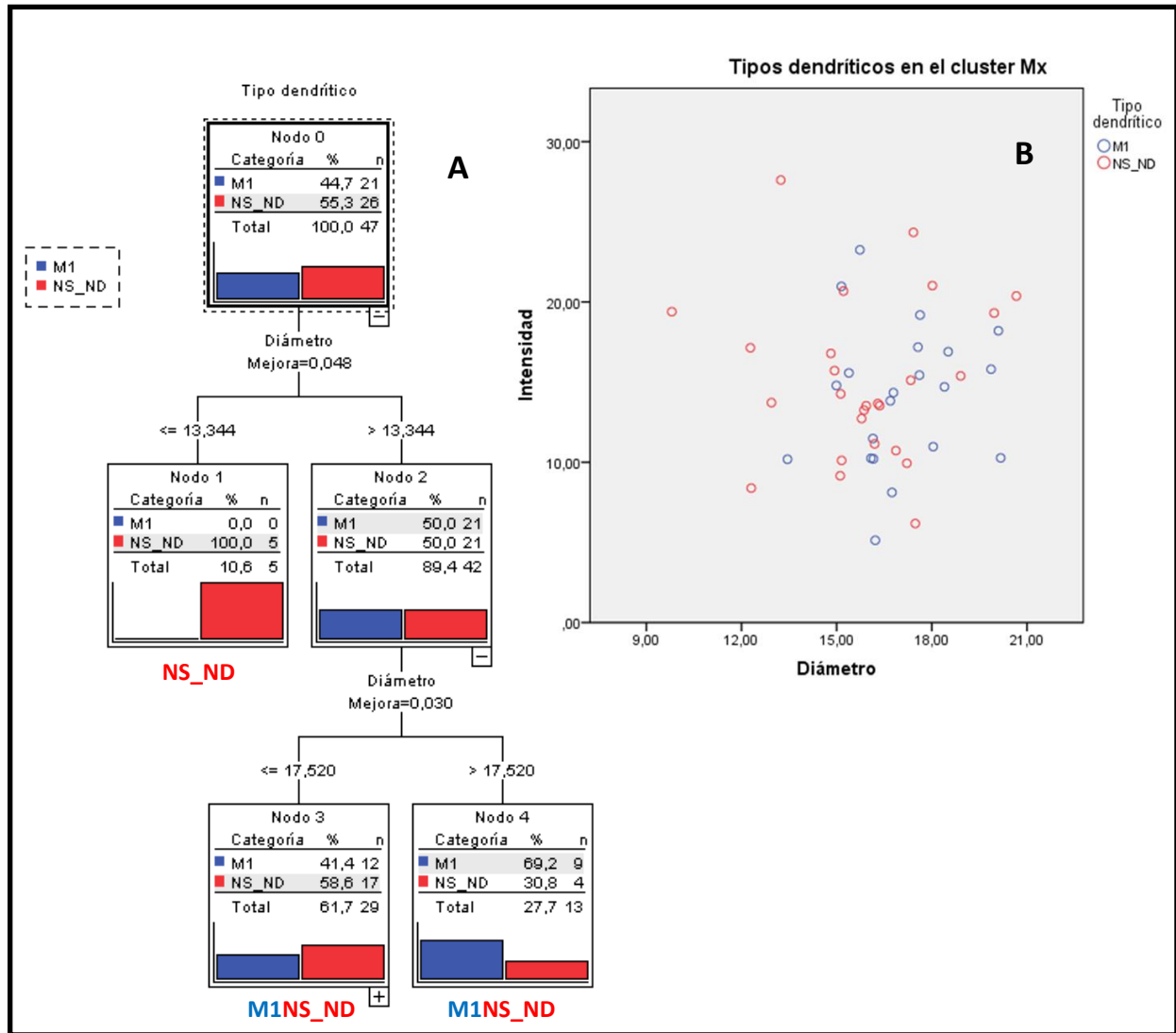


Fig. 4.25. Discriminación de los tipos dendríticos M1 y NS_ND en función exclusivamente del *cluster* Mx por diámetro e intensidad. A) Árbol de decisión. Se observan principalmente nodos híbridos M1-NS_ND y un pequeño nodo (n=5) para el menor diámetro. Se observa cierta tendencia al aumento del tipo NS_ND al disminuir el diámetro. B) Representación en diagrama de dispersión de puntos por intensidad y diámetro. Se observa cierta tendencia al enriquecimiento de NS_ND a bajos diámetros y de M1 al aumentar el diámetro.

4.2.3.5. Un modelo global según intensidades arbitrarias

Para determinar un modelo global se realizó un árbol de decisión para todos los *clusters* utilizando como variable dependiente el tipo dendrítico (M1, M2 y NS_ND) y como posibles variables predictoras el diámetro y la intensidad (Fig. 4.26) (Precisión del 73%).

Partición primaria

Se encontraron 3 nodos principales que coinciden con los determinados indirectamente mediante análisis de *cluster* solo con diámetro e intensidad. La primera separación ocurre en función de la intensidad, separando, por un lado, el *cluster* M1, y, por otro, el M2 y el Mx. La siguiente separación ocurre por diámetro entre M2 y Mx.

El nodo de M1 presenta una gran mayoría de células M1 y algunas células con dendritas difíciles de determinar. El nodo de M2 presenta una gran mayoría de células M2, algunas células M1 y algunas células con dendritas difíciles de determinar. El nodo Mx presenta prácticamente mitad de células con dendritas difíciles de determinar y mitad de M1, y alguna M2 de la zona de contacto con el *cluster* M2.

Partición secundaria

El nodo de M1 presenta una parte de gran pureza de células M1 y otra pequeña de contacto con MX con mitad de células con dendritas difíciles de determinar. El nodo de M2 presenta una zona de gran mayoría de células M2 y otra parte más cercana al *cluster* M1 con casi tantas células M1 como M2. El nodo MX presenta una zona de células con dendritas tipo M1 y una cantidad ligeramente inferior con dendritas más difíciles de determinar, y otra zona en la que predominan las dendritas más difíciles de determinar sobre las M1.

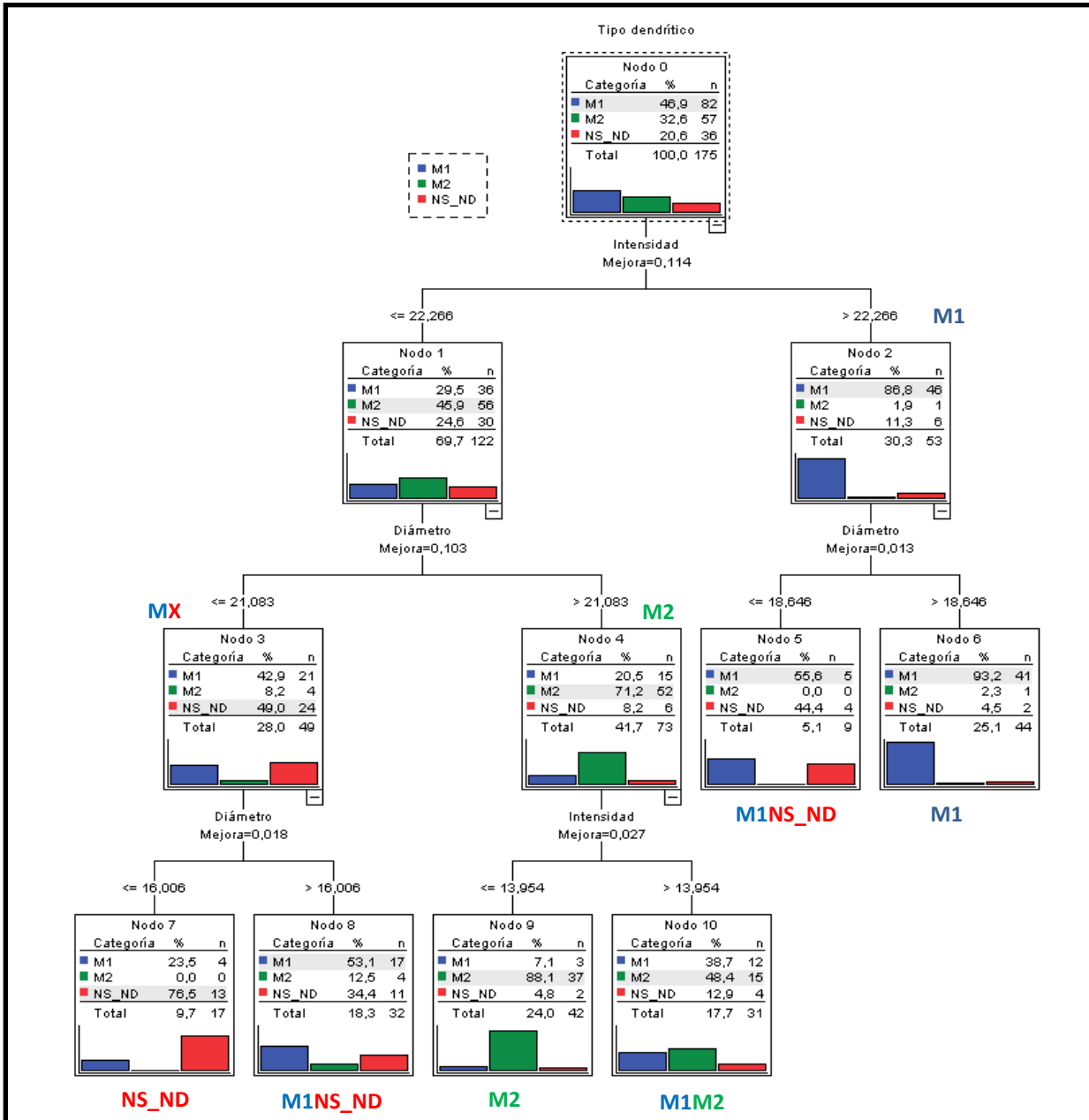


Fig. 4.26. Árbol de decisión según los tipos dendríticos M1, M2 y NS_ND en función de todos los clusters por diámetro e intensidad. Una primera división por intensidad separa el cluster M1 puro (nodo 2) del resto de tipos (nodo 1). Una siguiente división por diámetro separa el nodo 1 en el cluster M2 (nodo 4) y el cluster Mx (nodo 3). Una siguiente división por diámetro separa el cluster M1 en un cluster mayoritario de gran pureza (nodo 6) y un pequeño cluster más próximo a Mx (nodo 5). El cluster M2 se divide por intensidad en un cluster de gran pureza de M2 y otro híbrido M1-M2. El cluster Mx se divide por diámetro en una zona de menor diámetro más enriquecida en NS_ND y en una de mayor diámetro con mayor proporción de M1.

4.2.3.6. Un modelo global según intensidades percentiles

Para estandarizar el modelo realizamos un árbol de decisión en el que el valor arbitrario de intensidad de cada célula fue sustituido por su intensidad percentil, es decir, la posición ordinal que ocuparía si ordenásemos la células por intensidad. Como resultado se obtuvieron básicamente cuatro tipos de *clusters*: *clusters* de gran pureza de M1, *clusters* de gran pureza de M2, *clusters* híbridos de M1 y M2, y *clusters* mezcla de M1 y NS_ND. Este modelo básicamente define los *clusters* M1, M2 y Mx, y divide el *cluster* M2 en dos partes, una pura y otra mezclada con M1 (Fig. 4.27) (73% precisión).

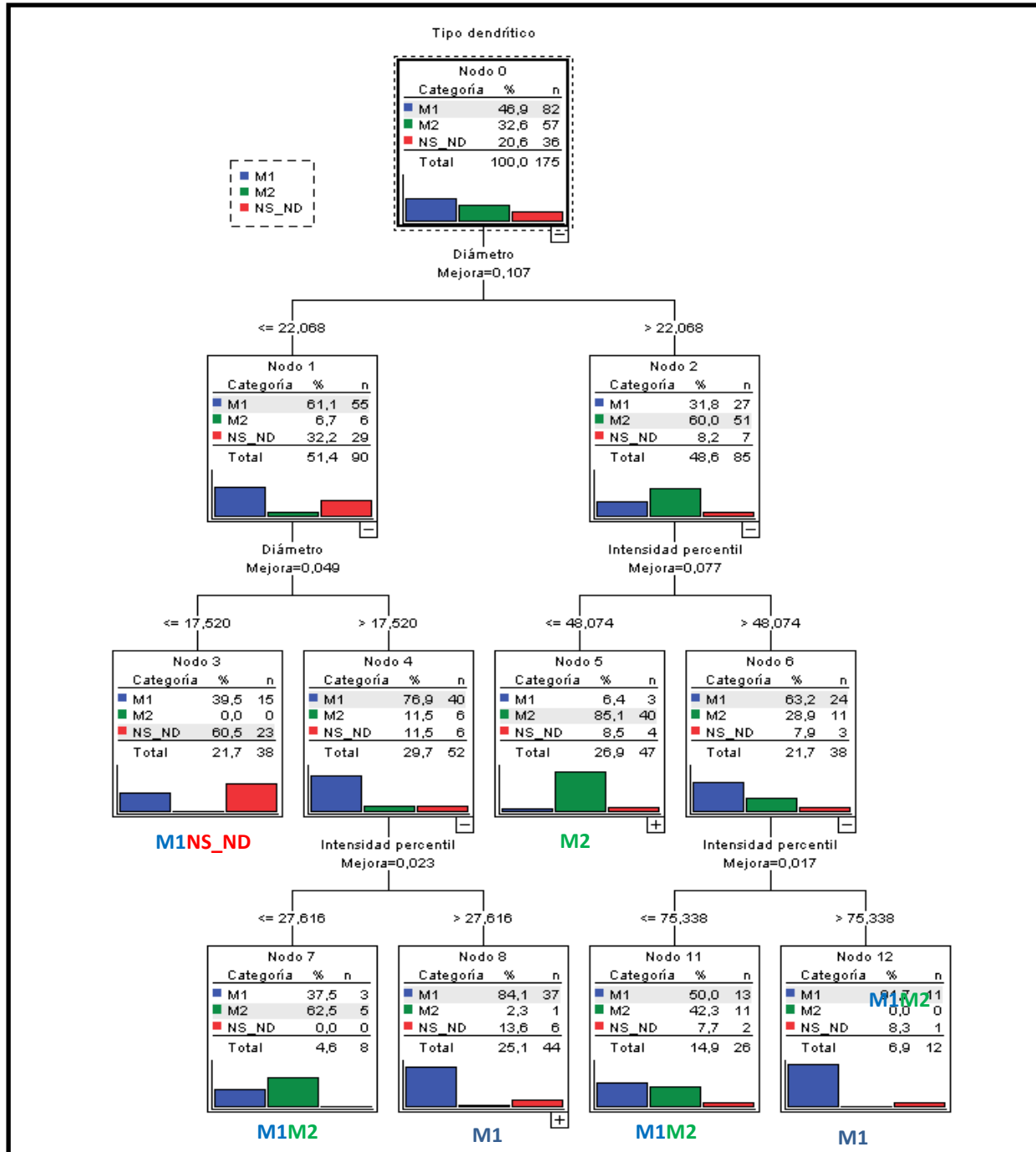


Fig. 4.27. Árbol de decisión según los tipos dendríticos M1, M2 y NS_ND en función de todos los *clusters* por diámetro e intensidad percentil. En este caso, la secuencia de división no es tan intuitiva, pero sí el resultado. Se encuentran 4 tipos de *clusters* que corresponden a los *clusters* M1, Mx, M2-puro y M2 parte híbrida M1-M2.

4.2.3.7. No detección de las zonas híbridas solo por análisis de cluster con intensidad y diámetro

Para comprobar si los parámetros de diámetro e intensidad por si solos eran capaces de describir un modelo para más de tres *clusters* que coincida con lo observado en función de los tipos dendríticos realizamos un análisis de *cluster* buscando cuatro *clusters*. Mientras que en el caso de tres *clusters* se había encontrado homogeneidad de criterio para separarlos (Fig. 4.11), en este caso se pierde dicha homogeneidad. Al buscar 4 *clusters*, en todos los casos se encontró uno de menor tamaño y poca intensidad (Mx) y uno de mayor tamaño y poca intensidad (M2), pero los otros 2 variaban de posición y composición alterando toda la estructura de la distribución de los mismos (Fig. 4.28).

Imitando la distribución de los árboles realizamos una *clusterización* primaria con 3 *clusters* (M1, M2, Mx) y, a continuación, una *clusterización* secundaria de cada uno de los *clusters* primarios, tanto en 2 *clusters* como en *clusters* libres, para buscar un patrón en las retinas analizadas. No se encontró un patrón común y alineado con la designación dendrítica en la formación de *subclusters* para ninguno de los *clusters* designados (Fig. 4.29).

De esta manera, se concluye que el análisis indirecto en función de diámetro e intensidad permite diferenciar los 3 *clusters* M1, M2, Mx, mientras que es necesario el conocimiento directo del árbol de clasificación para determinar los tipos dentro de cada *cluster*. Esto resulta evidente en el *cluster* M2, que tiene dos subgrupos de tipos dendríticos, uno híbrido M1-M2 y otro más puro M2 que no se encuentra solo en función del diámetro y de la intensidad.

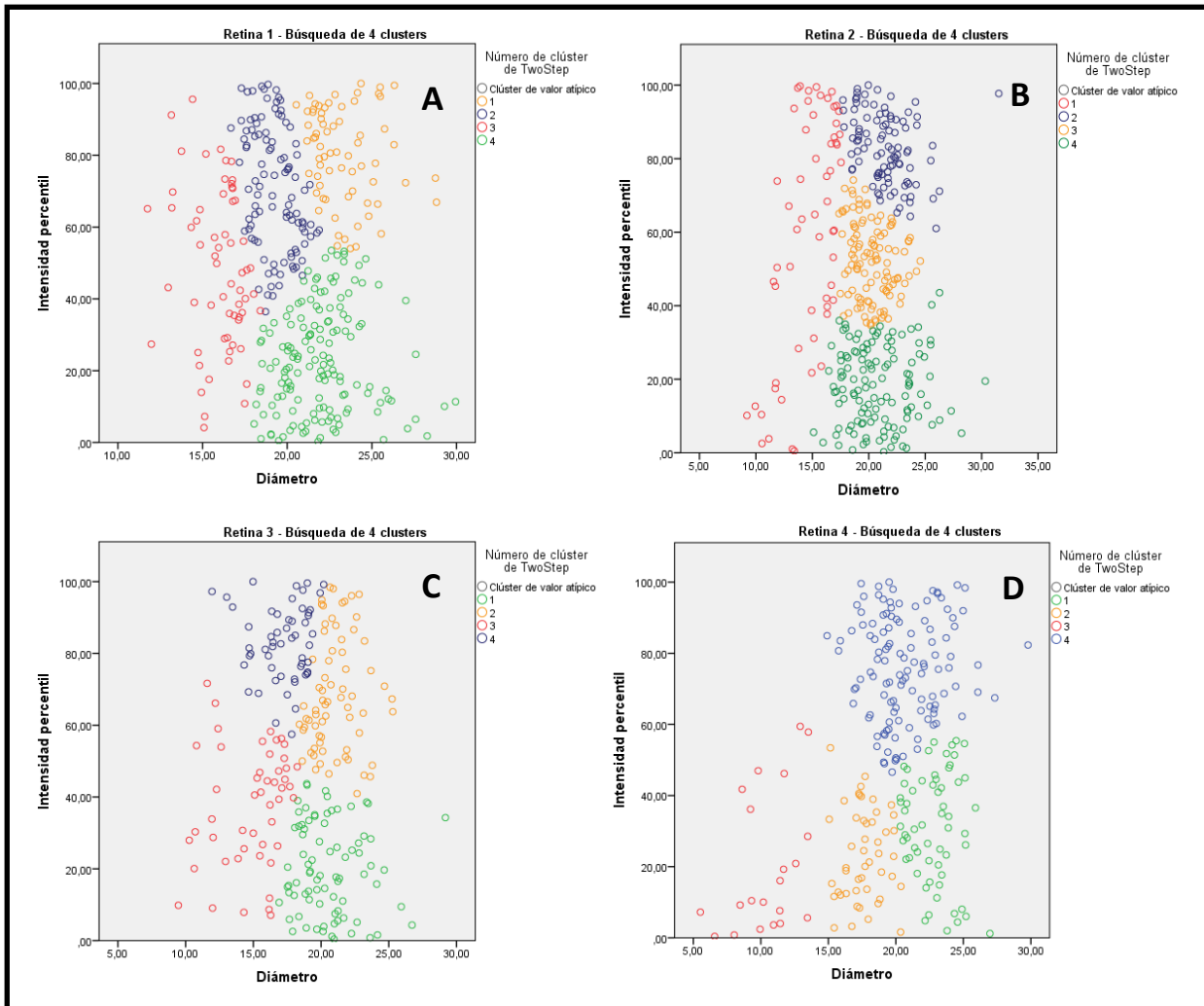


Fig. 4.28. Búsqueda de cuatro *clusters* por intensidad y diámetro para cada retina. A-D) Los *clusters* detectados para las retinas 1-4. Se observa que no existe una distribución común de *clusters* como ocurría con 3 *clusters*. Añadir un *cluster* sin tener en cuenta las dendritas rompe la estructura común a través de las retinas.

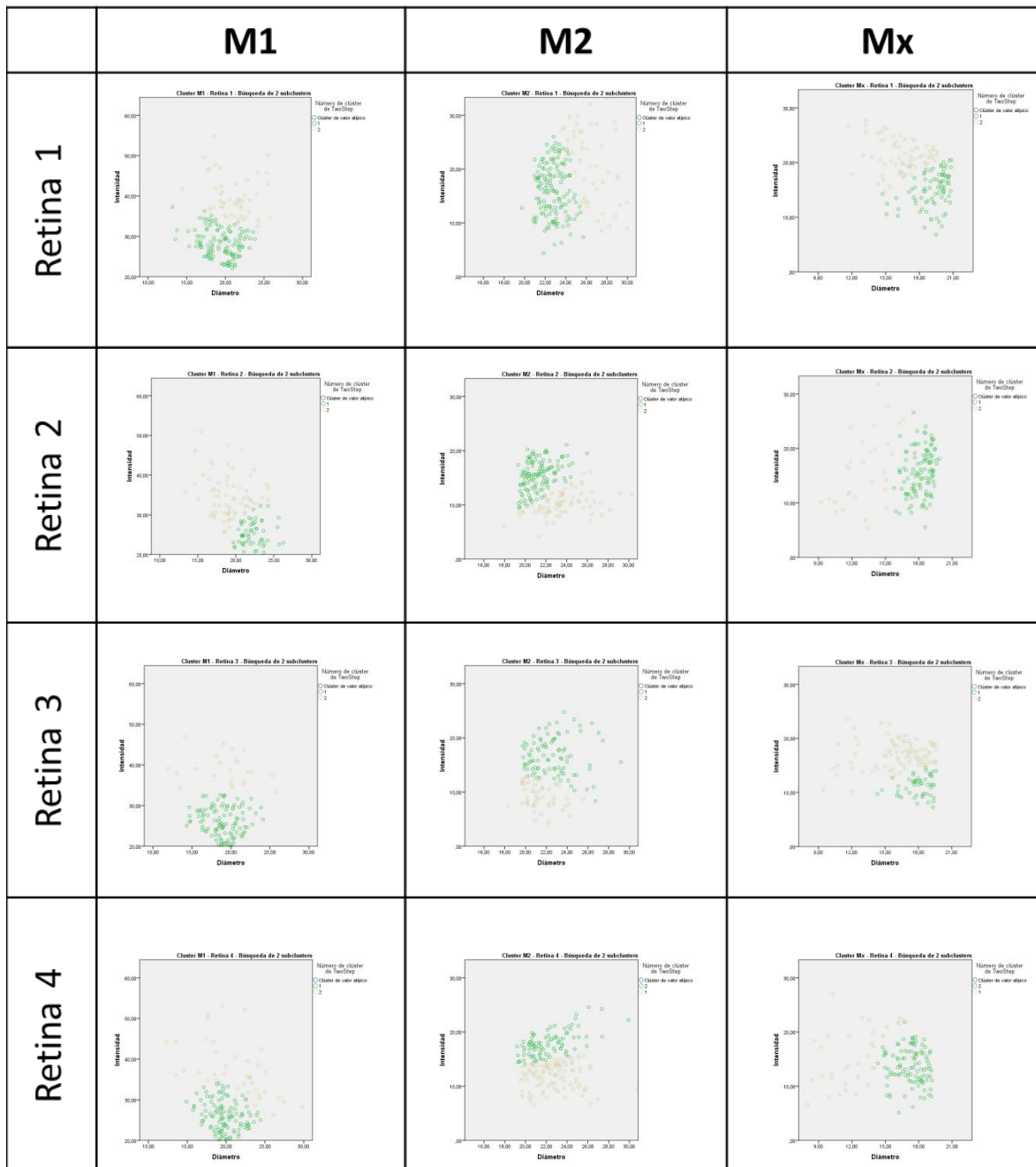


Fig. 4.29. Búsqueda de dos *clusters*, por intensidad y diámetro, dentro de cada *cluster* M1, M2, Mx. Se observa que no existe una distribución común a través de las 4 retinas para ninguno de los 3 *clusters*. El análisis directo por intensidad y diámetro permite detectar los *clusters* M1, M2 y Mx que coinciden con grupos dendríticos, pero no permite detectar las agrupaciones dentro de estos, como ocurre en el caso del *cluster* M2 que tiene un componente dendrítico M2 puro y otro híbrido M1-M2 que no se observa aquí.

4.2.4. Isoformas de la melanopsina

Se midió la expresión de las isoformas L y S de melanopsina a dos horas del ciclo diario, ZT23 y ZT3, esto es, una hora antes y 3 horas después de encenderse la luz, respectivamente. Los ratones sometidos a 3 horas de luz se separaron en dos grupos que fueron expuestos a dos intensidades diferentes: 200 lx y 2000 lx.

Según la literatura las células M1 presentan tanto la isoforma S como la isoforma L, mientras que las células M2 presentan solo la isoforma L. Las células que expresan solo la isoforma L (M2) son más escasas y más difícilmente identificables. Se encontró una proporción 10:1 de células M1 respecto a células M2 (Fig. 4.30 B).

4.2.4.1. El diámetro de M1 y M2

Las células M1 y M2 presentan diferencias altamente significativas en su diámetro. M1 tiene un diámetro promedio de 18,76 y M2 de 17,02 (Figs. 4.37C, E y F). En la literatura se describen las células M2 como células mayores que las M1, al igual que encontramos nosotros en las medidas para proteína total, por lo tanto la asimilación de los tipos M1 y M2 de la bibliografía a la expresión de las isoformas puede no ser correcta. Por ello, pasaremos a llamar a las células M1 o que expresan L y S, tipo celular LS y a las células que expresan solo la isoforma L, posibles M2 o Mx, el tipo celular L (Fig. 4.30 C, E y F).

4.2.4.2. La expresión de la isoforma L entre el tipo LS y el tipo L

Las células LS y L presentan diferencias altamente significativas en sus niveles de expresión de la isoforma L. El tipo celular LS tiene un intensidad promedio de la isoforma L en una escala arbitraria de 16 y el tipo celular S de 7 (Fig. 4.30 D).

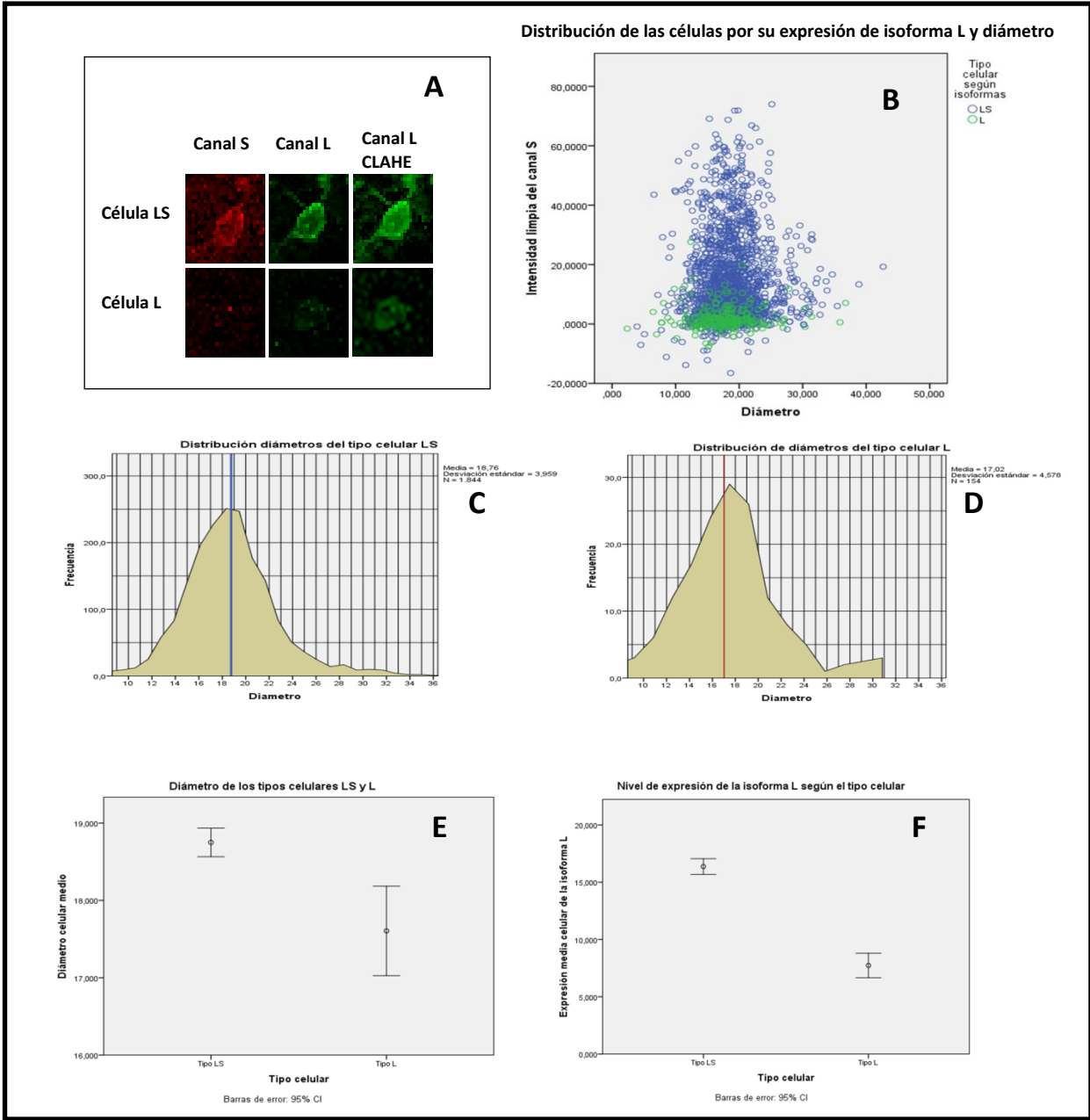


Fig4.30. Las poblaciones celulares LS y L. A) Muestra de 2 células en los canales S, L y L contrastado. La célula superior de tipo LS, presunta M1 y la célula inferior de tipo L, presunta M2. B) Distribución de las células LS y L según su diámetro y expresión de la isoforma L. Se observa las células tipo L entorno al valor 0. C-D) Representación de la distribución de diámetros en las células LS y L correspondientemente. E) Diámetro de las células LS y L, mayor en las primeras. F) Expresión de la isoforma L de las células LS y L, mayor en las primeras.

4.2.4.3. La expresión de la isoforma S en las células LS según la hora y la intensidad lumínica

La expresión de la isoforma S en las células LS tiende a aumentarr ligeramente entre ZT23 y ZT3 a 200lx, pero no de manera significativa. La expresión de S baja ligeramente entre ZT23 y ZT3 a 2000lx, pero no de manera significativa. La expresión de S baja en ZT3 a 2000lx respecto a 200lx de manera significativa. Este tipo de paradoja estadística, se debe a querer establecer un límite fijo de significación para el p-valor, en vez de tomarlo como lo que es, una variable continua de probabilidad. Por tanto, el aumento de la intensidad lumínica provoca un descenso de la cantidad de isoforma S en las células LS (Fig. 4.31A).

4.2.4.4. La expresión de la isoforma L en las células LS según la hora y la intensidad lumínica

La expresión de la isoforma L en las células LS aumenta entre ZT23 y ZT3 a 200lx de manera significativa. La expresión de L sube entre ZT23 y ZT3 a 2000lx de manera significativa, pero en menor medida que a 200lx. El aumento de expresión de L es significativamente mayor a 200lx que a 2000lx. La isoforma L aumenta entre ZT23 y ZT3 y esta subida se ve atenuada por el aumento de intensidad lumínica a 2000lx (Fig. 4.31B).

4.2.4.5. La ratio L/S en las células LS según la hora y la intensidad lumínica

La ratio L/S en las células LS disminuye entre ZT23 y ZT3 a 200lx y a 2000lx de manera significativa. La ratio baja ligeramente más a 2000lx que a 200lx, si bien la diferencia no llega a ser significativa (Fig. 4.31D).

4.2.4.6. La expresión de la isoforma L en las células L según la hora y la intensidad lumínica

La expresión de la isoforma L en las células L sube entre ZT23 y ZT3 a 200 lx y 2000 lx de manera significativa. La expresión de L sube en la misma medida a ambas intensidades. La subida en misma medida de la isoforma L a distintas intensidades indica

que en las células tipo L ocurre un proceso de aumento regulado internamente, no por la intensidad lumínica (Fig. 4.31 C).

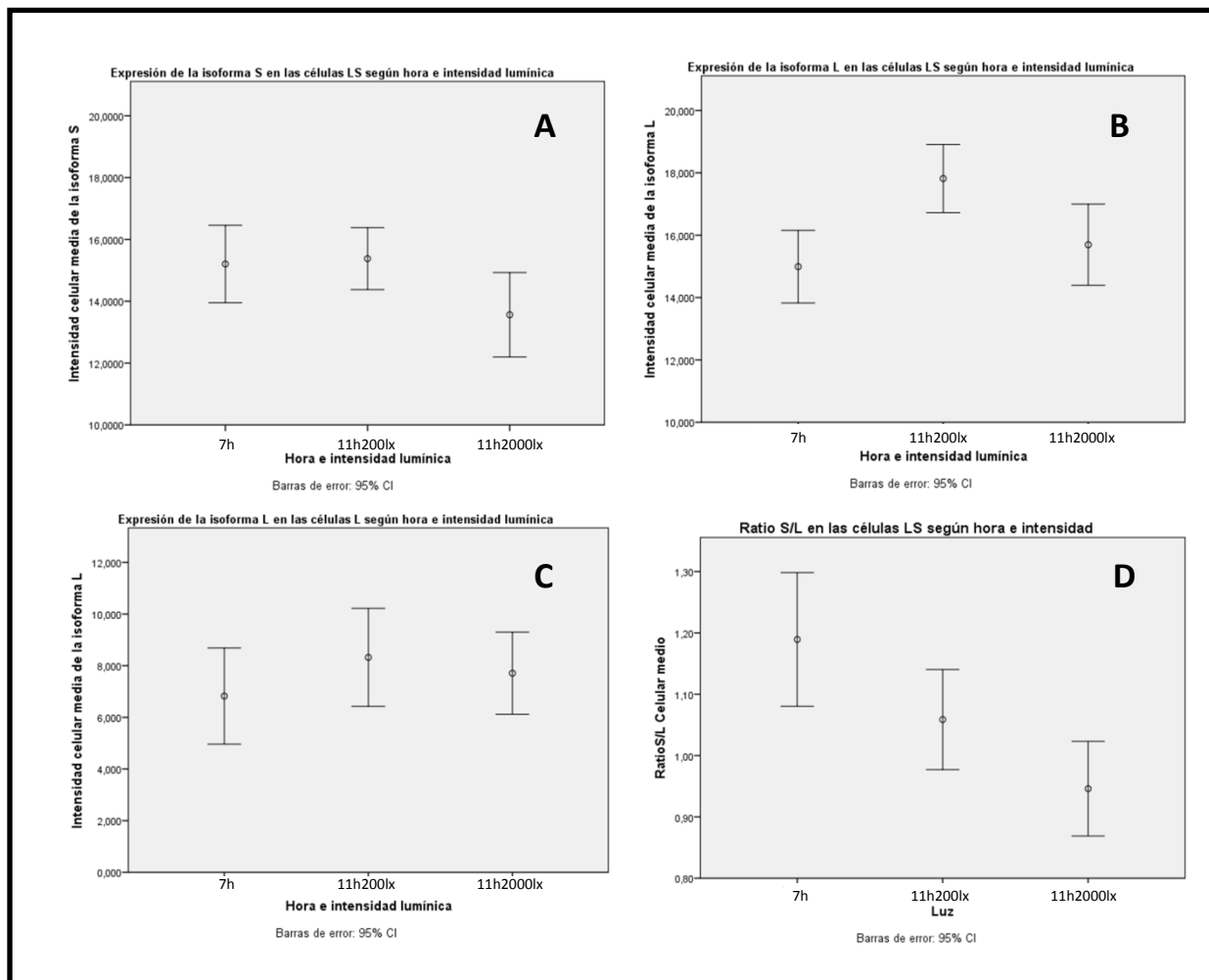


Fig 4.31. Expresión de las isoformas L y S de melanopsina en los tipos LS y L a las ZT23 y a las ZT3 tras pasar 3 horas a 200lx o 2000lx. A) Expresión de la isoforma S en las células LS. B) Expresión de la isoforma L en las células LS. C) Expresión de la isoforma L en las células L. D) Ratio de la expresión de las isoforma S y L en las células LS.

4.2.4.7. Variación del número de células LS y células L según la hora e intensidad lumínica

El número de células LS y L no varía estadísticamente entre las condiciones de ZT23 y ZT3 a 200 lx y ZT3 2000 lx. Gráficamente, se observa un ligero descenso a 2000lx del número de células LS. No obstante, el análisis mostró que la diferencia no era

significativa, aunque quedaba muy cerca de serlo. El número de células L no varía significativamente entre las dos condiciones analizadas (Fig. 4.32).

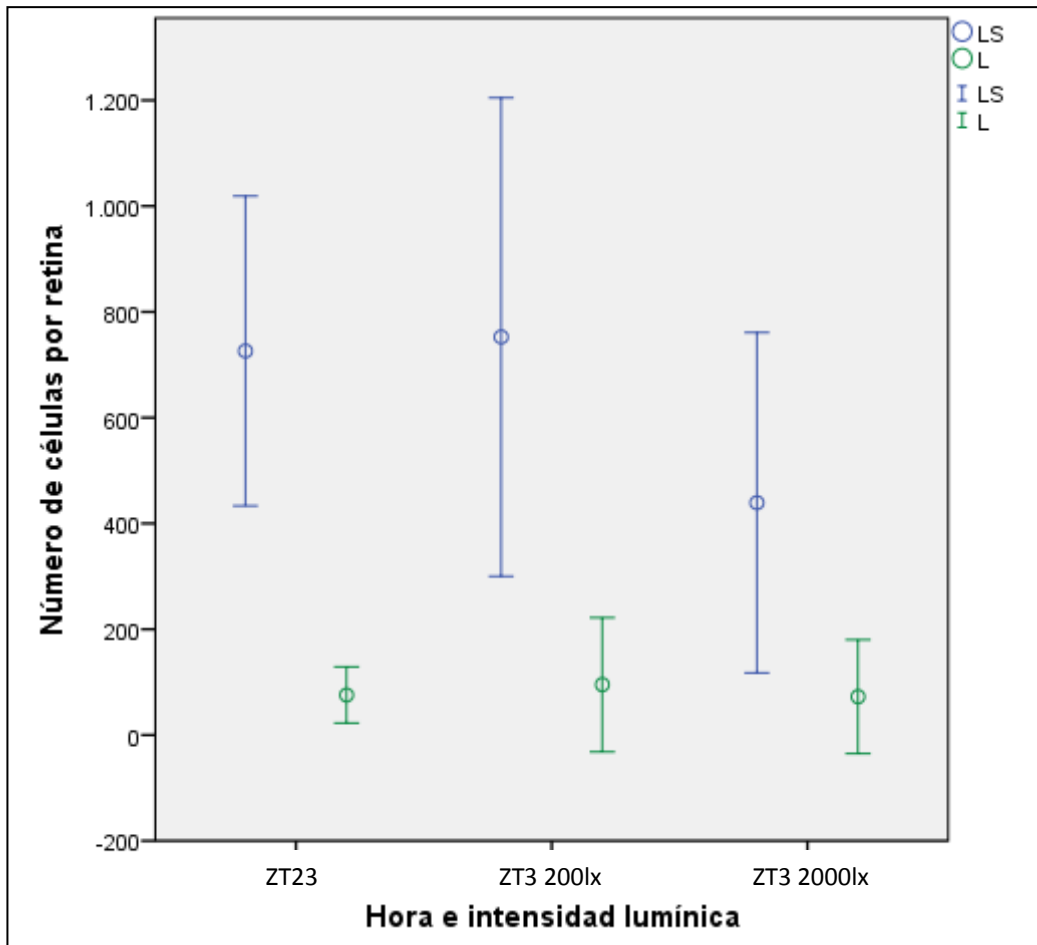


Fig. 4.32. Representación del número de células por retina de las poblaciones celulares L y LS según hora e intensidad lumínica.

4.2.5. Variación de los subtipos de ipRGC en retinas in vitro (luz frente a oscuridad)

Las retinas extraídas de ratones C3H *rd/rd* sacrificados en ZT23 se mantuvieron en cultivo organotípico en oscuridad hasta ZT0 y, posteriormente, desde ZT0 a ZT3 un grupo se mantuvo en oscuridad, mientras que otro se sometió a una iluminación de 200lx. Una vez inmunomarcadas, se cuantificó en ellas el número de células M1, M2 y Mx y sus niveles de expresión de melanopsina.

4.2.5.1. Variación del número de células por tipo según la luz

Dentro de los tipos de ipRGC la proporción de células del tipo M2 aumenta en oscuridad respecto a luz, no así los subtipos M1 y Mx (Fig.4.33 y Fig.4.34).

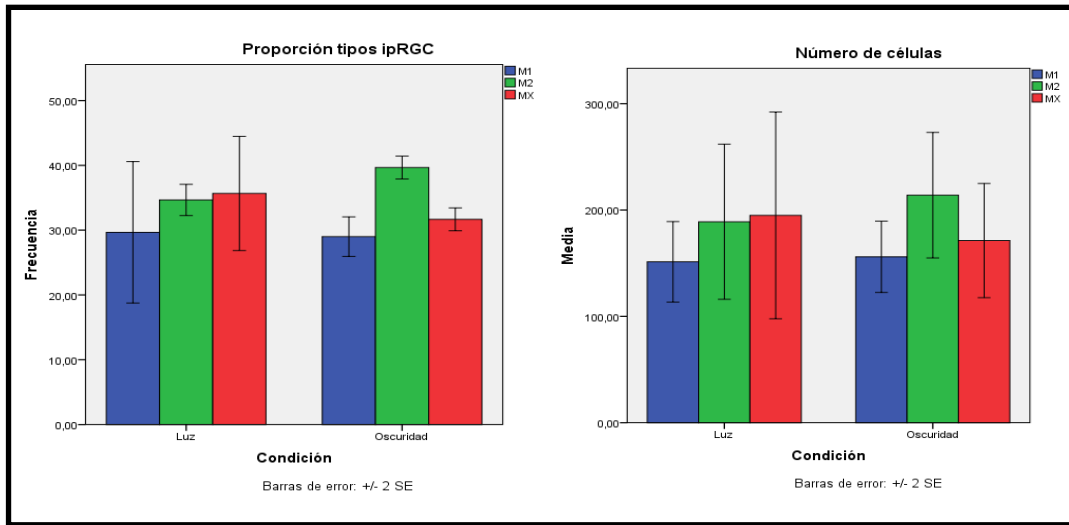


Fig. 4.33. Las frecuencias, en proporción y número total de células, de los distintos tipos de ipRGC en las 3 retinas expuestas a luz (izquierda) y en las 3 expuestas a oscuridad (derecha). Se puede observar una frecuencia superior de M2 en oscuridad.

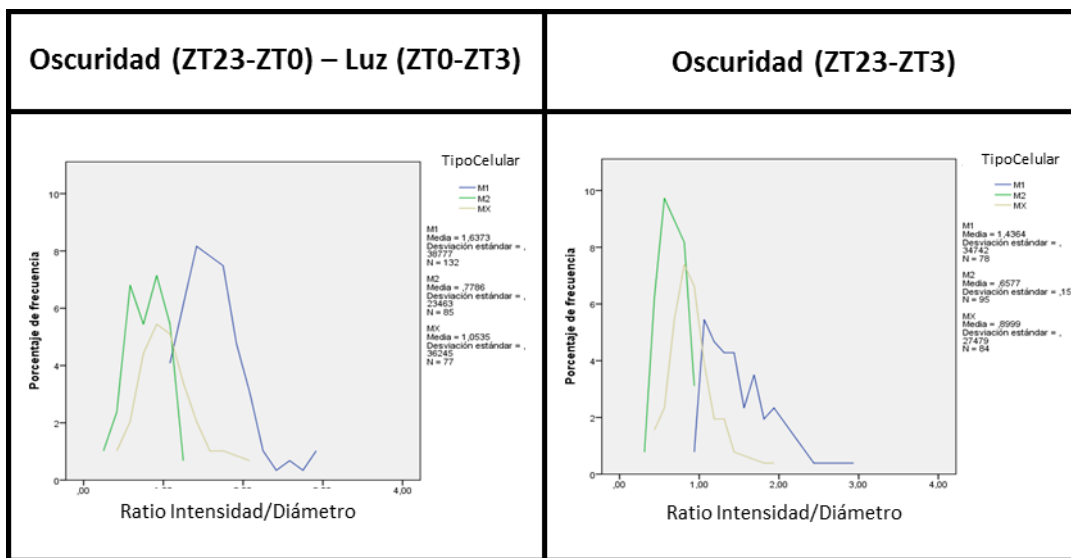


Fig. 4.34. Representación de las frecuencias de aparición (la proporción) de ipRGC según la ratios intensidad/diámetro mostrado según los tipos celulares en 2 retinas representativas de un mismo individuo según las condiciones a las que fueron expuestas in vitro. Se puede ver un ascenso de la proporción de células M2 en las retinas que se mantuvieron en oscuridad entre ZT0 y ZT3.

4.2.5.2. Variación de la intensidad de inmunomarcaje en los subtipos de ipRGC (luz frente a oscuridad)

Solo en las células M2 se encuentra una variación significativa y constante en las retinas de todos los individuos estudiados en la intensidad de inmunomarcaje (lo cual es un reflejo de los niveles de expresión de melanopsina) (Fig.4.35).

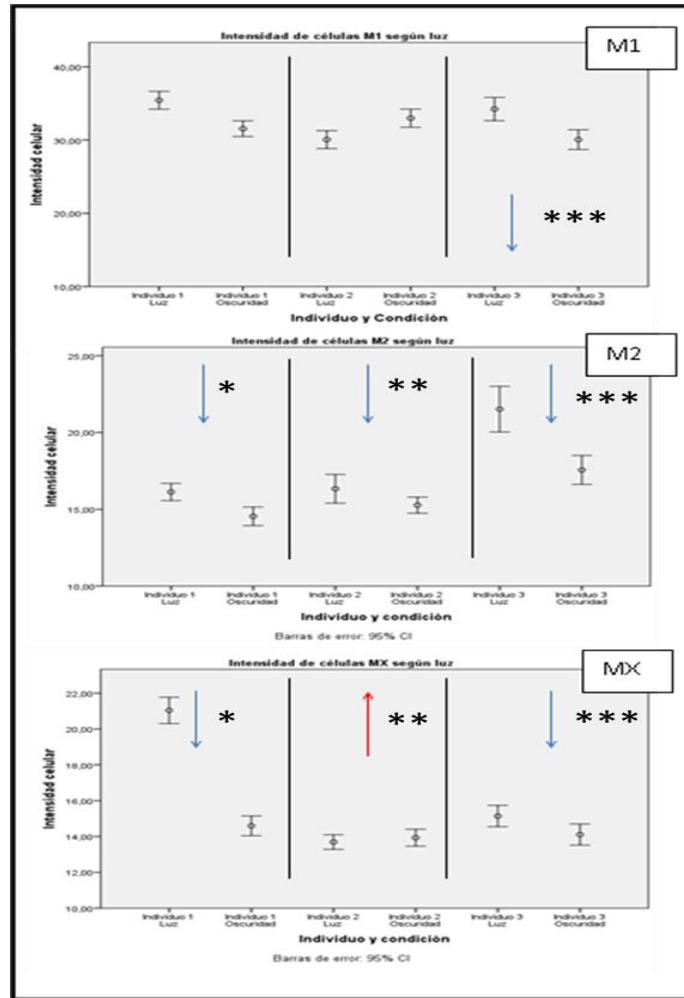


Fig. 4.35. Representación de la variación de la intensidad celular de los tipos celulares por individuo.

4.2.5.3. Subpoblaciones de M2 y su variación

Exploramos las frecuencias de las células según las intensidades de marcaje de las células M2.

Encontramos que existen probablemente 3 poblaciones de M2 según el análisis exploratorio de frecuencias (Fig. 4.36A), 4 poblaciones según el análisis de cluster (Fig. 4.36B). De estas poblaciones, la de menor intensidad de marcaje (M2a) aumenta característicamente en condiciones de luz. Esto explica que la intensidad media disminuya pero aumente el número de células en oscuridad (Fig. 4.36). Aunque el aumento en esta población M2a era común a todos los individuos, no se alcanzó el grado de significación 0,05 entre luz y oscuridad.

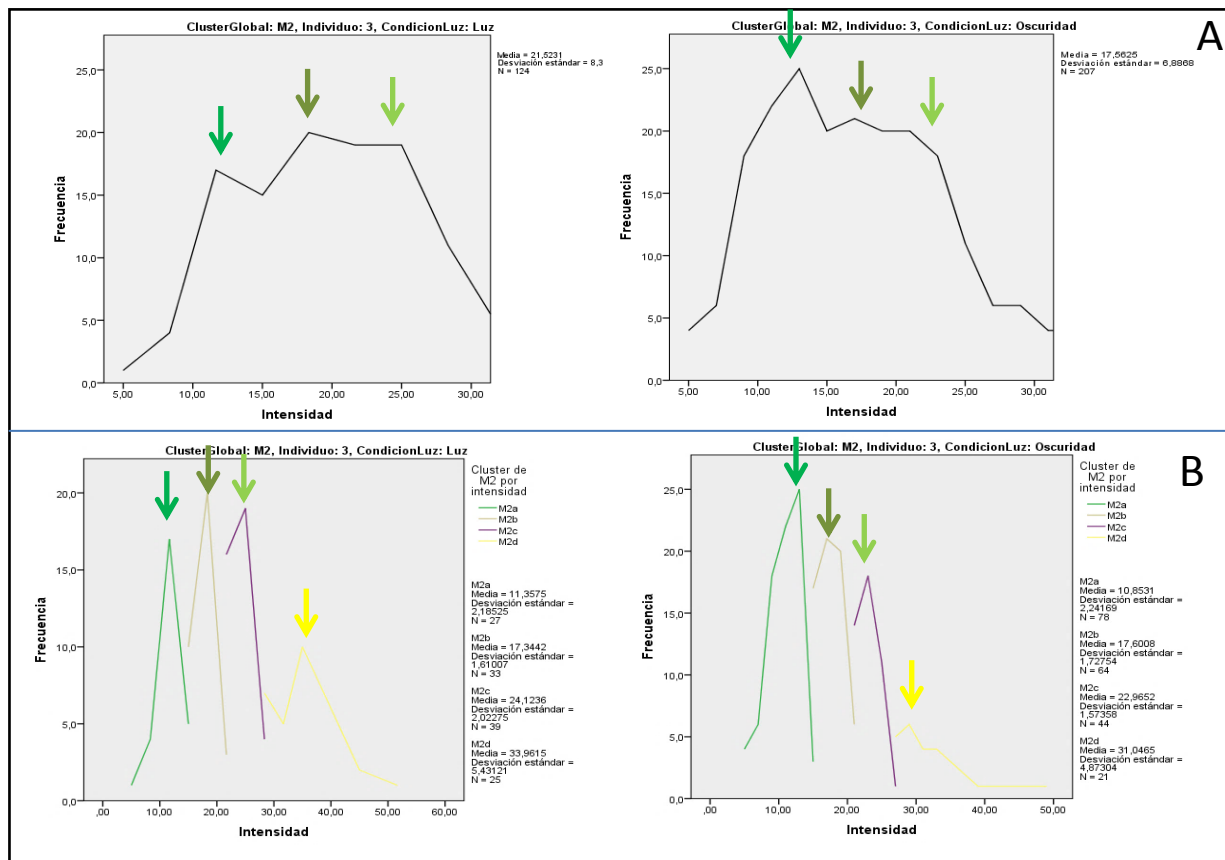


Fig. 4.36. Ejemplo representativo de las frecuencias de intensidades celulares dentro del *cluster* M2 en las dos retinas in vitro de un mismo individuo: a la izquierda, en luz; y a la derecha, en oscuridad. A) Pueden observarse tres posibles poblaciones y cómo la de menor intensidad aumenta en oscuridad. B) Las cuatro poblaciones detectadas por el análisis de cluster.

4.3. Software desarrollado

En este apartado exponemos el diseño a alto nivel del software y las cualidades del software final desarrollado. La explicación del diseño la conforman un breve resumen del programa, una lista de las funciones del programa, la estructura secuencial básica de funcionamiento del programa y una lista de algoritmos desarrollados e implementados. En el Anexo 2. “Análisis inicial del desarrollo de software”, se explican los primeros pasos de evaluación sobre la idoneidad y características del desarrollo del software, el lector puede recurrir a este para entender la decisión y definición inicial del software. En el Anexo3. “Diseño del software desarrollado a bajo nivel”, se explican una serie de conceptos y terminología utilizados en el diseño y el funcionamiento de los algoritmos del software, este anexo permite al lector profundizar en determinados aspectos o funcionamientos del programa que le puedan intrigar.

Circadian Control Center fue desarrollado para controlar la actividad circadiana de animales en tiempo real. Stitch&Focus se creó para juntar imágenes obtenidas manualmente en microscopio desplazándose en los 3 ejes. ConsecRenamer cumple la función de renombrar imágenes de microscopio confocal asignándoles coordenadas en base a su orden de captura. LayerMaker permite juntar imágenes de confocal en capas celulares. CellFinder detecta y mide células u otros objetos en imágenes.

4.3.1. *Circadian Control Center*

4.3.1.1. Resumen

Circadian Control Center es un software capaz de medir actividad en distintas zonas de una ventana. *Circadian Control Center* filtra, agrega, segmenta y resume la información para que pueda ser manejada. La actividad circadiana es representada en tiempo real mediante un diagrama de double-plot. *Circadian Control Center* también calcula diversos parámetros y modelizados de base diaria que son guardados automáticamente en el disco duro. El inicio y fin del periodo de actividad diario calculados son representados en la gráfica double-plot.

4.3.1.2. Funcionalidades

El software presenta las funcionalidades que se exponen a continuación.

Entrada de información (Fig.4.50A-C):

- Se pueden recoger datos de distintos orígenes al usar ventanas como origen de información.

- El usuario puede seleccionar zonas de análisis y nombrarlas.

- El usuario puede recargar zonas de análisis.

Análisis de imagen (Fig. 4.51 A-G):

- Detecta el movimiento y lo convierte a una medida numérica.

- Gestiona la información visual entrante sin tener que ocupar gran cantidad de espacio en disco.

Manejo de datos:

- Resume los datos de movimiento en diferentes escalas de tiempo.

- Suaviza/limpia los datos/elimina outliers.

- Genera parámetros cronobiológicos de escala diaria.

- Guarda automáticamente las medidas de movimiento y los parámetros calculados.

- El programa analiza los datos en un lenguaje predispuesto para el análisis de datos

(R).

- Realiza el análisis en tiempo real.

- Controla el ruido en la imagen.

- Controla la pérdida de señal, genera un archivo de alerta y registra el periodo de pérdida.

Actograma (Fig. 4.51 H):

- Genera un actograma por zonas.

- Genera un actograma tanto en tiempo real como fuera de línea.

- Representa en el actograma el inicio y fin de actividad de los días finalizados.

4.3.1.3. Estructura

Visión reducida:

1) El usuario selecciona las zonas de una ventana a medir circadianamente

2) Se mide continuamente la actividad en cada zona

3) Se generan continuamente en una ventana cronogramas con las actividades medidas

Visión ampliada:

- 1) Se selecciona la ventana de captura
- 2) Se delimitan las zonas a analizar
 - 2.1) Se pueden cargar unas zonas ya seleccionadas previamente
- 3) Se guardan las zonas delimitadas.
- 4) Se realizan de manera continua los pasos 5-19.
- 5) Se capturan continuamente fotogramas de la ventana de captura. Con cada nuevo fotograma se realizan los pasos 6-8.
- 6) Se calcula la diferencia de cada fotograma del anterior generando una imagen de movimiento
- 7) Se promedia el valor de todos los píxeles en cada zona en la imagen de movimiento.
- 8) Se genera con estos promedios una línea de medidas en memoria.
- 9) Cada minuto se vuelcan todas las líneas de medida a un archivo y se genera un archivo llamado “GoR”
- 10) Cuando aparece “GoR”, R lo detecta y se realizan los pasos 11-15.
- 11) Se recogen las últimas líneas del archivo diario
- 12) Se descartan las líneas que no correspondan al último minuto
- 13) Se filtran las líneas eliminando los outliers
- 14) Se agregan en una línea promedio, una línea de minuto
- 15) Se guarda la línea de minuto en un archivo diario de minutos, se borra “GoR” y se genera un archivo llamado “GoImageJ”
- 16) Tras la primera línea de minuto guardada aparece la ventana de actogramas.
- 17) Se genera una actograma diario para cada zona con el archivo diario de minutos.
- 18) Cada actograma diario se coloca en una columna en la ventana para que cada zona conforme un actograma.
- 19) Cuando se cambia de día ocurren los cambios 20-25.
- 20) Las líneas de medida pasan a guardarse en un archivo diario nuevo con el nombre de la fecha.
- 21) Las líneas de minuto pasan a guardarse en un archivo diario de minutos nuevo con el nombre de la fecha.
- 22) Se calcula el inicio y fin del día subjetivo en el día que se ha acabado.

23) Se representa el inicio y fin del día subjetivo en actograma del día acabado.

24) Se empieza un actograma diario nuevo para cada zona con el nuevo archivo diario de minutos que se coloca.

25) Estos actogramas diarios nuevos se colocan debajo justo de los del día anterior en su columna correspondiente a su zona generando así actogramas.

4.3.1.4. Algoritmos

Se desarrollaron e implementaron algoritmos para las siguientes funciones:

- Seleccionar la ventana sobre la que capturar.
- Delimitar y nombrar zonas de medida.
- Obtener imagen de movimiento.
- Cuantificar el movimiento en una zona.
- Agregado de líneas en líneas de minuto.
- Filtrado de líneas.
- La medida del tiempo y la sincronización entre ImageJ y R.
- Calcular del inicio y fin de día y noche subjetivos.
- Generar actograma diario.
- Organizar actogramas diarios en ventana de actogramas.

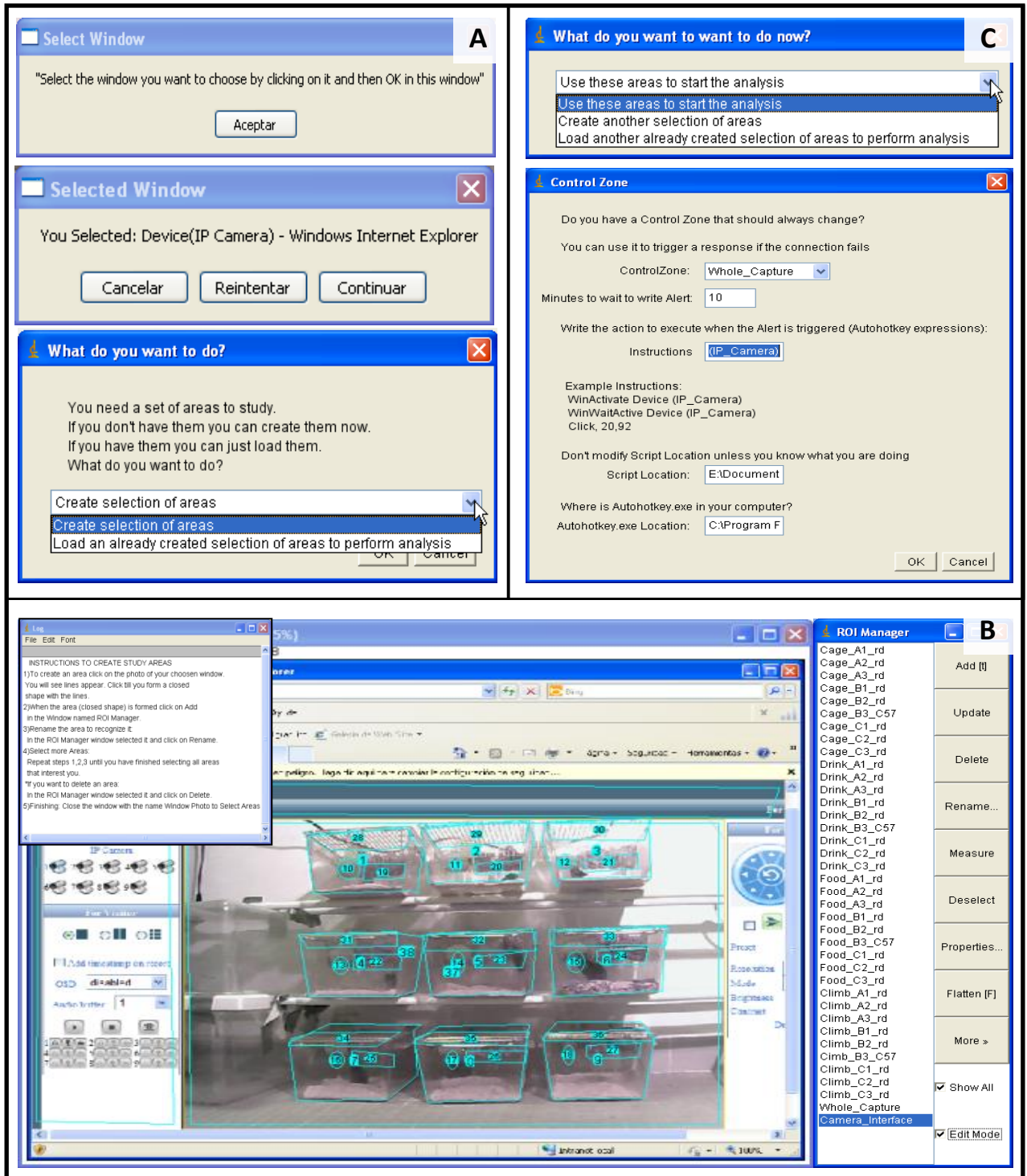


Fig4.50.Creación de un análisis de CircadianControlCenter. A) Selección de ventana de análisis. B)Selección de áreas individuales de análisis. C) Selección de zona de control y mecanismo de alerta.

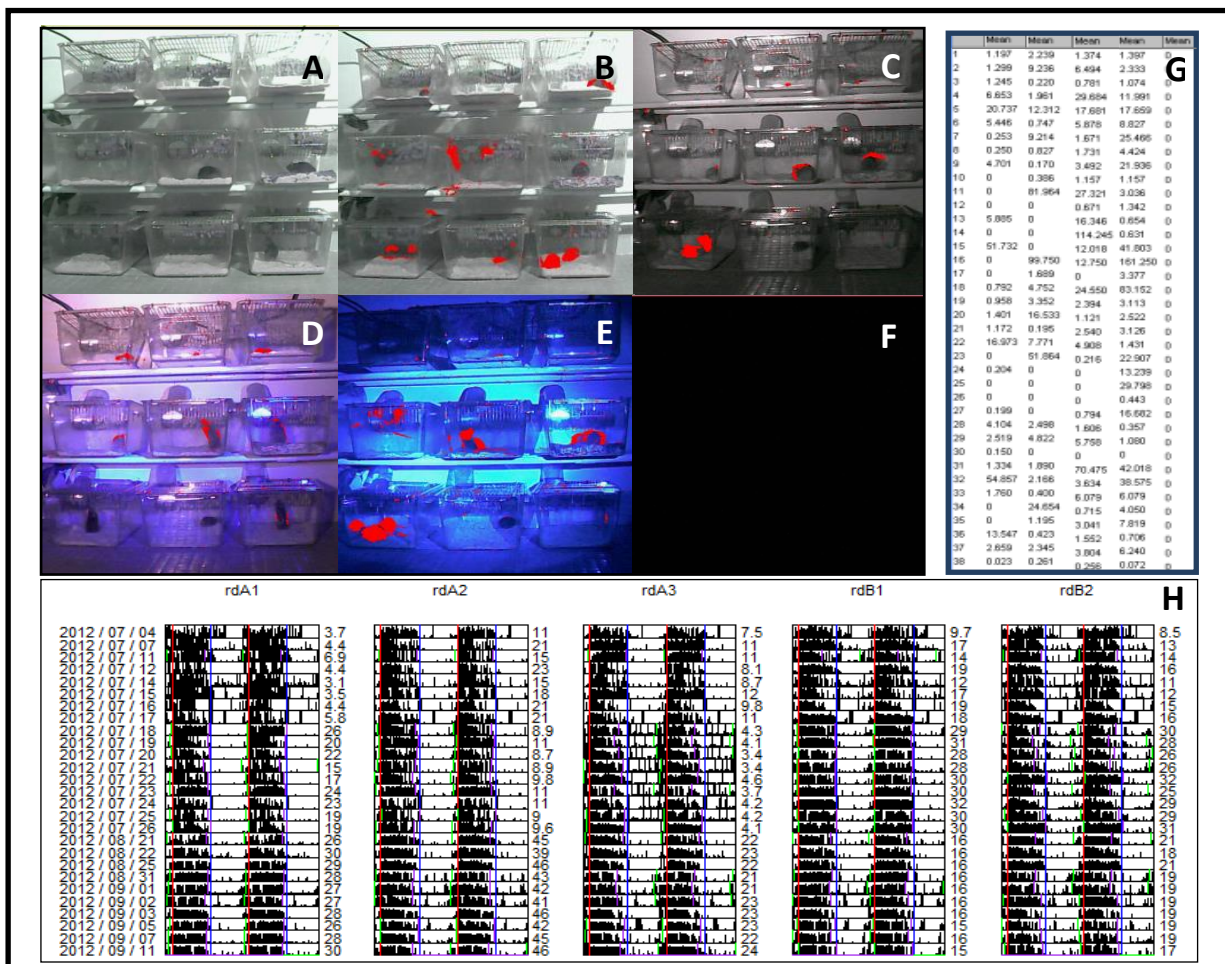


Fig4.51. La medición de actividad en CircadianControlCenter. A-F) La actividad detectada en distintas condiciones lumínicas. A) Luz blanca sin medición de actividad. B) Medición en luz blanca. C) Medición en luz infraroja. D) Medición en luz infraroja y luz azul combinadas. E) Medición en luz azul. E) Medición sin iluminación. G) Medidas de actividad entre fotogramas. H) Representación en tiempo real en forma de actograma double-plot.

4.3.2. *Stitch&Focus*

4.3.2.1. Resumen

Stitch&Focus es un software capaz de formar una composición que represente la muestra original a partir de imágenes obtenidas en microscopio sin pletina motorizada, mediante desplazamientos manuales, mientras exista solapamiento entre las imágenes. *Stitch&Focus* crea una imagen con la información enfocada de las imágenes de distintas posiciones Z de un mismo plano XY. *Stitch&Focus* crea una superimagen compuesta de todos los planos XY enfocados y la misma imagen con contraste CLAHE.

4.3.2.2. Funcionalidades

El software presenta las funcionalidades que se exponen a continuación.

Entrada de información (Fig.4.52A):

- Recoge las imágenes ordinalmente según su momento de captura.

Detectar posiciones:

- Detecta las imágenes consecutivas que pertenecen al mismo plano xy.
- Detecta las imágenes consecutivas que pertenecen a distintos planos xy.
- Detecta los solapamientos entre planos xy consecutivos.
- Detecta imágenes consecutivas sin solapamiento.
- Detecta solapamientos no contiguos para juntar regiones.
- Se calcula continuamente el tiempo restante de análisis y se notifica al usuario (30-90 minutos/GB en un procesador Intel corei5 en nuestras pruebas).

Crear composición (Fig. 4.52 C y D):

- Copia y renombra los archivos y carpetas con su posición en los distintos pasos para poder reiniciar el análisis.

- Asigna a cada foto inicial su posición xy correspondiente a su posición global en la gran imagen con una resolución a nivel de pixel.

- Realiza un enfoque de todos los planos en z de un plano xy.
- Puede manejar gran cantidad de imágenes al trabajar sobre el disco duro.
- Genera una superimagen con toda la información enfocada.
- Genera una superimagen con toda la información enfocada contrastada.

Corrección por el usuario (Fig.4.52B):

- Permite al usuario corregir aproximadamente la localización de los planos mediante una interfaz de usuario.

- La corrección se realiza con imágenes escaladas para poder gestionar todos los planos en memoria.

-Si el usuario corrige una posición el programa se encarga de realizar el encaje exacto en todas las imágenes.

4.3.2.3. Estructura

Visión reducida:

- 1) Se enfocan los planos xyz de cada plano xy en un plano xy enfocado.
- 2) Los planos xy enfocados se fusionan formando regiones mediante stitching.
- 3) Las regiones se fusionan por stitching en una Superimagen enfocada.

Visión ampliada:

- 1) El usuario introduce el nombre de la carpeta que contiene las imágenes.
- 2) El programa va comparando las imágenes consecutivas para determinar si son planos xyz de un mismo plano xy.

2.1) Si son del mismo plano se van guardando en una lista a enfocar, se continúa en el paso 2.

2.2) Si son de distinto plano o se acaban los planos xyz, ir a paso 3.

- 3) Los planos xyz de la lista a enfocar se agregan en planos xy enfocados.

3.1) Si aún quedan planos xyz se reinicia la lista con el plano xy distinto y vuelve al paso 2.

3.2) Si se acaban todos los planos xyz va al paso 4.

- 4) Se busca el solapamiento entre planos xy enfocados.

4.1) Si hay solapamiento, se va al paso 5.

4.2) Si no hay solapamiento se inicia una nueva región.

5) Al encontrar solapamiento calcula su posición y pasa a formar parte de una región.

- 6) Al acabar con los planos xy enfocados:

6.1) Si solo hay una región se va al paso 9.

6.2) Si hay más de una región se va al paso 7.

- 7) Se busca coincidencia de 2 planos de 2 regiones:

7.1) Si se encuentra una coincidencia se va al paso 8.

7.2) Si no se encuentra coincidencia se dejan las regiones separadas, se va al paso 9.

8) Se comprueba la coincidencia con los demás planos de las regiones:

8.1) Si es cierta se fusionan las regiones, recalculandose la posición de los planos xy enfocados.

8.2) Si no es cierta se vuelve al paso 7.

9) Las regiones juntadas conforman la superimagen calculada automáticamente por el software.

10) Se ofrece la superimagen al usuario.

11) Se ofrece la posibilidad de corregir la superimagen al usuario:

11.1) Si el usuario elige corregirla, se va al paso 12.

11.2) Si el usuario considera que está bien, no quiere corregirla, se va al paso 18.

12) Se ofrece al usuario un panel para que recolocque aquellas imágenes descolocadas aproximadamente en su posición.

13) Al acabar de recolocar en su posición aproximada las imágenes el usuario cierra el panel de colocación manual.

14) Las nuevas posiciones aproximadas se guardan en un archivo

15) Se leen las nuevas posiciones aproximadas y se realiza un stitching fino con las que cambiaron de posición

16) Se crea la superimagen final.

17) Se crea una superimagen con contrastado CLAHE con la superimagen final.

18) Se ofrece la superimagen final al usuario

4.3.1.4. Algoritmos

Se desarrollaron e implementaron algoritmos para las siguientes funciones:

- Determinar la relación entre dos planos xyz consecutivos mediante el cálculo de stitching

- Acumular planos de enfoque y desencadenar su enfoque

- Calcular posición entre planos xy enfocados con solapamiento

- Codificar la posición de las imágenes

- Determinar nuevas regiones por no solapamiento
- Determinar solapamiento entre regiones
- Pasar imágenes al módulo de corrección
- Recoger cambios tras el módulo de corrección
- Realizar ajuste fino tras corrección
- Generar superimagen
- Generar superimagen contrastada

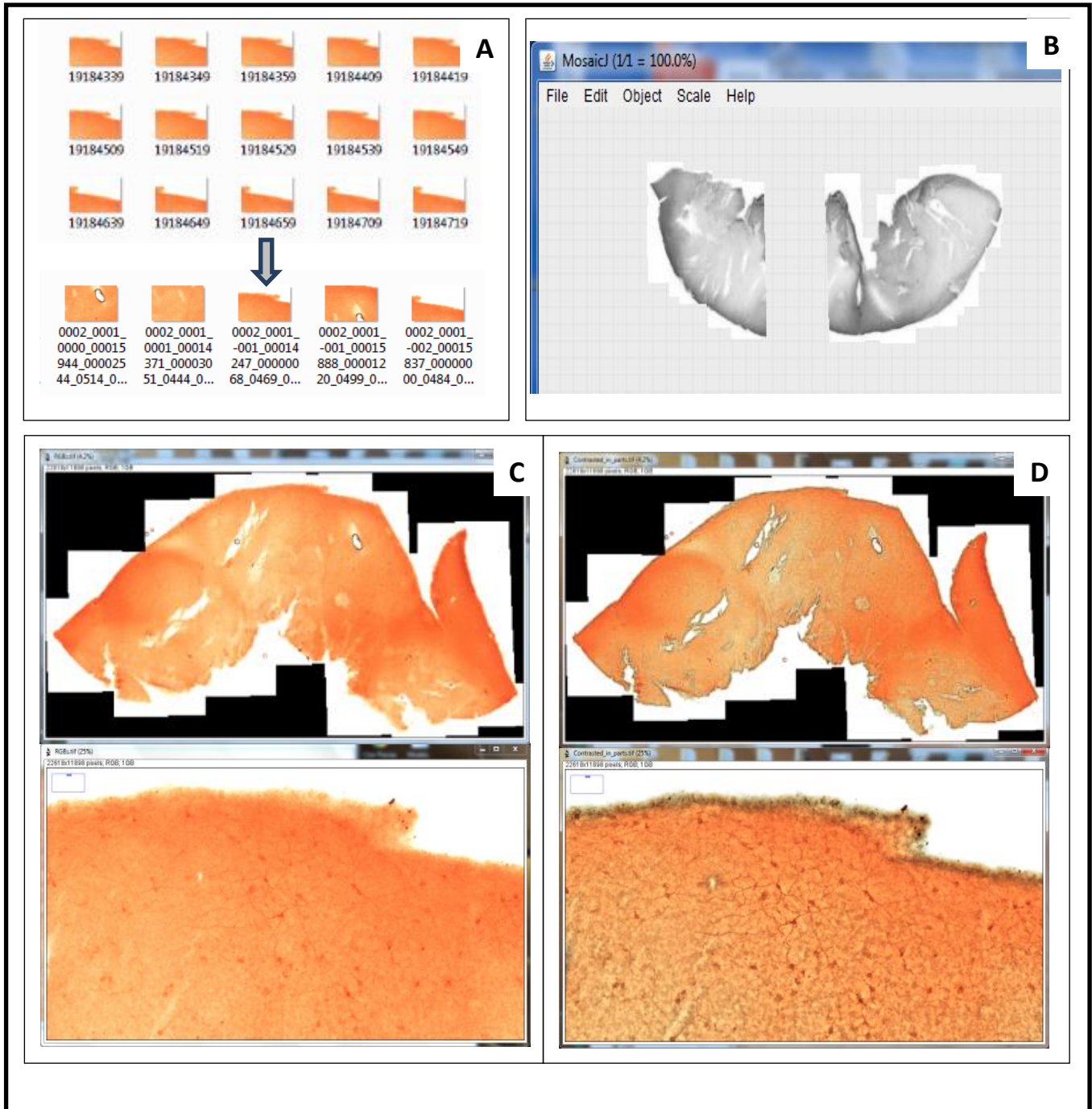


Fig4.52. Stitch & Focus. A)Proceso de enfoque en z y asignación posición global en xy. B)Mecanismo de corrección manual de posiciones. C)Imagen de esa una retina entera marcada contra melanopsina, revelada con ABC ya procesada por Stitch&Focus. Arriba toda la retina , debajo un detalle al 25% de aumento. D)Una segunda imagen que ofrece Stitch & Focus. La misma imagen de C pero contrastada por el método CLAHE.

4.3.3. ConsecRenamer

4.3.3.1. Resumen

ConsecRenamer es una sencilla aplicación de renombrado de archivos para asignar posiciones XY a fotografías procedentes de microscopio confocal que carezcan de estas coordenadas.

4.3.3.2. Funcionalidades

El software presenta las funcionalidades que se exponen a continuación.

Interfaz de usuario (Fig.4.53A-C):

- Permite seleccionar un rango de imágenes a utilizar.
- Calcula combinaciones rectangulares de muestreo en función del número de imágenes.

- Ofrece una variedad de conformaciones del orden muestreado.

Calculo y renombrado (Fig.4.53D):

- Asigna a cada imagen su posición xyzc.
- Maneja gran cantidad de imágenes al trabajar sobre el disco duro.

4.3.3.3. Estructura

Visión reducida:

- 1) El usuario indica la carpeta con imágenes, las dimensiones y orden de captura usados.

- 2) Se calcula la posición de cada imagen y se duplican las imágenes con la nueva información en su nombre.

Visión ampliada:

- 1) El usuario indica la carpeta que contiene las imágenes.

- 2) Se obtiene la lista de imágenes.

- 3) El programa ofrece una serie de combinaciones rectangulares de captura y unos posibles ordenes de captura.

- 4) El usuario elige las dimensiones y orden usados.

- 5) Se calcula el número de planos antes de cada cambio de posición en cada dimensión en base a las dimensiones.

- 6) Se calculan los vectores de desplazamiento según el orden de muestreo.
- 7) Para cada imagen se hacen los pasos 8 y 9.
- 8) Se calculan la posición de la imagen en cada dimensión xyzc
- 9) Se duplica la imagen y se codifica en su nombre la posición xyzc

4.3.3.4. Algoritmos

Se desarrollaron e implementaron algoritmos para las siguientes funciones:

- Ventana de captura de parámetros del usuario
- Asignar a las imágenes posición en las dimensiones

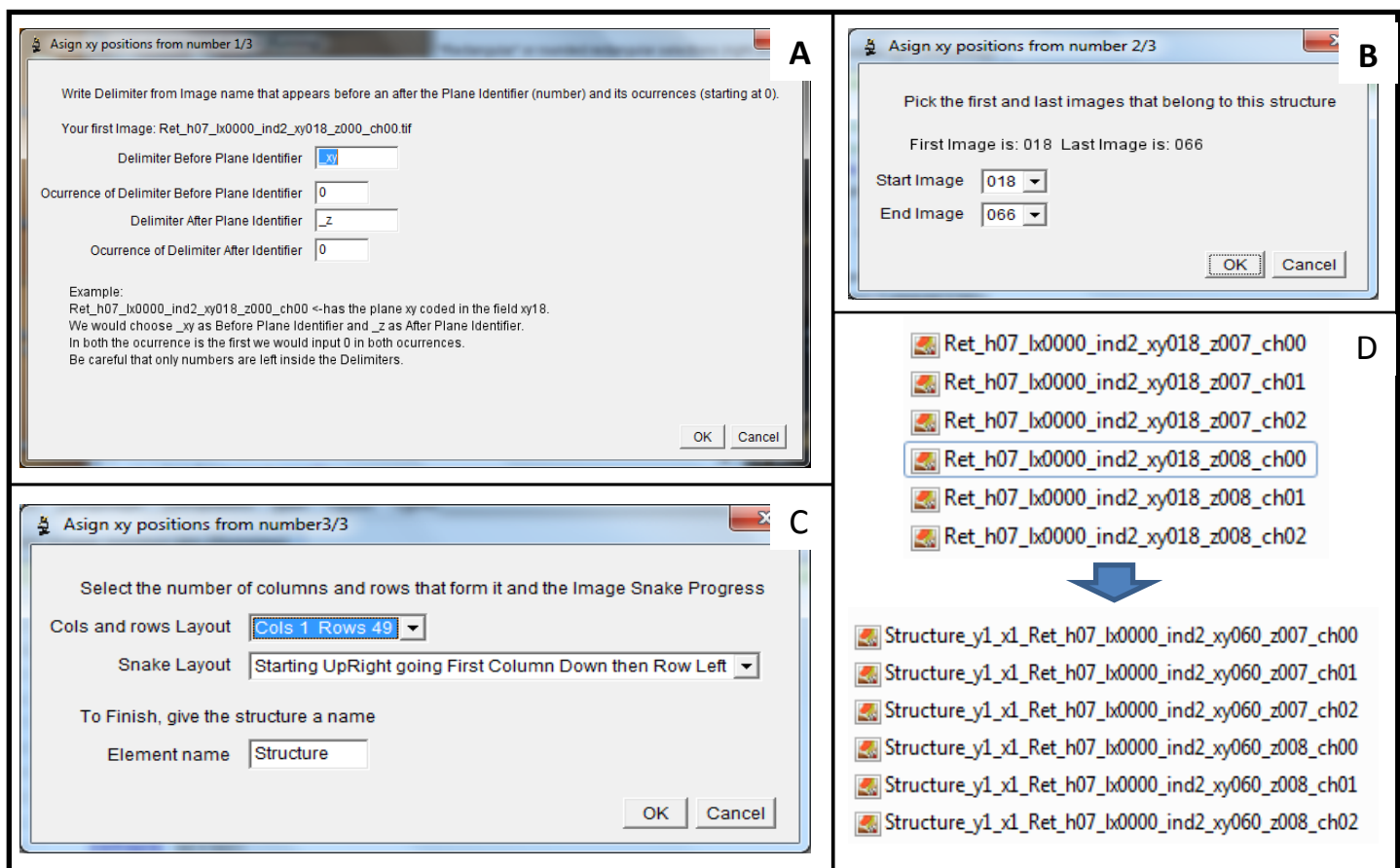


Fig4.53. ConsecRenamer. A)Designación de los delimitadores usados en el nombre del archivo. B)Selección del rango de imágenes a usar. C)Selección del número de filas y columnas en un esquema rectangular y del patrón de captura. D)Los archivos de imagen antes y después de ser renombrados.

4.3.4. LayerMaker

4.3.4.1. Resumen

LayerMaker es un software capaz de formar una composición que represente la muestra original dividida en sus capas celulares a partir de imágenes obtenidas en microscopio confocal con pletina motorizada. *LayerMaker* crea una imagen con la información enfocada de cada capa y canal con las imágenes de distintas posiciones Z de un mismo plano XY. *LayerMaker* crea una superimagen compuesta de todos los planos XY enfocados para cada canal y capa y la misma superimagen con contraste CLAHE. *LayerMaker* crea un hyperstack de superimágenes compuesta de las superimágenes de cada capa y canal tanto en su formato original como con contraste CLAHE y de canales combinados.

4.3.4.2. Funcionalidades

El software presenta las funcionalidades que se exponen a continuación.

Entrada de información:

- Lee las posiciones xyzc codificados en el nombre de archivo.
- Permite al usuario elegir qué canal usar para detectar las capas, por ejemplo el de

DAPI.

Detectar capas locales:

- Determina las capas presentes en cada plano xyz independiente.
- Enfoca en cada canal, capa y plano xy toda la información.
- Estima en cada plano xy el grosor de la capa.
- Estima la significación de las capas en cada plano xy.

Detectar capas globales:

- Determina la mediana global del número de capas.
- Establece puntos de inicio estadísticos para asignar planos a nivel global.
- Asigna las correspondencias de capas entre planos xy vecinos.
- Genera múltiples modelos de capas a los que asociaba probabilidades.
- Estimar globalmente el grosor y número de capas.
- Permite al usuario seleccionar un modelo de asignación de capas con

probabilidades asociadas.

Crear composición (Figs.4.54 y 4.55):

- Renombra los archivos con su capa local y global y su canal.
- Se crean las superimágenes que el usuario desea.
- Se crean las superimágenes con canales contrastados.
- Se crean las superimágenes con canales combinados.
- Se crean los stacks de superimágenes que el usuario desea.
- Se crea un hyperstack con todos los planos y se le muestra al usuario.
- Puede manejar gran cantidad de imágenes al trabajar sobre el disco duro.

4.3.4.3. Estructura

Visión reducida:

- 1) Se detectan las capas dentro de cada plano xy
- 2) Se detectan las capas globalmente
- 3) Se crea un hyperstack de superimágenes por capa y canal

Visión ampliada:

- 1) El usuario selecciona la carpeta que contiene las imágenes.
- 2) El usuario indica como están las dimensiones codificadas en las imágenes.
- 3) El usuario elige el canal en base al cual se buscarán las capas en los pasos 4 a 14.
- 4) Para cada plano xy del canal elegido se realizan los pasos 5 a 8.
- 5) Se obtiene la media de intensidad de cada uno de sus planos xyz.
- 6) Las medias de intensidad de los xyz de cada plano xy conforman una curva respecto de su posición z.
- 7) Se buscan mínimos locales en las curvas.
- 8) Los mínimos locales son utilizados para delimitar capas locales que se codifican en los planos xyz.
- 9) Se calcula la mediana del número de capas de los planos xy.
- 10) Los planos xy con el mismo número de capas que la mediana son tomados como puntos de partida para determinar las capas globalmente. Cada punto de partida genera un modelo mediante los pasos 11-13.
- 11) Se busca la mayor similitud entre las capas de un punto de partida y un vecino.
- 12) Cuando se encuentra la mayor similitud se asignan capas al vecino en función de esta.

13) La asignación se propaga desde los vecinos asignados hasta asignar capas a todos los planos xy de la muestra.

14) Se buscan todos los modelos producidos y se les otorga un porcentaje de probabilidad en función de su frecuencia de ocurrencia.

15) El usuario selecciona qué modelo utilizar.

16) A cada plano xyzc le es asignada una capa global, pasando a ser planos xyzcl.

17) Se enfocan las imágenes por canal y capa.

18) Se le pregunta al usuario para qué canales, canales enfocados, canales contrastados, y combinaciones de canales quiere crear superimágenes y como quiere conformar el hyperstack.

19) Se crean las superimágenes que el usuario desea.

20) Se crean los stacks de superimágenes que el usuario desea.

21) Se crea un hyperstack con todos los planos y se le muestra al usuario.

4.3.4.4. Algoritmos

Los siguientes algoritmos ya se desarrollaron e implementaron para *Stitch&Focus* y se utilizan de nuevo en *LayerMaker*:

- Acumular planos de enfoque y desencadenar su enfoque
- Codificar la posición de las imágenes
- Generar superimagen
- Generar superimagen contrastada

Se desarrollaron e implementaron algoritmos para las siguientes funciones:

- Saber la posición y canal de las imágenes xyzc
- Elegir un canal para determinar las capas
- Determinar las capas localmente mediante curvas de intensidad en z.
- Medir la representatividad de un punto de inflexión.
- Como obtener las capas globales.
- La mediana y los planos xy de partida para buscar capas globales
- Determinar la correspondencia de capas entre dos planos xy vecinos según z.
- Propagar la asignación de capas por la muestra.
- Elegir el modelo más probable para determinar las capas globalmente
- Convertir posiciones xy ordinales a posiciones xy en píxeles

- Crear superimágenes combinadas
- Crear *hyperstack* de superimágenes

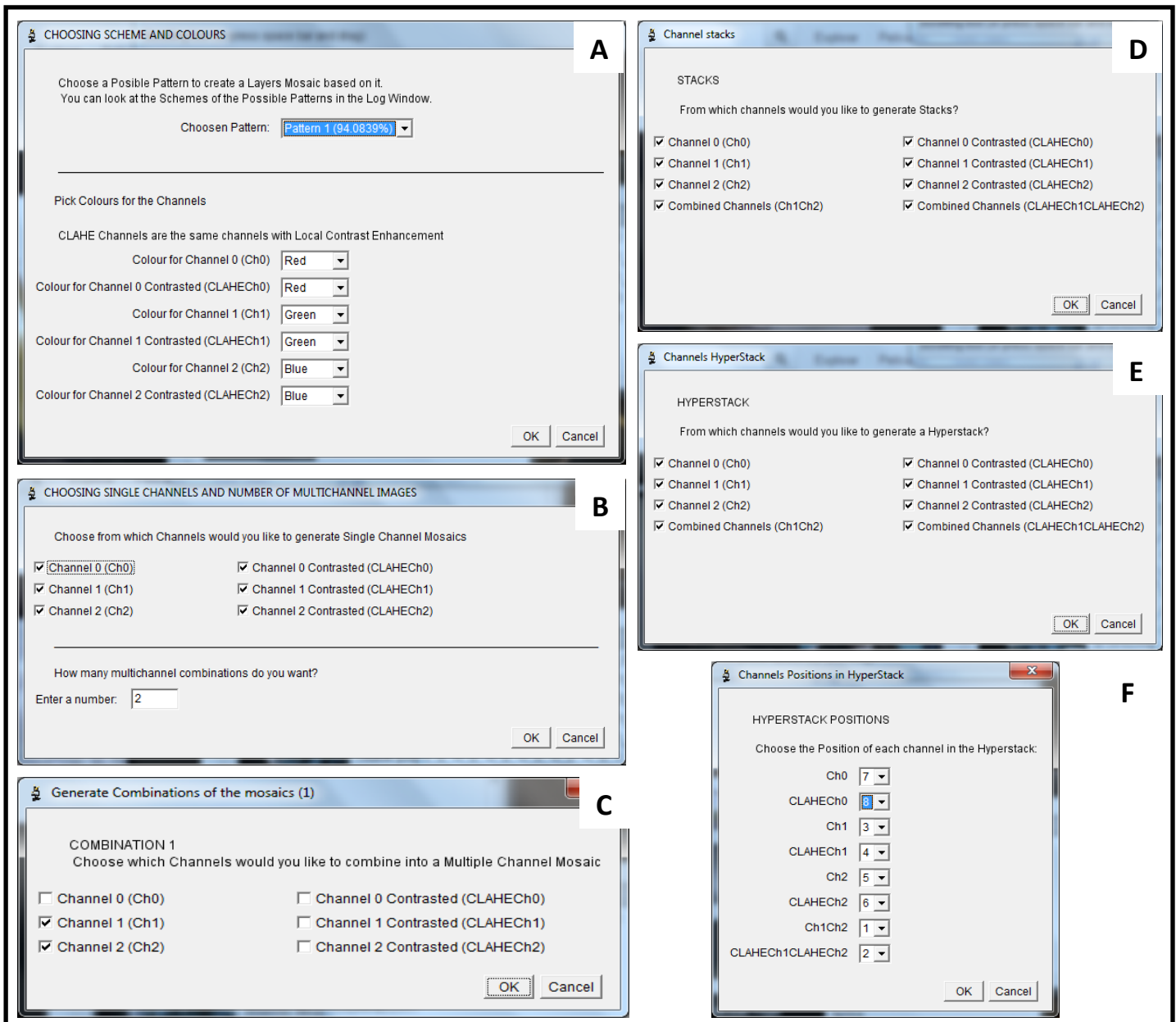


Fig4.54. Selección de los resultados de LayerMaker. A) Selección del patrón de capas a usar y de los colores para cada canal. B) Selección de los canales para los que generar resultados y del número de combinaciones de canales a crear. C) Selección de canales para crear combinación. D) Selección de canales para los que generar un Stack. E) Selección de canales y combinaciones de canales para generar el hyperstack. F) Selección del orden en que mostrar los canales en el Hyperstack.

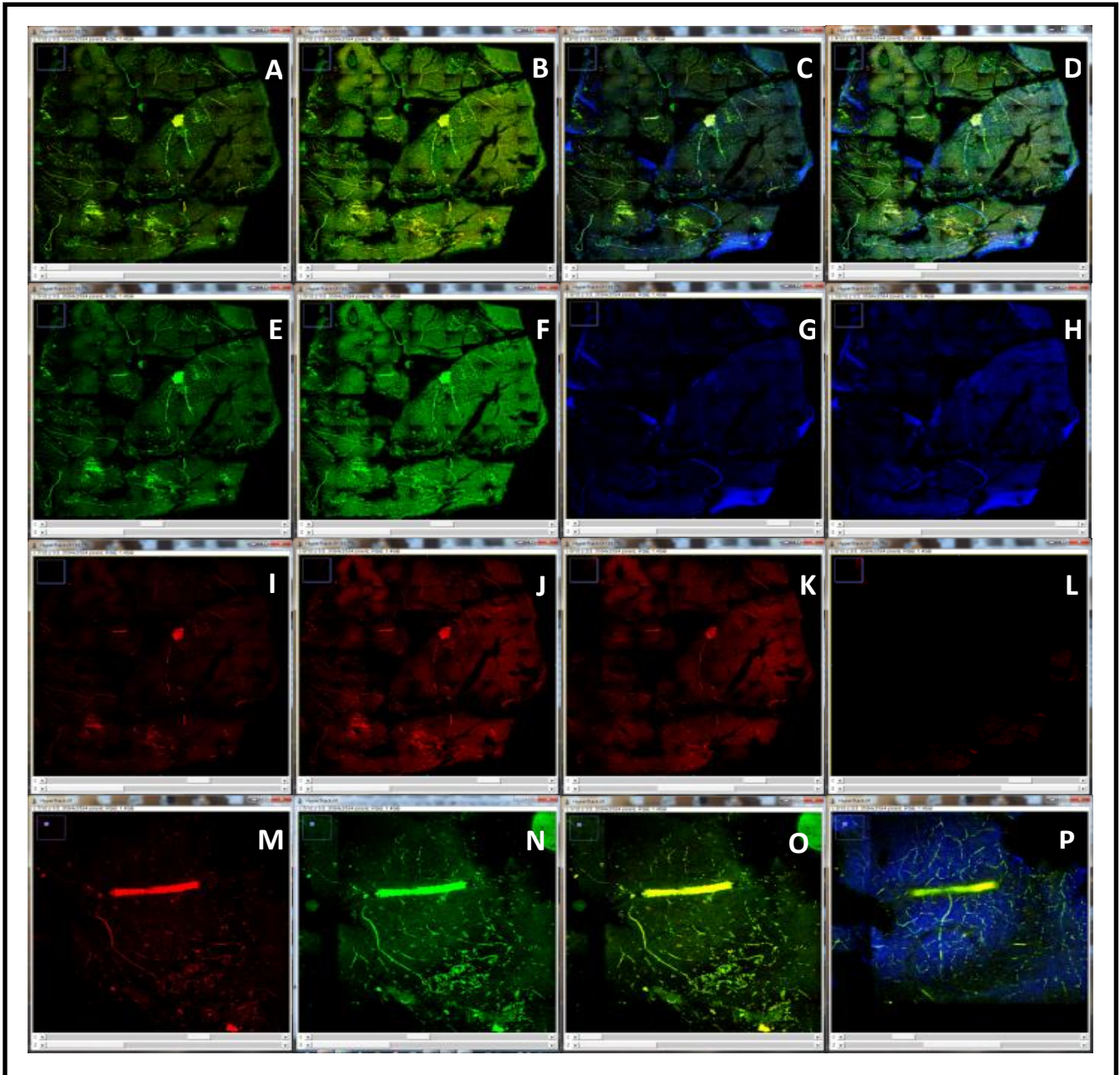


Fig4.55.El hyperstack de LayerMaker. (A-L) Muestran toda la retina. (M-P)Muestran un detalle de la retina. El color verde muestra la isoforma L de melanopsina, el rojo la isoforma S y el azul el DAPI. Las imágenes A y B son resultado de combinar los canales rojo, verde. Las imágenes C y D son resultado de combinar los canales rojo, verde y azul. Las imágenes B,D,F,H son resultado de someter las imágenes correspondientes (A,C,E,G) a un aumento de contraste. A-J muestran la primera capa detectada (correspondiente a la ganglionar), K muestra la segunda (correspondiente a la amacrina) y L algún resto detectado como una tercera capa (probablemente debido a que la retina no está completamente aplanada en el portaobjetos en alguna zona). M) Un detalle de la primera capa en el canal rojo. N) Detalle de M en el canal verde. O) Combinación de los canales de rojo y verde del detalle de M. P) Detalle de ese plano xy pero en la segunda capa, se muestra la combinación de canales verde, rojo y azul.

4.3.5. *CellFinder*

4.3.5.1. Resumen

CellFinder es un software capaz de detectar y describir células u otros objetos a partir de imágenes. *CellFinder* se basa en el paradigma de visión artificial, en protocolos de análisis de imagen desarrollados por nosotros, en inteligencia artificial y en el desarrollo de software orientado a objetos y servicios.

El diseño de *CellFinder*

Para explicar el funcionamiento del programa *CellFinder* se va a seguir un esquema diferente al utilizado previamente ya que creemos puede ser más adecuado para su comprensión. Primero, se introducen las partes que conforman el problema que se quiere resolver. En el Anexo2 se indica el análisis que hicimos sobre las posibles soluciones de cada parte del problema.

Tras esto, exponemos resumidamente los cambios que se realizaron entre versiones. En el Anexo3 se detalla el diseño de cada versión. En este apartado de resultados solo se explica la última versión codificada en el momento de redacción de esta tesis (v0.6). Cada nueva versión aporta mejoras respecto a la anterior en la manera en que se aproxima a las distintas partes del problema. Durante su evolución el programa aumentó progresivamente su complejidad por ello una explicación basada en cambios de versión permite al lector empezar con una imagen mental de menor complejidad para luego añadir complejidad sobre ella. Recomendamos una lectura progresiva del diseño de las versiones cuando se quiera entender a fondo el funcionamiento de *CellFinder*.

Las partes del problema

Para cada una de estas partes del problema que se quiere resolver existen diferentes aproximaciones, con diferentes grados de exactitud, automatización, velocidad y sofisticación. Estas distintas aproximaciones a cada parte del problema son definidas junto a sus ventajas, desventajas, rendimiento y variantes en el Anexo3.

El problema que ataca *CellFinder* es un reto clásico del Análisis de Imagen: El

Reconocimiento de Objetos. Las personas cuando observamos una escena o imagen podemos describir los objetos que se encuentran en ella. El objetivo del Reconocimiento de Objetos es que un ordenador realice esta misma función. Las ventajas que reporta el Reconocimiento de Objetos son:

- No requerir un observador, liberar el trabajo manual mediante automatización.
- Estandarizar la medida.
- Realizar y manejar medidas de las que no son capaces la visión y cerebro humanos.
- Preparar los datos para su análisis y/o analizarlos directamente.

En nuestro caso para facilitar la comprensión e imagen mental a nuestros objetos protagonistas los llamamos Células.

El problema de Reconocimiento de Objetos según lo abordamos aquí se compone de los siguientes subproblemas o partes:

- Encontrar las células en la imagen.
- Delimitar el contorno de las células.
- Determinar las características de las células.
- Clasificar los contornos y células.

Las versiones de *CellFinder*

En el Anexo 3 se da primero un resumen de la motivación de esa versión. Tras esto se introducen conceptos o terminología que pudiesen ser necesarios en el contexto de esa versión. Seguidamente se indica la aproximación elegida para cada parte del problema en esa versión. Tras indicar las aproximaciones elegidas, se introduce la estructura del software en esa versión y, finalmente, se explica más en detalle los algoritmos desarrollados para ella.

A modo introductorio se va a describir aquí las principales características de cada versión de *CellFinder*.

CellFinder v0.1: se desarrolló un algoritmo de análisis de imagen para poder identificar todos los objetos o células de una imagen, así como sus bordes, independientemente de su intensidad de marcaje.

CellFinder v0.2: ya que la cantidad de objetos detectados por el algoritmo de la primera fase era difícil de manejar, se pasó a ofrecer la posibilidad de limitar la búsqueda a

aquellos objetos señalados por el usuario. En este caso el usuario señala el objeto y el algoritmo define sus bordes.

CellFinder v0.3: se desarrolló un interfaz para ofrecer al usuario la posibilidad de elegir otros posibles contornos para cada objeto en caso de que el usuario considerase que el contorno seleccionado por el algoritmo no fuese correcto.

CellFinder v0.4: se incluyó un módulo de inteligencia artificial (IA) de manera que el algoritmo de selección de contornos de objetos aprenda de las correcciones del usuario.

CellFinder v0.5: se integró el algoritmo de la versión 1.0 para que la búsqueda de células en la imagen y selección de sus bordes sea automática y basada en lo que aprende la IA del usuario.

CellFinder v0.6: se incluyó la asignación de etiquetas, la solicitud de mejora en los contornos y la medida en varias dimensiones a través de hyperstack.

4.3.5.2. Funcionalidades y propiedades

El software presenta las funcionalidades y propiedades que se exponen a continuación.

Arquitectura (Figs.4.56 y 4.57):

- *CellFinder* está desarrollado con una estructura hexagonal o de puertos adaptadores. En el centro del hexágono está núcleo. En las paredes del hexágono están distintas unidades con las que se comunica. Hexagonal es un nombre genérico, puede tener más o menos de 5 paredes, lo importante es el tipo de distribución centralizada y modular.

- Las unidades que encontramos son: interacción con el usuario o interfaz de usuario/cliente, persistencia, análisis de imagen, análisis de datos y obtención de resultados.

- El núcleo es el responsable central de dirigir las acciones entre todas las unidades y de mantener en memoria una copia centralizada de las células.

- Cada unidad, excepto la de cliente, está compuesta por un *broker* y uno o varios ejecutores. Los ejecutores realizan el trabajo y el *broker* dirige la unidad y encarga trabajo a los ejecutores. Este es un paradigma de computación distribuida.

- Las unidades se comunican con el núcleo y los *brokers* con sus ejecutores mediante adaptadores. El núcleo, cada unidad, cada *broker* y cada ejecutor presenta una superficie expuesta, un contrato llamado interfaz, si se quiere interactuar con ellos debe ser respetando ese contrato. De esta manera, unas partes interactúan con la superficie de otras

sin saber que ocurre dentro de ellas solo en su superficie de manera similar a los receptores de las células.

- Los adaptadores son unidireccionales, lo que permite la comunicación asíncrona y que una unidad siga funcionando sin tener que esperar inactiva la respuesta de aquella a la que realizó una petición.

- Los adaptadores son los únicos que conocen la interfaz de destino, si se quiere cambiar un módulo por otro, por ejemplo, uno de ImageJ por uno de Matlab solo hay que tocar el adaptador, el resto del programa queda intacto. Esto es muy importante para la flexibilidad y sostenibilidad del código.

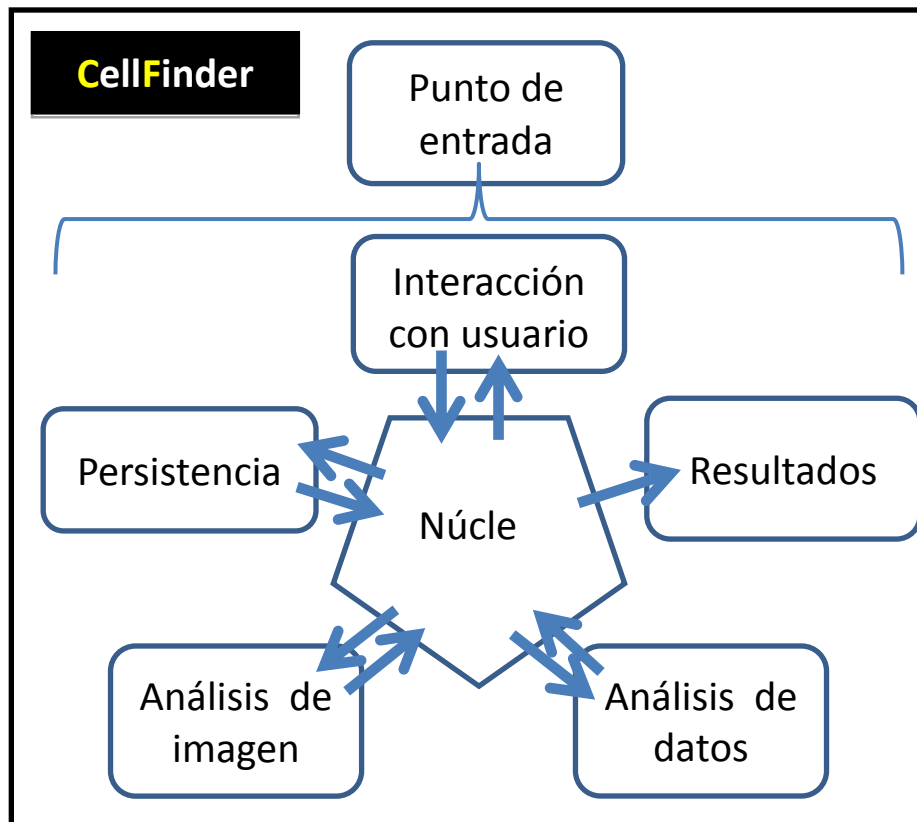


Fig4.56. Esquema a alto nivel de la arquitectura de CellFinder.

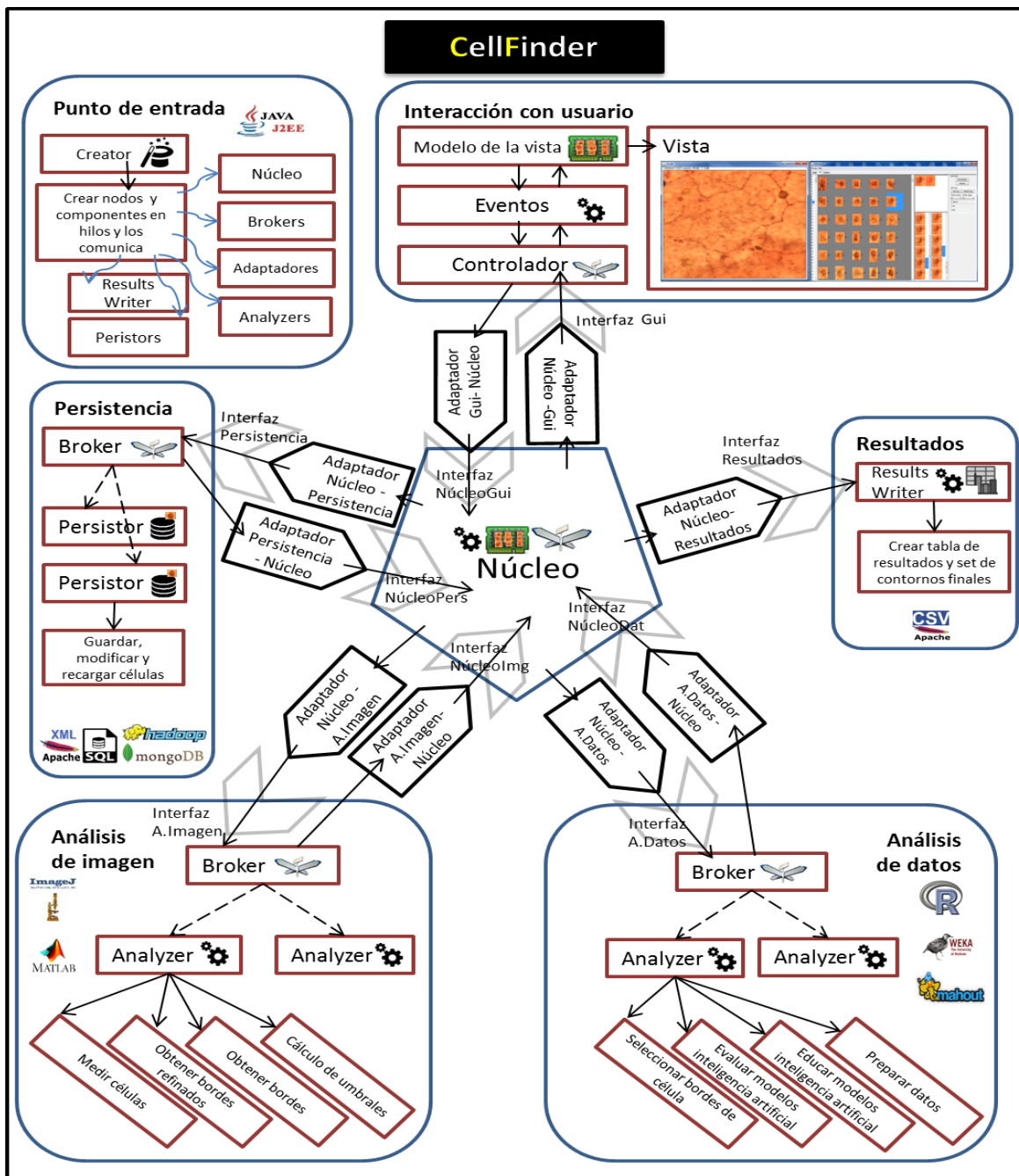


Fig4.57. Esquema a nivel medio de la arquitectura de CellFinder.

Objetos de comunicación (Fig.4.58):

- Las distintas unidades se comunican entre ellas mediante objetos llamados dtos (del inglés *data transfer objects*). La unidad principal de comunicación de *CellFinder* es la célula.

- Una célula en *CellFinder* está conformada por un identificador, un nombre, una etiqueta de estado, una lista de vistas de la célula, una lista de contornos de la célula y una lista de etiquetas de la célula. También contiene el índice de los contornos seleccionados automáticamente y por el usuario, así como el índice de la vista mostrar.

- Una vista de una célula contiene un índice, una imagen e información de la ubicación/origen de esa vista.

- Un contorno contiene un índice, la información de los parámetros de análisis de imagen con que se obtuvo, el *roi* que define los píxeles del contorno, una lista de líneas de medida del objeto con ese contorno y la puntuación que le dio a ese contorno la unidad de análisis de datos.

- Una línea de medida contiene un índice, el índice de la vista con que se obtuvo, la lista de medidas obtenidas para esa combinación de vista y contorno por la unidad de análisis de imagen.

- Los *dtos* se combinan formando colecciones con reglas para su manejo. Estas colecciones se conocen como *daos* (del inglés *data access objects*).

Creación e interacción de nodos:

- Cuando se inicia *CellFinder* se elige en un punto de entrada llamado creador, este define qué nodos se van a desplegar.

- Este creador es responsable de crear los nodos y de darle la referencia de los adaptadores que usar.

- Por defecto, en la versión v0.6 se crean nodos locales para todas las funciones. Se crea un nodo para el cliente de interfaz gráfica, otro nodo conjunto para núcleo, persistencia y resultados, un nodo para análisis de datos y dos nodos de análisis de imagen.

- Para funcionar como clúster de computación simplemente hay que lanzar en cada ordenador el creador, elegir los nodos que se quieren desplegar y cambiar el adaptador

CellFinder

Célula	
Id	9
Estado	3
Nombre	1.1.1.125.234.45.65
Lista de objetos vista	
Lista de objetos contorno	
Lista de etiquetas	Cell, ipRGC, M1, CellQuality: 1.0, BorderQuality:1.0,
Lista de Ids de contornos candidatos	1, 3,6,7,10,11,12
Id de contornos seleccionado por el usuario	7
Id del contorno seleccionado automáticamente	6

Contorno	
Id	6
Roi	
Nombre del roi	ABSsnake-35r-7t
Lista de objetos línea de medida	
Actual objeto puntuación	
Histórico lista de objetos puntuación	
Objeto Parámetros de análisis de imagen usados	

Línea de medida																	
Id de la vista usada	0																
Lista de medidas	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 0.8em;"> <thead> <tr style="background-color: #4a7ebb; color: white;"> <th>Label</th><th>Area</th><th>Mean</th><th>Stdev</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>235</td><td>2029</td><td>131.85</td><td>4.594</td></tr> <tr style="background-color: #4a7ebb; color: white;"> <th>Perim</th><th>Mayo</th><th>Minor</th><th>Wid</th></tr> <tr><td>58.811</td><td>40.224</td><td>58.814</td><td>40.212</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	Mean	Stdev	235	2029	131.85	4.594	Perim	Mayo	Minor	Wid	58.811	40.224	58.814	40.212
Label	Area	Mean	Stdev														
235	2029	131.85	4.594														
Perim	Mayo	Minor	Wid														
58.811	40.224	58.814	40.212														

Vista	
Id	1
Imagen	
Nombre de imagen de origen	Retina 1 Orig
Hashcode de imagen de origen	73e12bc336908a47a40cba4acc
Ordenador de origen (ip,mac)	198.162.75.4., 00:17:4F:08:5F:69
Posición (t,c,z,x,y,w,h)	1.1.1.125.234.45.65
Objeto ImageInfo	

ImageInfo	
Lista de frecuencias de las valores de grises	0:12, 1:12, 2:9, 3:6, 4:6, 5:9, 6:15, 7:25, 8:35...255:1400
Lista de valores de grises ordenados según importancia como umbral	255, 0, 134, 80, 160, 155, 90, 120, 95, 180, 190, 200, 70...
Lista de valores de grises ya usados como umbral	255, 0, 134, 80, 160, 155, 90

Parámetros de análisis de imagen	
Umbral usado	134
Orden de umbral usado en la lista de umbrales ordenados	3
Modificación morfológica usada	Watershed
Iteración de borde refinado	7
Lista de funciones de medida	Basics, BorderQuality, CleanIntensity

Parámetros de análisis de datos	
Lista de opciones	IntracelularOrdinals, PreStandarditation, ReturnBelongingChance

Fig4.58.Principales objetos de transferencia de datos (dtos) utilizados en CellFinder. En la columna de la izquierda se muestran las propiedades de cada objeto y en la columna de la derecha un ejemplo de cada propiedad.

entre el ejecutor o unidad por uno de red. Este puede usar http, por ejemplo REST o SOAP o el sistema de escucha en carpeta integrado en *CellFinder* sobre una carpeta compartida en red local o en red global (GDrive/DropBox). Esto permite realizar las funciones de interacción y análisis en distintos ordenadores simultáneamente a modo de *cluster*.

- Cada nodo se crea en su propio hilo para aprovechar mejor el procesado y que no se pare su funcionamiento a esperar a otros nodos.

- También se utilizan hilos en diversas funciones del programa como en la gestión de archivos, la escucha de cambios en carpetas, el análisis de imagen o la interfaz de usuario.

Entrada de imágenes:

- Permite abrir y desplazarse por grandes imágenes
- Permite abrir y desplazarse por hyperstacks de imágenes.

Interfaz general (Fig. 4.59 A):

- Ofrece al usuario una interfaz por pestañas que representan las fases del proceso: muestreo y corrección de bordes/etiquetado.

- La interfaz de usuario y la ventana de imagen sincronizan su posición, redimensión y minimizado/maximizado.

- La interfaz de usuario y la ventana de imagen se sincronizan según la pestaña seleccionada.

Pestaña de muestreo (Fig. 4.60):

- El usuario puede crear células al realizar selecciones rectangulares sobre la imagen de muestreo creando células

- Se incluye información identificaría de las células correspondientes a sus dimensiones xyzct ancho, alto, al nombre y al código hash de la imagen de origen y a la ip y mac del ordenador donde se muestreó.

- En la imagen se superimpone un rectángulo correspondiente al muestreo que es sustituido por los bordes de la célula cuando estos son encontrados.

- El borde cambia si el usuario elige uno distinto en la pestaña de contornos.

Pestaña de contornos (Fig.4.59):

- En un panel en el lateral izquierdo se numeran los identificadores de las células encontradas.

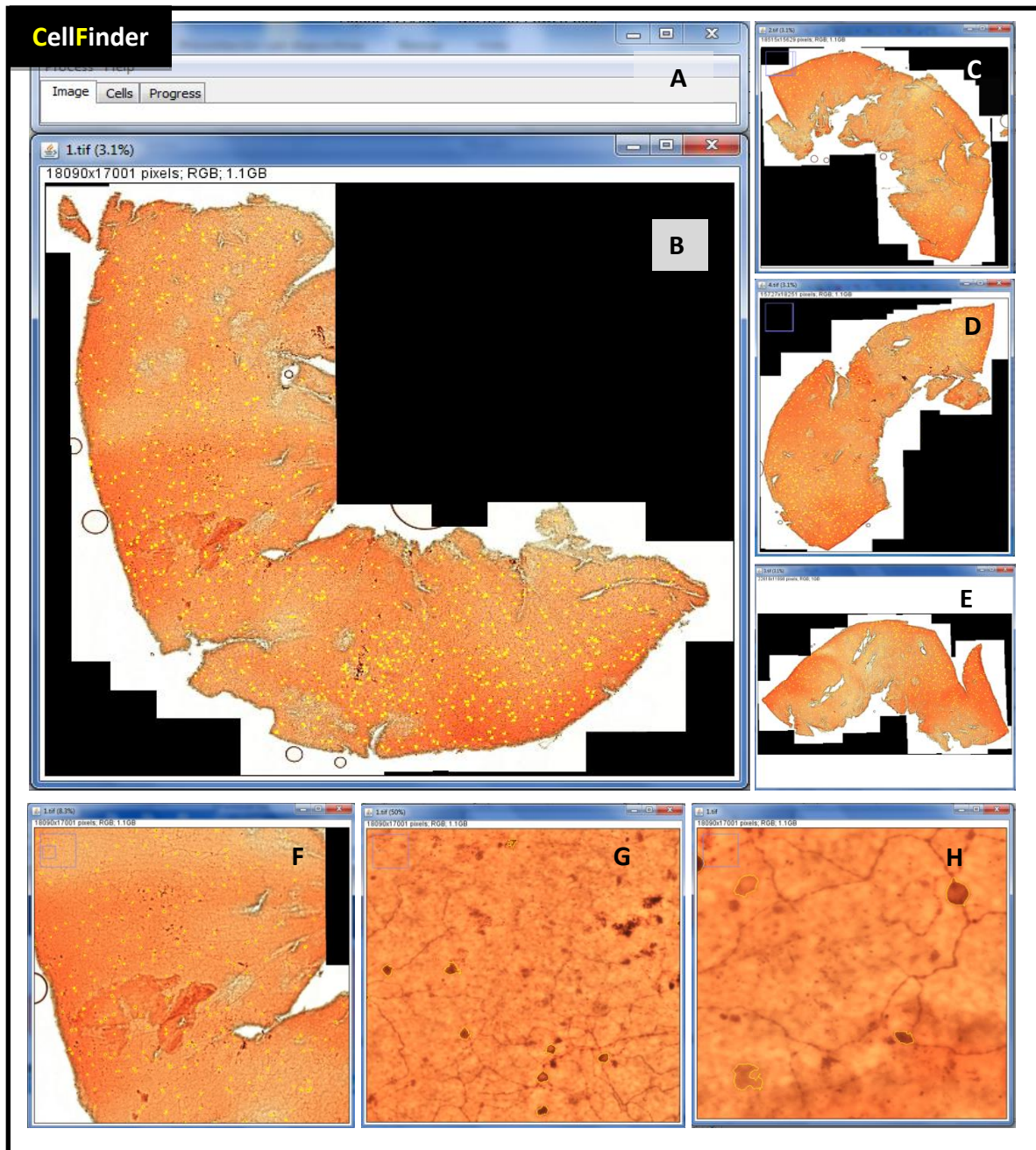


Fig4.59. Superimágenes de retinas marcadas. A) Interfaz de CellFinder, pestaña de muestreo de células con una retina abierta (B). B-E) 4 retinas montadas con Stitch&Focus y marcadas con CellFinder. F-H) Detalle a distintos aumentos de la retina B con las células marcadas en CellFinder, aumentos: 8,3%, 50%, 100%.

- En un panel central se muestra la imagen de las células con su contorno sobreimpresionado
- Al seleccionar una célula por su imagen o identificador se sincroniza la selección con el otro panel.
- Al seleccionar una célula se muestra un panel con todas las imágenes o vistas de esa célula.
- Al seleccionar una célula se muestra en un panel la célula sobreimpresionada con todos sus posibles contornos.
- Al seleccionar una célula se muestra en un panel la célula sobreimpresionada con una serie de contornos más probables.
- Al seleccionar un contorno en el panel de todos los contornos o de contornos más probables este pasa a ser el contorno en el también en el otro panel y pasa a ser el contorno elegido y sobreimpresionado de la célula en el panel central, así como en la imagen de muestreo.
- Al seleccionar un contorno en el panel de todos los contornos este se añade al panel de contornos más probables si no se encontraba en este.
- La célula y su contorno seleccionado aparecen con un color de fondo diferente.
- Al seleccionar un contorno se adaptan las barras de scrolling para mostrar el contorno seleccionado centrado.
- La selección de un borde por parte del usuario pasa al núcleo del programa.
- El usuario puede solicitar eliminar una selección/célula, eliminándose esta de los paneles de esta pestaña y pasándose la petición al núcleo del programa.
- El usuario puede solicitar que se encuentren más contornos para una célula, pasándose la petición al núcleo del programa.
- El usuario puede asignar una probabilidad de ser positiva a una célula entre 0 y 1 en fracciones de 0.1, la asignación pasa a la célula y la célula actualizada al núcleo.
- El usuario puede asignar un índice de corrección al borde de una célula entre 0 y 1 en fracciones de 0.1, la asignación pasa a la célula y la célula actualizada al núcleo.
- El usuario puede asignar una célula como descartada, la asignación pasa a la célula y la célula actualizada al núcleo.
- Cuando un usuario selecciona una célula y a continuación otra se considera que la

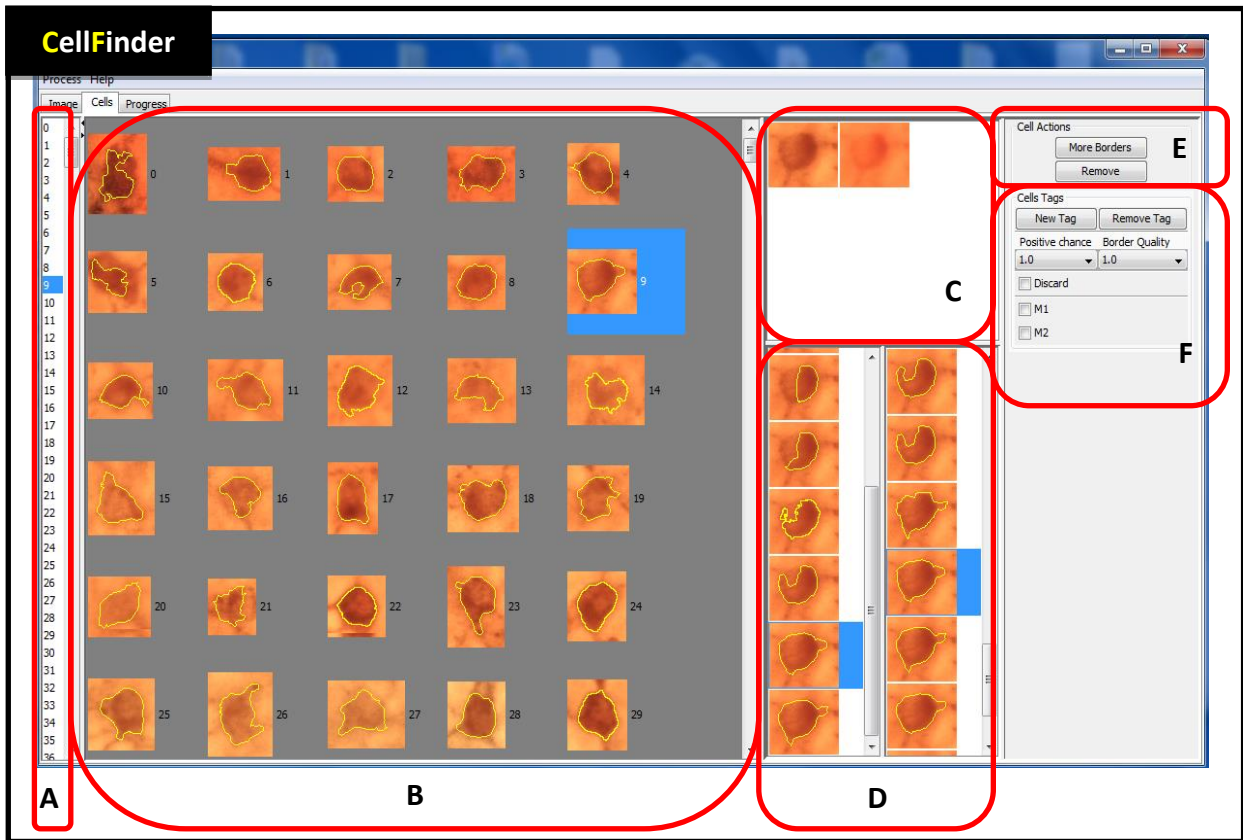


Fig4.60. Interfaz de CellFinder, pestaña de gestión de células. A) Lista selección de células por Id. B) Lista de selección de células por su imagen, se muestra la célula con su contorno elegido sobrepresionado. C) Vistas de la célula. En este caso, a la izquierda una vista contrastada correspondiente a la imagen se muestreo y a la derecha la imagen original sobre la que se realiza la medida. D) Paneles de selección de contorno. A la izquierda panel de los contornos más probables. A la derecha panel con todos los contornos. E) Panel de acciones sobre las células. Arriba opción de buscar más contornos de la célula. Abajo eliminar la célula del análisis. F) Panel de gestión de etiquetas. Arriba crear y eliminar etiquetas. En medio, las etiquetas por defecto: dos desplegable numéricos, uno para asignar la probabilidad de célula positiva y otro para asignar la calidad de borde y una etiqueta para marcar la célula como descarte. Abajo dos etiquetas creadas y usadas en nuestro caso: M1 y M2.

primera ya ha sido revisada por el usuario.

- El usuario puede crear etiquetas.
- El usuario puede eliminar etiquetas.
- El usuario puede asignar o quitar etiquetas a las células, la asignación pasa a la célula y la célula actualizada al núcleo.

- En cada célula se marcan los contornos elegidos según sean elegidos automáticamente por el programa o seleccionados por el usuario.

- Las etiquetas de cada célula son mostradas junto a la imagen de la célula en el panel central.

Menú procesos (Fig. 4.61A):

- El usuario puede solicitar diversos procesos, las peticiones son enviadas al núcleo.
- El usuario puede pausar o reiniciar la búsqueda de contornos de las células.
- El usuario puede pausar o reiniciar la búsqueda automática de las células.
- El usuario puede solicitar globalmente que se mejoren los bordes de todas aquellas células con un valor de calidad de borde no sea 1.0.

- El usuario puede reiniciar o recargar un análisis.

- El usuario puede solicitar que se generen la tabla de resultados.

- El usuario puede solicitar que se muestre una ventana con la ayuda/instrucciones.

- El usuario puede generar una serie de células a partir de un set de Rois/un Roiset, se generan las células y son enviadas al núcleo.

- El usuario puede pedir que se mida cada célula a través de un *hyperstack*, se capturan las vistas en el *hyperstack*, se añaden a la célula y se envía la célula con la petición al núcleo.

- El usuario puede pedir que se mida cada célula en la imagen actualmente abierta se capturan las vistas en la imagen, se añade a la célula y se envía la célula con la petición al núcleo.

Gestión del análisis de imagen:

- Las peticiones que recibe el núcleo del programa relativas al análisis de imagen son redirigidas a la unidad de análisis de imagen.

- La unidad de análisis de imagen recibe y gestiona las peticiones de análisis de

imagen mediante un *broker*. El *broker* conoce al núcleo y los analizadores de imagen. El *broker* recibe peticiones del núcleo, las pone en cola, las envía a los analizadores de imagen libres, recoge los resultados de los analizadores de imagen y devuelve los resultados al núcleo.

- El *broker* tiene una lista con los analizadores de imagen y si están libres u ocupados.

- El *broker* tiene una lista de peticiones de imagen para procesar, la petición puede requerir un tipo de analizador de imagen. El analizador revisa continuamente la lista de peticiones y el estado de los analizadores, si el tipo de petición coincide con el tipo de un analizador libre se le envía y se marca la petición como “en proceso”. Cuando el analizador devuelve el resultado se marca la petición como “completada”, se devuelve al núcleo y se elimina de la cola.

Analizador de imagen:

- El analizador implementado en esta versión está desarrollado para macros de ImageJ, pero puede usarse por ejemplo uno de plugins de ImageJ, de Matlab o de R.

- El analizador recibe peticiones de distinta índole y las dirige a su función correspondiente según de la petición.

- El analizador elegido utiliza los macros de ImageJ para definir los procesos de análisis de imagen ya que este lenguaje es mucho más asequible para los investigadores con poca experiencia en programación, facilitando la modificación o personalización del protocolo de análisis para sus intereses.

- Los macros son llamados y se les dice que información del disco duro deben usar y donde deben devolver los resultados escribiéndolos en el disco duro.

- El analizador escribe los datos al disco, llama al macro y queda observando el lugar de recogida de archivos en el disco duro que se le indicó al macro. El macro genera un último archivo indicando que finalizó su actividad y el programa cierra el proceso de escucha en esa ubicación.

- El analizador puede recibir peticiones de: analizar una nueva célula, buscar más contornos en una célula, refinar contornos en una célula, medir una célula sobre una nueva vista, medir una célula sobre un conjunto de vistas (procedentes de un stack), buscar semillas de células en modo auto.

- El analizador tiene módulos independientes, cada uno con su macro para las siguientes funciones:

- Detectar y ordenar los umbrales a usar para buscar objetos a partir de una imagen.
- Generar unos contornos a partir de unos umbrales, modificaciones de morfología matemática y selecciones de células individuales.
- Generar unos semillas/contornos a partir de unos umbrales, modificaciones de morfología matemática y capturas de zonas con múltiples células.
- Agrupar los contornos de una misma célula en el caso de modo Auto (uso de zonas).
- Generar contornos refinados a partir de la imagen y de contornos o semillas.
- Generar medidas paramétricas del a partir de contornos o semillas y de la imagen de la célula.

Protocolo de análisis de imagen (Fig. 4.61 B):- Los umbrales se devuelven ordinalmente según su capacidad para dejar un número de píxeles lo más equivalente posible a ambos lados del umbral teniendo en cuenta los umbrales ya determinados. Así, se ordenan los umbrales según sean más informativos en un sistema colaborativo entre los umbrales.

- Los objetos o contornos se detectan mediante un sistema multiumbral y de modificaciones morfológicas, cuando se alcanza suficiente número de contornos se sale de la búsqueda de contornos.

- Se buscan contornos activos mediante una modificación que realizamos del *plugin* de contornos activos de ImageJ.

- Se miden parámetros morfométricos y colorímetros de cada célula y dos parámetros desarrollados por nosotros: la “calidad de borde” y la “intensidad limpia”.

Gestión del análisis de datos:

- Su arquitectura es similar a la unidad de análisis de imagen con un broker, analizadores, una cola y peticiones.

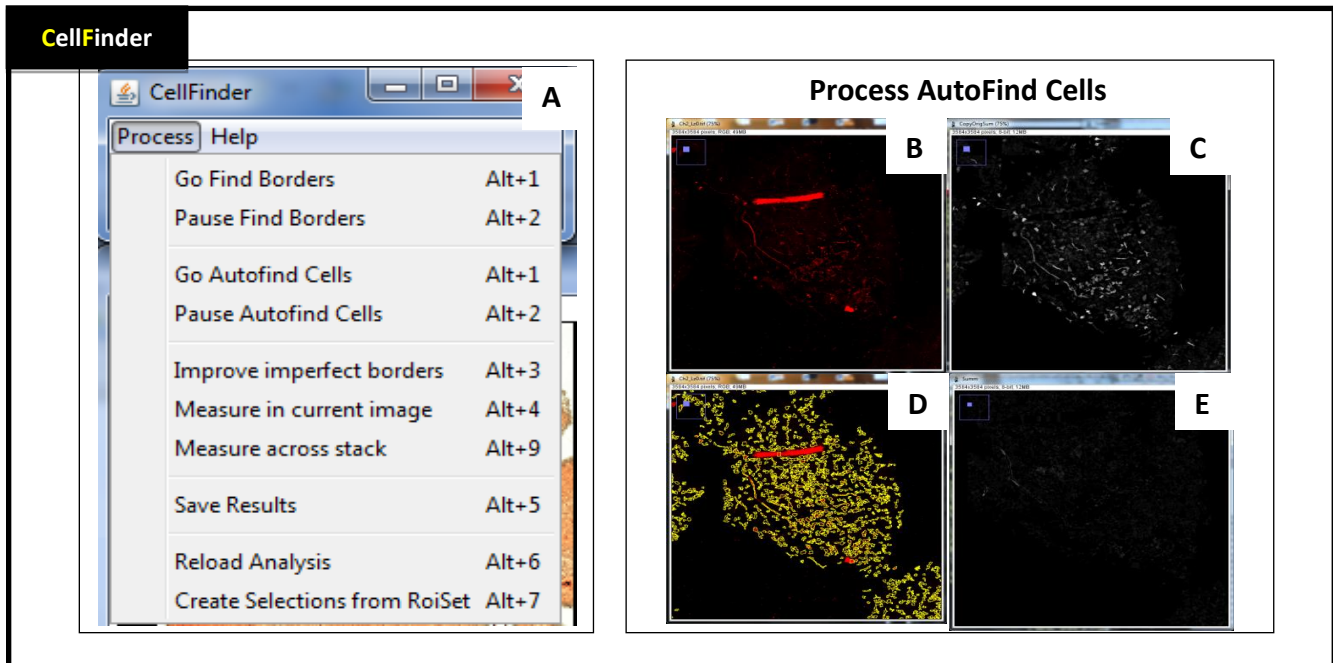


Fig4.61. Procesos de CellFinder y detalle del proceso automático de búsqueda de células. A)Procesos disponibles en CellFinder. B-E)Detalle del proceso de búsqueda automática de células. B)Imagen de la capa ganglionar de una retina entera marcada con un anticuerpo contra la isoforma S de la melanopsina. C)Imagen del final de la fase de búsqueda multiumbral, en ella se puede ver la suma de posibilidades en escala de grises D)La imagen original con los contornos superpuestos en amarillo. E)Fondo restante tras extraer las posibles células.

Analizador de datos:

- En esta versión hay implementados dos analizadores uno desarrollado por nosotros basado en la calidad de borde y circularidad y otro basado en el *Machine Learning* de árbol de decisión *random forest* de Weka, pero puede usarse por ejemplo otro analizador de datos de Weka, un analizador de R o de Mahout-Hadoop.

- En el analizador primero cada contorno va representado por las medidas obtenidas en la detección de ese contorno.

- Además de los valores paramétricos escalares devueltos por el análisis de imagen se añade la posición ordinal para cada parámetro dentro los contornos de la célula. Esto ayuda en la selección del borde óptimo ya que establece una comparación intracelular no solo global de los contornos.

- Según se añaden ejemplares de selecciones del usuario se van añadiendo parámetros al análisis, como parámetros iniciales utilizamos el eje menor, la intensidad

media, la calidad de borde, la circularidad y la regularidad.

- A Weka se le pide primero una reducción de dimensiones, y a continuación un testeo de varios modelos.

- Inicialmente los modelos se contrastan con un selección random 10x del set de entrenamiento, cuando hay suficientes ejemplares se crea un set exclusivo de testeo.

- A weka para educarlo se le presenta la información en formato tabla(csv) sobre el disco duro con la información de todas contornos de las células controladas por el usuario y una última columna indicando si ese contorno es el seleccionado o no. Weka tiene una conexión abierta escuchando modificaciones en el archivo.

- A weka se le presenta una tabla con este mismo formato pero sin la última columna para que puntúe los nuevos contornos. Weka devuelve otro archivo csv con las puntuaciones. Estas puntuaciones son recogidas y asignadas a los contornos. El contorno con mayor puntuación es preseleccionado. Los contornos con puntuaciones altas son indicados en la célula como contornos más probables.

- Cada vez que aumenta significativamente el número de células corregidas por el usuario y por lo tanto el refinamiento del modelo el núcleo manda las células no revisadas a volver a ser puntuadas y se preselecciona un contorno y contornos más probables.

Persistencia:

- La arquitectura de la persistencia está conformada por un broker y persistores.

- Cada vez que una célula es modificada esta pasa al núcleo donde es modificada en memoria y de aquí redirigida a la unidad de persistencia.

- La unidad de persistencia es responsable de que todo el proceso vaya siendo guardado automáticamente en el disco duro.

- Cada vez que algo cambia en una célula, por parte del programa o del usuario, el cambio se persiste.

- En nuestro caso, el persistor consiste en un grabado en disco duro local en formato serializado y en formato XML.

- El formato serializado ofrece más velocidad mientras que el formato XML permite una lectura en texto plano del objeto y es más fácil de reutilizar.

- Se pueden utilizar otros persistores, como SQLServer o MySQL o preferiblemente NoSQL, como MongoDB o Hadoop.

- Las unidades de guardado son las células, al estar la información ya estructurada en estas pequeñas unidades es muy fácil almacenarla de manera distribuida. Cada célula se encuentra en una carpeta, esta contiene toda la información serializada y XML, menos los *rois* que van guardados como *rois* que no son serializables y van en la misma carpeta.

- El persistor es responsable de releer las células para recargar el análisis, una vez las relea las envía al núcleo donde pasan a memoria.

Obtener resultados:

- Cuando el usuario quiere obtener los resultados finales la petición pasa al núcleo y este envía sus células a la unidad de escritura de resultados.

- La unidad de escritura escribe una tabla que contiene la información de todos los contornos de todas las células y otra con la información exclusivamente del contorno elegido de cada célula, habiendo una fila por célula.

- Cada contorno puede tener varias medidas, por ejemplo para varias vistas, cada columna recibe el nombre del parámetro medido acompañado del canal, posición z, el frame temporal en que se obtuvo y el id de orden de medida para ese contorno. Esto permite tener las medidas de varios canales de una célula en una misma fila.

- También se genera un RoiSet, un conjunto de Rois con los contornos elegidos de todas las células según su posición en la imagen.

4.3.5.3. Estructura

Visión reducida:

- 1) El usuario abre la imagen a analizar
- 2) Se añaden células paralelamente por dos procedimientos:
 - 2.1) Manual: El usuario marca las células
 - 2.2) Automático: El software busca automáticamente células
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula
- 4) El software mide la célula con cada contorno
- 5) El software preselecciona un contorno basándose en la IA
- 6) El usuario corrige los contornos erróneos
- 7) El usuario asigna etiquetas y mide en otras dimensiones si así lo desea.
- 8) El software educa la IA con las medidas en base a las correcciones
- 9) El software corrige las preselecciones con la nueva IA

10) El software produce las medidas finales a petición del usuario

11) El usuario analiza las medidas y clasifica las células

Visión ampliada:

1) El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.

2) El usuario marca en la imagen algunas células.

3) El programa busca los posibles contornos en cada célula en los pasos 4 a 10. Para cada región de una célula se van realizando las operaciones 4-10.

4) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.

Para cada umbral se realizan los pasos 5-10.

5) Se convierte la región a binario con ese umbral.

Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-10.

6) Se buscan objetos en la imagen umbralada

7) Se miden los objetos detectados.

Para cada modificación (como *watershed* y *despeckling*) se realizan los pasos 8-10:

8) Se duplica la imagen umbralada

9) Se somete la imagen a la modificación.

10) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.

11) Se buscan contornos refinados en base a los contornos del paso 10.

12) Se miden los objetos detectados.

13) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide cuál de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor basándose en IA. Se le pide a la IA una probabilidad para cada contorno, el que tenga mayor probabilidad será el contorno predeterminado por el programa.

14) Una vez encontrados los contornos posibles para cada célula y determinado su contorno preseleccionado. El usuario se dirige a la pestaña de corrección de contornos.

15) El usuario puede aplicar etiquetas a las células. El usuario mide en otras dimensiones si así lo considera.

16) El usuario puede seleccionar un contorno diferente al preseleccionado. El usuario puede marcar células o rangos de células con contorno correcto. Cuando el usuario selecciona un contorno o marca contornos como correctos esta selección se pasa a la IA para educarla.

17) Se le vuelve a pedir a la IA una probabilidad para cada contorno, se cambia la preselección del contorno de cada célula si la IA así lo indica en aquellas células que usuario aún no ha revisado.

18) Se realiza la búsqueda automática en los pasos 19-22.

19) El programa selecciona cuadrantes de la imagen.

20) Para cada cuadrante se van realizando las operaciones 3-10 y 12.

21) Los contornos que se solapan pasan a ser contornos de una misma célula.

22) Se repiten los pasos 3-17 para cada célula y se le aplica la etiqueta auto a la célula.

23) El usuario pide las medidas finales que toman la línea de medida del contorno seleccionado para cada célula.

24) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

4.3.5.4. Algoritmos

Se desarrollaron e implementaron algoritmos para las siguientes funciones en las siguientes versiones:

CellFinder v0.1

- Umbralado multinivel.
- Detectar los niveles a umbralar.
- Detectar los niveles a umbralar local y globalmente.
- Ordenar los niveles de umbralado.
- Umbralado multinivel con modificaciones morfológicas.
- Agregado de objetos en la Imagen de Suma.
- Extraer células de la Imagen de Suma y componer la Imagen Resultado.
- Recorrer la imagen por cuadrantes.
- Generar las medidas de las células.

CellFinder v0.2

- Lectura del archivo de *CellCounter*.
- Búsqueda de objetos en el cuadrante de una célula.

- Uso de medidas para seleccionar un contorno.
- El parámetro calidad de borde.
- Obtener medidas finales.

CellFinder v0.3

- Capturar la ventana de muestreo.
- Gestionar las dimensiones, las pestañas y la imagen de muestreo.
- Crear selecciones y añadirlas a la colección de objetos.
- Gestionar la cola de análisis.
- El macro de búsqueda de objetos y medida.
- Selección de contorno preseleccionado y contornos candidatos.
- Adición de los contornos a la colección de objetos.
- Adición de selecciones y contornos a la imagen de muestreo.
- Corrección de contornos y sincronización.
- Guardado en tiempo real de selecciones.
- Recarga de análisis.
- Compilación de resultados finales.

CellFinder v0.4

- Iniciar la IA.
- Creación de modelos.
- Rellenar la base de aprendizaje y de testeo de modelos.
- Educar modelos.
- Seleccionar un modelo.
- Preguntar a la IA, preselección de un contorno y contornos candidatos.

CellFinder v0.5

- Calcular los tamaños límite de análisis.
- Crear los cuadrantes de análisis.
- Gestión de la cola de análisis auto.
- Sincronización entre colas.

- El proceso de buscar contornos.
- Asociar contornos en células.
- Crear las células auto.
- Adición de las células auto a la colección de objetos.
- Representación de las células auto en el panel de objetos.
- Adición sobre la imagen de muestreo.

CellFinder v0.6

- Crear etiquetas.
- Asignar o quitar etiqueta a posteriori.
- Mejorar bordes seleccionados.
- Medir en la imagen actual.
- Medir a través del *hyperstack*.

5. Discusión

5.1. Medidas de actividad animal

5.1.1. Tau más corto en animales sin conos y bastones

Nuestros estudios muestran que los ratones C3H *rd/rd* tienen un periodo endógeno más corto que el de los C3H *+/+* (23 horas frente a 23,29 horas). Además, los ratones C3H *rd/rd* presentan mayor variabilidad en su periodo que los C3H *+/+* (0,47 h frente a 0,26 h.). La principal diferencia entre nuestras cepas de ratón C3H, *rd/rd* y *+/+*, consiste en que la primera carece de conos y bastones desde un estadio muy temprano, dado que la degeneración en esta cepa ocurre de forma rápida. Pittendrigh (1976), utilizando como modelo la cepa C57BL, encontró un ritmo endógeno entorno a las 23,50h ($\pm 0,40$) [248]. Nuestros resultados apuntan a que los conos y los bastones, presentes en los ratones C3H *+/+* en el desarrollo deja su impronta en el SCN, responsable central del ritmo circadiano, produciéndose modificaciones en el mismo tal vez más allá de los primeros estadios del desarrollo postnatal.

Son varias las posibilidades que se pueden plantear sobre cuál puede ser el mecanismo por el que se generan estas diferencias entre *rd/rd* y *+/+* y sus implicaciones como mecanismo de adaptación: una regulación epigenética plástica, una regulación tónica o una regulación epigenética durante el desarrollo.

- Una **regulación epigenética plástica** implicaría una actuación constante en el SCN debida a la señal captada por conos y bastones. Los distintos subtipos celulares de ipRGC afectan a distintos núcleos del cerebro, como los del sueño, alerta, visuales o constricción pupilar, en los que el efecto puede depender de la presencia o ausencia de conos y bastones [114]. De igual manera, el SNC recibe un 90% de aferencias de células tipo M1 y un 10% de células de tipo M2 [114], siendo las últimas más sensibles a la señal que reciben de conos y bastones [105, 106]. En este sentido, nuestros resultados indicarían que ese 10% de células podrían ser suficientes para imprimir un ritmo circadiano más intenso y/o duradero generado por el SCN. Recientemente se ha descubierto la existencia de una metilación plástica del

DNA en el SCN [249] que podría estar relacionada con los efectos mencionados. Sin embargo, esta metilación, al ser plástica, se modifica progresivamente, por lo que, mientras que puede ser una buena explicación para los post-efectos, no lo es para el tau de los animales una vez se han pasado los postefectos.

- Una **acción tónica** implicaría que la mera presencia de conos y bastones produce una modificación de la actividad del SCN, independiente de su captación de luz [250]. Esto podría explicarse por la producción de melatonina de los conos y bastones que puede modificar la actividad de las ipRGC directamente [251] o indirectamente a través de células dopaminérgicas [252]. Las ipRGC, a su vez, podrían modificar la actividad del SCN. A favor de esta hipótesis encontramos que la enucleación [253], el daño del RHT[254, 255] o la ablación de bastones [256] parecen alterar el funcionamiento del SCN. Sin embargo, en modelos de degeneración tardía de conos y bastones, como la rata RCS, no se encuentra esta modificación del SCN [60, 257] que sí se encuentra en los ratones CBA/J o C3H *rd* con degeneración retiniana temprana [250, 258]. Todo esto sugiere que la presencia o ausencia de conos y bastones en las primeras etapas postnatales puede ser crucial en el desarrollo del SCN.

- Una explicación basada en una **modificación epigenética permanente en las etapas tempranas de desarrollo postnatal** es la que parece tener más sentido en el contexto expuesto. En estas etapas una acción tónica o las señales transmitidas de conos y bastones pueden definir el desarrollo y funcionamiento de distintos núcleos cerebrales. Este mecanismo de desarrollo dependiente de señales ya ha sido descrito para los núcleos visuales del cerebro [259, 260]. En el caso del SCN la señal de conos y bastones podría modificar o influir en la metilación de del gen de la CKIε, responsable de la duración del periodo mediante la hiper/hipofosforilación de los genes reloj[261]. Modificando la expresión de CKIε se modificaría consecuentemente el periodo.

La diferencia de Tau entre *rd/rd* y *+/+* por modificaciones epigenéticas permanentes durante desarrollo

La posibilidad de que la presencia o ausencia de conos y bastones afecte al

desarrollo del SCN ya ha sido descrita en nuestro grupo para ratones C3H *rd/rd* [250], y en otros grupos para ratones CBA [262]. En el caso de los ratones CBA se encontró un aumento en el número de células que expresan péptido vasoactivo intestinal (VIP) o vasopresina (VP) en el SCN de ratones sin conos ni bastones[262]. En condiciones de oscuridad constante el SCN de los ratones C3H sin conos ni bastones presentan niveles reducidos de Per1 y CREB respecto a los ratones C3H con conos y bastones.[250].

La conexión de la retina con distintos núcleos del cerebro tiene un papel importante en el desarrollo. Durante el desarrollo la pérdida de tejidos diana puede dar lugar a la pérdida de las células inervantes, de manera que la supervivencia de las células depende de su diana. Aumentar el número de células diana reduce la muerte neuronal en el desarrollo de las células que la inervan [263, 264] y reducir el input aferente aumenta la muerte neuronal [265, 266]. De esta manera, la conexión de las células de la retina con el SCN y la producción de inputs por conos y bastones al SCN podría determinar su desarrollo y composición celular en el adulto.

En los ratones CBA/J o C3H *rd1* encontramos una degeneración retiniana temprana e intensa que elimina pronto conos y bastones. Las ratas RCS también sufren pérdida de conos y bastones, pero en etapas más tardías, y en los adultos sin conos y bastones no se encuentran las modificaciones [60, 257] que sí se observan en CBA y C3H *rd1*[258].

La ontogenia de ipRGCs [110, la innervación del SCN y desarrollo del sistema circadiano {Ruggiero, 2009 #565, 267}, , la proporción de células ON-OFF{Tian, 2003 #583}y la expresión de melanopsina, genes reloj, AVP y VIP, y maduración de proyecciones [268, 269] podrían causar la modificación del SCN en el desarrollo, al igual que ocurre en el desarrollo de los núcleos visuales [270-273]. A partir de la apertura de los ojos (P15) maduran principalmente los astrocitos del SCN hasta P25 [274-276] que pueden influir en la conectividad sináptica [277]. Sin embargo, la identidad de las células y ciertas proyecciones de SCN parece ser plástica hasta P90 o mayor edad [249, 278] [279] [280].

Modificaciones epigenéticas permanentes durante desarrollo como mecanismo

adaptativo

Si observamos la dirección de las modificaciones: 23 ($\pm 0,47$) h en *rd/rd* frente a 23,29 ($\pm 0,26$) h en *+/+*, parece que la presencia de conos y bastones da lugar a un ritmo más cercano al impuesto ambientalmente (LD12:12) y con menor variabilidad.

Si tomamos como más probable la hipótesis de que las diferencias que encontramos entre *rd/rd* y *+/+* se deben a modificaciones ocurridas en el desarrollo por la captación de luz, podemos plantearnos que tales modificaciones son persistentes, de carácter epigenético y que están codificadas por las propias condiciones ambientales. Se ha descrito cómo el remodelado de la cromatina define perfiles de transcripción responsables de la plasticidad neuronal, el aprendizaje, la memoria, modulación de la vida temprana y comportamiento adulto, así como respuestas a la exposición a drogas [281]. De la misma manera, los estudios entre gemelos demuestran que existen variación de tau entre estos y que al menos la mitad de esta variación está controlada por el ambiente [282, 283].

Según este modelo, la señal de conos y bastones imprimiría modificaciones epigenéticas ligadas a las condiciones lumínicas ambientales durante el desarrollo que fuerzan al ritmo endógeno a acercarse a 24 h, los efectos de las condiciones lumínicas en los recién nacidos ya han sido demostradas [284],[285]. Esto podría haber surgido como un mecanismo adaptativo de respuesta ante un medio ambiente que cambia demasiado rápido para la deriva genética, que solo es capaz de una adaptación a muy largo plazo de la especie. Por otro lado, esta adaptación habría servido de alguna manera para que los individuos puedan conservar ritmos endógenos con mayor distancia a las 24 h. Para confirmar esta posibilidad debería exponerse ratones *+/+* a condiciones de oscuridad desde la gestación hasta su estado adulto y observar si su tau es más corto que el de individuos expuestos a condiciones de LD12:12.

5.1.2. La duración de los post-efectos, tau y las cepas

Cuando observamos la gráfica de actividad de nuestros ratones detenidamente e intentamos trazar una recta que defina el desfase del ritmo endógeno respecto a 24 horas nos percatamos de que existe una zona entorno al inicio de la condición de

oscuridad en la que la recta tiene una inclinación intermedia, entre la inicial bajo luz-oscuridad y la final en oscuridad. Esta zona de transición entre ritmos corresponde a los post-efectos, una serie de días en los que se produce una transición para tau entre las condiciones ambientales a las que estaba expuesto el animal y el periodo endógeno del animal que es expresado en oscuridad [248]. Es hasta cierto punto lógico pensar que cuanto mayor sea la diferencia entre el ritmo previo y el ritmo nuevo la transición será más complicada y larga, puesto que el cambio de fase debe ser mayor. Esto mismo es lo que observamos en nuestros resultados: cuanto menor es el tau endógeno del ratón, más distancia hay con el ritmo ambiental de 24h (LD12:12) y más aumentan los días que se tarda en alcanzar el ritmo endógeno estable. De esta manera, observamos que los días de post-efectos, hasta que se estabiliza el ritmo endógeno del ratón, viniendo de un ritmo LD12:12, dependerá del propio tau endógeno del ratón. Para ratones C3H encontramos que hay un día de post-efectos por cada 4,5 minutos de diferencia entre el periodo endógeno y el fotoperiodo. Pittendrigh (1976), utilizando la cepa C57BL, encontró un relación de en torno a 1 día de post-efectos por cada 2 minutos de diferencia[248]. Nos planteamos qué significado puede tener esta diferencia entre cepas, para ello estudiamos qué se conoce de la naturaleza y origen orgánico de los post-efectos y su posible relación con una importante diferencia entre las cepas, la expresión de melatonina.

Los post-efectos

Los post-efectos (o “after-effects”) son modificaciones del FRP (“free running period” o periodo endógeno) inducidas por la luz tras la exposición a condiciones diferentes a las del periodo interno [248]. Debido a estas condiciones se debe tener especial cuidado a la hora de realizar supuestos sobre el estado del tau de un individuo y estas condiciones deberían ser comprobadas y controladas para no invalidar o reducir el valor de determinados experimentos circadianos o con influencia circadiana (Aschoff 1978), [248]. Los post-efectos observados en nuestros experimentos se relacionan con el periodo del zeitgeber según la clasificación de Pittendrigh En estos tau evoluciona del fotoperiodo ambiental hacia el periodo endógeno al exponer los ratones a oscuridad constante [248].. Pittendrigh (1976) describió que, aunque un

animal tenga un tau genéticamente más probable, el estado observable dependerá de su historia fótica previa y la adaptación al ritmo interno será más rápida cuanto menos distancia haya entre este y el fotoperiodo impuesto ambientalmente [248].

Los humanos, con un ritmo endógeno de 24,18h, también muestran post-efectos de actividad tras ser expuestos a ritmos de 24,65h o 23,5h [286]. De igual manera, su expresión de melatonina depende de la historia previa de iluminación [287].

¿Qué origina los post-efectos?

Si bien se han propuesto y estudiado distintos órganos responsables de los post-efectos, y entre los posibles candidatos están el SCN, la retina y otros órganos del cuerpo, se desconoce de momento su origen exacto.

La influencia del ritmo previo no solo afecta al ritmo de actividad [248], sino también a la actividad del SCN [288, 289]. Además, ratones bajo distintos fotoperiodos muestran distintivamente grupos de células del SCN que se activan con el inicio del periodo de luz (M) y otras que se activan con el final del mismo (E)[290]. Estos grupos pueden generar distintos patrones según el acople de células M y E del SCN inducido por la luz, como podrían ser los post-efectos.[291]. No obstante, si se reemplaza el SCN de un animal con post-efectos por el SCN de un animal sin ellos, los post-efectos se mantienen, indicando que otras estructuras también están implicadas en su mantenimiento [292].

El SNC cultivado in vitro muestra un periodo de longitud inversamente proporcional en su expresión de Per1 al observado in vivo por la actividad animal. Es decir, el periodo del SCN parece oponerse al ritmo del post-efecto [278]. Esto implicaría que el SCN tiene una función compensatoria a los post-efectos generados en otro lugar del cuerpo. De igual manera, se observan post-efectos procedentes del periodo in utero, los cuales podrían ser de origen humoral, por temperatura o pistas sociales de la madre [278]. En ausencia de SCN las células de los tejidos periféricos continúan oscilando, pero pierden coherencia, siendo necesario el SCN para que se

mantengan en fase [293]. La ablación del SCN elimina el ritmo en algunos órganos y, al volver a transplantarlo, se restaura la ritmicidad en unos órganos (hígado, riñones) pero no en otros (bazo, corazón) [294]. Sin embargo, no se encuentran post-efectos en bazo, esófago, pulmón y timo. De esta manera, es posible que los post-efectos periféricos sean producto de cambios de fase, en vez de cambios de periodo [295].

La actividad de CKIε [296], genes Per [297] y CLOCK [298] no altera la formación de los post-efectos. Esto indica que los post-efectos no están modulados por el mecanismo circadiano molecular de los genes reloj.

¿Un posible efecto tónico mediado por melatonina?

En nuestros ratones C3H observamos 13,36 días de post-efectos por cada hora de desfase fotoperiodo-periodo endógeno mientras que Pittendrigh en C57/BL encontró un relación de en torno a 30 días de post-efectos por cada hora de desfase [248]. Entre los ratones C3H y los ratones C57/BL existe una diferencia importante, la expresión de melatonina. Los ratones C57/BL expresan cantidades muy reducidas de melatonina, mientras que los ratones C3H generan cantidades normales de melatonina [299, 300]. Si el SCN dirige la producción de melatonina por la pineal, se convierte en el principal sincronizador del resto del cuerpo. Si la síntesis de melatonina es reducida como en C57/BL, la expresión del ritmo endógeno tardará más tiempo en imponerse sobre el ritmo existente en el resto del cuerpo. Esto explicaría las diferencias de tiempo necesario para alcanzar el ritmo endógeno entre C3H y C57/BL.

Los experimentos de eliminación y sustitución de SCN muestran que este no influye en los post-efectos, al igual que la retina [278, 292]. Tampoco se encuentran post-efectos en bazo, esófago, pulmón y timo [295] y sin SCN se pierde la sincronización entre las células de en hígado, riñones, bazo, corazón resultando en una pérdida de ritmo del órgano[294]. Restituir el SCN resincroniza las células de hígado y riñones [294]. La melatonina es considerada el principal sincronizador de estas células[294]. Por otro lado, la melatonina se produce esencialmente en la glándula pineal, ojo y la médula ósea [301]. Además, también se produce para uso local en el tracto gastrointestinal y en la piel [302] y se considera responsable de eventos

asimilables a los post-efectos como el jet-lag [303].

Si al eliminar el SCN o el ojo siguen persistiendo los post-efectos, esto implica que, aunque la sincronización del ritmo esté centralizada en el SCN, este es capaz de delegar parcialmente la propagación del ritmo a otras partes del cuerpo y, al ser el SCN extirpado, estas partes son capaces de mantener el último ritmo impuesto previamente por el SCN. La glándula pineal y la médula ósea parecen buenos candidatos para ocupar este puesto. En el caso de C57/BL la producción de melatonina se ve alterada por una mutación en su vía de síntesis [303], por lo que resultan afectados tanto la glándula pineal como otros órganos productores de melatonina.

El hecho de que la modificación de la maquinaria molecular del reloj circadiano de las células del SCN (Per, CLOCK, CKI ϵ) no afecte a los post-efectos implica que la maquinaria que mantiene el ritmo circadiano celular del SCN no sea la misma que mantiene el ritmo circadiano en las células que responden a la melatonina en otras partes del cuerpo.

5.1.3. Efecto de la luz azul en el ritmo de los animales *rd/rd*

La melanopsina tiene una propiedad en común con las opsinas de invertebrados, la biestabilidad[107], que consiste en la capacidad de responder a la luz de onda corta (azul) usando 11-cis RAL que se convierte a todo-trans RAL y de regenerar 11-cis RAL (a partir de todo-trans RAL) con luz de onda larga (roja) [87-89]. Esta regeneración del cromóforo sería, de esta manera, posible en las ipRGC, que no se localizan próximas al epitelio pigmentario, responsable de la regeneración del cromóforo de conos y bastones. Con todo, la biestabilidad de la melanopsina, que se ha observado en pez zebra, aún está por demostrarse en mamíferos [108]. Podría ser que las ipRGC reciclasen su propio retinaldehído, aunque también cabría la posibilidad de que este fuese aportado por el epitelio pigmentario [107] o desde las células de Müller [304]. Por otro lado, a pesar de la biestabilidad de la melanopsina, puede que esta sea una vía secundaria, ocurriendo la principal regeneración del cromóforo mediante un mecanismo enzimático externo como ocurre en *Drosophila*

[305].

Para esclarecer la importancia de la biestabilidad en el aporte de 11-cis RAL expusimos los ratones a luz azul (esto es, en total ausencia de luz roja) a fin de que el 11-cis RAL se agotase, al no tener posibilidad de ser regenerado por el mecanismo de biestabilidad.

En nuestros resultados de actividad aparecen patrones interesantes: una ampliación del periodo de actividad, una evolución por fases, un patrón repetitivo o estacional con forma de pirámide y una evolución característica en la secuencia de estas pirámides. Tales patrones, que se comentan más detalladamente más abajo, podrían corresponder a una combinación de dos o tres eventos: supresión de actividad por luz azul (intensa), agotamiento del 11-cis RAL y cambio del ritmo circadiano en el SCN.

Ampliación del periodo de actividad por retraso del fin de actividad

El SCN está formado por grupos de células activadas por el inicio de luz (M de *Morning*) y otras por el fin de la luz (E de *Evening*) [290]. Los grupos M y E pueden generar distintos patrones según su grado de acoplamiento que es inducido por la luz [291]. En los ratones expuestos a luz azul observamos una tendencia a largo plazo de alargamiento del periodo de actividad basado en un retraso del fin de actividad. El periodo de actividad se va ampliando desde unas 8 horas hasta ocupar todo el periodo de oscuridad, 12 horas. Esta evolución nos da a entender que el contraste entre la luz intensa captada por las células M por la mañana y la falta de luz captada por las células E es de tal magnitud que se induce el retraso de la fase de las células E. Este experimento en condiciones de luz azul parece demostrar cierta dependencia de la distancia o acople entre M y E según la longitud de onda de la luz o su intensidad y por ende de 11-cis RAL.

Evolución por fases

Podemos observar tres fases en la evolución de la actividad, que se describen a continuación:

Fase 1) La actividad cesa al comenzar el periodo de luz. En este momento los niveles de 11-cis RAL son altos y la intensidad de luz es alta y en la longitud de onda

(azul) de mayor sensibilidad para la melanopsina. Hay que pensar que 200lx de luz azul, donde está el pico de respuesta de las ipRGC se puede considerar equivalente a 2000lx de luz blanca. Al captar tal cantidad de luz, se produce una supresión locomotora de actividad por luz, por lo que la actividad cesa rápidamente en el periodo de luz azul. Sin embargo, en esta fase ya se está produciendo una disminución de la cantidad de 11-cis RAL, al estar el animal expuesto a luz azul que lo gasta y no a luz roja que lo regenera.

Fase 2) La actividad del animal persiste al comienzo del periodo de luz. Según se va reduciendo la cantidad de 11-cis RAL, las ipRGC van perdiendo capacidad de respuesta a la luz. Como resultado de la poca señal captada el SCN, va ajustando hacia delante la fase de sus células M y E, según su ritmo endógeno que es menor que las 24 horas del fotoperiodo. De la misma manera, por esta poca señal, se va reduciendo o desaparece la supresión de actividad. Al continuar la actividad en el periodo de luz azul se sigue reduciendo ahora más rápido el 11-cis RAL.

Fase 3) Tras unos días en los que la actividad persiste en el periodo de luz azul retorna posteriormente al ritmo encarrilado. Esto significa que aún queda 11-cis RAL y, al introducirse la actividad en la luz azul, aumentan las horas de exposición a luz azul, con lo que recibe suficiente señal para conseguir encarrilar el SCN con el ritmo externo de LD12:12. Esto implica que la cantidad de 11-cis RAL presente, combinada con las horas de exposición, producen más señal que la velocidad a la que se reduce el 11-cis RAL en este momento en que la actividad vuelve a encarrilar con las condiciones ambientales. Ya que la captación de fotones y el gasto de 11-cis RAL deben ser proporcionales, que se dé este efecto debería implicar o que el adelanto de fase ocurre más rápido que la señal captada y, por lo tanto, no son proporcionales, o que la integración temporal a largo plazo de la señal es más efectiva que la integración a corto plazo.

Patrón repetitivo o estacional con forma de pirámide

Al observar el ritmo bajo en luz azul, encontramos que, hasta que se estabiliza el periodo de actividad, pasando a ocupar todo el periodo de oscuridad, aparece un patrón repetitivo o estacional con forma de pirámide. A cada una de estas pirámides la denominamos evento y está formado por unos días de expansión progresiva y un día

final de compresión repentina.

En cada evento se va retrasando el final de la actividad durante varios días y, en consecuencia, se expande el periodo de actividad hasta alcanzar un máximo en el que la actividad cubre todo el periodo de oscuridad y el fin del periodo de actividad coincide con el final del periodo de oscuridad. Tras este máximo, el final de actividad se adelanta bruscamente, comprimiendo el periodo de actividad, iniciando un nuevo evento.

Días de expansión: consideramos que la expansión progresiva se debe a que al perderse 11-cis RAL la fase de las células M del SCN tiende a avanzar la fase, adelantando el ritmo expresando el componente endógeno (inicio de pirámide), pero la supresión de actividad no permite observar este avance de fase. Al adelantarse la fase, M toca el periodo de luz azul por delante, al iniciar la actividad, la luz percibida por M en este periodo hace que las E regulen su ritmo atrasando su fase hacia el final de su actividad.

Día de compresión: la fase de E se va retrasando hasta que la fase de actividad cubre todo el periodo de oscuridad y se empieza a meter en el inicio del periodo de luz. Al captarse luz al final de la actividad, se detecta por E que se ha introducido en el periodo de luz, lo que provoca un fuerte avance de fase, iniciándose una nueva pirámide.

De este patrón de pirámide se extrae que el ratón siga activo al inicio del periodo de luz (al final de su periodo de actividad) tiene un efecto mucho más intenso que que inicie su actividad cuando todavía no ha iniciado el periodo de oscuridad. Esto podría deberse a dos opciones: 1) Una mayor susceptibilidad al final del periodo de actividad -del grupo E del SCN, que al inicio del periodo de actividad-el grupo M del SCN. 2) Que la regulación que media la expansión esté ligada al SCN, pero el colapso brusco del final del periodo de actividad se produce por enmascaramiento en vez de por encarrilamiento, de hecho, el adelanto está fuera del rango de regulación endógena (>2h).

Evolución del patrón repetitivo de pirámides

Los eventos en forma de pirámide se van sucediendo y, si nos fijamos, cada vez la compresión es menor, hasta llegar al punto en que ya no existen estas

formaciones, porque el periodo de actividad cubre todo el periodo de oscuridad. Esto nos indica que los bruscos avances de fase son cada vez menores, lo que podría deberse a que cada vez hay menos 11-cis RAL disponible siendo menor la respuesta de E, por lo que la intensidad de avance de fase es menor.

De igual manera, se encontró que la expansión es cada vez menos intensa, es decir, el retraso de fase es menor. Esto encaja también con una menor cantidad de 11-cis RAL disponible, que resulta en una menor señal de ajuste. La expansión se encuentra siempre en el rango del ritmo endógeno (máximo 2h), sugiriendo tener su origen en el SCN. Además, parece haber una componente dependiente del individuo que caracteriza estas pirámides, que bien podría indicar una dependencia del SCN.

5.1.4. Efecto de la delección dirigida de las células dopaminérgicas de la retina en ratones Swiss

La dopamina retiniana ejerce un importante efecto regulador en numerosos procesos de la retina, incluyendo la actividad de la melanopsina y fotorreceptores externos. Para conocer si sus efectos en la retina tienen un efecto palpable en el SCN se eliminaron las células dopaminérgicas de la retina mediante un anticuerpo contra estas células unido a una toxina y se midió la actividad de los ratones.

Nuestra estrategia de eliminación de células dopaminérgicas en la retina ya ha sido utilizada para la destrucción de las propias células melanopsínicas con un anticuerpo unido a una toxina inactivadora de ribosomas (saporina) contra melanopsina, lo que altera los efectos de la luz sobre los ritmos circadianos del ratón, que deja de responder a la luz [306], de la misma manera que los ratones sin conos, bastones y células melanopsínicas funcionales [76].

Las células melanopsínicas pueden eliminarse en un modelo no murino con un 70% de eficiencia utilizando un anticuerpo policlonal [307]. Su aplicación en adultos evita los efectos asociados a la ontogenia presentes en la eliminación genética [146]. De igual manera, se han utilizado anticuerpos contra el transportador reverso de dopamina unidos a saporina (antiDAT-SAP) para eliminar células dopaminérgicas in vivo, resultando en la eliminación de las células dopaminérgicas del cerebro medio causando efectos similares al Parkinson [308].

En nuestro caso, se utilizaron anticuerpos contra células dopaminérgicas [308] siguiendo los procedimientos de eliminación retiniana usados para eliminar células melanopsínicas expuestos arriba[306].

La dopamina en la retina

La síntesis y liberación de dopamina en la retina están regulados por la captación de luz en la retina y por el ritmo circadiano, aumentando ambos en el periodo de luz, pudiendo suponer un mecanismo adaptativo circadiano y diario [299, 309].

En la retina la dopamina ha sido implicada en la modulación del acople eléctrico en las uniones gap, en la transmisión a través de receptores de glutamato y GABA, en canales iónicos regulados por voltaje, el metabolismo de cAMP y la síntesis de melatonina [159, 310]. La dopamina podría regular la melanopsina, aunque el mecanismo no está claro [158] [127] [74] {Sakamoto, 2005 #1989}. Las células dopaminérgicas, a su vez, pueden estar reguladas, según sean OFF u ON, por conos y bastones o por ipRGC [159] [160] [128] [128].

La dopamina retiniana media múltiples dimensiones de la visión adaptada a la luz, incluyendo la respuesta retiniana a la luz, la sensibilidad al contraste, la agudeza visual y los ritmos circadianos retinianos [311]. Nuestro estudio busca, mediante la eliminación de las células dopaminérgicas, dilucidar si los marcados efectos que tiene la dopamina en la retinas tienen como consecuencia una alteración de la señal enviada al SCN que redunde en una modificación de los ritmos circadianos observables mediante el comportamiento.

El efecto sobre la actividad

Observamos que la destrucción de las células provocaba un adelanto del momento medio diario de actividad en una manera dosis dependiente, alcanzándose un adelanto de unos 40 minutos con 3 dosis. Que se produzca un adelanto en la actividad implicaría probablemente que se está alcanzando menor intensidad de luz al inicio de la actividad, que es captada y transferida a las células M del SCN, lo que induce un adelanto de la fase tomando un papel más protagonista el ritmo endógeno del SCN. Un aumento de dopamina provoca un aumento de señal procedente de los conos, una disminución de la señal procedente de los bastones [159] y un aumento de

expresión de melanopsina [152]. Un descenso de dopamina, implicaría que la señal procedente de bastones predomina sobre la señal de conos e ipRGC. Aunque ciertamente los bastones son más sensibles que conos e ipRGC, las ipRGC han sido siempre designadas como un importante director del SCN [56]. Sin embargo, parece que los bastones son los principales fotosincronizadores circadianos, tanto en condiciones escotópicas (de baja intensidad de luz) a través de las ipRGC, como a través de los conos en condiciones fotópicas (de mayor intensidad lumínica) [312]. El adelantamiento al disminuir la dopamina indicaría que la pérdida de señal por la falta de dopamina no es compensada por la predominancia de la señal de bastones. Con todo, hay que tomar los resultados de nuestro estudio con precaución, ya que se basan en la medida diaria de actividad de un número escaso de animales, de manera que no ha sido controlada la varianza interindividual para cada condición de dosis.

5.2. Medidas celulares

5.2.1. Recuentos celulares en cortes

5.2.1.1. Influencia de los conos y bastones en el número de células

Las ipRGC reciben *inputs* de conos y bastones que podrían ejercer una regulación sobre la expresión de melanopsina [122, 127, 151, 152, 156]. No obstante, también existen resultados que apuntan en contra de una dependencia de conos y bastones [157]. Estos fotorreceptores liberan melatonina que regula la sensibilidad de las ipRGCs a los *inputs* procedentes de células amacrinas y bipolares [313, 314]. En la literatura se describe un descenso en mRNA de ratas adultas debido a la degeneración retiniana [151, 257], especialmente en su distribución a dendritas [155]. Nuestros resultados muestran que también se produce un descenso del número total de ipRGC inmunopositivas para melanopsina en ratones C3H en ausencia de conos y bastones. De esta manera, se refuerza la hipótesis de que conos y bastones regulan la expresión de melanopsina provocando un incremento de su expresión. De hecho, los conos y los bastones liberan melatonina [315] y, recientemente, se ha demostrado la expresión de los receptores de melatonina MT1 y MT2 en el soma de ipRGC [316].

5.2.1.2. Proporción de tipos celulares

En las retinas *rd/rd* la proporción de M1 es mayor que en *+/+* y la de M2 menor. Esto implicaría que la ausencia de regulación por conos y bastones afecta más a las células M2 que a las células M1. Una posible razón para ello podría ser que las células M2 dependan en mayor medida de la señal procedente de conos y bastones, a la que son más sensibles que M1 [106].

5.2.1.3. Influencia de la localización del soma en el número de células

Las células M1 pueden presentar su soma en la capa ganglionar, llamándose M1A o en la nuclear interna, llamándose M1B [97, 113, 114]. En las retinas *rd/rd* disminuye el número de M1A y M2 respecto a *+/+*, no así M1B. Las células M1B, por

la localización de su soma en la subcapa de las células amacrinas, podrían estar sujetas a una regulación diferente a aquellas con el soma en la capa ganglionar, no viéndose afectadas por la ausencia de conos y bastones. Una posible explicación para esto es que la expresión de melanopsina no dependa exclusivamente de la melatonina, sino también de la dopamina. Se sabe que las células dopaminérgicas situadas en la subcapa de las amacrinas pueden segregar dopamina desde el soma [317] de manera tónica [318] y puede regular circadianamente núcleos neuronales [319] o reducir la señal de la melanopsina de las ipRGC, aumentando su sensibilidad a la señal de conos y bastones [252]. Si la dopamina reduce la señal intrínseca, de manera adaptativa las ipRGC podrían expresar más melanopsina, un mecanismo similar de adaptación de las ipRGC que ya ha sido descrito previamente [320]. Si la dopamina provoca un aumento de expresión de melanopsina, tiene sentido que las células M1B, con el soma muy próximo a las dopaminérgicas, mantengan niveles altos de melanopsina aún en la ausencia de conos y bastones. Es posible que estas células cumplan una función diferente a las M1 prototípicas (M1A), por lo que tal vez deberían considerarse un tipo de célula independiente y no un subtipo de M1.

5.2.1.4. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M1 en +/+

Otros autores ya describieron previamente una oscilación diaria de los niveles mRNA de melanopsina [73, 151]. También se ha detectado una variación en el número de células inmunopositivas a lo largo del día con pico a las ZT23 y mínimo a ZT3 en ratones +/+ con oscilaciones diferentes a las descritas previamente de mRNA [150]. Este ritmo diario no fue encontrado en los niveles absolutos retinianos de las isoformas de melanopsina, al menos, de manera significativa [117]. Estos resultados se pueden explicar por la existencia de distintas subpoblaciones celulares con distintos niveles de expresión que evitan una correlación entre cantidad de proteína y números celulares [150]. Una regulación extracelular de los niveles de mRNA, acompañada de una regulación intracelular de los niveles de proteína, buscando un equilibrio de respuesta, descrita previamente [320], podría explicar estos resultados. En condiciones constantes se pierde la ritmicidad de expresión de melanopsina y de número de células, lo que sugiere que depende directamente de la iluminación y no de

un mecanismo circadiano endógeno [150, 153, 154].

5.2.1.5. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M2

En las células M2 se encontró una bajada entre ZT23 y ZT3 en +/+, aunque no así en *rd/rd*. Las células M2 tienen una sensibilidad intrínseca menor y mayor sensibilidad a la señal de conos y bastones [106]. El hecho de que se mantengan los niveles en +/+ pero no en *rd/rd* implicaría que los conos y bastones son capaces de reducir la expresión de melanopsina, bien mediante melatonina [316], o bien mediante la señal que envían a las células M2, las cuales compensarían la mayor entrada de información reduciendo su expresión de melanopsina [320]. Esta separación de regulación respecto de conos y bastones se debería sumar a la lista de diferencias descritas entre M1 y M2 [106].

5.2.1.6. El nivel de expresión y el plexo

No se encontraron diferencias en la intensidad de tinción mediante observación subjetiva entre las células M1 y M2. Si bien en la literatura se describe una mayor expresión en M1 que en M2, tras determinar visualmente el grado de expresión, no encontramos diferencias significativas entre el número de células consideradas claras y el número de células consideradas oscuras [150]. Consideramos que pueden existir células M1 con niveles de expresión bajos o células M2 con niveles de expresión altos, es decir, que no expresan cantidades de melanopsina discretas, lo que dificulta su distinción según este parámetro. Es por ello que nos planteamos la necesidad de un sistema de medida no subjetivo de la intensidad. Fruto de esta necesidad y de querer entender mejor los tipos y subtipos de ipRGC creamos *CellFinder*.

5.2.2. Las ipRGC según intensidad de tinción y diámetro del soma

Los principales tipos celulares de ipRGC descritos en la literatura son M1 y M2. El soma de las M1 se describe como más pequeño y con marcaje más intenso, y el de las M2, como más grande y con menor marcaje [95, 113, 114, 138]. En nuestro estudio decidimos analizar si efectivamente las principales poblaciones celulares en *Mus musculus* corresponden a estos tipos según la intensidad de expresión total y el

diámetro, en función de una medición exacta, no subjetiva, con *CellFinder* y a una detección de tipos de base estadística indirecta, mediante *clustering*, con un gran tamaño muestral (>3000 células).

5.2.2.1. Análisis exploratorio de frecuencias de intensidad/diámetro

El análisis exploratorio de frecuencias mostró tres picos de frecuencias según el ratio intensidad/diámetro. Esto implicaría que en base a la intensidad y el diámetro deberían existir tres poblaciones, lo cual no encaja en el sistema de dos poblaciones propuesto clásicamente (M1 y M2) [114].

5.2.2.2. Búsqueda de dos *clusters* por ratio intensidad/diámetro

El análisis de *cluster* encontró dos poblaciones que respetan la relación correspondiente a un grupo con más intensidad y menor diámetro en el soma (M1) y otro grupo de menor intensidad y más diámetro en el soma (M2). Sin embargo, la diferencia de diámetros entre ambos *clusters* es llamativamente menor a la descrita en la literatura [116]. Por ello, nos surgen dudas de que estos *clusters* estén representando fidedignamente lo descrito en la literatura para los tipos M1 y M2. Por esta razón, pasamos a la búsqueda de *clusters* basada en tamaños del soma.

5.2.2.3. Búsqueda de *clusters* por dos diámetros

Al no encontrar en el análisis previo los diámetros descritos en la literatura buscamos *clusters* en función del diámetro. En este caso, encontrábamos unos diámetros muy similares a los descritos en la literatura, pero la diferencia de intensidades prácticamente desaparecía. En este punto, cabe preguntarse si no era tal la diferencia de intensidades. O tal vez sí lo era, pero no la asimilación a diámetros. Ya que la exploración de frecuencias mostraba la posibilidad de más de dos subpoblaciones podría ser esta la explicación.

5.2.2.4. Búsqueda libre de *clusters* por intensidad y diámetro

Ya que la ratio intensidad/diámetro solo nos mostró dos *clusters* quizá debería de buscarse una explicación basada en la intensidad y diámetro, pero que no fuese

lineal. Ya que una ratio entre dos variables (intensidad y diámetro) solo tendrá soluciones lineales en esta ratio, decidimos buscar soluciones de *cluster* usando las variables independientemente. Al permitir al análisis de *cluster* buscar automáticamente los clusters que mejor definiesen las poblaciones, se encontró que las retinas convergían a una solución de tres *clusters*: uno de mayor intensidad y diámetro intermedio (M1), uno de poca intensidad y mayor diámetro (M2), y uno de poca intensidad y menor diámetro que llamamos Mx. Esta composición poblacional de las ipRGC no ha sido descrita previamente en la literatura, sin embargo, como se puede ver en la distribución de células en las figuras (Figs. 4.11 y 4.14), parece evidente que la distribución de población total, de aspecto triangular según la intensidad y diámetro, contiene al menos tres poblaciones. Si contuviese solo dos poblaciones lo previsible sería una distribución longitudinal diagonal que uniese un grupo de soma pequeño y oscuro con otro de soma grande y claro.

5.2.2.5. Predicción lineal de pertenencia de células a *clusters*

Creamos un modelo lineal en forma de función discriminante para asignar las células a los tipos celulares M1, M2 y Mx en función de su diámetro e intensidad. Este tipo de solución es de muy sencillo uso, de manera que conociendo el diámetro y la intensidad de una célula podemos asignarle una probabilidad de pertenencia a un *cluster* con una sencilla ecuación de primer grado para cada tipo (M1, M2, Mx) con un 90,2% de fiabilidad.

5.2.2.6. Predicción no-lineal de pertenencia de células a *clusters*

Creamos un modelo en forma de árbol de decisión para asignar las células a los tipos celulares en base a su diámetro e intensidad. Esta solución no lineal ofrece una mayor resolución para estos problemas no lineales. Conociendo su diámetro e intensidad podemos asignar la célula directamente a un *cluster* con un 89% de fiabilidad, en función de unas pocas reglas.

Tanto la función discriminante como el árbol de decisión permiten clasificar a las células en *clusters* según su diámetro e intensidad en función de las retinas utilizadas. Pero ¿qué sucedería si un usuario utiliza otras retinas con un tratamiento

inmunohistoquímico distinto? Las intensidades variarán y el modelo no será útil. Para solventar esto creamos un árbol de decisión en función de las intensidades estandarizadas. Estas intensidades estandarizadas son intensidades percentiles, de forma que en esta escala las células son clasificadas en percentiles por su intensidad. Por ejemplo, el 1% más intenso tendrá valor 99 y el 1% más claro tendrá valor 0. Utilizando intensidades percentiles creamos un árbol de decisión con fiabilidad del 84% que puede utilizar cualquier usuario independientemente del tratamiento inmunohistoquímico. No encontramos en la literatura un sistema de clasificación similar en función del diámetro y la intensidad.

5.2.2.7. Parámetros que varían entre tipos celulares

Describimos una serie de parámetros que diferencian y permiten discernir a los tipos celulares, así como comprenderlos mejor, que no habían sido descritos previamente en la literatura. Por ejemplo, describimos la elongación o la intensidad integrada de los tipos con resultados muy interesantes.

5.2.2.8. El *aspect ratio* (AR) o elongación

El *aspect ratio* (AR) o elongación es una ratio obtenida al dividir el eje mayor por eje menor de una célula. El AR encontró que las células Mx son más alargadas que las M1, y estas, a su vez, más que las M2. Teniendo en cuenta que en las células M1 se marcan más las dendritas/axón y en el proceso de segmentación el contorno puede coger el inicio de los mismos, resulta razonable que M1 aparezca más elongado que M2 como resultado del proceso de análisis de imagen. Sin embargo, las células Mx, cuyas dendritas difícilmente se observan, son remarcablemente más elongadas que las células M1. Esto nos indica que el soma de este tipo es *per se* más elongado que el de M1. Las células Mx y M1 tienen un eje mayor igual, por lo que la diferencia procede de que las células Mx sean más estrechas. Las células M2 tienen mayor eje mayor, por lo que su volumen es mayor en general y son más esféricas.

5.2.2.9. La intensidad integrada y la proteína creada de M1, M2 y Mx

La intensidad integrada corresponde a la suma de las intensidades de todos los

pixeles de la célula. La intensidad integrada en M1 y M2 es la misma, lo cual significaría que la cantidad de proteína expresada es la misma en ambos tipos, pero en M2 se reparte sobre una mayor superficie. En realidad, este valor no tiene en cuenta la intensidad de fondo ya presente en la imagen, que distorsiona las diferencias entre M1 y M2. Los valores de intensidad integrada restando el fondo son de 35424 para M1 y de 23706 para M2 en unidades arbitrarias. La diferencia de intensidades corregidas muestra que M1 es 1.50 veces más intensa. Por otro lado, la superficie del soma de las células no será el mismo: $1102\mu\text{m}^2$ en M1 y $1312\mu\text{m}^2$ en M2. La diferencia de superficies de soma muestra que M2 es 1.26 veces más grande. Esto nos muestra que la cantidad de proteína en el soma es solo un 25% mayor en M1 que en M2. Por lo tanto, debemos comprender que una buena parte de la diferencia de intensidad asignada normalmente al soma de M1, en realidad, se debe a que su producción de proteína se distribuye en una superficie menor. Esto da una sensación subjetiva excesiva de diferencia de producción de melanopsina, lo cual no es tenido en cuenta en observaciones histológicas, pero sí en mediciones de expresión total en retina [95, 113, 114]. Estas consideraciones sobre la intensidad se refieren al soma neuronal. La melanopsina en las dendritas es mucho mayor en M1 que en M2, siempre que no exista un mayor calibre de dendritas en M2 [155]. Este no es el caso de Mx, donde la intensidad no solo es menor, sino también la superficie. De hecho, tiene una intensidad integrada corregida de 103395, lo que es 0.34 veces la intensidad integrada de M1. Su superficie de soma es de $907\mu\text{m}^2$, lo que es 0,82 veces la superficie de soma de M1. Por lo tanto, la expresión total de proteína creada y presente en la superficie de soma en Mx es 0,28 veces la de M1 y 0,35 veces la de M2. De esta manera, M1 y M2 se diferencian entre sí principalmente por la mayor producción de melanopsina que M1 lleva a sus dendritas, y Mx se diferencia por una producción de melanopsina notablemente menor, al menos, en lo que respecta a la melanopsina en la superficie del soma.

5.2.2.10. Sobre Mx

Mx presenta un diámetro significativamente inferior a M1, aunque no muy inferior. Las células Mx presenta exactamente la misma intensidad que M2. Si

tenemos en cuenta el total de proteína expresada presente en la superficie del soma, la de Mx es notablemente inferior a M1 y M2. Probablemente esta baja tinción, su diámetro similar a M1, su intensidad similar a M2 y su escasa expresión de melanopsina, que probablemente redunde en una baja respuesta a la luz, haya hecho pasar desapercibidas estas células Mx. Nos surge una serie de preguntas: ¿Constituye Mx una subpoblación ipRGC nueva? ¿Se trata de células M1 con expresión muy baja de melanopsina? ¿Es tal vez un *cluster* con una mezcla de dos tipos celulares, a saber, M1 y otro tipo (Mx)? ¿En qué sublámina arborizan sus dendritas? ¿Qué isoformas de melanopsina produce? ¿Cómo modifica su expresión la luz? En los apartados siguientes se intentará responder a estas preguntas.

5.2.3. Tipos de ipRGC por diámetro, proteína total y dendritas

Tras describir 3 *clusters* de células (M1, M2 y Mx) en función de su diámetro e intensidad buscamos conocer cómo de bien se asignaban estos *clusters* a los tipos celulares M1 y M2, en función de su arborización dendrítica, siendo característico que las células M1 presentan su plexo en la sublámina OFF; las células M2, en la sublámina ON; y las M3, muy escasas, en ambos [114]. El plexo de las dendritas puede estar relacionado con su sensibilidad y respuesta a la luz, su expresión de proteína y los núcleos cerebrales a los que proyecta la ipRGC [105] [114, 116]

5.2.3.1. Análisis exploratorio de los *clusters* de una retina

El *cluster* M1 presenta solo células con dendritas en OFF, correspondiendo, por tanto, a la subpoblación M1. El *cluster* M2 presenta células con dendritas en ON que se corresponderían con la subpoblación M2, pero una zona cercana al *cluster* M1 presenta mezcla de células con dendritas en OFF (M1) y de células con dendritas en ON (M2). El *cluster* Mx está formado por células en las que no se ven las dendritas (ND) o que envían sus dendritas a OFF (por lo que serían M1). Esto parece indicar que nuestra determinación por *clusters* en base al diámetro y la intensidad son acertadas, pero que existe cierto grado de solapamiento entre los tipos.

5.2.3.2. Frecuencias de los tipos dendríticos en el centro de los *clusters*

El Tipo dendrítico OFF (M1) se encuentra dominando el *cluster* M1, así como

la mitad de los *clusters* M2 y Mx. En el cluster M2 encontramos todas las ipRGC cuyas dendritas ramifican en OFF. En el *cluster* Mx encontramos la gran mayoría de células con dendritas difícilmente detectables. Esta distribución de tipos dendríticos en clusters nos indica que podemos predecir con alta certeza las dendritas de las células que queden encuadradas en el tipo M1, y asignar probabilidades en los *clusters* M2 y Mx, conociendo solo su intensidad y diámetro.

5.2.3.3. Separación de los tipos dendríticos M1 y M2

El análisis por regresión logística y árbol de decisión mostró que la mejor separación de los tipos dendríticos M1 y M2 se basa en la combinación de la intensidad y el diámetro. Hay zonas exclusivas de M1, zonas exclusivas de M2 y zonas híbridas de M1-M2. Esto indica que sabiendo el diámetro y la intensidad podemos predecir para cada célula individual sus dendritas en todos los casos M1 y en la gran mayoría de M2. Y, además, podemos predecir probabilísticamente la cantidad de M1 y M2 en la zona híbrida, no así la asignación individual de cada célula en esta zona.

5.2.3.4. Composición del *cluster* Mx

El *cluster* Mx es principalmente híbrido de M1 y células en las que no se detectan las dendritas (ND), aunque estas últimas aumentan su frecuencia en los diámetros menores. Las células en las que no detectamos las dendritas, en buena parte porque son dendritas muy finas, se debe a la poca melanopsina que expresan o a que no la transportan a las dendritas [155]. Esto nos deja abierta una incógnita con tres posibilidades: 1) Las células Mx pueden ser M1 con menor tinción, ya que en este *cluster*, cuando se ven dendritas, son OFF: todas son M1, hay M1 claras. 2) Cuando se ven las dendritas son en OFF, pero eso no implica automáticamente que sea M1 ya que el diámetro, elongación y niveles de melanopsina en superficie son diferentes a M1 por lo que es un cluster de otro tipo celular: Mx. 3) En este *cluster* hay una mezcla de M1 más claras en las que se ven las dendritas y otro tipo celular, Mx, con expresión muy baja y en el que no se transporta melanopsina a las dendritas o en niveles tan bajos que no se detecta. Independientemente de si es o no un tipo celular

distinto a M1, lo que es cierto es que hay una subpoblación celular caracterizada por: baja expresión de melanopsina, bajo tamaño de soma, dendritas muy finas y poco marcadas en OFF o no visibles. Esta población es muy representativa y había pasado desapercibida en las clasificaciones previas de otros autores [116].

5.2.3.5. Un modelo global según intensidades arbitrarias

En función de las dendritas se encuentran tres nodos que corresponden con los tipos M1, M2 y Mx. Dentro de estos se detecta una zona híbrida M1M2 y otra M1Mx y tres puras M1, M2, Mx. Esto muestra que, aunque el *cluster* M1 es puro en M1, los *clusters* Mx y M2 presentan una zona híbrida con presencia de M1. Aunque este modelo describa mejor nuestra muestra, un modelo estandarizado basado en percentiles permite un uso generalizado independientemente de la tinción.

5.2.3.6. Un modelo global según intensidades percentiles

El modelo estandarizado encuentra cuatro tipos de zonas: M1, M2, M1M2 y MxM1. El modelo estandarizado muestra que la zona híbrida más representativa se encuentra en el *cluster* M2, considerándose el *cluster* Mx bastante homogéneo mezclando dendritas en OFF y no visible (ND). Con este modelo puede predecir el usuario con cualquier grado de tinción las dendritas de una célula individual con un 73% de acierto; con acierto prácticamente total, cuando coincidan con las zonas M1 y M2; y con aproximación probabilística, en M1M2 y MxM1.

5.2.3.7. Un modelo indirecto basado en intensidad y diámetro para el modelo directo dendrítico

Aunque con el diámetro e intensidad podemos encontrar mediante análisis de *cluster* los 3 nodos principales, este análisis de *cluster* no encuentra las zonas híbridas. Sin embargo, el modelo global propuesto previamente permite asignar una probabilidad de pertenecer a cada subtipo celular dendrítico en función de su diámetro e intensidad, conociendo su diámetro e intensidad percentil. La intensidad y diámetro permiten asignar las células a 3 *clusters*. Si caen en el M1, sabemos que es M1. Si cae en el M2, si es la zona lejana a M2 sabemos que es M2. Si cae en M2 cerca del *cluster*

M1 sabemos que tiene 50% de ser M1 o 50% de ser M2. Si cae en MX sabemos que es 50% M1 o 50% no detectable (ND), que podría ser 100% M1, si lo consideramos como M1 con poca expresión.

5.2.3.8. Las células M3

Las células M3 detectadas se encontraban en el *cluster* M2 en la zona que contenía exclusivamente M2. Asimismo, detectamos que la morfología del soma de M3 se asemeja con la del M2. Esto coincide con los datos morfológicos y electrofisiológicos descritos en la literatura sobre el parecido de M2 y M3 [56].

5.2.4. Isoformas de la melanopsina

La melanopsina se conoce en ratones en 2 isoformas L y S, que se diferencian por la longitud de su extremo C-terminal y se considera que se generan por *splicing* alternativo del mRNA [95, 321]. La isoforma S se expresa en una cantidad mucho mayor que la L. Se considera que las células que expresan las isoformas S y L son las M1 y las que expresan solo la L, las M2 [95]. Las células con las isoformas S y L (M1) tienen una respuesta más sostenida y las que presentan solo la isoforma L más rápida (M2) [95, 106]. El extremo carboxil se fosforila por una G-proteín-quinasa para desactivar la respuesta a la estimulación fotónica, este extremo contiene 37 sitios serina/treonina fosforilables, aunque 6-7 sitios pueden llegar a ser suficientes para la inactivación [322]. La diferencia de respuesta entre M1 y M2 se podría explicar por presentar mayor probabilidad de inactivación la forma L que la S al presentar más sitios de unión a la G-proteín-quinasa. Estas diferencias pueden dar lugar a la regulación de distintas vías intracelulares o distintos grados de intensidad de señalización mediante la regulación del *splicing* alternativo. En nuestro caso, se estudió el efecto de la hora del día ZT23 vs ZT3 y de la intensidad lumínica en ratones C3H *rd/rd*.

5.2.4.1. El diámetro de M1 y M2

El diámetro de las células con mayor expresión (expresión de L y S) es mayor que el de las células con menor expresión (expresión solo de L). Esto nos lleva a pensar que las células que expresan L y S correspondan al *cluster* M1 y las que

expresan solo L correspondan al *cluster* Mx y no al tipo M2, como está descrito en la literatura [95].

5.2.4.2. La expresión de la isoforma L entre el tipo LS y el tipo L

La isoforma L se expresa en mayor nivel en las células LS (M1) que en las células L (Mx). Esto implicaría que las células M1, de las que se asume que expresan más proteína total por la expresión de la isoforma S, también expresan mayor cantidad de isoforma L que las Mx [95].

5.2.4.3. La expresión de la isoforma S en las células LS según la hora y la intensidad lumínica

La expresión de S en las células LS (M1) es menor a 2000lx que a 200lx. Esto implicaría que la isoforma S ajusta su expresión a altos niveles de luminosidad, una adaptación que ya fue descrita previamente por otros autores [320].

5.2.4.4. La expresión de la isoforma L en las células LS y en las células L según la hora y la intensidad lumínica

La expresión de L sube en las células LS (M1) y en las células L (MX) entre ZT23 y ZT3. Esto debe implicar que la isoforma tiene un bajo aporte a la captación de luz y puede que un papel más regulador. En las células LS (M1) la subida de L (Mx) es menor a 2000lx que a 200lx, es decir, el aumento de intensidad lumínica reduce el aumento de intensidad celular de la isoforma L, que se produce entre ZT23 y ZT3. Este evento, unido a que S disminuye en las células LS (M1) a 2000lx respecto a 200lx, nos lleva a plantear la hipótesis de que la captación de luz por parte de la isoforma S, la más sensible y de señal más persistente, resulta en una reducción de la expresión total de melanopsina, tanto de isoforma L como S, en una suerte de mecanismo adaptativo similar al propuesto por Hannibal [320]. En otros estudios se ha encontrado también una tendencia ascendente de mRNA entre ZT23 y ZT3 aunque en su caso no significativa [117].

5.2.4.5. La ratio L/S en las células LS según la hora y la intensidad lumínica

La ratio L/S disminuye entre ZT23 y ZT3, es decir, en el paso de ZT23 a ZT3 hay menor generación de L que de S. Si la ratio varía en las mismas células entre horas podemos considerar que exista un mecanismo que regula el *splicing* alternativo aumentando o disminuyendo el *splicing* que da lugar a una u otra isoforma, como ha sido sugerido previamente [95]. El hecho de que dependa de la hora del día da a entender que pueda existir un mecanismo circadiano. Sin embargo, se ha demostrado repetidamente que las condiciones constantes provocan una pérdida de ritmicidad en el número de células melanopsínicas y la expresión de melanopsina [150, 153, 154], por lo que la variación entre horas probablemente esté asociada a los cambios en las condiciones de iluminación.

Si hay una modificación de la regulación del *splicing* alternativo, podemos asumir que esto será para modificar la funcionalidad de las células M1. Esto, a su vez, implica una funcionalidad diferente para las isoformas L y S en las células M1. Si a ZT3 ha aumentado la proporción de la isoforma S, que es más sensible, en detrimento de la isoforma L, debería traducirse en una mayor sensibilidad intrínseca de las ipRGC. Otra manera de verlo sería pensar en el posible papel que represente la isoforma L y por qué se prioriza la expresión de la isoforma S. La señal de M1 se dirige principalmente al SCN, mientras que la señal de células no-M1 se dirige a los núcleos relacionados con la constricción pupilar y la visión [56] Si la isoforma L regula principalmente la señal procedente de conos y bastones, y dirige su salida a núcleos de escasa utilidad en el periodo de reposo, tiene sentido que se priorice la isoforma S sobre la isoforma L. Recientemente, se ha descrito cómo la isoforma S interviene en el enmascaramiento de actividad, y la isoforma L, en la constricción pupilar [323]. Esto implicaría que el *splicing* alternativo se usa como una suerte de mecanismo adaptativo que redundaría en una funcionalidad fisiológica.

5.2.4.7. Variación del número de células LS y células L según la hora e intensidad lumínica

No encontramos en nuestro análisis de isoformas una variación significativa del número de células LS ni L entre horas ni entre intensidades. Esto coincide con la falta de variación significativa que encontramos en estas mismas condiciones en el número de células en ratones *rd/rd* en cortes de retina.

5.2.4.8. Si las células L son Mx ¿dónde están las M2?

Si el diámetro de las células que solo expresan L las coloca en el lugar de las células Mx, entonces qué es de las células M2. Teniendo en cuenta la falta de oscilaciones en el mRNA de las isoformas [117], pero la presencia de oscilaciones en el mRNA total [73, 151], podría ser posible que existiese otro *splicing* alternativo [56], o bien que la expresión de la isoforma L, debido a la degeneración retiniana, esté disminuida hasta el punto de no ser detectada con el anticuerpo contra esta isoforma.

5.2.5. Efecto de la hora y luz en la melanopsina de retinas en cultivo organotípico

El cultivo de retina se puede usar para realizar experimentos con células individuales marcadas con GFP para caracterizar distintas poblaciones celulares [325]. La medición de características morfológicas de estas células, como ofrece *CellFinder*, añade una dimensión más para diferenciar estas células. En nuestro caso, utilizamos el cultivo in vitro para exponer la retina a condiciones lumínicas aisladas de la influencia del resto del organismo.

5.2.5.1. Variación del número de células por tipo según la luz

Encontramos que en oscuridad aumenta el número de células del tipo M2, esto implicaría que una serie de células de M2 en presencia de luz tienen un nivel de expresión demasiado baja para ser visibles y su inmunomarcaje solo resulta visible en oscuridad. Dicho de otra manera, la luz provocaría que ciertas células “apagasen” su expresión de melanopsina.

5.2.5.2. Variación de la intensidad de las células por tipo según la luz

En oscuridad no solo aumenta el número de células del tipo M2, sino que disminuye su intensidad media. Esto puede resultar un tanto paradójico en un primer momento, sin embargo, podría ser el resultado directo de un aumento del número de

células M2 detectadas: las nuevas células detectadas en oscuridad expresarían melanopsina, pero no llegarían a alcanzar el nivel de expresión que encontramos en las células presentes bajo luz. De esta manera, serían las nuevas células las que harían bajar el nivel medio de expresión de las células M2. Todo esto da a entender que puede haber más de un tipo de células M2. Unas, que denominamos M2b, tendrían un inmunomarcaje observable siempre; mientras que el inmunomarcaje de las otras, las M2a, solo sería observables en muestras de retina de animales en oscuridad. Una hipótesis similar ya fue propuesta por nuestro grupo para explicar la falta de correspondencia entre el número de células observado [150] y las oscilaciones de mRNA diarias detectadas por otros grupos [73, 151].

5.2.5.3. Subpoblaciones de M2 y su variación

Gracias a que *CellFinder* nos permite conocer las intensidades de células individuales exploramos las frecuencias de las células del *cluster* M2 en función de su intensidad, encontrando 3-4 subpoblaciones de M2. Un análisis de *cluster* divide las frecuencias correctamente en 4 *clusters*. Efectivamente, como ya habíamos hipotetizado en estudios previos, existe más de una subpoblación de células M2, que la expresión de melanopsina varía de distinta manera según la exposición a la luz. Concretamente, observamos que la población de M2 de menor intensidad de inmunomarcaje, que llamamos M2a, aumenta en número en oscuridad, lo que redundaría en un aumento del número de células M2 y en un descenso de la intensidad media de las mismas. Hay que reseñar que, aunque se observó el aumento en oscuridad en todos los individuos, la varianza del aumento y el bajo tamaño muestral hizo que no se encontrara significación estadística. Sin embargo, el hecho viene reafirmado lógicamente en sí mismo como posible explicación del aumento del número de células M2 y la bajada de su intensidad media de estas.

Como se puede observar, se detectan 4 posibles subpoblaciones dentro del *cluster* M2 (M2a, M2b, M2c, M2d). Basándonos en el análisis de *clusters* tras visualización de la arborización dendrítica, una parte de las células de mayor intensidad del *cluster* M2 pueden ser M1 (probablemente las que se encuentran en el *cluster* M2d). Esto nos deja 3 poblaciones (M2a, M2b y M2c), de entre las que, como mínimo, por su comportamiento ante la oscuridad, podemos concluir la existencia demostrada de 2 poblaciones de M2 que

funcionan de diferente manera (M2a y M2b). De esta manera, gracias al recuento celular y las medidas celulares individualizadas que permite *CellFinder* se consiguen diferenciar 2 subpoblaciones de células M2 con funcionamiento claramente diferente, M2a que aumenta su expresión de melanopsina bajo condiciones de oscuridad, y M2b que no se ve afectada por la oscuridad.

5.2.6. Redefiniendo los tipos celulares de ipRGC

Gracias a las herramientas, a las hipótesis y experimentos desarrolladas en nuestro grupo hemos estudiado a fondo e intentado redefinir las subpoblaciones de ipRGC: las grandes agrupaciones de células, según criterios morfológicos deberían ser M1, M2 y Mx; Mx es el principal representante de la expresión en exclusiva de la isoforma L; M1b no depende de conos y bastones, M1a y M2 sí; M2 está compuesto, al menos, por dos tipos celulares (M2a y M2b). Por tanto, la clasificación de las ipRGC definida hasta este momento por otros autores (M1a, M1b, M2, M3, M4 y M5) se ve ampliada en tres subpoblaciones más, como son: Mx, M2a y M2b, en función de sus características morfológicas y de su comportamiento (en cuanto a expresión de melanopsina) frente a las condiciones lumínicas ambientales.

5.3. Software desarrollado

5.3.1. Circadian Control Center

La medición de actividad es una herramienta de gran utilidad para investigar el efecto de diversos factores en el comportamiento y el cerebro. Cuando dicha medición se realiza a nivel circadiano podemos conocer cómo afectan distintos factores a los componentes del sistema circadiano: la retina, el SCN y el cuerpo. En nuestro caso, se utilizó Circadian Control Center (CCC), un software original desarrollado para esta investigación, para registrar los ciclos de actividad-reposo de los animales bajo diferentes condiciones de iluminación y así intentar dilucidar aspectos importantes de su fisiología circadiana.

Los sistemas de medición de actividad

Los medidores de actividad clásicos se basan en estabilizadores, microondas, células fotoeléctricas, emisores RFID y ruedas con sensores. Estas soluciones presentan importantes limitaciones o un coste alto. Un defecto común a todas ellas es que no captan el movimiento total, sino solo algunos movimientos, generalmente la locomoción o el ejercicio.

Más recientemente han aparecido los sistemas de medición de actividad motora basadas en sistemas de vídeo [326-328] que, al incorporar infrarrojos, permiten medir la actividad en oscuridad [329]. CCC no utiliza señal de vídeo, sino que mide la actividad directamente en una ventana de cualquier origen que este abierta en el escritorio del ordenador, aunque se encuentre fuera del plano visual. Este método de medida sobre ventana permite medir la información sin importar su origen: tarjeta capturadora de vídeo, señal de red local cableada, señal de red local wifi, señal emitida online desde cualquier parte del mundo o reproducción de un archivo local. Esta propiedad hace de CCC un sistema muy flexible. El análisis en CCC permite usar cualquier ordenador y seguir utilizando el ordenador normalmente para otras tareas ya que no es requerido en exclusiva para CCC.

Gemvid y CCC

Nuestras primeras medidas de actividad las realizamos con el software Gemvid. Gemvid es un sistema de medida de actividad a partir de señal de vídeo que utiliza la librería de Linux Video4Linux, gracias a esta Gemvid interacciona con la tarjeta capturadora de vídeo para calcular el movimiento. Para calcular el movimiento resta un fotograma del siguiente, y los píxeles con diferencias entre fotogramas por encima de cierto umbral equivaldrán a movimiento. El resultado de la ejecución de Gemvid es un archivo de texto con las medidas de movimiento y su marca temporal (produciendo unos 80MB/día). Gemvid ofrece una solución automatizada, gratis, de software libre, no invasiva y con gran resolución de frecuencia (25fps) [329]. Gemvid estaba diseñado para captar actividad en una sola zona, pero trabajamos con uno de los autores de Gemvid para conseguir que midiese varias zonas utilizando máscaras desarrolladas en software de terceros. Gemvid producía un archivo que solo se podía analizar *off-line* con software de terceros. Además, los sistemas de selección de máscaras, el tratamiento de la información, su análisis y representación no estaban conectados entre sí. Es más, el usuario se veía ligado al uso de Linux, de señal de vídeo y de una tarjeta capturadora. Para solventar estas limitaciones desarrollamos CCC, una solución completa que incluye la creación interactiva de zonas de análisis, captura y medición de actividad, segmentación, limpiado y agregación de datos, análisis y representación de la actividad. CCC funciona en cualquier plataforma y con señal de cualquier origen.

Representación y análisis circadianos

En la realización de estudios circadianos normalmente existen dos tareas, primero se captura y mide numéricamente la actividad, como hace Gemvid, y tras esto, se analiza y representa circadianamente la actividad [330, 331].

El software encargado de la segunda tarea, el análisis y representación, suele realizar las tareas representación del actograma, análisis del periodograma y análisis de la forma de onda [332]. El actograma permite observar las características globales de los ritmos y su evolución a lo largo de varios días. El análisis del periodograma calcula el periodo mediante análisis como el de Fourier [333] o el de Wavelets [334] entre otros. La forma de onda de los días permite detectar formas características, fases y picos [332].

Dentro del software de análisis y representación de actividad circadiana encontramos paquetes de software de pago: Vitalview Actiview [335], ClockLab Actimetrics [336]; paquetes gratis antiguos: Circadian [334], BRASS [337]; paquetes gratis modernos: ActogramJ [332] y paquetes diseñados para análisis circadiano molecular: JTK [338], CircWave [339]. Dentro de estos paquetes en una comunidad científica abierta se suelen buscar sistemas abiertos y adaptables, por lo que descartamos el software de pago. Los paquetes antiguos no son capaces de gestionar la gran cantidad de datos que produce un sistema de medida visual, por lo que tampoco nos son de utilidad. Los paquetes orientados a problemas moleculares pueden ser de utilidad parcial pero preferimos paquetes desarrollados para estudiar comportamiento animal. De esta manera, nos encontramos con un buen candidato para las tareas de análisis y representación: ActogramJ.

ActogramJ está desarrollado como un *plugin* de ImageJ, la plataforma que utilizamos para medir la actividad, lo que podría facilitar su integración con CCC. En CCC las funciones de análisis y representación las realizamos a través del lenguaje R. R es probablemente el primer lenguaje cuando se trata de análisis de datos y estadística, especialmente si se trata de series temporales para las que siempre cuenta con los últimos modelos, además de ser R muy potente en las tareas de representación gráfica y de gestión de grandes cantidades de datos. En CCC se programaron en R las tareas de segmentación, limpieza y agregación de datos, así como el análisis y representación de la actividad. Nuestra elección de R parece acertada desde el punto de vista de los datos y el análisis, pero habría que considerar si es viable la integración de la interfaz de ActogramJ, ya que presenta opciones interesantes que consideramos para nuestro software, pero no llegamos a implementar. Entre estas están la posibilidad de hacer zoom sobre distintas partes de la representación o algunos cálculos y representaciones clásicas del periodograma [332]. El zoom puede ser muy útil, ya que nuestro sistema de captura se caracteriza por altísimas frecuencias y ha sido descrita la importancia que puede tener el estudio a estas frecuencias, por ejemplo, para caracterizar los componentes del sueño [340]. Nuestro software implementa algoritmos propios para determinar el periodo, el inicio de actividad y el inicio de reposo a nivel de minutos. Nuestro algoritmo busca el mejor ajuste a un modelo que presente la mayor diferenciación posible entre los periodo de actividad y de reposo. Sin embargo, una aproximación clásica de periodograma puede ser más intuitiva para los

investigadores de cronobiología. Tanto ActogramJ como CCC representan el periodograma sobre el actograma.

Por otro lado, CCC presenta una serie de características que no tiene ninguno de los sistemas anteriores. Es capaz de gestionar varios GB de información, ya que segmenta la información. CCC también analiza y representa en tiempo real la actividad producto de su integración vertical con la captura de actividad y de la segmentación y agregado de datos. Por otra parte, aprovecha los paquetes de R `fitdstr` y `fitdstrplus` para ajustar una gran diversidad de funciones de onda y dominios de función a los días y para estimar qué función describe mejor con los mínimos parámetros la forma de la actividad de ese día. CCC calcula los momentos del día en que el ratón ha realizado un tanto por ciento de su actividad diaria. CCC tiene un sistema estadístico y otro zonal de control del ruido que utiliza como mecanismos correctores. Por último, CCC detecta la pérdida de señal, crea un registro del fallo y una alarma.

Medición de actividad no circadiana y aprendizaje automático

En los sistemas de medición de actividad descritos previamente nos centramos en Gemvid, ya que es el único sistema de medida de actividad basado en vídeo gratuito y centrado en el registro circadiano que hemos encontrado documentado. Sin embargo, existe una plétora de sistemas de análisis de actividad animal no centrados en la actividad circadiana, algunos muy avanzados. Los patrones de comportamiento animal son una consecuencia de la interacción de numerosos sistemas en el individuo. Un estudio detallado de estos patrones puede desentrañar distintos aspectos de la fisiología, así como desenmascarar procesos patológicos. Para caracterizar el cerebro, la fisiología o la genética de los animales se hace necesario un incremento de la automatización en los ensayos de comportamiento [341].

Se han desarrollado sistemas de monitorización de actividad de pez cebra [342], de moscas [343], roedores [344-346] y multiespecie [347]. Incluso se han desarrollado sistemas con aprendizaje automático para moscas [348] y roedores [349, 350] basados en el software Ctrax. Para ello, han utilizado una red neural convolucional (CNN), una técnica líder en el reconocimiento de objetos, incluidas células, que deberíamos estudiar [351].

Por otro lado, CCC permite definir distintas zonas libremente. En nuestro caso, en

algunos ensayos definimos zonas de bebida, de comida y de trepado. Los sistemas de análisis de actividad con aprendizaje automático, aunque no dedicados al análisis circadiano, también miden estas actividades concretas[344]. Esto ha permitido el fenotipado comportamental automático en ratón permitiendo, por ejemplo, determinar modelos de autismo o diferenciar cepas con distinto background genético por su comportamiento [352-354]. Incluso se han desarrollado sistemas que permiten identificar y medir la actividad de ratones individuales coexistiendo [355] y en condiciones naturales o virtuales [356]. Parece que la tendencia se dirige hacia el estudio mediante inteligencia artificial de alta resolución de la actividad en un modelo descrito como “panopticon”. En este modelo sociedades de individuos son estudiadas a nivel sociológico, psicológico y fisiológico. Científicos con conocimientos para manejar esta gran cantidad de datos se encargarían de producir lecturas cuantitativas e imparciales de lo que ocurre en los cerebros de los animales [341].

En este contexto parece que una vía a explorar sería fusionar las propiedades de CCC con nuestro software de reconocimiento de objetos CellFinder. CellFinder se encargaría de la etapa de análisis de imagen generando descriptores y clases de los movimientos detectados, y CCC generaría actogramas de una gran diversidad de actividades. El valor añadido de CellFinder y CCC respecto a un sistema como Ctrax se basaría en la capacidad de segmentación y de medida por CellFinder y en la de estudio circadiano por parte de CCC.

5.3.2. Stitch&Focus

Un problema recurrente cuando se quiere analizar imágenes de microscopio es querer mantener una imagen de toda la estructura histológica y que esta, a la vez, sea de suficiente resolución. Clásicamente, tendríamos que conformarnos con tomar unos planos a modo de muestreo, pero con esto perdemos la estructura histológica y podemos introducir un grado de variación indeseado en el proceso de muestreo. Aproximaciones más modernas utilizan pletinas motorizadas que realizan desplazamientos parametrizados por el usuario o escáneres que integran las imágenes mediante software. No obstante, estos medios no están disponibles en la mayoría de laboratorios, en muchas ocasiones por el alto costo que implican. Cuando no existe

automatización del desplazamiento de la muestra los desplazamientos deben ser realizados manualmente y, por lo tanto, no serán exactos, variarán constantemente, y no se podrá reconstruir la imagen en base a unos parámetros fijos de desplazamiento. La inexactitud mecánica de pletinas y escáneres también hace necesario en ocasiones el *stitching* [357]. Para solventar este problema creamos Stitch&Focus. Hemos utilizado exitosamente Stitch&Focus en nuestro laboratorio para reconstruir retinas enteras procesadas por IHC a partir de miles de imágenes tomadas manualmente. Las células inmunomarcadas en estas retinas fueron posteriormente estudiadas con Cellfinder.

Stitch&Focus y las soluciones de stitching

El proceso de *stitching* consiste en, al menos, dos pasos bien diferenciados: (1) detectar el solapamiento exacto entre dos o más imágenes, y (2) generar una composición o mosaico con ellas. Hasta hace poco más de un lustro las herramientas de *stitching* se dedicaban exclusivamente a detectar solapamientos en imágenes obtenidas en 2 dimensiones. Algunas soluciones requieren de un primer posicionamiento por el usuario como en MosaicJ [358] y en otras es totalmente automático [359]. En las versiones más modernas se utilizan rasgos claves de las imágenes para acelerar el proceso [359, 360], e incluso se realiza el *stitching* en línea de zonas observadas utilizando la potencia de la tarjeta gráfica[357].

La microscopía es capaz de realizar capturas en xyz, por lo que surge la necesidad de software de *stitching* en 3D. Entre los paquete más conocidos de *stitching* en 3D están GlueMRC/LinkMRC[361], “Stitching 2D/3D” de Fiji [362], XuvTools[363], iStitch[364] y Terastitch[365].

GlueMRC/LinkMRC es el primer programa conocido de *stitching* 3D y requiere una colocación manual previa de planos, por lo que hoy en día se puede considerar inviable. En nuestra experiencia “Stitching 2D/3D” de Fiji y XuvTools no fueron capaces de resolver nuestros problemas de *stitching* con retinas enteras. Ambos eran incapaces de manejar el volumen de información de cada retina (1-2 GB). Por otro lado, cuando reducíamos la resolución de las imágenes o muestreábamos áreas fallaban en algún solapamiento y no teníamos posibilidad de solucionarlo. Además,

los algoritmos que utilizaban para realizar la composición en 2D provocaban la pérdida de información útil: concretamente, se dejaban de ver algunas células y otras se veían peor. A raíz de estos problemas, decidimos realizar nuestra propia solución, Stitch&Focus. En 2012 “Stitching 2D/3D” permitió trabajar sobre el disco duro, eliminando el problema de memoria, al igual que hacen iStitch y Terastitch, que pueden trabajar con soltura con imágenes de varios GB o TB.

Stitching 1 a 1

Stitch&Focus utiliza un simple *plugin* de Fiji llamado *Pairwise Stitching* que nos indica el lugar y grado de solapamiento entre 2 planos. En Stitch&Focus combinamos estos 2 valores de solapamiento con 3 premisas respecto a las parejas de imágenes: 1) si no hay buen solapamiento, las imágenes en realidad no están solapadas, es decir, son discontinuas; 2) si se solapa una imagen justo encima de la otra, se trata de desplazamientos en z; 3) si se solapan con desplazamiento, se trata de planos contiguos en las coordenadas xy. El hecho de ir comparando las imágenes consecutivas 1 a 1 hace que los requerimientos de memoria dinámica sean muy bajos y el programa no falle al agotarse la memoria RAM disponible.

Corrección del *stitching*

Algo común en el *stitching* es que en la composición final algún plano no esté bien colocado. En todas las herramientas expuestas arriba, cuando este es el caso, obtendremos una composición final defectuosa. Si como en nuestro caso queremos a posteriori identificar los objetos o células del tejido/retina sin duplicados y cuantificarlas fidedignamente, este defecto de *stitching* tiene repercusiones finales muy negativas. En Stitch&Focus, cuando el cálculo de *stitching* ha finalizado, se le ofrece al usuario observarlo y corregirlo antes de generar la composición final. Para ello, el usuario mueve la imagen que esté mal colocada a su posición aproximada y Stitch&Focus la ajusta a nivel de pixel. Para esta función Stitch&Focus utiliza el *plugin* de ImageJ MosaicJ. Debido a que MosaicJ trabaja con las imágenes en la memoria RAM, puede tener muchas dificultades trabajando con un alto número de imágenes. Para evitar esto Stitch&Focus crea imágenes a menor resolución que son utilizadas por el usuario dentro de MosaicJ [358, 366].

Focusing

Un problema importante a la hora de navegar por una muestra y especialmente para analizarla es que esta tenga una dimensionalidad excesiva. En los modelos 3D esta dimensionalidad se reduce combinando la información de los distintos planos z en un solo plano. Un problema que nos encontramos es que en este proceso se producía una pérdida de información muy valiosa debido a que los algoritmos utilizados eran demasiado sencillos: media, mediana, mezcla lineal, etc. Para solventar este problema se utilizó *z-focusing*.

Si observamos las imágenes capturadas, vemos que gran parte del exceso de dimensionalidad corresponde a información fuera de foco que no nos es de ninguna utilidad. En *Stich&Focus*, gracias al *z-focusing*, nos quedamos solo con la información enfocada de los distintos planos z en un único plano, eliminando la dimensión profundidad (z). Normalmente el proceso de detección de información enfocada se realiza mediante la detección de bordes o análisis de Fourier[333]. En casos más avanzados se puede evitar el ruido armónico con una aproximación de *wavelets* [367]. También se puede tomar el problema como un problema de optimización de un modelo basado en la función de dispersión puntual (PSF) del microscopio [368]. La solución de *wavelets* tiene la ventaja de no requerir el PSF de la lente y requerir mucha menos computación. En nuestro caso, utilizamos la aproximación de *wavelets* con nombre “Extended Depth Field” o “EDF”, creada e implementada para ImageJ [367].

Contrastado CLAHE

Un problema común en las imágenes de microscopía es que mientras que nuestro sistema visual optimiza la información que recibe ajustando el contraste, una imagen captada por un sensor no sufre esta transformación. Es más, dependiendo del protocolo de captura es muy probable que de todos los valores que pueden tomar los píxeles (0-255 en 8-bits) la mayoría se acumulen en valores bajos o altos. Para solventar este problema se realiza un tratamiento de imagen conocido como contrastado por ecualización del histograma (HE), que redistribuye los valores de los

pixeles a lo largo de todos los valores posibles para separarlos entre sí, esto es, el contrastado.

Si la ecualización, en vez de realizarse a nivel global en la imagen, se realiza adaptativamente por regiones de la imagen, esto se conoce como ecualización adaptativa del histograma (AHE). Para eliminar la amplificación de ruido en el contrastado se establece un límite para este, de manera que surge la ecualización adaptativa de histograma con limitación de contraste (CLAHE)[369]. En Stitch&Focus utilizamos el contraste CLAHE mediante el *plugin* de Fiji “Enhanced Local Contrast”, creado por Zuiderveld en 1994 [247] e implementado por Stephan Saalfeld en 1999. En Stitch&Focus creamos un mosaico con las imágenes originales y otro con contrastado CLAHE. El contrastado CLAHE lo realizamos sobre las imágenes enfocadas antes de realizar el montaje ya que es un proceso demasiado intensivo como para usarlo en una imagen de grandes dimensiones.

5.3.3. ConsecRenamer

ConsecRenamer es una sencilla utilidad para renombrar imágenes en función del orden en que fueron obtenidas en microscopio confocal. Si bien existen numerosos paquetes de software generales dedicados o con funciones de renombrado de imágenes/archivos en masa, en nuestro caso, desarrollamos ConsecRenamer como solución fácil de integrar con ImageJ y como paso intermedio entre el microscopio confocal y LayerMaker. ConsecRenamer permite al usuario designar el patrón de captura que siguió el microscopio confocal y, a partir de ahí, a cada imagen le son asignadas sus coordenadas xyz y canal, coordenadas que luego son utilizadas por LayerMaker.

5.3.4. LayerMaker

Al igual que Stitch&Focus, LayerMaker surgió de una necesidad. Al estudiar las isoformas de melanopsina, nuestra información ya no eran imágenes obtenidas en un canal a mano sin posiciones conocidas, sino imágenes con posiciones xyz conocidas, que correspondían a células de distintas capas y de distintos canales de captura. Al intentar analizar las imágenes originales del confocal, observamos que muchas veces tenían poca señal y, si recurríamos al enfoque en z, se acumulaba

demasiado ruido procedente de todas las capas. Por ello, decidimos que teníamos que realizar un enfocado por capas celulares y canales, para lo que creamos LayerMaker. Utilizamos exitosamente LayerMaker para construir *hyperstacks* de retinas enteras a partir de miles de imágenes tomadas con pletina motorizada en microscopia confocal y renombradas con ConsecRenamer, las células de estas retinas fueron posteriormente estudiadas con Cellfinder.

Detección de capas celulares

En Layermaker primero detectamos en cada plano xy para todas sus posiciones z dónde hay mínimos de intensidad en el canal de los núcleos (DAPI), en estos puntos en z será donde se separen dos capas. Una vez se han concretado las capas de cada plano xy, se crean varios modelos partiendo de distintos planos xy que hacen concordar las capas de todos los demás planos xy por propagación, generando varios modelos. El resultado son modelos predominantemente de 2 capas (correspondientes a la capa ganglionar y a la nuclear interna de la retina, en concreto, a la subcapa de las células amacrinas, en la que también existen somas de ipRGC).

Por el momento, solo hemos encontrado en la literatura estrategias de segmentación en capas en secciones transversales de la retina [370-373] [374]. No obstante, los algoritmos de detección de capas en secciones transversales poco tienen que ver en realidad con la detección en retinas enteras aplanadas. Una aplicación en la que sí se estudian las retinas desde una perspectiva paralela o frontal, no transversal, es en la tomografía de coherencia óptica (OCT), herramienta de diagnóstico en oftalmología [375-378], en algunos casos para determinar el grosor de la capa de RGC [376]. Sin embargo, el principio de la OCT es la interferometría de baja coherencia, que también tiene poco que ver con los métodos de microscopia confocal.

El hecho es que no encontramos en la bibliografía biomédica un modelo claro con el que comparar nuestra técnica de detección y modelado de capas de LayerMaker. Por ello, se revela como una metodología original y novedosa en el estudio de una estructura compleja como la de la retina, organizada en capas alternas de somas neuronales y de contactos sinápticos. Su utilidad se demuestra, en particular, cuando ha de analizarse en un montaje de todo el órgano (*whole-mount*) extendido en

el portaobjetos, como es nuestro caso.

Reconstrucción por capas celulares

Tras determinar las capas de cada plano xy y crear un modelo global de asignación, LayerMaker realiza un proceso de *focusing* y de creación de mosaico para cada capa y canal. También genera los canales contrastados CLAHE y combinación de canales que desee el usuario.

Mientras que en Stitch&Focus teníamos como resultado una gran imagen final, en este caso, tenemos como resultado una colección de superimágenes. Concretamente, habrá una superimagen para cada combinación de capa celular y canal (o mezcla de canales). De esta manera, estamos añadiendo dos nuevas dimensiones: la capa (l, de *layer*) y canal (c). Para representar esta información se usa un *hyperstack* [379], que contiene dos deslizadores, uno para l y otro para c, de manera que es posible estudiar toda la retina con facilidad en una sola ventana.

5.3.5. CellFinder

La necesidad de CellFinder

En la actualidad, con el uso de cámaras digitales y el desarrollo de mecanismos automatizados de captura, somos capaces de generar una gran cantidad de imágenes de las muestras observadas en un microscopio. De estas imágenes se puede extraer valiosa información sobre estructuras o procesos biológicos. Los ordenadores pueden ayudar a este objetivo proporcionando mecanismos de automatización, estandarización, medida y análisis. Para ello, se utilizan técnicas de análisis de imagen, de visión por ordenador y de aprendizaje automático. Al análisis de esta gran cantidad de información se la conoce muchas veces como *High Content Analysis* (HCA) y cuando es utilizado para testear medicamentos, compuestos o genes que provocan cambios fenotípicos se conoce como *High Content Screening* (HCS)[380].

En el proceso de análisis de imagen el principal cuello de botella lo representa la tarea de encontrar los objetos en las imágenes. Para solventar este problema se utilizan técnicas de procesamiento de imagen como el filtrado de ruido, la normalización de intensidad o la segmentación. Sin embargo, los algoritmos y protocolos de análisis de imagen sufren

ante la heterogeneidad de intensidades y formas de los objetos de las imágenes biológicas. Esta heterogeneidad se hace todavía más patente cuando se quieren desarrollar soluciones de uso general [381]. Para solventar estos problemas hacen falta sistemas flexibles. Esta flexibilidad la buscamos con CellFinder combinando un análisis de imagen iterante, la posibilidad de interacción del usuario y el aprendizaje del sistema en base a las interacciones del usuario.

CellFinder permitió el análisis de nuestras muestras y puede ser de gran utilidad para el análisis de otras imágenes de microscopía o de cualquier tipo de imagen en la que se deseen localizar y medir objetos.

CellFinder frente a un sistema ideal

El análisis de tejidos aplicado a la medicina se conoce como patología computacional. En ella se define cómo sería un sistema ideal de análisis [382], que tendría tres etapas: una primera de recolección de información procedente de microscopía y etiquetado por expertos, una segunda de análisis de imagen con aprendizaje automático, y una tercera de estadística con métricas médicas para obtener conclusiones. Las fases uno y dos estarían sujetas a aprendizaje conjunto en línea mediante las interacciones del usuario.

CellFinder encaja perfectamente con la definición de las dos primeras fases. Se utilizan imágenes procedentes de microscopía utilizando la biblioteca más popular de manejo de tales imágenes, BioFormats, a través de ImageJ. La interfaz de CellFinder permite al usuario crear etiquetas y asignárselas a las células. El análisis de imagen en CellFinder crea diversas posibilidades de contornos de la célula de las cuales la mejor es elegida por la inteligencia artificial-aprendizaje automático a través de Weka, en base a las cualidades de la célula que es delimitada con ese contorno. El usuario puede corregir en tiempo real el borde seleccionado para cada célula en el interfaz de CellFinder y esta corrección educa la inteligencia artificial en Weka. Planteamos en un futuro incorporar la tercera fase en base a la descripción de la población celular según las características de los tipos celulares y su número, probablemente utilizando R.

La definición de un sistema de patología computacional requeriría además de cuatro cualidades [382]: simplicidad (*plug-and-play*), descriptores invariantes, aprendizaje por árboles de decisión aleatorios y aplicación en problemas reales. CellFinder fue diseñado de

manera que sea muy sencillo de usar. El software no requiere parametrización y solo necesita que el usuario señale unos objetos de ejemplo. CellFinder produce descriptores variantes e invariantes, encontrando en estos últimos descriptores tanto de forma como de textura. Weka utiliza árboles de decisión aleatorios para seleccionar las variables más informativas y permite crecer el árbol en línea con un set de aprendizaje y otro de testeo para elegir el mejor modelo de árbol. Hemos demostrado el uso de CellFinder en un caso que ofrece importantes retos por la cantidad de ruido y diversidad de intensidades de células y fondo, con muestras de inmunohistoquímica reveladas con el método ABC y con muestras de inmunofluorescencia en diversos canales.

Otros aspectos importantes en este tipo de sistema serían [382]:

-El uso de estándares y formatos de intercambio no solo para las imágenes [383], sino también para los modelos estadísticos, algoritmos y de análisis que definan proyectos [382]. CellFinder guarda en cada célula una descripción del protocolo de análisis de imagen y de análisis de datos utilizado y origen de la célula, así como una función resumen (*hashcode*) de los archivos de protocolo de análisis de imagen y datos. De manera que en cada célula está definida de manera inequívoca el proyecto y protocolos utilizados. Mediante el uso de las etiquetas el usuario puede definir el organismo, tejido y protocolo histológico/bioquímico utilizado.

-Incorporación de conocimiento de expertos de dominios de la histología al sistema. Este es uno de los mayores retos del aprendizaje automático y la visión artificial [384]. Un experto puede corregir la clasificación de la máquina, educándola en el proceso (aprendizaje conjunto interactivo en línea)[385]. CellFinder utiliza este tipo de aprendizaje en el etiquetado y corrección de bordes. Esto redundaría en un perfil de inteligencia artificial. Los perfiles de inteligencia artificial pueden ser guardados, generando una librería de conocimientos para distinguir y clasificar células.

-Que el código sea abierto. Las soluciones de análisis de imagen comerciales prácticamente siempre van por detrás de los desarrollos de código abierto [386]. Esto se debe en gran parte a que el software sin una comunidad activa con la que adaptarse a nuevos problemas es un recurso estático de vida limitada [385]. El código de CellFinder será liberado tras su divulgación científica.

-Aplicación futura de la patología más deslocalizada y menos invasiva: en tiempo

real e in-vivo [387] y con el uso de móviles [388]. En este sentido, CellFinder está desarrollado en Java y con componentes basados en Java, un lenguaje dominante y polivalente para las plataformas móviles.

A este tipo de sistema se le deben aplicar las consideraciones de herramientas de bioimagen [389]:

-El desarrollo de herramientas de bioimagen debe pasar del desarrollo de sistemas monolíticos específicos para un problema a sistemas de interoperabilidad, evitando la tediosa necesidad de transferir datos entre paquetes de software obsoletos. CellFinder está desarrollado de manera altamente modular y orientado a adaptadores, por lo que es muy fácil modificar o intercambiar partes del mismo sin que afecte al resto del programa. Además, utiliza estándares de la programación, análisis de imagen y datos: Java, ImageJ y Weka.

-Hacen falta no solo ideas y aproximaciones, sino también codificación, consenso, buenas prácticas y estándares, control de la calidad del software, documentación, formación, sostenibilidad y compartición de código modular[390]. CellFinder lleva a la práctica mediante el diseño y la codificación muchas ideas y aproximaciones como las que se expone más arriba para las que existe consenso. CellFinder se ha desarrollado según buenas prácticas y estándares facilitando la sostenibilidad, su comprensión y limitando la complejidad del código mediante modularización, uso de patrones de diseño conocidos y arquitectura hexagonal. La alta modularidad y orientación a adaptadores facilita el diseño de unidades de testeo para distintas partes del programa. El software está altamente documentado, estando gran parte de ello en esta Tesis. El software posee un menú de ayuda y se colgará un vídeo de demostración en Internet. El código estará disponible en GitHub tras su publicación científica.

Una nueva detección de bordes

La segmentación es la base de la detección de células y cambios fenotípicos y sigue siendo un problema abierto para la comunidad científica [380].

Tradicionalmente se requiere identificar unos ROI (regiones de interés) que delimitan los objetos para conocer sus características, número y distribución en una imagen [391]. Los ROI pueden ser definidos o bien manualmente, lo que es inviable en la práctica,

o bien automáticamente, mediante un algoritmo de segmentación [392]. Los mejores resultados de segmentación implican métodos complejos como los contornos activos [393]. En el programa DetectTiff se consigue la detección automática de objetos y su medición mediante la iteración del umbralado y del filtrado de tamaño de los objetos en imágenes de micrografía [381]. La segmentación basada en el valor de píxeles o de grupos de píxeles y aprendizaje automático ha sido implementada en el *plugin* de Fiji *Trainable Segmentation Plugin* [394] y en Ilastik [395].

CellFinder se originó a partir de un algoritmo de detección de bordes, de ahí que probablemente sea uno de sus puntos fuertes. El refinamiento en la búsqueda de contornos de CellFinder probablemente sea una de las principales razones para su buen funcionamiento. Nuestra primera aproximación en CellFinder se parecía mucho a la de DetectTiff, se determinaban numerosos umbrales y se buscaba objetos en cada uno de ellos, filtrando por un tamaño aproximado de los objetos. A esta opción le añadimos la obtención de variaciones con modificaciones morfológicas (*watershed*, reconstrucción geodésica, etc.). Tras esto, a partir de los contornos encontrados, le añadimos la búsqueda de otros contornos avanzados por contornos activos. Los diversos contornos generados son asociados a cada célula y la célula es medida para cada contorno. Con estas medidas el aprendizaje automático decide qué contorno es el más posible. El usuario puede elegir un contorno distinto, lo que permite alimentar al aprendizaje automático. Este aprendizaje se basa en las medidas de toda la célula, de ahí que consideremos que esta aproximación sea superior a la basada en unos píxeles o grupos de píxeles que no definen todo el objeto/célula objetivo.

El aprendizaje automático

El aprendizaje automático apareció del campo de la inteligencia artificial basándose en su habilidad de mejorar con la experiencia [389]. Los métodos del aprendizaje automático pueden ser supervisados, no supervisados o semisupervisados. Los supervisados, como redes neurales artificiales (RNA) o *Support Vector Machines* (SVM), permiten clasificar células en distintas clases que ya han sido enseñadas [396]. Los no supervisados, el *clustering* principalmente, permiten identificar nuevos tipos celulares [397]. Los semisupervisados combinan ambos métodos. Algunos ejemplos de uso de estas

técnicas los encontramos en la detección de la fase celular: *Support Vector Machines* (SVM), *K-Nearest Neighbors* (KNN) y *naive Bayesian Classifiers* y en el descubrimiento automático de nuevos fenotipos: *Gaussian Mixture Model* (GMM), *Hierarchical Clustering* y *Consensus Clustering* [380].

Herramientas existentes de bioimagen y aprendizaje automático

Dentro de las herramientas de bioimagen de código abierto encontramos herramientas especializadas, como Farsight, y también flexibles, como ImageJ, Fiji, CellProfiler, Icy, Vaa3D, BioImageXD. ImageJ es el software más popular probablemente por su historia y diversidad de *plugins* disponibles. Fiji es una distribución de ImageJ que incluye una serie de *plugins* populares de serie. CellProfiler se basa en la detección mediante *pipelines* o secuencias lineales de pasos. Icy, BioImageXD y Vaa3D, muy recientes, de apenas 2-3 años, ponen un énfasis más fuerte en la visualización que en la detección (para una revisión más detallada véase [389]).

En el contexto de análisis de imagen con aprendizaje automático nos encontramos a PSLID, wndchrm, Cellprofiler-Analyzer y CellExplorer. El software más popular de análisis de imagen ImageJ y su distribución Fiji carecen de integración con el aprendizaje automático en base a objetos. PSLID y wndchrm tienen buenos algoritmos para soluciones no lineales, como redes neurales, pero carecen de interfaz gráfica y también de herramientas propias de análisis de imagen, por lo que realmente no son herramientas para un usuario final no programador. CellProfiler-Analyzer y CellExplorer sí poseen interfaz gráfica. CellProfiler-Analyzer utiliza aprendizaje automático, pero establece limitaciones lineales en cómo conducir el experimento y solo es funcional para segmentaciones sencillas. Por ejemplo, no es viable una segmentación iterativa, además de usar un algoritmo de GentleBoosting, que no es muy efectivo. Tales limitaciones hicieron que fuese inviable utilizarlo para nuestras retinas, a pesar de un importante conocimiento del software. CellExplorer utiliza aprendizaje automático, pero utiliza SVM por lo que solo ofrece soluciones lineales. Además, requiere software de pago para su ejecución (Matlab) y solo ha sido probado en *C. elegans* [391].

Como se puede observar, ninguna de estas soluciones cumple con los requisitos de un sistema ideal o mínimamente funcional para un reconocimiento de objetos completo.

CellFinder ofrece una sencilla interfaz de usuario que alimenta el aprendizaje automático, algoritmos de análisis de imagen iterativos, la plataforma más popular de análisis de imagen, ImageJ, así como una de las soluciones más populares y sencillas de usar de aprendizaje automático, Weka. Por todo ello, consideramos que CellFinder ocupa un espacio que era necesario rellenar. CellFinder funciona como una estructura o *framework* que intenta unir lo mejor de distintos mundos, estando, además, desarrollado en el lenguaje más apropiado para esta arquitectura, Java. De esta manera, tareas altamente diversas y especializadas que requieren gran trabajo, y que son necesarias para nuestro objetivo, son mantenidas por software externo gratuito y testado en el tiempo, ImageJ y Weka.

Repositorios como fuente del conocimiento experto

En el terreno de la genómica los algoritmos generales de comparación de secuencias como BLAST, junto con repositorios públicos como GenBank, han permitido que se genere nuevo conocimiento rutinariamente a partir de colecciones existentes de secuencias. Por analogía, la integración de algoritmos universales de comparación de imágenes con grandes repositorios de imágenes diversos y bien etiquetados es un paso esencial hacia la extracción de datos y conocimiento de imágenes biológicas [391].

Existe una serie de bases de imágenes biológicas anotadas *online* para exploración en el navegador: Visible Human Project, Biomedical Informatics Research Network, Cancer Biomedical Informatics Grid, JCB Data Viewer, The Cell: An Image Library, Cell Centered DB, Human Protein Atlas, etc. Además, algunas bases de imágenes son accesibles *online* de manera programable como BISQUE y OMERO.

CellFinder podría adaptarse para conectarse a estas bases de datos y usarlas como fuente de conocimiento experto generando perfiles de inteligencia artificial reutilizables. Esto permitiría que CellFinder sea un software con inteligencia artificial experta. De igual manera, sería interesante que los usuarios de CellFinder pudiesen compartir sus perfiles de inteligencia artificial apropiadamente anotados para generar una base de conocimiento experto común del que utilizar las partes necesarias en otras investigaciones.

6. Conclusiones

- La degeneración retiniana temprana, la iluminación con luz azul y el uso de toxinas contra células dopaminérgicas modifican las características de la actividad circadiana del animal. Todo ello apunta a una relación aún más estrecha entre la retina, su desarrollo postnatal y el funcionamiento adecuado del sistema circadiano, en particular, del núcleo supraquiasmático.
- Existe una subpoblación de ipRGC no descrita previamente (de soma pequeño, baja expresión de melanopsina y dendritas finas en la sublámina OFF de la plexiforme interna) de función aún por determinar. Los grandes tipos de ipRGC están, a su vez, compuestos de subpoblaciones con diferentes comportamientos ante distintos estímulos lumínicos.
- En la degeneración retiniana la expresión diferencial de las isoformas S y L de la melanopsina varía según las condiciones lumínicas dependiendo del tipo de ipRGC. La subpoblación M2, detectada mediante inmunomarcaje de la melanopsina total, no lo es por el de L y S, por lo que estas isoformas conocidas de la melanopsina podrían tener alterada su expresión en retinas *rd*.
- Los programas informáticos desarrollados, que han demostrado ser de gran utilidad en la obtención de resultados de esta tesis, pueden tener aplicabilidad en otros campos de la investigación. En particular, todo el software relacionado con el estudio de preparaciones histológicas permite un análisis automático y libre de sesgo de las mismas, lo que le confiere un enorme potencial en el uso de técnicas de morfometría. La combinación de los paradigmas clásicos de experimentación y teoría con los paradigmas modernos de software y datos nos permite iluminar rutas de conocimiento anteriormente ocultas.

A. Anexos

Contenido Anexos

A. Anexos	219
A.1. Análisis estadístico	220
A.1.1. Medidas de actividad	220
A.1.2. Medidas celulares	225
A.2. Análisis inicial del desarrollo de software	241
A.2.1. Circadian Control Center	241
A.2.2. Stitch&Focus	246
A.2.3. ConsecRenamer	251
A.2.4. LayerMaker	253
A.2.5. CellFinder	257
A.3. Diseño de software a bajo nivel	269
A.3.1. Circadian Control Center	269
A.3.2. Stitch&Focus	283
A.3.3. ConsecRenamer	297
A.3.4. LayerMaker	301
A.3.5. CellFinder	313

A.1. Análisis estadístico

A.1.1. Medidas de actividad

A.1.1.1 Diferencias de tau entre +/+ y rd/rd y post-efectos

A.1.1.1.1. Tau de +/+ vs rd/rd

Al comparar el desfase de *Tau* entre ratones +/+ y rd/rd, el test de Levene sobre igualdad de varianzas mostró que la distribución de varianzas no permitía realizar un test paramétrico como la t de Student. En su lugar, se utilizó su equivalente no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney. Este test mostró que los ratones rd tienen un Tau significativamente más corto ($p < 0,001$, con un rango promedio rd de 6 y un rango promedio para +/+ de 4).

A.1.1.1.2. Variabilidad de Tau de +/+ vs rd/rd

Igualmente, se puede observar en la Fig. 4.4 que, como indica el test de Levene ($p < 0,001$), el Tau de los ratones rd presenta significativamente mayor variabilidad que el de los ratones +/+.

A.1.1.1.3. Duración de los post-efectos y Tau

La duración en días de los post-efectos y el Tau de los ratones estudiados correlacionan según el Coeficiente de correlación de Pearson con una significación de $p < 0,001$.

Para poder conocer uno en base a otro, se calculó la ecuación de regresión, para lo cual se tomaron 2 parámetros fáciles de manejar: los días que duran los post-efectos (PE) y el desfase de Tau respecto a 24 horas medido en horas (DesfaseTau). Las ecuaciones de regresión resultantes pasando por 0,0 fueron:

$$PE = \text{DesfaseTau} * 13,359$$

$$\text{DesfaseTau} = PE * 0,0734$$

Estas ecuaciones de regresión explican correspondientemente un 91,3% y un 86,79% de la varianza (R^2).

A.1.1.2. Efecto de la luz azul en el ritmo de *rd/rd*

A.1.1.2.2. Evolución del ritmo en luz azul

Inicio de la actividad

El Test de Levene mostró que la distribución de varianzas era muy diferente ($p < 0,000$) entre luz azul y luz blanca. La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que las evoluciones no se ajustaban a una distribución normal para ninguna de las condiciones ($p < 0,001$).

La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias altamente significativas entre las distribuciones de luz azul frente a luz blanca ($p < 0,001$). La asignación de rangos promedio (4-5) muestra que no existen diferencias de la mediana, sino diferencias de la distribución (Fig. 4.11). La hora de inicio no parece evolucionar en luz azul de manera diferente a en luz blanca. La hora de inicio es más dispersa entre los ratones en luz azul que en luz blanca.

Punto medio de actividad

El Test de Levene mostró que las distribuciones de varianzas eran diferentes ($p < 0,029$) entre luz azul y luz blanca. La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que las evoluciones no se ajustaban a una distribución normal para ninguna de las condiciones ($p < 0,001$).

La prueba U de Mann-Whitney mostró que las diferencias entre las distribuciones de luz azul frente y luz blanca se encontraban en el límite de la significación ($p = 0,05$), la asignación de rangos promedio (6-3) muestra que existen diferencias de la mediana a la vez que diferencias de la distribución. El Test T de Student para varianzas desiguales da un valor algo mayor de p ($p = 0,056$) y algo menor para varianzas iguales ($p = 0,019$). El punto medio de actividad parece evolucionar ligeramente, puede que significativamente, más en luz azul que en luz blanca. El punto medio de actividad varía más entre los ratones en luz azul que en luz blanca.

Fin de actividad

El Test de Levene mostró que las distribuciones de varianzas eran muy diferentes ($p < 0,001$) entre luz azul y luz blanca. La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que la distribución de las evoluciones no se ajustaban a una distribución normal para ninguna de las condiciones, aunque se acercaba más en el caso de luz azul ($p < 0,018$) que en luz blanca ($p < 0,001$).

La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias altamente significativas entre las distribuciones de luz azul frente a luz blanca ($p < 0,016$), la asignación de rangos promedio (7-2) muestra que existen diferencias de la mediana. El punto medio de actividad evoluciona notablemente en luz azul en comparación a luz blanca.

A.1.1.2.3 Ampliación de la duración del periodo de actividad por luz azul

El Test de Levene mostró que las distribuciones de varianzas eran muy diferentes ($p < 0,001$) entre luz azul y luz blanca. La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que las evoluciones no se ajustaban a una distribución normal ninguna de las condiciones ($p < 0,001$).

La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre las distribuciones de luz azul frente a luz blanca para el percentil 90 ($p < 0,016$) y para el percentil 80 ($p < 0,032$). La asignación de rangos promedio (7-2) y (6-2) respectivamente muestra que existen diferencias de la mediana. La amplitud aumenta notablemente en luz azul al compararse con luz blanca.

A.1.1.2.4. Evolución de la adaptación regresiva a la ampliación del ritmo

Se calculó el grado de desplazamiento en cada evento como el ratio de las horas que cubre dicho evento entre los días que dura el evento. Se puede ver que este grado de desplazamiento está en el rango del desplazamiento del ritmo endógeno. Se estudió la relación del grado de desplazamiento respecto del individuo y del orden del evento. El escaso número de observaciones no permitió analizar la interacción a nivel multivariante. El contraste de Levene mostró que las varianzas no eran equivalentes en ninguno de los dos casos.

El grado de desplazamiento y el individuo

El análisis de Kruskal-Wallis encontró que el grado de desplazamiento es característico de cada ratón ($p < 0,001$). Los rangos promedio para los individuos de 1 a 5 fueron: 7, 10, 6, 3 y 8.

El grado de desplazamiento y el orden

El análisis de Kruskal-Wallis encontró que el grado de desplazamiento disminuye con el orden del evento ($p = 0,011$), es decir, según ocurran antes o después en el tiempo. Los rangos promedio para los órdenes de 1 a 3 fueron: 11, 8 y 3. El análisis U de Mann-

Whitney entre los pares 1-2, 1-3 y 2-3 encontró, respectivamente, significaciones de 0,000; 0,016 y 0,016; y rangos promedio de 6-2, 7-2 y 7-2. Esto significa que efectivamente el grado de desplazamiento es mayor en los primeros eventos y menor en los últimos, coincidiendo con una adaptación paulatina hasta una posición de equilibrio.

A.1.1.3. Efecto de la deleción dirigida de las células dopaminérgicas de la retina en ratones Swiss

A.1.1.3.1. Efecto de la dosis sobre el punto medio de actividad

El análisis de regresión lineal mostró una alta influencia de la dosis en el adelantop $<0,000$. Las matrices de residuos sugieren un buen ajuste lineal (Figs. 4.15 B y 4.15 C). La ecuación de regresión resultante es: $y = -0.2574x + 18.01$ ($R^2 = 0,0706$). Para contrastar si realmente existe la relación lineal realizamos un contraste a priori de linealidad, este ofreció una p de 0,004.

Comparamos la presencia de diferencias entre los grupos mediante el test de Kruskal-Wallis obteniendo una p de 0,004. El test U de Mann-Whitney mostró las siguientes diferencias entre los grupos de momentos diarios según la dosis: entre 0 y 1: $p=0,091$ (42-33); entre 0 y 2: $p= 0,02$ (29-19); entre 0 y 3: $p= 0,002$ (30-18); entre 1 y 2: $p<0,001$ (38-32); entre 1 y 3: $p=0,011$ (40-27); entre 2 y 3: $p<0,001$ (27-21). Se puede observar que en las comparaciones por pares se encontró significación entre todas las condiciones excepto entre la ausencia de dosis y una dosis. Las diferencias de rangos muestran que se encuentran diferencias en la mediana que aumentan con la diferencia de dosis.

A.1.1.3.2. Efecto sobre otros puntos de la actividad

En el 33% de actividad diaria

El análisis exploratorio muestra que en el 33% todas las dosis se han adelantado de manera similar, unos 40 minutos a la ausencia de dosis.

Se realizó un análisis a priori para determinar si existía estadísticamente una relación en la que el grupo sin dosis fuese mayor que los demás con pesos equivalentes. Se utilizó un contraste con coeficientes 3,-1,-1,-1. El resultado de este contraste es significativo, con $p=0,017$.

Comparamos la presencia de diferencias entre los grupos de días mediante el test de

Kruskal-Wallis obteniendo un p de 0,044. El test U de Mann-Whitney mostró las siguientes diferencias entre los grupos de días según la dosis: entre 0 y 1: $p=0,011$ (45-32); entre 0 y 2: $p=0,027$ (28-20); entre 0 y 3: $p=0,022$ (29-19); entre 1 y 2: $p<0,001$ (36-36); entre 1 y 3: $p<0,001$ (36-35); entre 2 y 3: $p<0,001$ (25-23). Se encontró significación con diferencias importantes en la mediana en las comparaciones del grupo de días del ratón sin dosis respecto a los demás grupos.

En el 66% de actividad diaria

El análisis exploratorio muestra que en el punto de 66% de actividad todas las dosis mantienen entre sí la relación lineal pero se han retrasado respecto de la ausencia de dosis.

Se realizó un análisis a priori para determinar si existía estadísticamente una relación en la que el grupo sin dosis avanzase su posición mientras los demás mantenían su relación lineal. Se utilizó un contraste a priori respecto a los siguientes con coeficientes 1, 3, 1, -5. El resultado de este contraste es altamente significativo, con $p=0,001$.

Comparamos la presencia de diferencias entre los grupos mediante el test de Kruskal-Wallis obteniendo una p de 0,002. El test U de Mann-Whitney mostró las siguientes diferencias entre los grupos según la dosis: entre 0 y 1: $p<0,001$ (30-39); entre 0 y 2: $p<0,001$ (25-23); entre 0 y 3: $p=0,037$ (28-20); entre 1 y 2: $p<0,024$ (40-28); entre 1 y 3: $p<0,001$ (42-24); entre 2 y 3: $p<0,055$ (28-20). Se encontraron diferencias significativas y con diferencias de mediana en todas las comparaciones excepto entre el grupo sin dosis y el grupo de dos dosis y entre el grupo de dos dosis y el grupo de tres dosis.

A.1.2. Medidas celulares

A.1.2.1. Número de células en cortes

A.1.2.1.1. Proporción de tipos celulares

Se encontraron las siguientes proporciones de células.

Ratones *+/+* y *rd/rd*: M1A=78%; M1B=13,5%; M2=8,5%

Ratones *+/+*: M1A=76,9%; M1B=5,8%; M2=17,2%

Ratones *rd/rd*: M1A=79,2%; M1B=11,1%; M2=9,7%

A.1.2.1.2. Influencia de los conos y bastones en el número de células

En los ratones *rd/rd* hay menos ipRGC que en *+/+* bajo todas las condiciones (7h, 11h 200lx, 11h 2000lx) ($p < 0,001$).

A.1.2.1.3. Influencia de la localización del soma en el número de células

La reducción entre *+/+* y *rd/rd* se produce en el número de células con el soma en la capa ganglionar ($p < 0,001$), no así en aquellas con el soma en la capa amacrina ($p = 0,617$).

A.1.2.1.4. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M1

No se encontró variación ni en el número de células M1A, con soma en la capa ganglionar, ni en el número de células M1B ($p = 0,719$), con soma en la subcapa de las neuronas amacrina ($p = 0,941$).

A.1.2.1.5. Influencia de la hora e intensidad lumínica en las células M2

No se encontró variación en el número de células M2 la intensidad lumínica en ninguna de las cepas. Sí se encontró que el número de células a las 7h era significativamente mayor que a las 11h independientemente del grado de iluminación (Fig. 4.006).

A.1.2.1.6. Proporción de tipos celulares

Se encontraron las siguientes proporciones de células por soma, dendritas y tinción.

Célula	Totales			Porcentual		
	+/+	rd/rd	Ambas	+/+	rd/rd	Ambas
Amacrinas	23.4	36.4	29.9	7.13	10.66	8.93
Gang. ON Claras	20.6	11.5	16.05	6.28	3.37	4.79
Gang. ON Oscuras	31.2	22	26.6	9.51	6.44	7.94
Gang. OFF Claras	128.2	133.4	130.8	39.06	39.06	39.06
Gang. OFF Oscuras	124.8	138.2	131.5	38.03	40.47	39.27
Gang. Biest. Oscuras	31.8	18.5	25.15	9.69	5.42	7.51
Total	328.2	341.5	334.85	100.00	100.00	100.00

A.1.2.2. Las ipRGC según intensidad de tinción y diámetro±

A.1.2.2.2. Búsqueda de dos *clusters* por ratio intensidad/diámetro

Se realizó un análisis de clúster (*clustering* bietápico con medida de distancia por log-verosimilitud y con 15 puntos de inicio) en cada retina. Delimitamos el número de *clusters* a 2 y se utilizó como variable el ratio Intensidad/Diámetro.

Se encontraron 2 *clusters* que coinciden con lo descrito en la bibliografía para las ipRGC: un clúster de menor diámetro con mayor tinción y un clúster de mayor diámetro con menos tinción. El clúster de mayor tamaño tenía una intensidad arbitraria de 26.25 ± 1.70 y el clúster menor 14 ± 1.41 . En una escala percentil de intensidad el de menor tamaño tenía una intensidad de 71.25 ± 4.19 y el de mayor tamaño 28 ± 5.48 .

El diámetro de las células de menor tamaño era de $18.25 \pm 0.96 \mu\text{m}$ y el de las células de mayor tamaño $20.5 \pm 1 \mu\text{m}$. Aunque la distribución de *clusters* según intensidad y diámetro coincidía con los descritos en la bibliografía los diámetros que obtuvimos no coincidían con los descritos en la bibliografía para M1 y M2, de en torno a $17 \mu\text{m}$ y $22 \mu\text{m}$. Esto nos llevó a realizar la siguiente comprobación según diámetro celular.

En la Prueba U de Mann-Whitney Tanto el diámetro como la intensidad mostraron diferencias por *cluster* en las 4 retinas ($p < 0,001$).

A.1.2.2.3. Búsqueda de *clusters* por dos diámetros

Tras observar que los *clusters* encontrados por ratio intensidad/diámetro cuadraban con los tipos descritos pero su diámetro difería nos planteamos comprobar qué distribución de diámetros celulares se encontraba en nuestras retinas. Para comprobarlo procedimos a realizar un análisis de clúster (*clustering* bietápico con medida de distancia por log-

verosimilitud y con 15 puntos de inicio) en cada retina. Delimitamos el número de *clusters* a 2 y los *clusters* se buscaron por la variable Diámetro.

Se encontraron 2 *clusters* cuyos diámetros sí parece coinciden con lo descrito en la bibliografía uno de 18.25 ± 1.26 y uno de $22.25 \pm 0.96 \mu\text{m}$. El clúster de $18 \mu\text{m}$ tenía una intensidad arbitraria de 20.75 ± 1.5 y el de $22 \mu\text{m}$ de 19. Estas intensidades corresponden en una escala percentil a 51 y 49.5 (Fig. 4.13). De esta manera las intensidades no representan lo descrito en la bibliografía, mientras que los diámetros sí coinciden. Este resultado junto con el resultado de la *clusterización* por ratio intensidad/diámetro nos llevó a realizar el siguiente análisis.

En la Prueba U de Mann-Whitney tanto el diámetro como la intensidad mostraron diferencias por *cluster* en las 4 retinas ($p < 0,001$).

A.1.2.2.4. Búsqueda libre de *clusters* por intensidad y diámetro

Los resultados de la *clusterización* por el ratio intensidad/diámetro nos daban a entender una correcta relación de intensidades/diámetros pero no unos diámetros correctos. Por otro lado, la *clusterización* por diámetros sí encontraba estos diámetros, pero ¿por qué no encajaban estos *clusters* de ratios con los diámetros? Debía existir otra variable o componente que hacía que los *clusters* intensidad/diámetro viesen el diámetro de su *cluster* de mayor diámetro disminuido. Ya que los tipos de ipRGC según su soma se definen por las 2 variables diámetro e intensidad, no queríamos introducir una tercera y en su lugar buscamos una explicación no lineal en forma de distribución de *clusters*. Cuando se agrupa por la variable intensidad/diámetro estamos limitando el problema a una solución lineal. Gran parte de la gracia de la búsqueda de *clusters* es que puede ofrecer soluciones no lineales cuando se usa más de una variable. Por ello buscamos *clusters* con las variables intensidad y diámetro individualmente en vez de por su ratio. Dos *clusters* siempre supondrán una solución lineal, por ello añadir más componentes en forma de *clusters* era necesario para obtener un modelo no lineal. Realizamos el análisis de *clusters* con determinación automática del número de *clusters*, de manera que fuesen los propios datos los que decidiesen el número de *clusters*. Como con los demás análisis de *clusters* se utilizó clustering bietápico con medida de distancia por log-verosimilitud y con 15 puntos de inicio, pero en este caso con 2 variables, intensidad y diámetro, y con determinación automática del número de *clusters*.

El análisis de clúster encontró en las 4 retinas 3 *clusters*, y en las 4 retinas los 3 *clusters* tenían la misma conformación: células de un tamaño de soma intermedio y alta intensidad, células de un tamaño de soma mayor y baja intensidad, células de un tamaño de soma menor y baja intensidad. Es decir dos intensidades y tres tamaños. De estos tres tipos de ipRGC las primeras encajan con M1-M3 y las segundas con M2. Las células más pequeñas y claras no coinciden con ninguno de estos dos tipos morfológicos, en la Fig. 4.11 aparecen nombradas por nosotros como MX.

Las células más oscuras, las presuntas M1-M3, aparecen con un tamaño de $19.5 \pm 0.58 \mu\text{m}$, las presuntas células M2 aparecen con un tamaño de $22 \pm 0.5 \mu\text{m}$, las células MX aparecen con un diámetro de $16.25 \pm 0.96 \mu\text{m}$. Las presuntas M1-M3 tienen una intensidad de 29.25 ± 1.5 , mientras que las presuntas M2 tienen una intensidad de 14.5 ± 1.73 y las MX de 15 ± 1.41 . En una escala percentil de intensidad las M1-M3 tendrían un valor de 79 ± 3.16 , las M2 de 30.5 ± 1 y las MX de 31.5 ± 7.55 . Es decir las células MX tienen la misma intensidad que las M2 pero un soma algo más pequeño que las M1.

En la Prueba de Kruskal-Wallis Tanto el diámetro como la intensidad mostraron diferencias por cluster en las 4 retinas ($p < 0,001$). Mientras que no existía homogeneidad de varianzas para tener en cuenta la alta significación de los contrastes ANOVA. Con los test post-hoc observamos que para todas las retinas se encontraron 3 subconjuntos homogéneos por diámetro. Además para 3 de las 4 retinas se encontraban 2 subconjuntos homogéneos por intensidad, teniendo así las presuntas M2 y MX la misma intensidad. Esto es especialmente significativo teniendo en cuenta el gran tamaño muestral usado en el contraste (de 400 células por retina aproximadamente).

A.1.2.2.5. Predicción lineal de pertenencia de células a *clusters*

Como aproximación lineal se utilizó el Análisis Discriminante. El análisis discriminante según diámetro e intensidad media para cada retina devolvió ecuaciones similares para todas las retinas y con unas probabilidades de acierto porcentuales de 97, 97.8, 95.2 y 96.2. Sin embargo lo que nos interesa no es la función discriminante de cada retina, sino la función discriminante que cubra todas las retinas, para ello realizamos el análisis discriminante para las retinas conjuntamente. La función discriminante de Fisher resultante fue:

$$M1: -59 + 4 * \text{Diámetro} + 1.053 * \text{Intensidad}$$

$$M2: -60+4*\text{Diámetro}$$

$$MX: -37+3*\text{Diámetro}$$

Esta función tiene una capacidad de acierto del 90,2%.

Para abstraerse de las diferencias de intensidad de tinción entre distintos experimentos podemos utilizar la intensidad en una escala percentil (Intensidad percentil), en vez de simplemente la intensidad. Utilizando el diámetro y la intensidad percentil para las cuatro retinas conjuntamente se obtiene la siguiente función discriminante de Fisher:

$$M1: -55.023+4*\text{Diámetro}$$

$$M2: -57.056+4*\text{Diámetro}+0.1*\text{IntensidadPercentil}$$

$$MX: -35+3*\text{Diámetro}$$

Esta función tiene una capacidad de acierto del 88,8%.

A.1.2.2.6. Predicción no-lineal de pertenencia de células a *clusters*

Se puede observar que el análisis discriminante ofrece funciones basadas principalmente en el diámetro. La razón de esto es que debe ofrecer una solución lineal para un problema que realmente no es lineal. Aunque esta solución sea más sencilla la más exacta para explicar un problema no lineal es un sistema no lineal, en nuestro caso a un árbol de decisión. Realizamos un árbol de decisión de tipo CRT con el diámetro y la intensidad, su capacidad predictiva es del 89%. A su vez realizamos un árbol de decisión de tipo CRT con el diámetro y la intensidad percentil, su capacidad predictiva es del 84%. El árbol basado en la intensidad percentil presenta mayor sencillez 6 nodos frente a 9 y más amplia aplicación por estar la intensidad en una escala relativa.

A.1.2.2.7. Parámetros que varían entre tipos celulares

Para conocer qué variables se relacionaban más con los distintos tipos celulares analizamos su significación entre los tipos celulares mediante el Test de Kruskal-Wallis. A continuación se buscaron subconjuntos homogéneos mediante el Contraste de Scheffé. A continuación pasamos a comentar algunas de estas variables.

Variables de forma

+Área: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

+Perímetro, ancho y altura: Se obtuvieron diferencias significativas, un subconjunto

para M1 y MX y otro subconjunto para M2.

+Variables de la elipse de mejor ajuste:

-Eje menor de la elipse: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

-Eje mayor de la elipse: Se obtienen diferencias significativas, un subconjunto para M1 y MX y otro subconjunto para M2.

-Ángulo: Se obtienen diferencias significativas muy altas pero un solo subconjunto para los tres tipos celulares.

-El ratio de aspecto es el ratio del eje mayor entre el eje menor, es una medida de elongación. Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

+Variables relacionadas con el Feret:

-El Feret es la mayor distancia entre dos puntos del perímetro o diámetro máximo: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

-El Feret mínimo corresponde al diámetro mínimo: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

-Ángulo del Feret, FeretX y FeretY: el ángulo del Feret mide la posición del Feret respecto al eje x. El FeretX y el FeretY hacen referencia al desplazamiento en cada eje desde el inicio de la captura hasta el inicio del contorno de la célula. Los tres ofrecen diferencias significativas muy altas pero un solo subconjunto para los tres tipos celulares.

Variables de marcaje

+Media, moda, mediana e intensidad máxima: Se obtienen diferencias significativas altas y dos subconjuntos, uno para MX y M2 y otro para M1.

+Intensidad mínima: Se obtienen diferencias significativas muy altas pero un solo subconjunto para los tres tipos celulares.

+Simetría de la distribución, o tercer momento sobre la media. Se obtienen diferencias significativas y dos subconjuntos, uno para MX y M2 y otro para M1.

+Proyección vertical de la distribución, curtosis, o cuarto momento sobre la media. Se obtienen diferencias significativas y dos subconjuntos, uno para MX y M1 y otro para M2.

Variables calculadas

+Intensidad integrada, consiste en la suma de la intensidad de todos los píxeles de la célula. Se obtienen diferencias significativas y dos subconjuntos, uno para M1 y M2 y otro para MX.

+Media limpia, consiste en la intensidad media de la célula tras retirar la intensidad media del fondo que la rodea. Se obtienen diferencias significativas y dos subconjuntos, uno para MX y M2 y otro para M1.

+Diámetro, es una conversión unitaria del eje menor de píxeles a micrómetros. Su significación y subconjuntos coinciden con los del eje menor: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

+Ratio Intensidad Media/Diámetro, está calculado en base a la media limpia y al diámetro en micrómetros: Se obtienen diferencias significativas altas y subconjuntos únicos para cada tipo celular.

A.1.2.3. La intensidad, el diámetro y las dendritas

A.1.2.3.2. Frecuencias de los tipos dendríticos en el centro de los *clusters*

Se comparó la distribución de los distintos tipos dendríticos entre los *clusters*. Se realizó el test de Kruskal-Wallis encontrando entre las siguientes significaciones por tipo dendrítico: M1 ($p=0,023$); M2 ($p=0,009$); M3 ($p<0,001$); ND ($p=0,005$); NS ($p=0,021$); NC ($p<001$).

A continuación se muestra el resultado de las comparaciones según el test U de Mann-Whitney para cada tipo dendrítico.

M1

Para el tipo dendrítico M1 se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M1 y M2 ($p=0,02$; rangos promedio: 6-2), entre los *clusters* M1 y Mx ($p=0,028$; rangos promedio: 6-2) y entre los *clusters* M2 y Mx ($p<0,001$; rangos promedio: 5-3). La proporción del tipo dendrítico M1 en el cluster M1 es remarcablemente mayor que la en los *clusters* M2 y Mx. A su vez M2 presenta más células clasificadas como M1 que Mx (hay que tener en cuenta que muchas posibles M1 del cluster Mx no se clasifican de este modo por no poderse apreciar sus dendritas).

M2

Para el tipo dendrítico M2 se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M1 y M2 ($p=0,014$; rangos promedio: 2-6), entre los *clusters* M1 y Mx ($p<0,001$; rangos promedio: 4-5) y entre los *clusters* M2 y Mx ($p=0,029$; rangos promedio: 6-2). La proporción del tipo dendrítico M2 en el cluster M2 es remarcablemente mayor que la de los *clusters* M1 y Mx. M1 y Mx no presentan entre ellas diferencias en la proporción de tipo dendrítico M2.

M3

Para el tipo dendrítico M3 se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M1 y M2 ($p<0,001$; rangos promedio: 3-5) y entre los *clusters* M2 y Mx ($p<0,001$; rangos promedio: 5-3), pero no entre los *clusters* M1 y Mx ($p=1$; rangos promedio: 4-4). La proporción del tipo dendrítico M3 en el *cluster* M2 es remarcablemente mayor que la de los *clusters* M1 y Mx. M1 y Mx no presentan entre ellas diferencias en la proporción de tipo dendrítico M3.

ND

Para el tipo dendrítico ND, en el que no se aprecian dendritas, se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M1 y Mx ($p=0,013$; rangos promedio: 2-6) y entre los *clusters* M2 y Mx ($p<0,013$; rangos promedio: 2-6), pero no entre los *clusters* M1 y M2 ($p=1$; rangos promedio: 4-4). La proporción del tipo dendrítico ND en el cluster Mx es remarcablemente mayor que la de los *clusters* M1 y M2. M1 y M2 no presentan entre ellas diferencias en la proporción de tipo dendrítico ND.

NS

Para el tipo dendrítico NS, en el que no se consigue determinar el tipo dendrítico, se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M1 y Mx ($p=0,019$; rangos promedio: 2-6) y entre los *clusters* M2 y Mx ($p<0,019$; rangos promedio: 2-6), pero no entre los *clusters* M1 y M2 ($p=1$; rangos promedio: 4-4). La proporción del tipo dendrítico ND en el cluster Mx es remarcablemente mayor que la de los *clusters* M1 y M2. M1 y M2 no presentan entre ellas diferencias en la proporción de tipo dendrítico NS.

NC

Para el tipo dendrítico NC, correspondiente a artefactos que no son células, se encontraron diferencias significativas entre los *clusters* M2 y Mx ($p < 0,001$; rangos promedio: 3-5), entre los *clusters* M1 y Mx ($p < 0,001$; rangos promedio: 4-4) y entre los *clusters* M1 y M2 ($p < 0,001$; rangos promedio: 4-4). La proporción de artefactos parece no presentar dependencia del cluster.

A.1.2.3.3. Separación de los tipos dendríticos M1 y M2

Regresión logística de todos los *clusters*

Se realizó regresión logística binaria utilizando como variable dependiente el tipo dendrítico y como posibles variables predictoras: diámetro, intensidad e intensidad*diámetro.

En el caso de utilizar todas las células de los tipos dendríticos M1 y M2, se encontró que todas las variables independientes y la constante eran significativas pero solo la constante y el producto intensidad*diámetro aportaban peso a la ecuación de regresión logística:

Diámetro: $p = 0,046$, coeficiente=0;

Intensidad: $p < 0,001$, coeficiente=0;

Intensidad*diámetro: $p < 0,001$; coeficiente=0,003;

Constante: $p < 0,001$; coeficiente=-6,1;

Esta ecuación predice correctamente un 84% de cada tipo dendrítico y global.

Regresión logística del cluster M2

En el caso de utilizar solo las células de los tipos dendríticos M1 y M2 que se encontrasen en el cluster designado como M2, se encontró que todas las variables independientes y la constante eran significativas pero solo la constante y el producto intensidad*diámetro aportaban peso a la ecuación de regresión logística:

Diámetro: $p < 0,001$, coeficiente=0;

Intensidad: $p < 0,001$, coeficiente=0;

Intensidad*diámetro: $p < 0,001$; coeficiente=0,023;

Constante: $p < 0,001$; coeficiente=8;

Esta ecuación predice correctamente un 16% del tipo M1 (muchas M1 observadas son clasificadas M2 en la regresión), un 92% del tipo M2 y un global del 74%.

En el modelo de regresión logística centrado en el cluster M2 el peso en la ecuación del producto intensidad*diámetro respecto del modelo de regresión para todos los *clusters* (0,003 vs 0,023).

Árbol de decisión de todos los *clusters*

Como se puede observar gráficamente es posible que una aproximación no lineal explique mejor el cluster M2 por ello realizamos un árbol de decisión para el total de M1 y M2 en todos los *clusters*, en los clusters designados M1 y M2 y exclusivamente en el *cluster* M2 (Fig. 4.55).

El análisis para los tipos dendríticos M1 y M2 para todos los *clusters* muestra tres tipos principales de nodos: nodos con alta pureza de M1, nodos con alta pureza de M2 y nodos híbridos de M1 y M2.

Los nodos con alto contenido de M1 eran:

Nodo 5: 96,2% M1; n=53; intensidad>14,3; diámetro<=22,8

Nodo 12: 88,9% M1; n=9; intensidad>22,8; diámetro>22,8

Nodo 3: 100% M1; n=7; intensidad<=14,3; diámetro<17,3

Los nodos con alto contenido de M2 eran:

Nodo 8: 92,7% M2; n=41; intensidad<=14,3; diámetro>22,1

Los nodos híbridos de M1 y M2 eran:

Nodo 7: 37,5% M1-62,5%M2; n=8; intensidad \leq 14,3; diámetro 17,3-22,1

Nodo 11: 47,6% M1-52,4%M2; n=21; intensidad 14,3-22,8; diámetro $>$ 22,8

Este modelo predice correctamente un 80% de M1, un 94% de M2 y un global del 86%.

Árbol de decisión de *clusters* M1 y M2

El análisis para los tipos dendríticos M1 y M2 para los *clusters* M1 y M2 muestra tres tipos principales de nodos: nodos con alta pureza de M1, nodos con alta pureza de M2 y nodos híbridos de M1 y M2 (Fig. 4.56).

Los nodos con alto contenido de M1 eran:

Nodo 2: 97,8% M1; n=45; intensidad $>$ 22,8

Los nodos con alto contenido de M2 eran:

Nodo 3: 93,2% M2; n=44; intensidad $<$ 14,1

Los nodos híbridos de M1 y M2 eran:

Nodo5: 53,6%M2-46,4% M1; n=28; intensidad 14,1-22,8

Este modelo predice correctamente un 73% de M1, un 98% de M2 y un global del 85%.

Árbol de decisión del cluster M2

El análisis para los tipos dendríticos M1 y M2 en el cluster M2 muestra dos tipos principales de nodos: nodos con alta pureza de M2 y nodos híbridos de M1 y M2 (Fig (Fig4.57)

Los nodos con alto contenido de M2 eran:

Nodo 1: 93,2% M2; n=44; intensidad \leq 14,1

Nodo 6: 75% M2; n=8; diámetro $>$ 26

Los nodos híbridos de M1 y M2 eran:

Nodo 5: 56,5% M1-43,5%M2; n=16; intensidad>14,1; diámetro<26

Este modelo predice correctamente un 33% de M1, un 98% de M2 y un global del 82%.

A.1.2.3.4. Composición del cluster Mx

Para analizar la composición del cluster Mx se realizó un árbol de decisión utilizando como variable dependiente el tipo dendrítico y como posibles variables predictoras: diámetro, intensidad. En este caso se utilizó por un lado el tipo dendrítico M1 y por otro el tipo NS_ND, que incluye aquellos casos en los que no se observaban dendritas y aquellos en los que no se podía decidir en base a estas el tipo dendrítico. Se encontró principalmente nodos híbridos M1-NS_ND y un pequeño nodo NS_ND.

Los nodos híbridos de M1 y NS_ND eran:

Nodo 3: 41,4% M1-58,6%NS_ND; n=29; diámetro 13,3-17,5

Nodo 4: 69,2% M1-30,8%Ns_ND; n=13; diámetro>17,5

Los nodos con alto contenido de NS_ND eran:

Nodo 1: 100% NS_ND; n=5; diámetro<13,3

Este modelo predice correctamente un 100% de M1, un 38% de NS_ND y un global del 65%.

A.1.2.3.5. Un modelo global según intensidades arbitrarias

Para determinar un modelo global se realizó un árbol de decisión para todos los *clusters* utilizando como variable dependiente el tipo dendrítico (M1, M2 y NS_ND) y como posibles variables predictoras el diámetro y la intensidad.

Partición primaria

Se encontraron 3 nodos principales que coinciden con los determinados indirectamente mediante análisis de cluster solo con diámetro e intensidad. La primera

separación ocurre en base a la intensidad, separando por un lado el cluster M1 y por otro el M2 y Mx. La siguiente separación ocurre por diámetro entre M2 y Mx.

El nodo de M1:

Nodo 2: 86,8% M1-11,3%NS_ND-1,9%M2; n=53; intensidad>22,3

El nodo de M2:

Nodo 4: 71,2% M2-20,5%M1-8,2%NS_ND; n=73; intensidad<=22,3; diámetro>21,1

El nodo de Mx:

Nodo 3: 49%NS_ND -42,9%M1-8,2%M2; n=49; intensidad<=22,3; diámetro<=21,1

Partición secundaria

El nodo de M1- principal parte pura:

Nodo 6: 93,2% M1-4,5%NS_ND-2,3%M2; n=44; intensidad>22,3; diámetro>18,6

El nodo de M1- pequeña parte de contacto con Mx:

Nodo 5: 55,6% M1-44,4%NS_ND-0%M2; n=9; intensidad>22,3; diámetro<18,6

El nodo de M2-parte pura:

Nodo 9: 88,1% M2-7,1%M1-4,8%NS_ND; n=42; intensidad<=14; diámetro>21,1

El nodo de M2-parte híbrida M2-M1:

Nodo 10: 48,4% M2-38,7%M1-12,9%NS_ND; n=31; intensidad 14-22,3; diámetro>21,1

El nodo de Mx-parte con más dendritas detectables:

Nodo 8: 53,1% M1-34,4%NS_ND-12,5%M2; n=32; intensidad<=22,3; diámetro 16-21,1

El nodo de Mx-parte con menos dendritas detectables:

Nodo 7: 76,5%NS_ND-23,5%M1-0%M2; n=17; intensidad \leq 22,3; diámetro $<$ 16

Este modelo predice correctamente un 76% de M1, un 91% de M2, un 36% de Ns_ND y un global del 73%.

A.1.2.3.6. Un modelo global según intensidades percentiles

Para estandarizar el modelo realizamos un árbol de decisión en el que el valor arbitrario de intensidad de cada célula fue sustituido por su intensidad percentil, es decir la posición ordinal que ocuparía si ordenásemos la células por intensidad. El resultado fue básicamente cuatro tipos de *clusters*: *clusters* de gran pureza de M1, *clusters* de gran pureza de M2, *clusters* híbridos de M1 y M2 y *clusters* mezcla de M1 y NS_ND. Este modelo básicamente define los *clusters* M1, M2 y Mx y divide el cluster M2 en dos partes, una pura y otra mezclada con M1 (Fig. 4.60).

Los nodos M1:

Nodo 8: 84,1% M1-13,6%NS_ND-2,3%M2; n=44; diámetro 17,5-22,1; intensidad percentil $>$ 27,7

Nodo 12: 91,7% M1-8,3%NS_ND-0%M2; n=12; diámetro $>$ 22,1; intensidad percentil $>$ 75,3

Los nodos M2-parte pura:

Nodo 5: 85,1%M2-8,5%NS_ND-6,4%M1; n=47; diámetro $>$ 22,1; intensidad percentil $<$ 48,1

Los nodos híbridos M2-M1:

Nodo 11: 50,0% M1-42,3%M2-7,7%NS_ND; n=26; diámetro $>$ 22,1; intensidad percentil 48,1-75,4

Nodo 11: 62,5% M2-37,5%M1-0%NS_ND; n=8; diámetro 17,5-22,1; intensidad percentil \leq 27,6

Los nodos de Mx:

Nodo 3: 60,5%NS_ND-39,5%M1- 0% M2; n=38; diámetro<17,5

Este modelo predice correctamente un 74% de M1, un 78% de M2, un 63% de NS_ND y un global del 73%.

A.1.2.4. Isoformas de la melanopsina

A.1.2.4.7. Variación del número de células LS y células L según la hora e intensidad lumínica

Se calculó el área retiniana en base al área medida en píxeles con ImageJ. El área mínima encontrada en una retina individual correspondía a un 65% del área real (o máxima), estando la mayor parte de retinas en el rango 80-90%. Es decir, las áreas de las retinas utilizadas representaban la gran mayoría del área de la retina real. La densidad celular se calculó dividiendo el total de células de cada tipo por el área total de la retina.

Según el test Kruskal-Wallis no existe variación en el número de células LS ($p=0,079$) y L ($p=0,403$) entre las condiciones de ZT23y ZT3 a 200 lx y 11h 2000 lx. Aunque el tipo LS se queda cerca de la significación.

A.1.2.5. La variación de los tipos celulares in vitro según luz

A.1.2.5.1. Variación del número de células por tipo según la luz

Según el test de Kruskal-Wallis la proporción de células del tipo M2 aumenta en oscuridad respecto a luz ($p=0,05$ rangos promedio 2-5), no así los tipos M1 y MX ($p=0,513$ ambas). (Fig.4.201 y Fig.4.202).

No se encuentra una variación significativa cuando se tienen en cuenta los valores absolutos de recuento de células en vez de su proporción M1 ($p=1,0$), M2 ($p=0,1$), MX ($p=0,2$).

A.1.2.5.2. Variación de la intensidad del inmunomarcaje en los subtipos de ipRGC (luz vs. Oscuridad)

Se encontró una dependencia altamente significativa entre la variación de la expresión de melanopsina, el individuo y las condiciones lumínicas y en la relación por niveles

individuo-condición, según el ANOVA para todas las condiciones: ($p < 0,000$). Se asumieron supuestos paramétricos según el Teorema del límite central por el tamaño muestral ($N > 400$ por combinación).

El análisis post-hoc de Tukey encontró para todas las combinaciones de tipo e individuos $p < 0,000$, excepto para M1 ind1-ind3: $p = 0,004$ y para MX ind2-ind3: $p = 0,025$. Se encontró en M1 un subconjunto homogéneo para los individuos 2 y 3 y otro para el 1. Se encontró en M2 un subconjunto homogéneo para los individuos 1 y 2 y otro para el 3. Se encontró en MX un subconjunto homogéneo para cada individuo. El análisis T de Student encontró las siguientes significaciones entre luz y oscuridad:

M1: ind1: $p = 0,1$; ind2: $p = 0,081$; ind3: $p < 0,000$.

M2: ind1: $p = 0,028$; ind2: $p = 0,001$; ind3: $p < 0,000$.

MX: ind1: $p < 0,000$; ind2: $p = 0,009$; ind3: $p = 0,022$.

A.1.4.2.4.3. Subpoblaciones de M2 y su variación

Los *clusters* fueron detectados mediante *clusterización* a 4 *clusters* por log-verosimilitud en función de la intensidad de las células clasificadas como M2.

La comparación dentro de M2a según Kruskal Wallis resultó en $p = 0,127$.

A.2. Análisis inicial del desarrollo de software

A.2.1. Circadian Control Center

Descripción general

Se pretende desarrollar un software que permita medir la actividad de animales a partir de una señal de vídeo y analizar por separado la actividad simultánea de varios animales.

El resultado del análisis debe presentarse como actograma. El análisis debe permitir estimar parámetros cronobiológicos. Es deseable que el análisis ocurra en tiempo real. Es deseable que el software además de estimar sea capaz de predecir estos parámetros.

Interés

Cubre un nicho de interés libre:

- Es gratis, abierto y multiplataforma.
- Utiliza un estándar del análisis de imagen: ImageJ.
- Utiliza un estándar del análisis y representación de datos: R.
- Al utilizar vídeo puede una solución muy barata y exacta de control de actividad.
- Funciona en tiempo real.
- El investigador puede inspeccionar el actograma.
- El software ofrece parámetros cronobiológicos sobre los datos estimados.
- El software predice parámetros cronobiológicos futuros.
- Al analizar tejidos animales es muy importante conocer el ambiente y regulación de ese tejido en el animal. Cada animal puede tener un ritmo circadiano distinto en el momento de toma de tejido.

Alcance y exclusiones

Se decidió **incluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de Circadian Control Center:

Prioridad alta

- Que el programa sea capaz de recoger las imágenes o fotogramas de cualquier programa que permita visualizarlas.
- Que el usuario pueda determinar distintas zonas de la imagen sobre las que se realizará análisis individual mediante una interfaz de usuario.

- Desarrollar un protocolo de análisis de imagen para vídeo/fotogramas que sea capaz de detectar el movimiento y convertirlo a una medida numérica.

- Que el programa sea capaz de gestionar la información visual entrante sin tener que ocupar gran cantidad de espacio en disco.

- Que el programa pueda generar un actograma.

Prioridad media

- Que el programa sea capaz de limpiar los datos de interferencias y outliers.

- Que el programa corra en tiempo real.

- Que el programa estime parámetros cronobiológicos.

Prioridad baja

- Que se puedan nombrar las zonas seleccionadas por el usuario.

- Que el programa sea capaz de resumir los datos de movimiento medido en diferentes escalas de tiempo.

- Que el programa recuerde un set de zonas seleccionadas para el análisis.

- Que el programa pueda predecir parámetros cronobiológicos.

- Que los parámetros estimados y predichos se muestren en el actograma.

- Que el programa analice los datos en un lenguaje predispuesto para el análisis de datos.

- Que la actualización del actograma sea lo más eficiente posible.

Se decidió **excluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de Circadian Control Center:

Prioridad baja

- Que el programa busque patrones ultradianos.

- Que el programa se reinicie automáticamente con el reinicio del ordenador.

- Que el programa envíe avisos de email al usuario.

- Que el actograma permita hacer zoom.

Entradas y salidas

Datos de entrada

La señal de video que se puede contemplar en la pantalla. Independientemente de su

procedencia y del programa que la muestre.

Resultados a mostrar

El resultado del análisis debe presentarse como actograma. El análisis debe permitir estimar parámetros cronobiológicos. Es deseable que el análisis ocurra en tiempo real. Es deseable que el software además de estimar sea capaz de predecir estos parámetros.

Casos de uso

Caso de uso: Selección de zonas de medida e inicio medida.

Descripción: Permite al usuario delimitar una serie de zonas de medida y le da la opción de iniciar el análisis.

Precondición: El usuario tiene abierta una ventana en la que puede ver la señal de vídeo que muestra sus animales.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ
2. El usuario lanza el macro de *Circadian Control Center*.
3. Se le abre una ventana con instrucciones.
4. Se le pide al usuario que seleccione la ventana en la que se muestra la actividad.
5. El usuario selecciona la ventana con la señal de video.
6. Se abre la ventana ROIManager desde donde gestionará las selecciones.
7. Se le pide al usuario que marque zonas que quiere estudiar y las vaya añadiendo usando el botón “Add” de ROIManager.
8. Se le pide al usuario que renombre esas zonas para que las reconozca fácilmente
9. Se le pide al usuario que acepte guardar las selecciones cuando termine de realizarlas.
10. Ya se habrá generado la archivo que contiene las mascararas usadas para medir en distintas zonas.
11. Al usuario se le pregunta si quiere lanzar la medida de actividad en ese momento.

Poscondición: se inicia o no la medida según elija el usuario.

Caso de uso: Iniciar medida con selecciones ya existentes.

Descripción: Se inicia la medida sobre unas zonas ya seleccionadas.

Precondición: El usuario tiene abierta una ventana en la que puede ver la señal de vídeo que muestra sus animales y ya ha seleccionado unas zonas de medida.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ
2. El usuario lanza el macro de Circadian Control Center
3. Se le abre una ventana con instrucciones.
4. El usuario carga las selecciones ya hechas.
5. El usuario da por satisfecha la selección de zonas.
6. Al usuario se le pregunta si quiere lanzar la medida de actividad en ese momento.

Poscondición: se inicia o no la medida según elija el usuario.

Caso de uso: Visualización de actograma y parámetros estimados.

Descripción: El usuario puede ver el actograma que refleja la actividad sobre las zonas que seleccionó y los parámetros estimados. Puede hacerse con la medida parada o en tiempo real con la medida funcionando. El programa detecta si se realizan cambios en el archivo que contiene los datos de medidas.

Precondición: Debe de haberse lanzado la medida de actividad previamente, de manera que exista un archivo con actividad registrada o se esté generando en este momento.

Flujo normal:

1. El usuario ejecuta el script Actograma.
2. El usuario ve como aparece una ventana en la que se va reflejando el actograma y sus parámetros día a día.

Poscondición: el actograma se guarda diariamente. Los parámetros cada vez que se corre la visualización.

Fases del proyecto

El proyecto se desarrolló en 3 fases:

Fase 1. Captura. Análisis de imagen. Tratado de datos.

Fase 2. Generación de actograma. Limpieza de datos.

Fase 3. Captura. Estimaciones cronobiológicas. Predicciones cronobiológicas.

Viabilidad

Puntos críticos para la viabilidad y el nivel de riesgo que implican:

- (Bajo) Recoger entrada de cualquier origen.
- (Bajo) Conversión movimiento en vídeo a datos.
- (Medio) Segmentar y agregar los datos.
- (Alto) Limpiar los datos.
- (Medio) Representar el actograma.
- (Alto) Estimar parámetros cronobiológicos.
- (Alto) Predecir parámetros cronobiológicos.

Paradigmas a utilizar

Top-down.

Bottom-up.

Programación estructurada.

Selección de herramientas

ImageJ fue elegido para el análisis de imagen.

ImageJ es abierto, gratis y multiplataforma. ImageJ es la opción por excelencia en el análisis de imagen en ciencias de la salud. Posee un sencillo lenguaje de macros y un sistema de creación de macros que permiten al sistema crecer gracias a aportaciones de científicos, analistas o programadores noveles. Además, está programado en Java y admite plugins de Java, probablemente el lenguaje más soportado hoy en día para la computación distribuida y *Big Data*.

En este caso particular:

Permite capturar fotogramas directamente desde una ventana, lo que facilita mucho nuestro trabajo.

R fue elegido para el tratamiento de datos.

R es abierto, gratis y multiplataforma. R es la primera opción para la mayoría de

analistas de datos y muchos científicos por diversas razones. Posee una gran biblioteca de funcionalidades para análisis estadísticos, ajustes, digestión, tratamiento de grandes volúmenes de datos y representación gráfica. Además, su lenguaje es de muy fácil comprensión, gracias a su biblioteca y buena documentación, permitiendo realizar análisis complejos con muy pocas líneas de código y tiene gran cantidad de interfaces para usuarios sin conocimiento de programación.

Muchos analistas de *Big Data* utilizan R en conjunción con la plataforma de Java Hadoop para convertir terabytes de información en simples gráficas y obtener importante información escondida en los datos.

En este caso particular:

La facilidad de R para digerir y moverse por gran cantidad de datos así como su capacidad para generar gráficas lo convirtió en una muy buena opción.

A.2.2. Stitch&Focus

Descripción general

Desarrollar un software que permita, a partir de cientos o miles de imágenes de microscopio de un tejido obtenidas a mano con desplazamientos aleatorios en xyz, reconstruir la conformación del tejido.

Las imágenes aportadas presentarán una numeración cronológica, correspondiendo al momento de su obtención. Normalmente las imágenes consecutivas corresponderán al mismo plano xy y a plano z distinto, o corresponderán a un plano xy distinto, pero presentarán solapamiento con el consecutivo. En algunos casos minoritarios se puede perder esta continuidad. El número de imágenes en planos z de cada plano xy variarán aleatoriamente. El número de planos xy en las dimensiones x e y globales no mantienen ningún tipo de relación matemática o lógica. El número de píxeles de desplazamiento en xy será aleatorio. La magnitud del desplazamiento en z también será aleatoria.

El resultado debe mostrarse como una gran imagen en 2 dimensiones,xy. Esta imagen debe contener toda la información significativa de los distintos planos z. Se entenderá por significativa aquella información que esté enfocada. A las imágenes originales se les asignará una posición xy correspondiente a su posición en la composición de la gran imagen. Es deseable que esta posición se asigne con resolución a nivel de píxel.

Es deseable que se estime la posición z de cada imagen original en la gran imagen.

Interés

Cubre una necesidad técnica propia y extensible a muchos laboratorios:

- Es gratis, abierto y multiplataforma.
- Utiliza un estándar del análisis de imagen: ImageJ.
- Permite tomar fotos de cualquier muestra manualmente en 3 dimensiones y reconstruir todo el tejido.

- Es especialmente útil en el caso de carecer de una pletina automatizada. El único requisito para que cumpla su función en un tiempo razonable es que se tomen las imágenes de manera lógica. Esto es que los desplazamientos en z sean consecutivos y los desplazamientos en xy suelen presentar solapamiento.

- Permite al usuario concentrar toda la información útil de los distintos planos z en una superimagen de un solo plano.

- Permite al usuario corregir la composición que genera el programa y ajustar esta corrección.

Alcance y exclusiones

Se decidió **incluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *Stitch&Focus*:

Prioridad alta

- Detectar las imágenes consecutivas que pertenezcan al mismo plano xy.
- Detectar las imágenes consecutivas pertenecientes a distintos planos xy.
- Detectar los solapamientos entre planos xy consecutivos.
- Detectar solapamientos no contiguos para juntar zonas ya agregadas.
- Realizar un enfoque de todos los planos en z de un plano xy.
- Generar una superimagen con toda la información enfocada.

Prioridad media

- Asignar a cada foto inicial su posición xy correspondiente a su posición global en la gran imagen con resolución a nivel de pixel.

- Permitir al usuario corregir la localización de los planos mediante una interfaz de usuario.

Se decidió **excluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *Stitch&Focus*:

Prioridad baja

- Estimar la posición z de cada imagen original en un plano xy y asignársela.
- Estimar la posición z global de cada imagen original respecto al montaje global.
- Crear un mapa de las posiciones en z de la información enfocada.
- Crear una composición en xyz con varias superimágenes, una para cada plano z.
- Determinar la existencia de capas mediante la posición en z de la información enfocada.
- Determinar las propiedades, como el tamaño, de la información enfocada.

Entradas y salidas

Datos de entrada

Las imágenes aportadas presentarán una numeración cronológica, correspondiendo al momento de su obtención. Normalmente, las imágenes consecutivas corresponderán al mismo plano xy y a plano z distinto o corresponderán a un plano xy distinto pero presentarán solapamiento con el consecutivo. En algunos casos minoritarios se puede perder esta continuidad. El número de imágenes en planos z de cada plano xy variarán aleatoriamente. El número de planos xy en las dimensiones x e y globales no mantienen ningún tipo de relación matemática o lógica. El número de píxeles de desplazamiento en xy será aleatorio. La magnitud del desplazamiento en z también será aleatoria.

Resultados a mostrar

El resultado debe mostrarse como una gran imagen en 2 dimensiones, xy. Esta imagen debe contener toda la información significativa de los distintos planos z. Se entenderá por significativa aquella información que esté enfocada. A las imágenes originales se les asignará una posición xy correspondiente a su posición en la composición de la gran imagen. Es deseable que esta posición se asigne con resolución a nivel de píxel. Es deseable que se estime la posición z de cada imagen original en la gran imagen.

Casos de uso

Caso de uso: Crear montaje

Descripción: El usuario inicia el programa para que este vaya analizando y colocando los planos.

Precondición: El usuario tiene una serie de imágenes en una carpeta que corresponden con los datos de entrada descritos para el software.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ.
2. El usuario lanza el macro de *Stitch&Focus*.
3. Al usuario se le pide que seleccione la carpeta en la que se encuentran las imágenes.

4. El usuario ve como se genera una carpeta al lado de la carpeta de las imágenes. En esta carpeta van apareciendo las imágenes con las imágenes ordenadas.

5. Al usuario se le muestra una superimagen resultado de colocar las imágenes en xy y de enfocar en z.

6. Se le pregunta al usuario si quiere corregir manualmente alguna colocación.

7. Al usuario le parece correcto el montaje y marca no corregir y guardar.

Flujo Alternativo: Usuario decide corregir.

- 7A. El usuario marca corregir (véase caso de uso “corregir”).

Poscondición: La superimagen montada también se guarda con las imágenes ordenadas.

Caso de uso: Corregir el montaje

Descripción: El usuario quiere corregir el montaje de realizado por *Stitch&Focus*

Precondición: El programa ha acabado su montaje y le ofrece al usuario corregirlo, el usuario ha elegido corregirlo.

Flujo normal:

1. El usuario es presentado con una ventana con todos los planos xy colocados según determinó el programa.

2. El usuario selecciona los planos xy y los arrastra aproximadamente a donde considera que corresponden.

3. El usuario da por finalizadas las correcciones y cierra la ventana.

Flujo Alternativo: Mover simultáneamente varios planos

2A. El usuario puede mover varios planos a la vez manteniendo pulsada la tecla Ctrl.

Poscondición: El programa recalcula la posición exacta a nivel de píxel teniendo en cuenta el posicionamiento aproximado del usuario. Se monta la superimagen y también se guarda con las imágenes ordenadas.

Fases del proyecto

El proyecto se desarrolló en 3 fases:

Fase 1. Detección de mismo plano xy. Enfocado de z. Detección de xy contiguo con solapamiento. Montaje de contiguos.

Fase 2. Detección y montaje de no consecutivos.

Fase 3. Corrección por el usuario, su ajuste y montaje.

Viabilidad

Puntos críticos para la viabilidad y el nivel de riesgo que implican:

- (Bajo) Detectar planos consecutivos en z, de mismo xy.
- (Medio) Detectar planos consecutivos en xy y su desplazamiento exacto.
- (Alto) Detectar como unir planos no consecutivos.
- (Alto) Detectar posición correcta tras corrección por usuario.
- (Medio) Enfocar la información de z.

Paradigmas a utilizar

Top-down.

Bottom-up.

Programación estructurada .

Selección de herramientas

ImageJ fue elegido para el análisis de imagen (Ver selección de herramientas de CCC).

En este caso particular:

ImageJ posee *plugins* para calcular el *stitching* lateral de imágenes. ImageJ también posee *plugins* para obtener un enfoque en 2D de un *stack* 3D. Por ello, ImageJ presenta soluciones óptimas para 2 puntos críticos del desarrollo de esta solución.

A.2.3. ConsecRenamer

Descripción general

Desarrollar un software que permita, a partir de cientos o miles de imágenes de microscopio de un tejido obtenidas automáticamente con dimensiones fijas *xyzc* pero desconocida, asignarles su posición *xyzc* correspondiente. El parámetro *c* corresponde al canal. Se busca una solución simple de renombrado. El usuario conoce cuántos planos *z*, *x*, *y* y canales *c* existen y el orden de desplazamiento automático. El usuario introduce estos parámetros y a las imágenes se les asigna una posición *xyzc*.

Interés

Cubre una necesidad propia y es de muy rápido desarrollo:

- Es gratis, abierto y multiplataforma.
- Utiliza un estándar del análisis de imagen: ImageJ
- Permite renombrar imágenes tomadas por pletina automatizada que vengan sin coordenadas.

Alcance y exclusiones

Se decidió **incluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *ConsecRenamer*:

Prioridad alta

- Recoger mediante una interfaz de usuario el número de planos *xy* en las dimensiones *x*, *y*, *z* y *c*, donde *c* es el canal.
- Asignar a cada imagen su posición *xyzc*.

Prioridad media

- Ofrecer elegir el sentido en el que se obtienen los planos en cada dimensión *x*, *y*, *y*

z.

- Ofrecer elegir el orden en que se realizan los desplazamientos.

Se decidió **excluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *ConsecRenamer*:

Prioridad baja

- Controlar que la multiplicación del tamaño de las dimensiones elegidas de x, y, z y c corresponda con el total de imágenes.

Entradas y salidas

Datos de entrada

El usuario conoce cuántos planos z, x, y y canales c existen y el orden de desplazamiento automático. El usuario introduce estos parámetros.

Resultados a mostrar

La asignación a las imágenes de su posición xyzc.

Casos de uso

Caso de uso: Asignar xyz a las imágenes

Descripción: El usuario introduce los parámetros de la obtención automática para renombrar las imágenes.

Precondición: El usuario tiene unas imágenes sin posición xyzc pero sabe en qué orden se obtuvieron automáticamente y cuántos planos x, y, z y canales hay.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ
2. El usuario lanza el macro de *ConsecRenamer*.
3. Se le pide al usuario que seleccione la carpeta con las imágenes a renombrar.
4. Al usuario se le presenta una interfaz gráfica. En esta interfaz el usuario mete el número de planos en cada coordenada x, y, z y la parte del nombre de archivo que indica el canal.
5. El usuario acepta los datos introducidos.

Poscondición: Se crea una carpeta al lado de la carpeta original de las imágenes que contendrá las imágenes renombradas.

Fases del proyecto

El proyecto se desarrolló en 2 fases:

Fase 1. Renombrado sin selección de secuencia de toma.

Fase 2. Renombrado con selección de secuencia de toma.

Viabilidad

Puntos críticos para la viabilidad y el nivel de riesgo que implican:

- (Bajo) Validar la selección de tamaños xyzc.
- (Medio) Habilitar distintos esquemas de orden de toma de fotos.

Paradigmas a utilizar

Top-down.

Bottom-up.

Programación estructurada.

Selección de herramientas

ImageJ fue elegido para desarrollar esta solución ya que este componente se desarrolló como un paso previo a *LayerMaker*, desarrollado con ImageJ. ImageJ permite desarrollar diálogos modales con facilidad. Por lo demás, este tipo de solución sencilla de renombrado se puede desarrollar en cualquier lenguaje.

A.2.4. LayerMaker

Descripción general

Desarrollar un software que permita, a partir de cientos o miles de imágenes de microscopio confocal de un tejido que poseen una posición xyzc conocida, determinar las capas celulares del tejido.

Las imágenes de entrada poseen una posición y canal conocidos y estos vienen codificados en el nombre de cada imagen.

El resultado debe mostrarse como una serie de grandes imágenes en 2 dimensiones, xy. Cada gran imagen corresponderá a un canal y una capa. Cada una de estas imágenes

debe contener toda la información significativa de los distintos planos z de ese canal y capa. Se entenderá por significativa aquella información que esté enfocada. A las imágenes originales se les asignará una posición xyzcl correspondiente a su posición en la composición de la gran imagen, a su canal c, y a su capa l.

Interés

Cubre un nicho de interés libre:

- Es gratis, abierto y multiplataforma.
- Utiliza un estándar del análisis de imagen: ImageJ
- Permite a partir de sets de imágenes con coordenadas xyzc, donde c es el canal, crear superimágenes por canal y capa celular.
- Es capaz de detectar las capas entre los planos z de cada plano xy y, a continuación, concuerda las capas de todos los planos xy para generar una superimagen.

Alcance y exclusiones

Se decidió **incluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *LayerMaker*:

Prioridad alta

- Determinar las capas presentes en cada plano xyz independiente.
- Determinar el número medio de capas global.
- Enfocar de cada canal, capa y plano xy toda la información.
- Generar una superimagen con toda la información enfocada de cada canal y cada capa.

Prioridad media

- Permitir al usuario elegir qué canal usar para detectar las capas, por ejemplo el de DAPI.
- Asignar las correspondencias de capas entre planos xy vecinos para la asignación global de capas.

Prioridad baja

- Establecer un punto de inicio estadístico para asignar planos a nivel global
- Estimar en cada plano xy el grosor de la capa.
- Estimar la significación de las capas en cada plano xy.

- Generar superimágenes con canales combinados

Se decidió **excluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de *LayerMaker*:

Prioridad baja

- Permitir al usuario corregir la localización de los planos mediante una interfaz de usuario.

- Estimar globalmente el grosor de las capas.
- Estimar globalmente la significación de las capas.
- Determinar las capas para cada canal independientemente.
- Combinar las estimaciones de capa de todos los canales.

Entradas y salidas

Datos de entrada

Las imágenes de entrada poseen una posición y canal conocidos y estos vienen codificados en el nombre de cada imagen.

Resultados a mostrar

El resultado debe mostrarse como una serie de grandes imágenes en 2 dimensiones, xy . Cada gran imagen corresponderá a un canal y una capa. Cada una de estas imágenes debe contener toda la información significativa de los distintos planos z de ese canal y capa. Se entenderá por significativa aquella información que esté enfocada. A las imágenes originales se les asignará una posición $xyzcl$ correspondiente a su posición en la composición de la gran imagen, a su canal c , y a su capa l . Es deseable que esta posición se asigne con resolución a nivel de píxel.

Casos de uso

Caso de uso: Crear montaje por capas

Descripción: El usuario inicia el programa para que este vaya analizando y colocando los planos.

Precondición: El usuario tiene una serie de imágenes en una carpeta que corresponden con los datos de entrada descritos para el software.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ.
2. El usuario lanza el macro de *LayerMaker*
3. Al usuario se le pide que seleccione la carpeta en la que se encuentran las imágenes
4. El usuario se le ofrece una interfaz gráfica.
5. En la interfaz gráfica el usuario elige como está determinado en el nombre de las imágenes su posición xyzc. El usuario elige qué canal usar para detectar las capas.
6. El usuario ve como se genera una carpeta al lado de la carpeta de las imágenes. En esta carpeta aparecerán las imágenes y superimágenes enfocadas por canal y capa.
7. Al usuario se le muestra un *stack* virtual con superimágenes resultado de colocar las imágenes en xy y de enfocar en z y separar por canal y capa. Estas ya estarán guardadas en la carpeta creada.

Fases del proyecto

El proyecto se desarrolló en 2 fases:

Fase 1. Detección de capas en cada plano xy.

Fase 2. Detección de coherencia de capas entre distintos planos xy y montaje.

Viabilidad

Puntos críticos para la viabilidad y el nivel de riesgo que implican:

- (Medio) Detectar las capas en z de cada plano xy.
- (Alto) Detectar la coherencia de capas en planos consecutivos.
- (Baja) Representación de todas las capas y canales en *hyperstack*.

Paradigmas a utilizar

Top-down.

Bottom-up.

Programación estructurada.

Selección de herramientas

ImageJ fue elegido para el análisis de imagen (Ver selección de herramientas de CCC).

En este caso particular:

Permite obtener estadísticas de los niveles de intensidad de las imágenes con facilidad. A su vez, si fuese necesario, la plataforma es idónea para localizar objetos que se asimilan a capas. También presenta facilidad para crear y manejar montajes multidimensionales, como requiere la dimensionalidad *xyzcl*, en forma de *hyperstack*.

A.2.5. CellFinder

Descripción general

Desarrollar un software que permita encontrar en una imagen de un tejido todas las células.

El sistema será probado con imágenes de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia procedentes de *Stitch&Focus* y de *LayerMaker* por lo tanto serán focalizaciones de 3 dimensiones *xyz* en 2 dimensiones *xy*.

El resultado debe ser una señalización de los bordes de las células señaladas. También debe de presentarse las medidas paramétricas de todas las células encontradas en un archivo de formato de tabla.

Es necesario que el usuario pueda elegir de las células encontradas las que le interesen, que pueda seleccionar manualmente las células y que pueda corregir los bordes marcados por el programa. Es deseable que el programa aprenda de las elecciones del usuario.

Interés

Es un proyecto muy ambicioso que pretende convertirse en un estándar:

- Es gratis, abierto y multiplataforma.
- Utiliza un estándar del análisis de imagen: ImageJ
- El usuario le señala al programa qué es lo que busca en la imagen se marcha a por un café y cuando vuelve tiene sus medidas exactas y resultados finales.
- El objetivo del programa es, con la mínima interacción por el usuario, proveer la detección del 100% de las células y una exactitud del 100% en los bordes de las células.

- Incluye un potente algoritmo itinerante de procedimientos de análisis de imagen para la detección de objetos y sus bordes desarrollado por el autor de esta tesis.

- Mediante una simple interfaz en la que el usuario solo hace unos pocos clicks sobre imágenes reduce al mínimo la necesidad de conocimientos técnicos o complejidad para el usuario final y evita la introducción manual de parámetros.

- El mecanismo de búsqueda automática ahorra al usuario la mayor parte o todo el tiempo de trabajo, a su vez evita la dependencia subjetiva del observador.

- La interfaz permite al usuario controlar y corregir las células o estructuras detectadas y sus bordes para conseguir un 100% de exactitud en bordes.

- El programa incluye un módulo de Inteligencia Artificial (IA) para reducir al mínimo posible la interacción del usuario.

- El usuario puede seguir en todo momento el progreso del análisis.

- Los perfiles de Inteligencia Artificial son reutilizables de manera que si el usuario ya hizo elecciones en una ocasión no se precisa más interacción.

- El programa es capaz de detectar objetos más allá de las limitaciones del ojo humano.

- El programa devuelve una variedad de parámetros descriptores de las células u objetos encontrados.

- El programa clasifica con estos parámetros las células u objetos en grupos y devuelve la significación de las diferencias entre grupos para estos parámetros.

Alcance y exclusiones

Se decidió **incluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de CellFinder:

Prioridad alta

- Permitir al usuario señalar células.

- Detectar los posibles perfiles de una célula.

- Seleccionar un perfil para una célula.

- Permitir al usuario corregir el perfil de una célula.

- Medir los parámetros morfométricos y colorimétricos de cada célula.

- Que el programa localice automáticamente las células.

Prioridad media

- Ofrecer al usuario una serie de perfiles más posibles de todos los encontrados.
- Conseguir que el software aprenda de las preferencias del usuario.
- Permitir redirigir las medidas a una imagen distinta de aquella en la que se mide.
- Permitir analizar sets de imágenes.
- Guardar el estado del análisis para ser continuado en otro momento.
- Permitir guardar el perfil de inteligencia artificial.

Prioridad baja

- Permitir al usuario solicitar más perfiles.
- Permitir al usuario definir manualmente los perfiles.

Se decidió **excluir** los siguientes requisitos en el desarrollo de CellFinder:

Prioridad media

- Mostrar al usuario los parámetros que definen los objetos encontrados.

Prioridad baja

- Mostrar el progreso del análisis.
- Mostrar gráficamente los objetos encontrados distribuidos según su similitud.
- Permitir analizar *sets* de imágenes con dimensión *z* y medir en el plano *z* apropiado el objeto identificado en una imagen enfocada.

Entradas y salidas

Datos de entrada

El sistema será probado con imágenes de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia procedentes de *Stitch&Focus* y de *LayerMaker*, por lo tanto, serán focalizaciones de 3 dimensiones *xyz* en 2 dimensiones *xy*.

Resultados a mostrar

El resultado debe ser una señalización de los bordes de las células señaladas. También debe de presentarse las medidas paramétricas de todas las células encontradas en un archivo de formato de tabla.

Casos de uso

Desarrollar un software que permita encontrar en una imagen de un tejido todas las células.

El sistema será probado con imágenes de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia procedentes de *Stitch&Focus* y de *LayerMaker*. Por lo tanto, serán focalizaciones de 3 dimensiones xyz en 2 dimensiones xy.

El resultado debe ser una señalización de los bordes de las células señaladas. También debe de presentarse las medidas paramétricas de todas las células encontradas en un archivo de formato de tabla.

Caso de uso: Iniciar *CellFinder*

Descripción: El usuario inicia *CellFinder* para poder desarrollar diversos casos de uso.

Flujo normal:

1. El usuario arranca ImageJ
2. El usuario abre en ImageJ la imagen o *stack* de imágenes a analizar.
3. El usuario lanza el *plugin CellFinder*
4. Al usuario se le presenta una ventana con varias pestañas: muestreo, bordes, datos, opciones e instrucciones. La ventana se ajusta a la imagen o stack de imágenes abierto.

Poscondición: el usuario elegirá una pestaña u otra según sus necesidades

Caso de uso: Ver instrucciones

Descripción: El usuario quiere ver las instrucciones antes de usar el programa.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado.

Flujo normal:

1. El usuario elige la pestaña “Instrucciones”.
2. Al usuario se le presenta un texto con las instrucciones en el que puede hacer scrolling.

Flujo Alternativo: Instrucciones en ventana

2A. El usuario puede abrir las instrucciones en una ventana separada.

Flujo Alternativo: Video de instrucciones

2B. El usuario calca el enlace para ver un vídeo demostración.

Poscondición: Tras ver las instrucciones el usuario se dirigirá normalmente a la pestaña de muestreo o explorará las distintas pestañas.

Caso de uso: Seleccionar células

Descripción: El usuario marca en la ventana de muestreo células para que se encuentren sus perfiles y para que sirvan de ejemplo a la inteligencia artificial.

Precondición: CellFinder ya se ha iniciado.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Muestreo”.
2. El usuario puede navegar por la imagen o *stack* de imágenes abiertas en la pestaña “Muestreo”.
3. Cuando el usuario ve una célula realiza un rectángulo a su alrededor. El rectángulo lo realizará haciendo *click* derecho en la esquina superior izquierda y arrastrando hasta la esquina inferior derecha del rectángulo imaginario que incluya la célula. El recuadro seleccionado es copiado, guardado en el disco y se puede ver en la pestaña “Bordes”.

4. El usuario sigue marcando células hasta marcarlas todas.

Flujo Alternativo: IA AutoFind Rest

4A. El usuario marca una buena cantidad de células y permite a la inteligencia artificial encontrar el resto automáticamente.

Flujo Alternativo: Find Everything

2A. El usuario no marca ninguna célula. Marca el botón “Find everything” y deja que el programa encuentre automáticamente todos los objetos en la imagen, para que luego el usuario elija, más lento.

Poscondición: Tras seleccionar células el usuario debe asegurarse de que los bordes encontrados por CellFinder son de su agrado y, si no, corregirlos, para lo cual, se dirige a la pestaña “Bordes”.

Caso de uso: Encontrar bordes

Descripción: El usuario marca el botón encontrar perfiles.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado, el usuario ya ha marcado rectángulos

entorno a células en el panel de muestreo que han pasado al panel de bordes.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Bordes”
2. El usuario calca el botón “Encontrar Perfiles”
3. Para todas las selecciones van buscándose los perfiles y estos van apareciendo en el panel central de la pestaña “Bordes”.

Poscondición: El usuario podrá ir corrigiendo los bordes a la vez que aparecen.

Caso de uso: Corregir bordes preseleccionados

Descripción: El usuario corrige en la ventana de bordes los bordes que no considera correctos, así se tienen medidas de los objetos correctos y sirven de ejemplo a la inteligencia artificial.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado, el usuario ya ha marcado células en el panel de muestreo que han pasado al panel de bordes y se ha lanzado la detección de bordes.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Bordes”
2. El usuario observa en el panel central los bordes que van siendo asignados a cada célula.
3. Cuando el usuario ve una célula a la que se le ha asignado un borde con el que no está conforme selecciona esa célula en el panel central.
4. A la derecha del panel central el usuario encuentra dos columnas con los bordes alternativos que puede elegir. La primera columna tiene una selección de bordes que el software considera más probables o interesantes para el usuario para esa célula. La segunda contiene todos los posibles bordes encontrados para esa célula.
5. El usuario selecciona el borde que considera más apropiado haciendo click encima de este en cualquiera de estas dos columnas.
6. El borde elegido aparece reflejado en los paneles laterales, en el panel central y en la imagen de muestreo.
7. Tras revisar los bordes de todas las células se da esta fase por finalizada y solo queda recoger las medidas de los objetos con sus bordes correctos.

Flujo Alternativo A: *FindMore*

5A. El usuario no está conforme con ninguno de los bordes que se le ofrece y selecciona “*FindMore*” para que el programa itere más profundamente en su búsqueda de bordes ofreciéndole más bordes a elegir.

6B. El marcaje como “*FindMore*” aparece reflejado en los paneles laterales, en el panel central y en la imagen de muestreo.

Flujo Alternativo B: *LabelNegative*

5B. El usuario marca la selección como negativa. Esto puede deberse a que cambia de parecer después de haberlo marcado o a que es un objeto encontrado por la inteligencia artificial que el usuario considera falso positivo. La IA utiliza este feedback para autocorregirse.

6B. El marcaje como negativo aparece reflejado en los paneles laterales, en el panel central y en la imagen de muestreo.

Flujo Alternativo C: *MarkOK*

3C. El usuario marca un borde de los que se muestra en el panel central como OK. Esta opción no es siempre necesaria. Por defecto, los bordes no corregidos se consideran positivos. La IA puede solicitar este mecanismo cuando hay pocas correcciones o negativos. Esto permite a la IA discernir si el usuario no realizó todavía las correcciones pertinentes o si es que los bordes son correctos. En general, la IA lo solicitará cuando requiera más *feedback* antes de dar el análisis por finalizado.

4C. El marcaje como OK aparece reflejado en los paneles laterales, en el panel central y en la imagen de muestreo.

Flujo Alternativo D: *IAGivesOK*

7D. No siempre es necesario revisar todos los bordes. Especialmente con un número muy alto de células. La IA aprende de nuestras correcciones y revisa sus selecciones. Cuando la IA considera que tiene un porcentaje de acierto muy alto nos indicará que podemos pasar a recoger los resultados finales. Este porcentaje se puede observar en el panel de progreso.

Poscondición: Después de esta fase el usuario puede pasar por la pestaña “Datos” para cerciorarse de que es el momento de recoger los resultados.

Caso de uso: Encontrar células automáticamente

Descripción: El usuario pide al programa que encuentre él solo las células.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Muestreo”
2. El usuario ya ha marcado células.
3. El usuario ya ha corregido los bordes de las células marcadas.
4. El usuario calca el botón “*AutoFind*”
5. El programa va encontrando células y las coloca en el panel “Bordes”.

Flujo Alternativo A: *SinMuestras-FindEverything*

2A. El usuario no ha marcado ninguna célula. El usuario solo puede marcar el botón “*Find everything*” y deja que el programa encuentre automáticamente todos los objetos en la imagen, para que luego el usuario elija, más lento.

Flujo Alternativo B: *SinPerfiles*

3B. El usuario ha marcado células, pero no ha corregido ningún perfil. La inteligencia artificial dará por bueno el borde que ella misma preseleccionó, e intentará intuir las características de los objetos en base a estos.

Poscondición: El usuario deberá dirigirse a la pestaña “Bordes” para cerciorarse de que los bordes ofrecidos son correctos o corregirlos si fuese oportuno.

Caso de uso: Ver progreso del análisis

Descripción: El usuario quiere ver el progreso del análisis, especialmente útil antes de recoger los resultados finales.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado. Normalmente, el usuario ya ha marcado células en el panel de muestreo y ha corregido bordes.

Flujo normal:

1. El usuario elige la pestaña “Progreso”.
2. Al usuario se le presenta una contabilidad de las células marcadas y de los bordes. También descriptores de los objetos positivos. A su vez ve distintos parámetros de la IA, como la progresión y predicción de acierto de esta al encontrar células y al elegir bordes. Y tiempo estimado en una búsqueda automatizada.

Poscondición: Si el usuario lo considera oportuno, tras este paso, puede recoger los resultados.

Caso de uso: Recogida de resultados (medidas y perfiles)

Descripción: El usuario recoge los resultados de los bordes correctos en forma de medidas perimétricas y de mascararas de los bordes seleccionados.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado, el usuario ya ha marcado células en el panel de muestreo que han pasado al panel de bordes, ha concluido la detección de bordes y su corrección por parte del usuario.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Datos”.
2. El usuario calca el botón “*Collect Results*”.
3. Los resultados se recogen como un archivo que contiene los parámetros medidos con los bordes seleccionados y un archivo con los bordes seleccionados.

Poscondición: El usuario podrá utilizar los bordes guardados para analizar otros canales o para rehacer la medición incluyendo más parámetros, los parámetros medidos se podrán analizar estadísticamente.

Caso de uso: Recargar un análisis previo

Descripción: El usuario recarga un análisis inacabado.

Precondición: *CellFinder* ya se ha iniciado, el usuario dejó un análisis inacabado.

Flujo normal:

1. El usuario selecciona o tiene seleccionada la pestaña “Opciones”
2. El usuario pulsa el botón “*Retake unfinished analysis*”
3. Al usuario se le abre una ventana para diálogo para seleccionar donde se encuentra el análisis inacabado.
4. Las capturas y datos se restablecen.

Poscondición: El usuario continúa su análisis ya sea marcando células, seleccionando perfiles o poniendo la detección automática.

Fases del proyecto

El proyecto se desarrolló en 3 fases:

Fase 1. Desarrollo de protocolos y parámetros de análisis de imagen para detectar todos los objetos y sus bordes más probables.

Fase 2. Desarrollo de interfaz. Capacidad de selección manual de célula. Capacidad de corrección de bordes. Estructura de soporte y motor del programa.

Fase 3. Inclusión de inteligencia artificial y funcionalidades de análisis.

Viabilidad

Puntos críticos para la viabilidad y el nivel de riesgo que implican:

(Muy alto) Desarrollar un protocolo de análisis de imagen de detección de todos los posibles objetos o bordes de objetos de una imagen.

(Alto) Desarrollar un protocolo de conversión de objetos concéntricos en posibles perfiles de un mismo objeto.

(Medio) Desarrollar un protocolo de análisis de imagen por ventana móvil.

(Medio) Desarrollar un parámetro de análisis de imagen para medir la calidad del borde.

(Bajo) Desarrollar una interfaz por pestañas.

(Medio) Desarrollar la sincronización interfaz-ventana de imagen.

(Bajo) Desarrollar la captura de región seleccionada.

(Alto) Desarrollar la interfaz de corrección de bordes y su correcta sincronización.

(Medio) Desarrollar la gestión de la cola de análisis de imagen.

(Alto) Gestión del motor y estructura del programa.

(Alto) Desarrollar la gestión de hilos de ejecución.

(Medio) Guardado y recuperación del análisis.

(Alto) Seleccionar el modelo correcto de Inteligencia Artificial.

(Medio) Desarrollar métricas y su representación.

(Alto) Análisis de agrupamiento y significación.

Paradigmas a utilizar

Top-down.

Bottom-up.

Programación estructurada.
Programación orientada a objetos (OOD).
Programación por capas.
Modelo-vista-controlador (MVC).
Arquitectura Hexagonal o de Puertos y Adaptadores.
Programación por hilos.
Ingeniería dirigida a modelos (IDM).
Programación orientada a servicios (SOAP o REST).
Ingeniería de software basada en búsqueda (SBSE).
Marco de trabajo o framework.
Para una fase más avanzada se considerarán:
Programación orientada a aspectos (POA).
Arquitectura cliente-servidor.

Selección de herramientas

ImageJ fue elegido para el análisis de imagen (Ver selección de herramientas de CCC).

En este caso particular:

ImageJ proporciona las herramientas idóneas para realizar las transformaciones de análisis de imagen y medidas paramétricas de las células. A su vez, se decidió restringir el protocolo de análisis de imagen a su definición mediante macro para que sea muy fácil de manipular para cualquier tipo de usuario.

Java fue elegido para desarrollar el interfaz, estructura y motor del programa. Este proyecto debe tener gran modularidad y capacidad para crecer sosteniblemente, por lo que requiere un lenguaje orientado a objetos de tipado fuerte. Por otro lado, ImageJ está programado e interacciona perfectamente Java mediante plugins. Java posee un maduro sistema de interfaces como es Swing. En Java se ha desarrollado un potente módulo de inteligencia artificial: WEKA. Además Java probablemente sea hoy en día el lenguaje más utilizado para computación distribuida y *Big Data* mediante la plataforma Hadoop. Además, posee conectores para R, RJava. Por ello, Java se presentaba como la opción más

adecuada sobre la que aposentar todo el proyecto.

A.3. Diseño de software a bajo nivel

A.3.1. Circadian Control Center

A.3.1.1. Conceptos y terminología

Ventana de medida

La ventana de medida o ventana de captura es la ventana sobre la que se va a medir la actividad. Al iniciar CircadianCC se le indica al usuario que seleccione una ventana de su escritorio sobre la que medir la actividad. Sobre esta ventana se seleccionarán unas zonas sobre las que se medirá individualmente la actividad. En nuestro caso es la ventana con la señal de vídeo de los De esta ventana se obtienen continuamente fotogramas, por lo que debe de permanecer siempre abierta aunque sí se puede sacar del área del escritorio. En la parte de algoritmos bajo el epígrafe “Seleccionar la ventana sobre la que capturar” se entra en más detalle respecto de esta ventana.

Ventana de actogramas

La ventana de actogramas es la ventana que se le presenta al usuario con las gráficas que representan la actividad en las zonas. En nuestro caso la actividad de los animales. Estas gráficas son actogramas. Más abajo se explica más en detalle el concepto un actograma y en la sección de algoritmos se entra más en detalle en la formación y composición de estos actogramas y la ventana de actogramas.

El píxel y su valor

Las imágenes están compuestas por píxeles. Visualmente si nos imaginamos la pantalla o una imagen como una cuadrícula muy fina cada cuadradito, cada celda es un píxel. O al menos esa es la manera en que se representan los píxeles. Pero yendo a un nivel más bajo, un píxel es una posición xy con un valor. Así un píxel en realidad se puede describir con 3 dimensiones: x, y e intensidad. Es decir un píxel son tres números. Por ejemplo, un píxel aleatorio sería: 1020, 700, 220.

En realidad si damos los valores de los píxeles de manera consecutiva, ordenada, con que nos digan inicialmente el ancho y alto de la imagen ya podemos crear una imagen,

dar xy sería redundante e información innecesaria. Por ejemplo para una imagen de 3 píxeles de ancho(w) y 2 de alto(h), la podríamos describir como: w=3; h=2; valores=110,200,115,5,14,222.

El fotograma

En el sentido general los fotogramas son las fotos estáticas con las que se compone una película o vídeo. El movimiento se compone en nuestro cerebro a partir de fotogramas, concretamente el cerebro captura unos 25 fotogramas por segundo con los que compone la película que vemos continuamente.

Un fotograma en nuestro contexto es cada una de las imágenes que se captura de la ventana de captura. Esta captura de fotogramas se produce de manera continua. Cada fotograma representa el estado visual en un momento temporal. En sentido práctico un fotograma es una imagen con una etiqueta temporal.

ROI

En el contexto del análisis de imagen ROI corresponde a una región de interés ("*Region Of Interest*"). Una región de interés es un área delimitada en una imagen. Normalmente esta área se define por la posición de los píxeles de su contorno. Si conocemos la posición de todos los píxeles de su contorno conocemos los píxeles que quedan englobados dentro.

En realidad para definir un ROI no se suelen utilizar todos los píxeles del contorno. Normalmente se dan solo los píxeles que son vértices en orden consecutivo según son unidos por líneas rectas. Por ejemplo nuestras zonas que rodean jaulas de ratones son de hecho ROIs, el contorno de estos ROIs puede estar compuesto por cientos de píxeles pero muchas veces se pueden definir solo con media docena de puntos ordenados ya que el espacio entre dos vértices consecutivos se rellena con una línea recta. Por ejemplo un ROI se podría definir por estas 5 parejas de coordenadas: (12,20)(220,13)(228,56)(6,54)(3,30). En la imagen se ve representado este ROI. [Imagen]

Zona de medida

Las zonas de medida, o zonas a secas, son los ROIs que delimita el usuario para

definir las áreas individuales a estudiar circadianamente. En nuestro corresponden a la jaula de cada animal. Estas zonas son definidas sobre una imagen de la ventana con la que trabajar por el usuario mediante clicks de ratón.

Imagen de movimiento

Una imagen de movimiento es una imagen que representa el movimiento producido en un fragmento de tiempo. Concretamente según lo utilizamos en CircadianCC se refiere al movimiento producido en el periodo entre la toma de dos fotogramas consecutivas, unos 40-100 milisegundos.

Esta imagen de movimiento se calcula la diferencia de los dos fotogramas. Esta imagen operación calcula la diferencia entre el valor de cada píxel de un fotograma y el valor del píxel en la misma posición xy en el otro fotograma.

Línea de medidas

Una línea de medidas, o línea a secas, es una lista de números que representa cuantitativamente el movimiento en las distintas zonas en un momento concreto. Esta línea de medidas es obtenida de una imagen de movimiento, es decir indica el movimiento entre dos fotogramas por zonas.

Esta línea de medidas representa la medida de actividad de los animales de mayor detalle. Se obtienen entre 10 y 25 líneas de medida por segundo, por lo que es parecido a la conformación de movimiento que recrea el cerebro. Cada línea de medidas tiene una etiqueta que identifica su fecha y hora hasta los milisegundos. Un ejemplo de línea de medidas para 3 zonas: 2015.04.20.12.55.34.759/43.25/6.05/28.14

Línea de minuto

Una línea de minuto contiene un resumen de las líneas de medidas contenidas en un minuto. Esta línea de minuto se obtiene seleccionando las líneas de medidas de un minuto, filtrándolas y promediándolas por zona. Cada línea de minuto tiene una etiqueta que identifica su fecha y hora hasta el minuto.

De esta manera se genera una línea por minuto que mide cuantitativamente la actividad en cada zona para cada minuto. Un ejemplo de línea de minuto para 3 zonas:

2015.04.20.12.55/3.55/12.08/30.32

Archivo diario de medidas

Un archivo diario de medidas, o archivo diario, es un archivo de texto que contiene todas las líneas de medida de un día. Cada archivo diario tendrá de nombre de archivo la fecha de ese día. Un ejemplo de tres líneas de minuto de un archivo diario:

2015.04.20.12.55.34.017/43.25/6.05/28.44

2015.04.20.12.55.34.059/42.77/6.63/29.78

2015.04.20.12.55.34.112/44.03/6.85/31.34

Archivo diario de minutos

Un archivo diario es un archivo de texto que contiene todas las líneas de minuto de un día. Cualquier archivo diario de minutos de un día que sea medido entero contendrá 1440 (24x60) líneas. Cada archivo diario tendrá de nombre de archivo la fecha de ese día. Un ejemplo de tres líneas de minuto de un archivo diario:

2015.04.20.12.55/3.55/12.08/30.32

2015.04.20.12.56/4.12/16.58/30.88

2015.04.20.12.57/1.05/5.73/4.12

Actograma

Un actograma es una representación gráfica de una variable cuantitativa cíclica. En esta representación el eje X (abscisas) contiene la medida de la variable en el transcurso de 1 ciclo, mientras que en el eje Y (ordenadas) se van añadiendo sucesivamente las medida de cada ciclo. Es una gráfica muy utilizada en investigación en Cronobiología.

En nuestro caso se genera un actograma para cada zona designada por el usuario. Los actogramas se generan utilizando los archivos diarios. Por lo tanto los actogramas representan la actividad en ciclos de 24 horas en las distintas zonas. Cada archivo diario es utilizado para cubrir un ciclo.

Actograma diario

El gráfico correspondiente al a un solo día del actograma aquí lo llamamos

actograma diario. Un actograma diario representa la actividad en el eje Y respecto de los minutos del día en el eje X. En cada minuto se generará una columna más alta o más baja según la cantidad de actividad.

Un actograma se genera mediante el apilamiento en Y de los actogramas diarios.

Actograma double plot

Un actograma double plot, es un tipo muy popular de actograma que facilita la visualización de desplazamientos en el día y noche subjetivo de los animales. Nuestro actograma y sus actogramas diarios son de tipo double plot.

Este actograma double plot, lo que hace es simplemente representar en el eje X un periodo de 48 horas en vez de 24 horas. Para ello a cada actograma diario le coloca un duplicado a su lado.

Inicio y fin del día y noche subjetivos

El inicio y fin del día subjetivo son dos puntos temporales en un actograma diario calculados estadísticamente que indican cuando empieza y acaba el periodo de reposo del animal. Esto a su vez indica el inicio y fin del periodo de actividad. Hay que recordar que los ratones son animales nocturnos por lo que durante el día subjetivo reposan y durante la noche subjetiva aumentan su actividad.

Estos periodos son subjetivos ya que representan el punto de vista del animal, el estado interno de su reloj circadiano.

A.3.1.2. Algoritmos explicados

Seleccionar la ventana sobre la que capturar

Para seleccionar la ventana sobre la que se va a analizar la actividad el usuario selecciona está haciendo click en ella. Esta ventana deberá permanecer siempre abierta ya que se obtienen fotogramas de ella continuamente. Sin embargo sí se puede sacar del campo de visión de la pantalla. La razón de esto es que la imagen representada se sigue generando aunque la ventana este fuera del plano visual y por lo tanto se sigue pudiendo generar fotogramas de ella.

Cada ventana en un sistema operativo tiene un identificador único que mantiene

mientras esté abierta. De esta manera al seleccionar esta ventana se guarda este identificador y cuando se quieran capturar fotogramas siempre se seleccionará la ventana con este identificador.

El hecho de capturar fotogramas de una ventana en vez de la pantalla permite mover la ventana y seguir capturando los fotogramas pudiendo visualizar los actogramas o utilizar el ordenador para otros fines.

Delimitar y nombrar zonas de medida

Para delimitar las zonas se captura un fotograma de la ventana de captura. Sobre este fotograma el usuario genera ROIs que será las zonas, los nombra y guarda. Para realizar este proceso al usuario se le presenta el fotograma, una ventanita con instrucciones y el menú de manipulación de ROIs de ImageJ.

Para crear un ROI, CircadianCC selecciona para el usuario por defecto la herramienta de crear polígonos. Así el usuario va haciendo clicks donde se encontrarían los vértices del polígono para generar una forma cerrada. Este procedimiento es bastante conocido e intuitivo para los usuarios. Una vez definido cada polígono se le indica al usuario que le tiene que dar a “Add” para añadir el polígono como ROI creando una zona de análisis circadiano. Al añadirlo se ve el nuevo ROI en el menú de ROIs. A continuación se indica al usuario que renombra cada ROI con un nombre identificativo de cada zona. Este nombre permitirá al usuario identificar los actogramas fácilmente. También se indica al usuario que puede modificar los ROIs añadidos si así lo desea. Se le indica al usuario que cuando ya haya seleccionado y guardado todas las zonas puede proceder a guardarlas. CircadianCC detecta las nuevas zonas guardadas y las asume para realizar el análisis.

El usuario no tiene porqué definir siempre nuevas zonas, puede simplemente recargar un set de zonas guardadas para utilizarlas o modificarlas para utilizarlas si así lo considera.

Al acabar de seleccionar las zonas se le pregunta al usuario si quiere iniciar el análisis, si así es comenzará la captura de fotogramas y su conversión en medidas.

Obtener imagen de movimiento

La imagen de movimiento se obtiene con la operación de análisis de imagen

diferencia. La operación diferencia detecta los píxeles que cambian entre dos imágenes y cuanto cambian. Esta operación coge dos imágenes y va comparando los valores de los píxeles que ocupan la misma posición xy en ambas imágenes. Esta comparación obtiene una medida de cuanto ha cambiado un píxel entre un fotograma y otro. A nivel matemático lo que se hace es obtener el resultado de restar al valor de un píxel el valor del otro píxel. Por ejemplo, si tenemos 2 imágenes de 4 píxeles: Imagen1=(50,120,180,60); Imagen2=(60,140,130,60); tendríamos:

$$\text{Imagen1-Imagen2}=(50,120,180,60)-(60,140,130,60)=(-10,-20,50,0)$$

$$[\text{Imagen1-Imagen2}]=[(-10,-20,50,0)]=(10,20,50,0)$$

$$\text{Imagen de movimiento}=(10,20,50,0)$$

Esta operación en mi implementación se realiza en base a escala de grises. Esto implica que los fotogramas son convertidos a escala de grises sumando la aportación de cada color antes de calcular la diferencia.

De esta manera la imagen de movimiento básicamente contiene la medida con dimensiones xy e intensidad de lo que cambia entre dos imágenes. El hecho de que posea estas dimensiones hace posible el siguiente paso en el que se miden los píxeles de distintas zonas de la imagen de movimiento.

Cuantificar el movimiento en una zona

Para cuantificar el movimiento en una zona se utiliza la imagen de movimiento y las zonas definidas por el usuario. De la imagen de movimiento se selecciona sucesivamente el área delimitada por cada zona y se calcula el movimiento para cada zona.

La zona delimita el área a estudiar de la imagen de movimiento. Esto hace que se seleccionen solo los píxeles de la imagen de movimiento correspondientes a esa zona o ROI. Para los píxeles seleccionados se obtiene el promedio de sus valores. Esto implica que de tener las 3 dimensiones xy e intensidad, pasamos a tener un solo valor numérico de resumen del movimiento en esa zona entre 2 fotogramas. Para el ejemplo anterior con Imagen de movimiento=(10,20,50,0) si tenemos una zona que toma el segundo y tercer píxeles tendríamos:

$$\text{Movimiento en zona}=\text{Valores píxeles}/\text{total píxeles}=(20+50)/2=35$$

A nivel de análisis de imagen, esta operación de promediado del valor de una serie

de píxeles es muy común y se conoce simplemente como “Mean”.

Los promedios de cada zona para una misma imagen de movimiento son utilizados para generar una línea de medida a la que se le asigna una etiqueta de fecha y hora hasta el nivel de milisegundos.

Agregado de líneas en líneas de minuto

Las líneas de medida se agregan para generar líneas de minuto. El proceso se inicia leyendo las últimas 10000 líneas de medida del archivo diario. De estas 10000 líneas se descartan todas aquellas que no correspondan al último minuto completo. A continuación se filtran para evitar posibles fuentes de ruido, este proceso se explica en más detalle en el siguiente apartado. Tras esto se obtiene la mediana de las columnas para obtener un valor de cada columna o zona. De esta manera hemos obtenido una medida de actividad de las distintas zonas en un minuto concreto. Estas medidas y su etiquetado temporal hasta el minuto conforman una línea de minuto.

Las líneas de minuto se van guardando en un archivo diario de minuto con la fecha de ese día. Ese archivo diario de minuto será el utilizado para generar el actograma. Hay que pensar que el actograma se está actualizando continuamente, si en vez de líneas de minuto utilizase líneas de medida se vería forzado en cada momento a realizar una gran cantidad de cálculos para generar la gráfica. Con el archivo diario de minuto ofrecemos una resolución mayor de la apreciable reduciendo el tiempo para generar la gráfica. Hay que pensar que un archivo diario de minuto tiene los 1440 minutos diarios, y una pantalla HD normal tiene un ancho de un 1280-1920 píxeles y esos píxeles será el máximo de columnas discernibles que pueda representar. Teniendo en cuenta que además el ancho de la pantalla lo ocuparán varios actogramas para las distintas zonas esta resolución a nivel de minuto parece óptima para un ritmo circadiano.

El hecho de utilizar la mediana ya supone un grado de filtrado, ya que evita que los valores más altos si son outliers deformen la medida de actividad en ese minuto. Hay que recordar que media y mediana son medidas de centralidad, pero la media es paramétrica y la mediana no, por ello la media se ve afectada por *outliers* y la mediana no.

Filtrado de líneas

En algunos casos se pueden producir interferencias en la señal de vídeo o eventos que no deben considerarse en la medida de actividad. Entre estos están que el usuario pase por delante de la cámara, algún temblor en la cámara y sobretodo interferencias en el canal de transmisión.

Para evitar este tipo de inconvenientes en el análisis de la actividad se filtran las líneas descartando aquellas que resulten sospechosas. Se parte de unos supuestos para eliminar estas líneas.

- Si la interferencia es baja o media pero constante, no será fácil de descartar, pero su efecto no ocultará las variaciones de actividad.

- Si la interferencia es alta, la interferencia se puede descartar o paliar, ya que provocarán una medida de actividad correspondiente a los percentiles superiores.

- Si la interferencia ocurre con homogeneidad en la imagen, esta será proporcional en distintas zonas de la imagen.

Si la interferencia es alta, generará valores de actividad muy alta. Para filtrar esta interferencia se suma las medidas de actividad de las zonas de cada línea de medida. Se ordenan las líneas por esta suma de actividad. En cada minuto se descarta el 5% de líneas de medida que sumen más actividad a la hora de generar la línea de minuto.

Si la interferencia es homogénea en las distintas zonas de la imagen, el usuario puede marcar una zona “Control”. Esta zona se utiliza para medir los niveles de interferencia o ruido. Cuando la medida de actividad en esta zona está en el 5% superior esa línea de medidas se descartará a la hora de generar la línea de minuto.

Además, la medida de actividad de la zona “Control” se utiliza a nivel de líneas de minuto. En cada línea de minuto a la medida de actividad de cada zona se le resta la medida de actividad de la zona “Control” en ese minuto proporcional al ratio área de la zona/área de zona control.

La medida del tiempo y la sincronización entre ImageJ y R

El sistema operativo hoy en día para sincronizarse pide la hora al usuario al instalarse o más comúnmente se conecta a servidores abiertos que le proporcionan la hora mundial para sincronizarse. Para mantener la hora internamente utiliza un oscilador

cristalino instalado en la placa madre. Este oscilador usa la resonancia mecánica de un cristal vibrante de material piezoeléctrico que crea una señal eléctrica de una frecuencia muy precisa entorno a 10MHz (10000000 ciclos/segundo). La pila del ordenador es responsable de aportarle la energía suficiente. Por esta razón el ordenador sigue en hora después de apagarlo.

CircadianCC está constantemente pidiendo información temporal al sistema operativo. El sistema operativo le proporciona información con resolución al nivel de los milisegundos. *CircadianCC* en ImageJ utiliza esta información para ponerle fecha y hora a los fotogramas.

Cuando se generan líneas de medida al detectar un cambio de minuto se envían las líneas de medida al archivo diario e ImageJ genera un archivo “GoR” para que R lea las nuevas líneas. Cuando R ya las ha leído genera un archivo “GoImageJ” indicándole a ImageJ que el archivo diario ya está libre para escribir más líneas.

Cuando se produce un cambio de día, la parte de *CircadianCC* de ImageJ lo detecta y empieza a generar un nuevo archivo diario. La parte de *CircadianCC* de R también lo detecta y busca el archivo diario correspondiente a la vez que genera el archivo diario de minutos apropiado.

La generación de gráfica de actogramas también detecta el cambio de día y pasa de regenerar el mismo actograma diario a generar un nuevo actograma diario que se situará debajo del anterior.

Cálculo del inicio y fin de día y noche subjetivas

El inicio y fin del día subjetivo, son los momentos en que se inicia y acaba el periodo de actividad en humanos. En ratones el inicio y fin del día subjetivo son los momentos de inicio y fin del periodo de reposo y el inicio y fin de la noche subjetiva indica complementariamente el inicio y fin del periodo de actividad. Esto se debe a que los ratones son nocturnos y los humanos diurnos.

Para evitar confusión a este respecto se habla de inicio y fin del periodo de actividad.

En personas es muy fácil distinguir los periodos de actividad y reposo porque el reposo es continuo y la entrada y salida de actividad relativamente abrupta. En ratones

existen momentos de actividad en los periodos de reposo y la entrada y salida del periodo de actividad es progresiva por lo que distinguir los periodos no es tan sencillo.

Mediante un actograma se puede estimar visualmente el inicio y fin de los periodos de actividad. Pero el problema de esta estimación es que está sujeta a limitaciones de subjetividad, de hecho varía según el observador, es inexacta y no permite automatizar el cálculo de tendencias.

Para solventar estas limitaciones se automatizó el cálculo de una estimación del inicio y fin del periodo de actividad diario para cada zona.

Para este cálculo se utilizan los siguientes supuestos:

- Se busca dos periodos de tiempo en el día: uno con muy poca actividad y otro con mucha actividad.

- Un periodo será una combinación continua de minutos.

- Cada uno de estos periodos debe tener una duración de entre 8 y 16 horas.

- Los periodos serán contiguos, donde acaba uno, empieza otro.

- Su duración combinada estará entre 22 y 26 horas.

- La mejor combinación será aquella que aumente la diferencia entre el la media de las medidas de actividad de todos los minutos de ambos periodos.

Teniendo en cuenta estos supuestos lo que se hace es ir creando segmentos de 1440 minutos (24 horas), formados por 720 minutos de actividad y 720 minutos de reposo.

Debido a la naturaleza circular del tiempo, para calcular los segmentos equivalentes a 1440 minutos ordenados se concatena por duplicado los 1440 minutos (24 horas) creando un rango de 2880 minutos. Sobre este rango de 2880 minutos se buscan los 1440 minutos que mejor se ajusten a la distribución descrita de segmentos en saltos de 10 minutos, esto mide 144 combinaciones. Esta aproximación fuerza a buscar un ritmo de 12 horas de actividad y 12 horas de reposo. Este ritmo es relativamente forzado por las condiciones lumínicas de luz-oscuridad 12-12(L12O12) que enmascaran el ritmo endógeno. Pero Pero en estas mismas condiciones el ratón puede no ajustarse del todo teniendo por ejemplo 13 horas de reposo y 11 de actividad. Para solventar esto se recorre el rango de 2880 buscando segmentos de 1440 minutos pero con distribuciones que varíen de 10 en 10 minutos desde 600-840 a 840-600 o lo que es lo mismo se prueban combinaciones de 10-14 a 14-10 horas de actividad-reposo, esto genera 20 combinaciones, por lo que se miden $144 \times 24 = 3456$

combinaciones. Cuando medimos el ritmo endógeno esta aproximación no es válida, ya que el ritmo no tiene por qué ser de 24 horas. Si tomamos varias longitudes de 22 a 26 horas en segmentos de 10 minutos, las combinaciones son $3456 \times 24 = 82944$.

Para evitar medir todas estas combinaciones lo que hacemos es buscar el mejor ritmo de 12-12 horas, considerando que el ritmo óptimo podrá variar respecto a este en su longitud total hasta 4 horas y en la longitud de cada parte. Partiendo de este ritmo se prueba a adelantar o atrasar los puntos de inicio de la actividad y el reposo en cantidades de base dos desde la mayor a la menor cantidad respecto del punto de origen. Esto es, se prueba a sumarle y restarle 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 minutos. En realidad 256 es ligeramente superior a 4 horas. Si el segmento seleccionado está por debajo de la media si es periodo de actividad o por encima si es periodo de reposo, se invierte su pertenencia disminuyendo la fase a la que pertenecía y aumentando aquella a la que ahora es asignado. Para respetar la regla de las 4 horas y ya que son potencias de dos siempre se disminuye la cantidad a probar en la siguiente ronda. Si encontramos que hay que sumar 60 minutos al punto de inicio, en la siguiente ronda se prueba a sumar o restar desde el nuevo punto 30 minutos.

De esta manera se hacen 144 pasadas con el ritmo 12-12.

Tras esto se prueban 9 sumas y 9 restas con el punto de inicio de la fase de actividad y la fase de reposo, en total $9 \times 4 = 36$.

El costo computacional de calcular estas sumas y restas equivale aproximadamente al de una pasada.

Así, con este algoritmo de aproximación pasamos de tener que probar 82944 combinaciones a probar unas 145, esto es una mejora de rendimiento del algoritmo en un factor 572, o 572 veces más rápido, para una efectividad similar.

Para el *double-plot* a los momentos de inicio de la fase de actividad y de reposo se les crea un duplicado. Para ello se suman la duración de la fase de actividad y la de reposo en la duración total del ritmo. Si el resultado era inferior a los 1440 minutos se le suma la duración total y si resulta más allá de los 1440 minutos se le resta la duración total minutos al duplicado.

En el actograma *double-plot* en realidad vemos una representación de 2880 minutos.

Generar actograma diario

Como se acaba de mencionar el actograma diario al ser de tipo double-plot representa 2880 minutos. Estos actogramas diarios corresponden a una sola zona de actividad. Para generarlos se lee el archivo diario de minutos del día. De este archivo se recogen los minutos de la zona de la que generar el actograma diario y se concatena 2 veces para cubrir los 2880 minutos. De estos valores se coge el valor del percentil 95 como límite relativo en el eje Y, los valores que superen este umbral son recortados a este nivel.

El actograma diario será la representación de los valores de la zona de un archivo diario de minutos en un rango de 1440 minutos duplicado, es decir de 2880 minutos. En cada minuto se crea una columna de altura correspondiente al valor medido, con límite en el percentil 95.

En el actograma diario se dibuja en rojo y verde correspondientemente el minuto de inicio del periodo de actividad y del minuto de inicio del periodo de reposo.

Organizar actogramas diarios en ventana de actogramas

Los actogramas se organizan por columnas en una ventana. Cada día corresponde a una fila. En cada columna como título se pone el nombre de la zona. A la izquierda se indica cada fecha. Los actogramas diarios de cada zona se organizan en una misma columna para generar un actograma.

El ancho de las columnas o sea de los actogramas, se calcula en función del número de zonas o actogramas a representar. La altura máxima de cada actograma diario se pone en un octavo del ancho del actograma diario.

Los actogramas diarios del día actual se regeneran constantemente, cada minuto.

Cuando se cambia de día se cambia de archivo diario de minutos que utilizar y de fila en la que representar los actogramas diarios del nuevo día.

A.3.2. Stitch&Focus

A.3.2.1. Conceptos y terminología

La muestra y sus dimensiones wh

La manera más intuitiva de imaginarse las dimensiones wh de una muestra es pensar en el rectángulo más pequeño que es capaz de englobar toda nuestra muestra. El número de píxeles que tenga de ancho será su dimensión w de width. El número de píxeles que tenga de alto será su dimensión h (del inglés *height*).

Posiciones xy dentro de la muestra

Cuando queramos indicar una posición de un píxel dentro de la muestra se puede dar como el número de píxeles de desplazamiento de esa posición respecto de la esquina superior izquierda del rectángulo que engloba la muestra. La esquina superior izquierda del rectángulo de la muestra se considera la coordenada 0,0. La posición que indiquemos tendrá una coordenada x correspondiente a su desplazamiento en píxeles en el eje x u horizontalmente. También tendrá una coordenada y correspondiente a su desplazamiento en píxeles en el eje y o vertical. La coordenada x siempre será menor a w y la coordenada y menor a h.

Los planos xy

Si nos imaginamos mirando sobre un microscopio. Estamos mirando sobre un plano xy, cuando tocamos el eje x o el eje y nos desplazamos lateralmente a otro plano xy. Este nuevo plano puede ser contiguo o no contiguo con el anterior, presentar o no solapamiento con el anterior. La concepción de plano xy que se utiliza en nuestro contexto corresponde a cada uno de los planos, con distinta posición xy, que nos encontremos moviéndonos lateralmente por la muestra.

Un plano xy de una muestra se define por los parámetros xywh. Los parámetros xy corresponden con la posición xy de la esquina superior izquierda del plano xy respecto de la esquina superior izquierda de la muestra. Los parámetros w y h, de width y height, son el ancho y altura del plano tomado. Cuando miramos por el microscopio o tomamos una fotografía, si el aumento es fijo, el ancho y alto de la imagen también lo son. Nosotros

siempre utilizamos planos tomados sin variar el aumento del microscopio, por lo que w y h se mantienen constantes. Por eso nos referimos a planos xy .

Los planos xyz

Este concepto le resultará familiar al usuario de microscopio confocal. Cuando además de movernos lateralmente, como se describió para los planos xy nos desplazamos en profundidad tocando el eje z pasamos a un plano xyz diferente.

Viendo el mundo como un espacio en tres dimensiones, el eje x representaría el espacio de izquierda a derecha, el eje y de arriba a abajo y el eje z de adelante a atrás. En el mundo macroscópico generalmente la dimensión z corresponde a la percepción de profundidad que crea nuestro cerebro con las pistas que recibe en dos dimensiones: líneas convergentes, cambios de luminosidad, etc. En microscopia la dimensión z se recorre gracias al cambio del punto focal. Esta propiedad se debe a que la luz es capaz de atravesar toda la muestra y a que la luz es captada por una lente. La luz devuelve la información de todo el grosor de la muestra pero la lente solo recoge enfocada aquella se encuentra a una profundidad z concreta.

Los planos xyz de un plano xy

Si lateralmente nos colocamos en un plano xy como punto de partida y a continuación, sin desplazarnos lateralmente, solo nos desplazamos en profundidad tenemos una serie de planos xyz que corresponden a un mismo plano xy . Estos distintos planos xyz pueden tener una posición z conocida o desconocida según se hayan obtenido automáticamente y manualmente. En el mundo macroscópico las distintos planos xyz podrían verse como las lonchas que se sacan de una pieza de embutido, cuya vista sin lonchar sería el plano xy . También se puede imaginar como un apilamiento de láminas translucidas, cada lamina es un plano xyz en una pila de láminas que sería el plano xy . En el mundo microscopio corresponde a cambios del punto focal sin cambiar lateralmente de plano xy .

Los planos xy enfocados

En microscopia cuando tomamos un plano xyz tenemos información enfocada e

información desenfocada. La razón de esto tiene que ver principalmente con la naturaleza de la lente. Respecto al eje z a información, objetos o células que se encuentren en el plano focal aportarán información enfocada, según nos alejemos del plano focal la información se difumina como información desenfocada y a más distancia directamente su información no atraviesa la cadena de lentes. Además, incluso en el mismo plano focal, las limitaciones ópticas de la lente hacen que aparezca información desenfocada de la información enfocada según la función de dispersión de punto de la lente.

Básicamente los distintos planos xyz presentan información enfocada, significativa, que nos interesa e información desenfocada que no nos interesa. Si tomamos toda la información enfocada de todos los planos xyz de un mismo plano xy y la concentramos en una sola imagen obtenemos un plano xy enfocado. Este plano xy enfocado tendrá toda la información que nos interesa de ese lote de planos xyz. Al eliminar la dimensión z, reducimos una dimensión con lo que hacemos la información mucho más manejable. Además este proceso elimina ruido de fondo. Se puede ver como una manera informática de engrosar el plano focal del microscopio sin afectar, incluso mejorando, la nitidez.

Los planos xy con solapamiento

Dos planos xy presentarán solapamiento cuando parte de su superficie se entrecruce. Esto quiere decir, que de la superficie total de la muestra, una parte, un área, esta presente en los dos planos xy. La porción compartida o solapada entre planos xy será igual o prácticamente igual con ligeras variaciones.

Formalmente el que dos planos xy presenten solapamiento se puede definir como una serie de condiciones. La zona que ocupa un plano xy en la muestra lo definen sus coordenadas xy su ancho w y alto h. Aquí para una primera imagen tomaremos: x_0, y_0, w_0, h_0 y para una segunda imagen tomaremos: x_1, y_1, w_1, h_1 . La segunda imagen y la primera se solaparán si se cumple una condición a o b para el eje x y otra condición c o d para el eje y:

Para eje x, a ó b:

a) $(x_1 \geq x_0) \ \&\& \ (x_1 \leq (x_0 + w_0))$

b) $(x_0 \geq x_1) \ \&\& \ (x_0 \leq (x_1 + w_1))$

Para eje y, c ó d:

$$c) (y1 \geq y0) \ \&\& \ (y1 \leq (y0+h0))$$

$$d) (y0 \geq y1) \ \&\& \ (y0 \leq (y1+h1))$$

La zona solapa entre planos xy con solapamiento

Siguiendo con la lógica anterior que determina el solapamiento entre dos planos podemos determinar la localización de la zona de solapamiento. Con los planos $x_0y_0w_0h_0$ y $x_1y_1w_1h_1$, según las condiciones a, b, c, d que definen planos con solapamiento se puede definir la zona solapada con parámetros x_s , y_s , w_s , h_s :

Para eje x, a ó b:

$$a) x_s=x_1; w_s=x_0+w_0-x_1$$

$$b) x_s=x_0; w_s=x_1+w_1-x_0$$

Para eje y, c ó d:

$$c) y_s=y_1; y_s=y_0+y_0-y_1$$

$$d) y_s=y_0; y_s=y_1+y_1-y_0$$

Regiones compuestas por planos xy

Cuando se encuentran dos planos xy o imágenes con solapamiento se puede formar una nueva imagen compuesta por ambas imágenes. La nueva imagen se formará solapando una imagen sobre la otra. A esta nueva imagen se la pueden añadir sucesivamente nuevas regiones que presente solapamiento. Esta nueva imagen no tiene porqué tener forma rectangular. A esta composición de varias imágenes formada por solapamiento aquí la denominamos región.

La región estará compuesta por una serie de planos xy que tendrán una serie de posiciones xy relativas. Normalmente se toma la coordenada 0,0 de la primera imagen o plano xy como el punto 0,0 de la región. La posición de cada plano xy que se une a la región se tomará como la suma de la posición xy del plano xy con el que se solapa más el desplazamiento xy con este en el solapamiento.

Solapamiento entre regiones de planos xy

Las regiones se generan mediante planos xy con solapamiento. Los planos se añaden a una región hasta que se da con un plano que no encaja con la región, que no

presenta solapamiento. En ese punto ese plano pasa a ser el inicio de una nueva región que se conformará e irá creciendo como otra región.

Que un plano con el que se inicia una región no presente solapamiento con otra región no significa que ningún otro plano de su región sí presente solapamiento con un plano de otra región. Por ello para juntar regiones, una vez estas se han conformado, se busca solapamiento de los planos de una región con otra. Cuando se encuentra un buen solapamiento entre 2 planos de 2 regiones, se comprueba con los demás planos si el solapamiento predicho por esos 2 planos se confirma por los demás planos. Si se confirma las regiones se fusionan, conformando una región mayor y las posiciones relativas de sus planos xy son actualizadas.

Superimagen

Una superimagen es el resultado de poner varios planos xy en sus posiciones globales apropiadas de manera que se cree una imagen fiel de la muestra completa. Básicamente se trata de una fotografía de dos dimensiones xy de gran altura y anchura que representa una muestra completa.

Superimagen enfocada

Para conformar esta superimagen se pueden utilizar planos xy enfocados. De esta manera se pueden convertir miles de imágenes en xyz en una sola superimagen enfocada.

Superimagen contrastada CLAHE

Una imagen se puede modificar para que sea la información que contiene sea más fácilmente apreciable por el usuario. Entre estas modificaciones esta el incremento de contraste CLAHE. Una superimagen con contraste CLAHE es aquella superimagen sometida a este procedimiento

Métodos usados

El cálculo de *Stitching*

El nombre de *Stitching* o *Image Stitching*, viene del termino inglés *stitching* que

significa coser o dar puntos para juntar. En análisis de imagen viene a ser algo muy parecido, es el proceso de juntar imágenes fotográficas que presentan zonas compartidas para producir una imagen de gran resolución. El proceso de *stitching* en realidad tiene dos pasos bien diferenciados. Primero se debe detectar donde se solapan las dos imágenes, como deben alinearse. A continuación se debe decidir como fusionar ambas imágenes.

El cálculo de *Stitching* se refiere a la primera fase. En esta primera fase se buscan rasgos descriptores de la imagen, “puntos de interés” que deben coincidir en la zona de solapamiento.

Esto produce una localización o desplazamiento xy de una imagen respecto a la otra y una probabilidad p que indica la probabilidad de acierto del *stitching*. Algunas versiones como {Preibisch, 2009 #423} permiten definir el número de rasgos a comparar, así se elige si invertir más en las probabilidad de acertar o en la velocidad de la solución.

Nosotros utilizamos el “Fourier Shift Theorem” que busca el mejor solapamiento como la medida de correlación cruzada de los rasgos de todos los solapamientos posibles {Preibisch, 2009 #423}. Este fue implementado en ImageJ por sus autores primero como “*Stitching 2D/3D*” y luego renombrado a “*Image Stitching*”.

El proceso de enfoque

El proceso de enfoque o *focusing* se introduce de manera general en el epígrafe anterior “Los planos xy enfocados”. El proceso de enfocado consiste en tomar la información enfocada de varias imágenes y concentrarla en una sola imagen. Esto es muy útil en el caso se varios planos xyz de un mismo plano xy en microscopia.

Genéricamente a este proceso se le conoce como “*Focus Stacking*”, “*Z-stacking*” o “Fusión del plano focal”. Normalmente, el proceso de detección de información enfocada se realiza mediante la detección de bordes o análisis de Fourier. En casos más avanzados se puede evitar el ruido armónico con una aproximación de wavelets como en {Forster, 2004 #424}. También se puede tomar el problema como un problema de optimización de un modelo basado en el la función de dispersión puntual (PSF) del microscopio {Aguet, 2008 #425}. La solución de wavelets tiene la ventaja de no requerir el PSF de la lente y requerir mucha menos computación.

En nuestro caso utilizamos la aproximación de *wavelets* con nombre “*Extended*

Depth Field” o “EDF”, creada e implementada para ImageJ {Forster, 2004 #424}.

La colocación manual de planos

La colocación manual de planos funciona como sigue. Al usuario se le presenta una interfaz o ventana. Esta interfaz contiene en el centro una matriz o cuadrícula de grandes dimensiones xy, de gran ancho y alto wh en realidad. El usuario importa una serie de imágenes a la matriz y las va colocando sobre ella. Una vez colocadas se puede salvar la posición de las imágenes en un archivo de texto o guardarla como una superimagen. El usuario puede hacer zoom para tener diferentes niveles de resolución. El usuario puede usar la tecla Ctrl para mover varias imágenes a la vez.

Colocar las imágenes en su lugar a nivel de píxel puede ser muy complicado pero si se concatena su uso con otra aplicación que realice ese trabajo puede ser de utilidad como en el caso de *Stitch&Focus*.

El modulo de colocación manual utilizado para *Stitch&Focus* se llama “MosaicJ” y fue desarrollado para ImageJ {Thevenaz, 2007 #430}. MosaicJ utiliza el motor de alineado TurboReg, también desarrollado para ImageJ {Thevenaz, 1998 #431}.

El contrastado CLAHE

Una imagen se puede modificar para que sea la información que contiene sea más fácilmente apreciable por el usuario. Entre estas modificaciones esta el incremento de contraste. Dentro de las técnicas de contraste están las técnicas de ecualización del histograma (HE). Si la ecualización en vez de realizarse a nivel global en la imagen se realiza adaptativamente por regiones de la imagen esto se conoce como ecualización adaptativa del histograma (AHE). Para eliminar la amplificación de ruido en el contrastado se establece un límite para este, de esta manera surge la ecualización adaptativa de histograma con limitación de contraste (CLAHE).

Cualquier imagen, enfocada o no, se puede someter a este procedimiento de contrastado CLAHE.

El contraste CLAHE utilizado para *Stitch&Focus* se llama X, fue creado por Zuiderveld en 1994{Zuiderveld, 1994 #429} e implementado en ImageJ con el nombre de “CLAHE” por Stephan Saalfeld en 1999.

A.3.2.2. Algoritmos explicados

Determinar la relación entre dos planos xyz consecutivos mediante el cálculo de *stitching*

El algoritmo de *stitching* calcula la posición de *stitching* más probable entre dos planos y devuelve la posición o desplazamiento xy de una imagen respecto a la otra y la probabilidad p de que ese *stitching* sea correcto.

Teniendo en cuenta estos parámetros utilizamos unos supuestos al comparar planos xyz consecutivos:

1. Si $p \geq 0.95$

Existe solapamiento.

1.1. Si $p \geq 0.95$ && $xy = 0,0$

Existe un buen solapamiento y no existe desplazamiento. Se entiende que ambos planos xyz consecutivos son en realidad distintos planos xyz de un mismo plano xy. Estos planos deberán ser enfocados juntos en un mismo plano xy enfocado.

1.2. Si $p \geq 0.95$ && $xy \neq 0,0$

Existe un buen solapamiento y existe desplazamiento. Se entiende que ambos planos xyz consecutivos son planos xyz de distintos planos xy entre los que existe solapamiento. Se enfocarán y pertenecerán a distintos planos xy enfocados. El desplazamiento será usado para calcular la posición de un plano xy enfocado respecto del otro. Ambos planos xy formarán parte de la misma región.

2. Si $p < 0.95$

No existe solapamiento. Los dos planos xyz no pertenecen al mismo plano xy ni a planos xy contiguos. En este caso procedemos a iniciar una nueva región. Los dos planos xyz pertenecerán a distintas regiones.

Acumular planos de enfoque y desencadenar su enfoque

Como acabamos de ver, el algoritmo de *stitching* nos permite conocer qué relación existe entre dos planos xyz consecutivos. Si la probabilidad de *stitching* es buena: $p > 0.95$ y no existe desplazamiento: $xy = 0,0$ esos dos planos xyz pertenecerán al mismo plano xy, si

no se dan esas dos condiciones no pertenecerán al mismo plano xy.

Basándose en este principio el programa va buscando el stitching de las imágenes o planos xyz (im) por parejas de la forma: $im_0-im_1, im_1-im_2, im_2-im_3, im_{i-1}-im_i \dots im_{n-1}-im_n$.

Cómo funciona el software para realizar el enfoque es primero acumulando los planos xyz a enfocar de un mismo plano xy y cuando encuentra un plano xyz de otro plano xy desencadena del enfoque de los planos acumulados.

Para realizar esto utiliza una lista de imágenes a enfocar. La primera imagen xyz pasará a esta lista, la segunda si cumple las condiciones de pertenecer al mismo plano que la primera también pasará a la lista, la tercera con la segunda si cumple las condiciones pasa a la lista, así pongamos hasta la novena. Al hacer el *stitching* de la novena con la octava se ve que no pertenece al mismo plano xy que las anteriores. En este punto se desencadena la secuencia que sigue:

1) La imagen de otro plano xy no pasa a la lista de imágenes a enfocar. La novena imagen en este ejemplo.

2) Se llama al módulo de enfoque para que enfoque la lista de imágenes acumuladas. De la primera a la octava en este caso.

3) Se genera una imagen enfocada con un nombre que indica que contiene las imágenes 1 a 8.

4) Se vacía la lista de imágenes a enfocar.

5) La imagen de otro plano xy pasa a la lista. La novena imagen en este ejemplo.

6) Se sigue las comparaciones entre planos xyz. La nueva comparación será entre la novena y décima imagen xyz.

Este modelo se repite hasta acabarse los planos xyz. El acabarse los planos xyz también desencadena el enfoque. Y el paso a la fase de búsqueda de *stitching* de los planos xy ya enfocados, en vez de en los planos xyz.

Calcular posición entre planos xy enfocados con solapamiento

Más arriba se explicó en “Los planos xy con solapamiento” el formalismo que relaciona la posición de dos planos para cerciorar que existe solapamiento entre sus planos. En realidad, ese formalismo solo nos es útil cuando ya sabemos la posición de los 2 planos xy. En nuestro caso sabemos la posición de un plano xy enfocado: x_0, y_0, w_0, h_0 , que

pertenece a una región. Y desconocemos la posición de un segundo plano xy enfocado: $x1,y1,w1,h1$. La posición del segundo plano xy enfocado la buscamos sumando a la posición del primer plano xy enfocado, que ya pertenece a una región, y el desplazamiento devuelto por el *stitching*.

Hay que recordar que solo existirá solapamiento entre ambos planos xy enfocados si el resultado del *stitching* es $p>0.95$ && $xy!=0,0$. Esto significa que existe un solapamiento bueno y un desplazamiento.

Si las coordenadas que ofrece el stitching son: x_s,y_s , la posición del segundo plano será:

$$x1=x0+x_s$$

$$y1=y0+y_s$$

$w1$ y $h1$ serán el ancho y el alto fijo de las imágenes.

Hay que tener en cuenta que el desplazamiento puede ser negativo así, con estas dos simples operaciones, se obtiene la posición de un plano xy enfocado que se solapa con un plano xy enfocado ya presente en una región.

Al segundo plano xy enfocado se le asignará la pertenencia a la región y su nueva posición en esta región. A continuación se pasaría a comparar este segundo plano con un tercero y se repetiría la misma operación.

Este procedimiento se realiza con todos los planos xy enfocados buscando el stitching los n planos xy enfocados (im) por parejas de la forma: $im_0-im_1,im_1-im_2,im_2-im_3,im_{i-1}-im_i\dots im_{n-1}-im_n$.

Al acabarse los planos xy enfocados se pasa a analizar las regiones formadas por el posicionamiento de estos planos.

Codificar la posición de las imágenes

Para mantener la posición de las imágenes se consideraron dos posibilidades, ir guardando las posiciones en una base de datos o ir codificando su posición en duplicados de las propias imágenes. Decidí hacerlo sobre las propias imágenes porque evita la necesidad de añadirle el peso de una base de datos, porque el usuario puede entender

mucho mejor lo que ocurre y utilizar las mismas imágenes para los procedimientos que considere sin tener que conectar y acceder a una base de datos que requiere ciertos conocimientos.

Cada plano xyz tiene una posición correspondiente a la posición de plano xy enfocado. Los planos xy enfocados contienen información que indica qué planos xyz contienen, a que región pertenecen y qué posición poseen en ella.

Por simplicidad, al acabarse los procesos de colocación se busca si existen valores negativos de posición en el eje x o el eje y.

Estos son producto de desplazamientos negativos, de un plano xy enfocado respecto a otro. Para ello se busca el valor mínimo para cada eje entre los planos xy enfocados, si ese valor es negativo, se el suma ese valor valor en positivo a todas las imágenes. Así la esquina superior izquierda sigue siendo 0,0.

Cuando se genera la superimagen a partir de las regiones, si existen regiones inconexas se añade a las regiones suficiente distancia con la posición máxima de las anteriores para que no se solapen y permanezcan separadas.

Determinar nuevas regiones por no solapamiento

La manera de decidir cuándo generar una nueva región ya se introdujo más arriba.

Según se busca el solapamiento entre planos xy enfocados contiguos si entre dos planos xy enfocados contiguos no aparece un buen solapamiento ($p < 0.95$) se inicia una nueva región.

La primera región será la 1, la segunda, la 2, y así sucesivamente, y sus planos xy enfocados recibirán esta denominación.

Determinar solapamiento entre regiones

Este tema ofrece cierta complejidad, principalmente por lo que respecta a encontrar una solución que no sea demasiado costosa computacionalmente, esto es, que no requiera demasiado tiempo para ofrecer una solución. Para encontrarle una solución lo mejor es imaginarse o reconocer la situación real con el microscopio, debajo se explican tres variantes comunes.

1) Cuando se sacan fotos con el microscopio si se mantiene continuamente

solapamiento el resultado final será una sola región. Esto implica seguir una forma de serpiente en la toma de imágenes, por ejemplo, se baja en el eje y hasta que se acaba la muestra, nos desplazamos en el eje x, por ejemplo a la derecha y se sube por el eje y, al llegar a la parte superior otra vez a la derecha y hacia abajo de nuevo hasta acabar con toda la muestra.

2) Cabe la posibilidad de que el usuario solo se desplace tomando fotos descendiendo en el eje y. De manera que cuando llega a la parte inferior de la muestra tomando fotos, sube rápidamente sin tomar fotos, se desplaza en el eje x y vuelve a bajar tomando fotos. Esto provocará tantas regiones como veces suba sin tomar fotos en el eje y ya que no existe conexión entre la última imagen al bajar en el eje y y la primera foto al volver arriba sin tomar fotos en el eje y.

3) También es posible que usuario siga una forma de serpiente pero la forma de la muestra sea muy variable o con muchos salientes y el usuario los recorra tomando fotos, para luego volver al cuerpo de la muestra pegando un salto sin tomar fotos.

En general se producirán tantas regiones como saltos se den sin tomar fotos.

Si comparamos todas los planos xy enfocados de todas las regiones entre sí, probablemente estemos matado moscas a cañonazos, requerirá mucho tiempo y cierta complejidad de programación.

Si comparamos solo las regiones vecinas: 1 con 2, 2 con 3...Ya reducimos en principio el número de comparaciones, pero si tenemos pocas regiones volvemos a estar en las mismas.

La aproximación que adopté tiene en cuenta dos supuestos:

1) La forma de la muestra es probable que sea hasta cierto punto solida, es decir que se encaje bien en un rectángulo.

2) El supuesto 1 lleva al supuesto de que las parte superior de de una región es más probable que corresponda con las parte superior de la región vecina que con la inferior. Y a la inversa.

3) Las regiones más expuestas, con mayor superficie externa, de la región tienen más posibilidades de solaparse con las regiones vecinas.

4) Si el usuario se desplaza dentro de la región de izquierda a derecha (o de derecha a izquierda) es probable que entre regiones también lo haga, que siga un criterio para cada

eje.

De esta manera, por ejemplo, si el movimiento es de izquierda a derecha, se comparan primero los planos xy enfocados que estén en la superficie derecha de la región 1 con los planos xy enfocados de la superficie izquierda de la región 2. Y esta comparación se hace en orden correspondiente en ambos: el primer plano superior de la región 1 con todos los de la región 2 empezando por arriba, luego el segundo plano superior de la región 1 con todos los de la región 2 empezando por arriba...

Así se continúa hasta acabar con todos los planos superficiales. Llegado este punto es preferible dejar las regiones separadas. Puede que las regiones estén realmente separadas o que el solapamiento sea muy complejo. En este punto el tiempo para obtener una solución para juntar las regiones, si acaso existe, no merece la pena. En su lugar el usuario es más adelante presentado con la posibilidad de ajustar manualmente los planos donde podrá solapar las regiones si así deben estar.

Cuando se encuentra dos planos xy enfocados de dos regiones con buen stitching se debe comprobar para toda la región. Por ello se comprueba qué planos deberían coincidir con cuales y en qué posición. Si al realizar stitching entre ellos se cumplen estos supuestos se fusionan las regiones. Al juntar regiones las posiciones de sus correspondientes planos xy enfocados y sus planos xyz son recalculadas. El resultado de juntar las regiones es la superimagen enfocada calculada automáticamente.

Pasar imágenes al módulo de corrección

Cuando el programa ya ha acabado de generar automáticamente la superimagen tras fusionar las regiones se la presenta al usuario. Si el usuario quiere modificar algo se abre una ventana de MosaicJ en la que puede reordenar por encima algún plano que no le parezca correctamente ordenado. MosaicJ puede importar imágenes con una posición determinada. Para ello requiere un archivo de texto que le indique la ruta a las imágenes y en qué posición debe presentar cada una.

Para que esto sea posible *Stitch&Focus* crea ese archivo con la ruta y posición de cada plano xy enfocado. La posición de cada plano xy enfocado está codificada en su nombre. Si existen regiones se crea suficiente espacio entre ellas para que no se solapen.

Recoger cambios tras el módulo de corrección

En el MosaicJ el usuario recoloca las imágenes como considera pertinente. Cuando considera que ya están los planos en su posición aproximada se le indica al usuario que guarde en MosaicJ las nuevas posiciones y cierre el interfaz de MosaicJ. Este archivo con las posiciones que ha guardado el usuario será el utilizado para recalcular finamente las posiciones de los planos xy enfocados.

Realizar ajuste fino tras corrección

Tras realizar los cambios pertinentes en MosaicJ ya se habrá guardado la nueva posición de los planos aproximada por el usuario. En este momento lo que *Stitch&Focus* hace es comparar las posiciones en el archivo de texto inicialmente introducido en MosaicJ con las posiciones en el archivo que se ha guardado tras las modificaciones. Aquellas imágenes que presenten una posición diferente se pasarán al módulo de stitching. En este caso al módulo de stitching se le indica una posición inicial y un límite de desplazamiento respecto de esa posición. El módulo de *stitching* devuelve el ajuste a nivel de píxel para cada imagen que fue movida. Cuando finaliza los calculos para todos los planos movidos, se reasignan regiones si aún existen y se asigna a cada plano xy enfocado su posición definitiva.

Generar superimagen

Con las posiciones de todos los planos xy enfocados ya definidas solo queda generar la superimagen. Para ello se genera una imagen de fondo en negro con suficiente dimensión para albergar la imagen. Para ello primero se asegura que la imagen empiece en 0,0. Para ello se recorren todos los planos xy enfocados buscando el mínimo para el eje x y el mínimo para el eje y. Conocido este mínimo para cada eje, se le suma o resta una cantidad a todas las imágenes para que pase a ser 0.

Teniendo ya el inicio en 0,0. Se procede a calcular el ancho y alto de la superimagen. El ancho corresponderá a la coordenada x del plano xy enfocado con mayor valor de x más el ancho de 1 plano xy enfocado. De la misma manera el alto de la superimagen corresponderá a la coordenada y del plano xy enfocado con mayor valor de y más el alto de 1 plano xy enfocado.

Con la posición de la superimagen y sus imágenes xy enfocadas ajustadas a 0,0 y la el ancho y alto de la superimagen conocidos se crea una imagen negra de estas dimensiones. Sobre esta imagen negra se van superponiendo los planos xy enfocados en su posición correspondiente generando la superimagen final.

Generar superimagen contrastada

Para generar la superimagen contrastada se crean capturas secuencialmente de la superimagen generando zonas con una localización. Estas zonas son pasadas al modulo de CLAHE que crea una versión contrastada de cada una de ellas. Una vez realizado el contraste de cada zona estas se vuelven a montar para generar una superimagen con contraste CLAHE.

A.3.3. ConsecRenamer

A.3.3.1. Conceptos y terminología

Planos sin dimensiones

Los planos sin dimensiones son aquellos en cuyo nombre solo aparece un número. Este número se va incrementando de uno en uno para cada nueva foto según van siendo tomadas. Estas fotos proceden en nuestro caso de microscopia confocal. Las imágenes carecen de cualquier indicativo de la posición que ocupan en la muestra o del canal en el que fueron obtenidas. La razón de esto es que no existe un buen mecanismo de comunicación de información entre la pletina motorizada y el mecanismo de captura del microscopio confocal. Pero sí contamos con el conocimiento del orden en qué fueron tomadas gracias al número incremental del nombre de las imágenes. Estas imágenes serán nuestro punto de partida.

Planos con dimensiones xyzc

Los planos con dimensiones xyzc son imágenes a las que les ha sido asignada una posición xyz y un canal c. En el caso de *ConsecRenamer* se refiere al producto de nuestro

programa. Las imágenes sin dimensiones y el tamaño de cada dimensión son introducidos y el programa crea una copia de las imágenes con la posición de cada imagen en las dimensiones asignadas. Estas posiciones en las dimensiones se corresponden con la posición de la pletina motorizada y el canal al tomar cada imagen.

A.3.3.2. Algoritmos explicados

Ventana de captura de parámetros del usuario

Al usuario se le presenta una ventana en la que puede introducir el orden en el que se toman las fotografías. En realidad, es más correcto indicar que se trata del orden de desplazamiento en las dimensiones. Cuando hablamos de orden nos referimos a cuando hay desplazamiento en unas dimensiones antes que en otras. Además el usuario indica el tamaño de cada dimensión. Vamos a poner un caso de ejemplo:

En el microscopio confocal en cada plano xyz se fotografían tres canales: rojo, verde y azul. En el microscopio la pletina se sitúa en cada plano xy y fotografía todo su stack en z, esto es todos los los planos xyz de un plano xy, en este ejemplo 20. Para moverse entre planos xy lateralmente la pletina primero cubre una fila de izquierda a derecha y cuando se acaba baja una columna y fotografía otra fila, así hasta acabarse la muestra. Es decir se desplaza en x antes que en y, en este ejemplo cubre 10 planos en x y 8 planos en y. Ahora veamos cómo se introduciría esto:

Primera dimensión: Nombre=c; Tamaño=3;

Segunda dimensión: Nombre=z; Tamaño=20; sentido=delante-atrás

Tercera dimensión: Nombre=x; Tamaño=10; sentido=izquierda-derecha

Cuarta dimensión: Nombre=y; Tamaño=8; sentido=arriba-abajo

Los sentidos a elegir para z son: delante-atrás o atrás-adelante

Los sentidos serán para x son: izquierda-derecha, derecha-izquierda, alterno empezando izquierda-derecha, alterno empezando izquierda-derecha.

Los sentidos serán para y son: arriba-abajo, abajo-arriba, alterno empezando arriba-abajo, alterno empezando abajo-arriba.

Estos datos introducidos serán utilizados en el siguiente algoritmo para calcular la

posición de cada imagen.

Asignar a las imágenes posición en las dimensiones

Para asignar a cada imagen una posición en cada dimensión se utiliza el número de cada imagen, el orden de dimensiones introducido, su tamaño y las operaciones de división (/) y modulo (%) de enteros.

Hay que tener en cuenta que nos referimos a operaciones de enteros, sin decimales. La operación división de enteros devuelve la parte entera de la división, truncando los decimales. La operación modulo devuelve el resto en enteros. Veamos un ejemplo:

Si dividimos 7 entre 3 tenemos de resultado 2 y de módulo 1. Esto se expresa como:
 $7/3=2$; $7\%3=1$.

Sabiendo el orden en que ocurre el desplazamiento en cada dimensión podemos saber que la posición en una dimensión de una imagen será el resultado de la división entera del módulo de la dimensión superior por el producto de las dimensiones inferiores. Veámoslo tomando el ejemplo expuesto anteriormente que tenía el siguiente orden y tamaño resumido:

1) [c]=3; 2)[z]=20; 3)[x]=10; 4)[y]=8

Podemos calcular los productos que determinarán cada cuantas imágenes cambiará una dimensión en base a sus dimensiones de orden inferior:

Cada imagen se toma como la unidad:1

El canal c cambiará con cada incremento en 1 en el número de la imagen. $1=1$

El canal z cambiará con cada incremento en 3 en el número de la imagen: $1*3=3$

El canal x cambiará con cada incremento en 60 en el número de la imagen:
 $1x3x20=60$

El canal y cambiará con cada incremento en 600 en el número de la imagen:
 $1x3x20x10=600$

Conociendo estos productos podemos calcular las posiciones en cada dimensión de un canal al inferior. Dados estos tamaños en las dimensiones vamos a calcular como ejemplo la posición de un plano con nombre 757. Recorremos las dimensiones de mayor a menor quedándonos con el resultado de la división para esta dimensión y pasando a la siguiente el modulo:

Posición $y=1157/600=1$ Modulo $y=1157\%600=557$

Posición $x=557/60=9$ Modulo $x=557\%60=17$

Posición $z=17/3=5$ Modulo $z=17\%3=2$

Posición $c=2/1=2$

De esta manera, para la imagen con número 757 sabemos que tiene las siguiente posiciones en cada dimensión: $y=1$, $x=9$, $z=5$, $c=2$. Hay que tener en cuenta que al igual que en programación la primera posición en cada dimensión es la posición 0 y por tanto la última posición el tamaño de la dimensión menos uno. Teniendo esto en cuenta esta será una foto en el tercer canal, en el sexto plano z , en la última columna de la segunda fila.

Este cálculo de posición sigue el sentido estándar de desplazamiento: en el eje x de izquierda a derecha, en el eje y de arriba a abajo y en el eje z de la parte superior a la inferior. Si en alguna dimensión se usa el sentido inverso de desplazamiento, la posición en esa dimensión será el tamaño de esa dimensión menos uno menos el resultado de la división.

Por ejemplo si el eje x y el eje y estuviesen invertidos la posición del plano anterior sería:

Posición $y=1$

Posición $x=(10-1)-9=0$

Posición $z=(20-1)-5=14$

Posición $c=2$

Resultado: $y=1$, $x=0$, $z=14$, $c=2$.

Si se en una dimensión un desplazamiento alterno provocará un desplazamiento en forma de serpiente. En el eje que varía el sentido se aplica el mismo método de inversión pero solo en las filas o columnas con sentido invertido, estas serán todas las pares o impares de la dimensión de orden superior. Si es par o impar se sabe calculando el modulo de la posición de la dimensión de orden superior respecto a $2(\text{dim}\%2)$. Si el modulo es 0 es par, si es 1 es impar. Si, por ejemplo, el eje x en nuestro ejemplo va en sentido normal en los pares y de derecha a izquierda en los impares se corregirá como sigue:

Posición $y=1$

Posición $y\%2=1\%2=1$ ->Por lo tanto: Posición $x=(10-1)-9=0$

Posición $z=5$

Posición $c=2$

Resultado: $y=1, x=0, z=5, c=2$.

Este proceso se repite para todas las imágenes y según se identifican sus coordenadas las imágenes son duplicadas y asignadas un nombre con separadores para cada dimensión al estilo: $y01_x09_z05_ch02$

Estas imágenes ya estarán listas para utilizar en un software que requiera conocer la posición de las imágenes como *LayerMaker*.

A.3.4. LayerMaker

A.2.4.1. Conceptos y terminología

Véase en *Stitch&Focus*:

- La muestra y sus dimensiones wh .
- Posiciones xy dentro de la muestra.
- Los planos xy .
- Los planos xyz .
- Los planos xyz de un plano xy .
- Los planos xy enfocados.
- Superimagen.
- Superimagen enfocada.
- Superimagen contrastada CLAHE.

La dimensión canal: c y los planos $xyzc$

En microscopía fluorescencia como la utilizada en microscopía confocal es capaz de estimular un plano xyz con distintos canales. Al tomar fotos de un mismo plano xyz estimulados con canales distintos canales de uno en uno obtenemos distintas respuestas para cada canal en ese plano xyz . A cada plano xyz , si le añadimos el canal con el que estaba siendo estimulado al tomar la foto, podremos decir que le estamos añadiendo una nueva dimensión, la del canal o c de “channel”. De manera que ese plano xyz tomado en un canal tendrá 4 dimensiones: $xyzc$. Solo tiene sentido crear una dimensión, en este caso

canal, cuando puede tener más de un valor, por ello no tiene sentido en campo claro pero sí cuando se usa más de una emisión en fluorescencia.

La dimensión capa: l y los planos xyzl

En biología celular al estudiar tejidos u órganos y las células que los componen, es común encontrarnos con que estas células se distribuyen en capas. Si conocemos las capas que hay en un plano xy y además conocemos qué capa de estas esta presente en un plano xyz podremos asignarle a este plano xyz una nueva dimensión la de capa o l de “layer”, correspondiente a su capa celular. De manera que se ese plano xyz tomado del que conocemos la capa tendrá 4 dimensiones: xyzl. Como adquirir este conocimiento de las capas celulares con las imágenes es el objetivo de *LayerMaker*.

Los planos xyzcl

Si de un plano xyz conocemos el canal con el que tomamos esa foto tenemos un plano xyzc. Si además conocemos la capa celular a la que pertenece el plano xyz tendremos una dimensión más la de capa. De esta manera tenemos un total de 5 dimensiones: xyzcl.

Las capas locales

Si de un plano xy obtenemos todas las capas celulares presentes en sus planos xyz sin tener en cuenta a los planos xy vecinos tendremos lo que llamamos capas locales. Esto es lo mismo que todas las capas celulares en la extensión en z de un plano xy aislado. Lo llamamos capas locales porque el criterio se establece independientemente dentro de cada plano xy.

Las capas globales

Si de un plano xy obtenemos todas las capas celulares presentes en sus planos xyz y las ponemos en contexto con las capas de los planos xy vecinos tendremos lo que llamamos capas globales. Esto es lo mismo que todas las capas celulares en la extensión en z de un plano xy en un contexto. Lo llamamos capas globales porque el criterio se establece globalmente en toda la muestra en vez de independientemente en cada plano xy.

Los planos xyc

Un plano xyc es un conjunto de planos xyzc que comparten las dimensiones xyc pero no así la z. Esto es, todos los planos xyz de un plano xy para un canal c concreto.

Los planos xyc enfocados

Si todos los planos xyzc de un plano xyc se enfocan o focalizan en un solo plano este será un plano xyc enfocado. Esto es enfocar todos los planos xyz de un mismo plano xy y que tienen el mismo canal c.

Los planos xycl

Un plano xycl es un conjunto de planos xyzcl que comparten las dimensiones xycl pero no así la z. Esto es, todos los planos xyzcl de un plano xyc para una capa concreta, o lo que es lo mismo, todos los planos xyz tomados en un mismo canal y que pertenecen a la misma capa. Esta es la base de *LayerMaker*, encontrar los planos xyz que comparten canal y capa.

Los planos xycl enfocados

Si enfocamos todos los planos xyzcl que pertenecen a un plano xycl tenemos un plano xycl enfocado. Esto es que se enfoquen las capas de un plano xy por canal y capa.

Superimagen cl enfocada

Una superimagen cl enfocada es una superimagen conformada por planos xycl enfocados. Esto es por planos xy del mismo canal y la misma capa celular enfocados.

Superimagen cl contrastada CLAHE

Una superimagen cl contrastada es, como dice su nombre, una superimagen cl que ha sido sometida al proceso de contrasta CLAHE.

Stack de planos xyz

Un stack de imágenes es una colección ordenada navegable de imágenes con 3 dimensiones. Esta colección de imágenes normalmente se representa como un panel que

muestra en 2 dimensiones un plano xyz y un deslizador para el eje z con el que seleccionamos el plano xyz a mostrar.

Hyperstack de planos xy_z enfocados

Un hyperstack de imágenes es una colección ordenada navegable de imágenes con más de 3 dimensiones. Esta colección de imágenes normalmente se representa como un panel que muestra en 2 dimensiones un plano xyz y varios deslizadores, uno por cada dimensión. En el caso de los planos xy_z enfocados, tendremos un deslizador para el eje c y otro para el eje l, con los que seleccionaremos el canal y la capa enfocada a mostrar.

Virtualstack de superimágenes

Un virtualstack de superimágenes es una colección ordenada de superimágenes. La diferencia entre un stack o un hyperstack y un virtualstack esta en que las imágenes del virtualstack son muy grandes. Debido a ello en vez de utilizarse un stack o hyperstack se utiliza un virtualstack. Mientras que un stack se carga en la memoria RAM un virtualstack se carga desde el disco duro, que tiene mucha más capacidad, aunque es más lento. Un virtualstack puede tener 3 dimensiones como un stack como un hyperstack, como será un virtualstack de superimágenes c_l enfocadas.

Métodos usados

Véase en *Stitch&Focus*:

- **El proceso de enfoque**
- **El contrastado CLAHE**

A.2.4.2. Algoritmos explicados

Ver en *Stitch&Focus*:

- Acumular planos de enfoque y desencadenar su enfoque
- Codificar la posición de las imágenes
- Generar superimagen
- Generar superimagen contrastada

Saber la posición y canal de las imágenes xyzc

Al usuario se le ofrece inicialmente una ventana en la que puede introducir el significado del nombre de las imágenes. En las imágenes en los nombres la posición x, y, z, c deben tener los mismos separadores para el programa sea capaz de buscar estas secuencias y determinar la posición de cada imagen. El canal corresponde al canal c.

Por ejemplo si una imagen cualquiera de las imágenes a analizar tiene el nombre: x120_y50_z03_ch01, los separadores a indicar serían:

Antes de x: “x”; después de x: “_y”

Antes de y: “_y”; después de y: “_z”

Antes de z: “_z”; después de z: “_ch”

Antes de canal: “_ch”; después de canal: “”

Al introducir estos separadores el programa ya sabrá leer las imágenes. El programa de hecho ya trae estos separados por defecto, pero permite cambiarlos por si las imágenes contuviesen otros.

Elegir un canal para determinar las capas

Las capas se podrían determinar en función de varios canales o de todos, pero en realidad esta solución puede que no sea óptima. La idea a la hora de detectar capas es que uno de los canales contenga señal suficiente para representar una capa sin que estas se mezclen. En nuestro caso utilizamos una tinción específica de núcleos celulares, DAPI. Si hubiésemos utilizado un canal que tiñe somas y dendritas puede que no obtuviésemos tan buena separación en capas. En nuestro caso si utilizásemos una combinación del canal de DAPI y de los canales de nuestra proteína solo estaríamos añadiendo ruido a la buena definición de capas que da el DAPI. En general debe ser el usuario el que elija un canal que considere apropiado para señalar capas celulares.

Tras elegir la carpeta de las imágenes e introducir los separadores de las dimensiones presentes en los nombres de las imágenes el programa comprueba que estos son correctos. Si son correctos se le ofrece al usuario una lista de los canales detectados para que elija el que utilizar para buscar las capas.

Determinar las capas localmente mediante curvas de intensidad en z.

La determinación local de capas implica que se hace independientemente en cada plano xy.

Para determinar las capas de un plano xy en el canal seleccionado para buscar capas se utiliza el nivel medio de intensidad de capa plano xyz en ese canal de ese plano xy. Una vez obtenida esa medida de cada plano xyz se considera estas medidas a modo de curva que representa la intensidad media de cada plano xyz respecto de su posición z.

Para cada plano xy tenemos una curva. En esta curva nos interesan los mínimos locales. Los mínimos locales son puntos que a su alrededor, a izquierda y derecha en el eje z, presentan valores mayores que el suyo en intensidad. Cada mínimo local es tomado como un posible punto de inflexión, un punto que separa dos capas.

Se puede imaginar como, al atravesar capas de células en el eje z la intensidad crece al llegar al centro de una capa decrece al alejarnos del centro de esta capa y de repente vuelve a crecer al empezar a acercarnos a otra capa. El en que la intensidad pasa de decrecer a crecer es el mínimo local.

Además de detectar estos puntos como posibles puntos de separación de capas queremos saber como de representativo es ese punto de inflexión. Para obtener esta medida tomamos el tamaño del valle entorno a ese mínimo.

Medir la representatividad de un punto de inflexión

Para medir la representatividad de un punto de inflexión medimos el tamaño del valle entorno a ese mínimo. Esto es medir en base a los dos máximos que rodean ese mínimo. Para obtener esta medida se suma el número de planos z que se encuentran en el valle, incluidos los máximos.

Para conseguir esto primero se recorren los valores de izquierda a derecha. Cada vez que un valor es inferior al anterior se suma uno. A continuación se recorren de derecha a izquierda realizando el mismo procedimiento. De esta manera podemos conocer la amplitud de un valle. Si en vez de sumar uno sumamos la diferencia con el valor anterior no solo medimos la amplitud del valle sino también el cambio de altura que comprende.

Cómo obtener las capas globales

Para asignar las capas globalmente es necesario detectar el modelo que mejor asigne

esas capas. Por ello opté por una aproximación en la que se crean varios modelos y luego se elige el más óptimo. Ahora se plantea la pregunta: cómo crear esos modelos. Para crear cada modelo decidí tomar un plano xy como punto de partida y propagar progresivamente sus capas a los vecinos hasta cubrir toda la muestra. Para crear varios modelos basta con tomar varios puntos de partida. Cada punto de partida cubre la muestra asignando sus capas. Al final de entre todos los modelos se elige el más óptimo, que tomé como el más probable.

La mediana y los planos xy de partida para buscar capas globales

Como se acaba de mencionar en el apartado superior, se calculan distintos modelos a partir de distintos planos xy de partida. De estos modelos más adelante se elegirá un óptimo. Ahora bien, debemos elegir estos puntos de partida. Podrían tomarse todos pero probablemente sea computacionalmente costoso sin ofrecer mejoras. Podrían tomarse aleatoriamente, esta no es una mala opción pero podría haberlas mejores. En mi caso preferí calcular la mediana de capas de los planos xy y tomar como punto de partida los planos que tengan ese número de capas y si estos no llegan al 20% del total de planos completar con los que tengan un número más cercano de capas. La razón de esto es que considero que el modelo con más probabilidades de ser bueno será aquél que parta con un número mayor de planos con capas parecidas al plano de partida. En definitiva, se intenta que el modelo global se ajuste a la realidad local del número de capas. Los cuatro apartados siguientes tocan más en detalle los procesos implicados en determinar las capas.

Determinar la correspondencia de capas entre dos planos xy vecinos según z.

Para generar cada modelo tomamos un plano xy como punto de partida. Las capas en este punto de partida se toman como capas globales. A los vecinos de este punto de partida se busca como asignarles estas mismas capas. Una vez los vecinos han recibido la denominación de las capas estos a su vez la propagarán a sus vecinos.

Según este paradigma cuando queramos asignar capas con dos planos xy siempre habrá al menos un plano xy con capas globales asignadas y otro plano sin capas globales asignadas. Ambos planos tendrán unas capas locales asignadas con índices: 1,2,...n y estas

capas tendrán unos índices z que delimitan sus capas, por ejemplo para 3 capas locales: Capa1:0-4, Capa2:5-10, Capa3:11-16.

Cuando buscamos asignar capas globales desde un plano xy a otro miramos como conseguir una correspondencia entre capas que reduzca la distancia entre los índices z de ambas capas. Hay que tener en cuenta que para exista una buena correspondencia en algunos casos el plano xy hacia la que se propaga deberá alterar los índices de sus capas para ajustarse al plano xy que ya tiene índices globales.

Lo que se hace es generar todas las combinaciones de índices de inicio y final de capa del plano sin índices sobre los índices fijos de inicio y fin del plano xy que ya tiene índices globales manteniendo el orden de las capas. La combinación que genere menos diferencia acumulada de índices z será la buena y la utilizada para asignar los índices de capa.

Un ejemplo de esta combinatoria:

Plano xy con índices globales: Capa1:0-4, Capa2:5-10

Plano xy sin índices globales: Capa1:0-2, Capa2:3-10

Combinaciones:

$$1) ([0-0])+([4-2])+([5-3])+([10-10])=4$$

$$2) ([0-2])+([0-3])+([4-10])+([5-10])=16$$

$$3) ([0-4])+([5-0])+([10-2])+([3-10])=23$$

En el caso 1 se prueba que las capas 1 y 2 de ambos planos coinciden.

En el caso 2 se prueba que la capa 2 del plano xy sin índices coincida con la capa 1 del plano con índices.

En el caso 3 se prueba que la capa 1 del plano xy sin índices coincida con la capa 2 del plano con índices.

Claramente, las capas que traía el plano xy sin índices son correctas y le son asignadas como capas globales.

Vamos a poner otro ejemplo para ver que no es siempre este el caso:

Plano xy con índices globales: Capa1:0-8, Capa2:9-10

Plano xy sin índices globales: Capa1:0-2, Capa2:3-10

Combinaciones:

$$1) ([0-0])+([8-2])+([9-3])+([10-10])=12$$

$$2) ([0-2])+([0-3])+([8-10])+([9-10])=8$$

$$3) ([0-8])+([9-0])+([10-2])+([3-10])=32$$

Las combinaciones probadas son las mismas que en el caso anterior. Se que la que ofrece menos error es en el caso 2 donde se prueba que la capa 2 del plano xy sin índices coincida con la capa 1 del plano xy con índices. De esta manera las capas globales para el plano xy sin índices se asignarán restando 1 a sus posiciones, la capa 1 pasa a capa 0 y la capa 2 a a capa 1: Capa0:0-2, Capa1:3-10. Es común que al acabar de asignar índices surjan índices negativos. Esto significa simplemente que existe alguna capa por debajo de la capa más baja del plano xy de partida. Por facilidad de comprensión al acabar de asignar índices globales si existen índices negativos se suben todos los índices para que no haya índices negativos.

La lógica de todo esto es intentar asignar las capas según unos supuestos entre planos xy:

- Las capas no se intercambian o rompen abruptamente, ni se invierten.
- Los cambios de grosor o la aparición y desaparición de capas es gradual.
- No se pueden inventar capas o dividir una capa en dos sin un punto de inflexión.
- Dos capas encontradas localmente no tienen que mantenerse si carecen de soporte global.

En base a estas hipótesis en el plano xy sin índices globales se pueden reasignar subiendo y bajando los índices de las capas o se pueden fusionar capas

Vamos a poner algunos casos de ejemplo. Partimos siempre de la misma capa que ya tiene índices globales como sigue:

El plano xy con índices globales para todas es: Capa1:0-4, Capa2:5-10,Capa3:11-16

- Si el plano xy sin índices globales es: Capa1:0-3, Capa2: 4-8, Capa3: 9-16. La asignación de índices que reducirá la distancia entre el inicio y final de cada capa será mantener los índices: Capa1:0-3, Capa2:4-8, Capa3:9-16.

- Si el plano xy sin índices globales es: Capa1:0-8, Capa2: 9-13, Capa3: 14-16. La asignación de índices que reducirá la distancia entre el inicio y final de cada capa será el fusionar las capas 2 y 3: Capa1:0-8, Capa2:9-16.

- Si el plano xy sin índices globales es: Capa1: 0-4, Capa2: 5-9, Capa3: 10-13, Capa4:14-16. La asignación de índices que reducirá la distancia entre el inicio y final de cada capa será el fusionar las capas 3 y 4: Capa1: 0-4, Capa2: 5-9, Capa3: 10-16.

- Si el plano xy sin índices globales es: Capa1:0-8, Capa2:9-16. La asignación de índices que reducirá la distancia entre el inicio y final de cada capa será dejar la asignación de capas como esta: Capa1:0-8, Capa2:9-16. En este caso es importante indicar que no se divide la capa en otras capas, ya que esto resultaría en capas inexistentes, lo que sí puede hacerse es cambiar los índices de las capas como en el siguiente ejemplo.

- Si el plano xy sin índices globales es: Capa1:0-11, Capa2: 12-16. La asignación de índices que reducirá la distancia entre el inicio y final de cada capa será dejar la asignación de capas como esta: Capa2: 0-11, Capa3: 12-16. En este caso se cambió el índice de las capas aunque siguen siendo dos, ya que es la combinación que mantiene más coherencia.

Al tratarse de cuadrantes en 2 dimensiones cada plano xy tiene hasta 8 vecinos. Qué pasa cuando un plano xy no tiene capas xy asignadas y varios de sus vecinos ya las tienen asignadas. Sus capas se decidirán en función de mantener el mejor acuerdo posible con todos los vecinos. El error, o diferencia de planos z acumulada será en este caso la suma de la diferencia para todos los planos xy con capas globales asignadas. La combinación que reduzca el error será la seleccionada para asignarle los índices al plano xy sin índices.

Propagar la asignación de capas por la muestra

Para propagar la asignación de planos globales por la muestra primero se elige un plano xy de partida. Las capas de este plano xy son tomadas como la primera asignación de capas globales. A continuación con la metodología explicada en el apartado anterior sus planos xy vecinos reciben una asignación de capas globales. Estos planos xy vecinos a su vez asignan capas globales a sus vecinos. Y así desde un plano xy de partida se va extendiendo la asignación global por toda la muestra.

La manera de asignar sucesivamente capas a los vecinos es ir recorriendo los planos xy de la muestra según su posición xy. En mi caso fue en el sentido normal de lectura desde arriba a la izquierda de izquierda a derecha y a continuación y hacia abajo al acabarse la fila. Por cada plano que se encuentra comprueba dos condiciones y si las cumple se le asignan índices globales:

- No tener índices globales asignados.
- Que alguno de sus vecinos tenga capas globales asignadas.

Si se cumplen estas dos condiciones se le asignan capas globales. Así se realiza un recorrido completo comprobando todos los planos de la muestra. Al acabar este recorrido se vuelve a iniciar otro recorrido completo hasta que en un recorrido ningún plano xy este sin capas globales.

Hay que recordar que el resultado de este proceso es un modelo de asignación de capas globales. No la asignación de capas globales definitivas. Cada punto de partida genera un modelo y de estos modelos se elige el más probable. Este proceso se explica en el próximo apartado.

Elegir el modelo más probable para determinar las capas globalmente

Como se acaba de explicar en el punto anterior, como resultado de la asignación de capas globales con varios puntos de partida se generan varios modelos para explicar las capas globales toda la muestra. Para elegir uno de estos modelos como definitivo tomo una aproximación probabilística. Si pensamos que la idoneidad de los modelos se distribuye como una distribución normal, los modelos más apropiados se concentrarán entorno a la medida de centralidad, donde se reduce la variabilidad. Teniendo esto en cuenta simplemente buscamos el modelo que mejor representa el conjunto de los modelos. Este será el modelo que difiera menos de los demás.

Para medir esta reducción de variabilidad lo que hacemos es para cada plano xy tomar todas las asignaciones de capas que se le hayan hecho en todos los modelos y generar porcentajes o probabilidades según el número de veces que aparezca en los modelos. Por ejemplo podemos tener para un plano xy con capas locales (CP) CP1: 0-3; CP2: 5-10; CP3: 11-17; CP4: 17-19; en una muestra de 200 planos xy podemos tener estas asignaciones de capas globales (CG) con estas probabilidades:

Combinación 1: CG1:CP1, CG2:CG2, CG3:CP3, CG4:CG4 $\rightarrow 68/200=34\%$

Combinación 2: CG1:CP1, CG2:CG2, CG3:CP3+CG4 $\rightarrow 90/200=45\%$

Combinación 3: CG2:CP1, CG3:CG2, CG4:CP3+CG4 $\rightarrow 4/200=2\%$

Combinación 4: CG1:CP1+CG2, CG2:CP3+CG4 $\rightarrow 24/200=12\%$

Combinación 5: CG1:CP1+CG2, CG3:CP3, CG4:CG4 ->14/200=7%

Cada modelo para este plano recibirá una puntuación (34,45,2,12,7)según la combinación que presente. Para cada plano xy se hace esta operación y se suma una puntuación a cada modelo. Al final el modelo que acumule mayor puntuación será aquél cuyas combinaciones de planos se repita más veces.

De esta manera, agregando las probabilidades de acertar con cada plano xy se determina el modelo que asignará finalmente las capas globales. Estas capas globales se codificarán en el nombre en los planos z xyzc como planos xyzcl. Con esta asignación hecha se procederá a crear planos xycl enfocados, es decir imágenes enfocadas por canal y capa global. Estas imágenes serán utilizadas para crear las susperimágenes finales.

Convertir posiciones xy ordinales a posiciones xy en píxeles

El programa da por hecho que los planos no se solapan sino que son consecutivos y ordinales. Es decir que las posiciones xy de los planos para el eje x serán 1,2,3...n, para los ejes y y z será igual. Las posiciones x e y a niveles de píxeles entonces dependerán del ancho y alto de las imágenes. Si tenemos en cuenta que el ancho (w) y alto (h) es el mismo en todas las imágenes, podemos obtener la posición xy a nivel de píxeles de cada plano. Si la posición xy ordinal esta compuesta por O_x y O_y , la posición de un plano será:

$$X=O_x*w$$

$$Y=O_y*h$$

Esta posición en píxeles será la utilizada para colocar los planos en la superimagen.

Crear superimágenes combinadas

Una vez se han asignado globalmente las capas se presenta al usuario al usuario una ventana en la que se le pregunta para qué canales, canales enfocados y combinaciones de canales quiere crear superimágenes. También deberá elegir un color para cada canal en caso de querer combinar estos.

Cuando se utiliza un solo canal las imágenes, estén coloreadas o no, corresponden a una escala de grises. Cuando se combinan varios canales como en las imágenes en color normalmente se utiliza un color para cada canal.

Cuando el usuario elige combinar canales, a las imágenes de los distintos canales se

les da un color y son combinadas en imágenes RGB. Estas imágenes RGB se colocan en sus posiciones pertinentes para formar una superimagen.

Crear *hyperstack* de superimágenes

En la parte de conceptos se definió lo que es un stack, hyperstack y virtualstack. En nuestro caso creamos un virtualstack, ya que se carga desde el disco duro, no la memoria RAM. Este virtualstack también será a su vez un hyperstack ya que muestra las imágenes con dos dimensiones seleccionables mediante un deslizador, la capa y el canal.

Al acabar de generarse las superimágenes y guardarse en el disco duro se genera el hyperstack mediante código. Este hyperstack se le presenta al usuario con sus capas y canales correspondientes.

A.3.5. CellFinder

A.3.5.1. Las partes del problema

Encontrar las células en la imagen

Contar manualmente

Definición: El usuario mira por el microscopio en tiempo real, en una salida por pantalla o las imágenes capturadas en el ordenador. El usuario va contando las células observadas.

Problemas:

- Se puede contar 2 veces la misma célula.
- Al usuario puede pasársele contar alguna célula.
- Es difícil comparar el criterio de distintos observadores.

Rendimiento:

- Las células claramente visibles se identifican bien
- La identificación de las células que no se diferencian bien del fondo dependen del usuario, luminosidad, pantalla, etc.

Marcando sobre imagen

Definición: En el ordenador se van marcando las células observadas sobre las imágenes guardadas.

Ventajas:

- Se mantiene el mismo rendimiento que a mano y se solucionan los problemas propios de la identificación manual.
- Permite la posterior determinación automatizada del contorno de las células marcadas.
- Permite educar la IA

Detección automática sin IA

Definición: El ordenador va encontrando automáticamente las células sobre las imágenes guardadas utilizando parámetros fijos.

- Depende de los parámetros seleccionados y de cómo rindan en esa imagen.
- Normalmente solo ofrecerá una respuesta lineal basada en uno o varios parámetros.
- Los parámetros deben introducirse a mano para mejorar la detección.
- Ahorra tiempo si se puede parametrizar correctamente.
- Encuentra más verdaderos positivos que una persona
- Encuentra más falsos positivos que una persona.
- Inicialmente, aunque más rápido, sin ningún aprendizaje puede mezclar positivas con negativas más de lo que lo haría una persona. Como las personas distingue mejor las que tienen mayor contraste. Según se establezcan los límites puede llegar a compartimentalizar una retina entera en regiones de forma celular, esto incluirá más positivos que los que detecta una persona pero también muchos más falsos positivos.

Detección automática sin IA con interfaz de corrección

Definición: El ordenador va encontrando automáticamente las células sobre las imágenes guardadas utilizando parámetros fijos. El usuario puede marcar las células encontradas automáticamente como negativas. El usuario puede marcar manualmente células para que sean añadidas.

- Permite eliminar manualmente los falsos positivos añadidos por la detección automatizada.

- Permite enseñar a la IA.

Detección automática con IA con interfaz de corrección

Definición: El ordenador va encontrando automáticamente las células sobre las imágenes guardadas utilizando inteligencia artificial. El usuario puede marcar las células encontradas automáticamente como negativas. El usuario puede marcar manualmente células para que sean añadidas. Marcar las células como negativas o añadir manualmente células se utiliza para educar la inteligencia artificial.

- Según se educa la IA, va identificando las reglas que el cerebro humano utiliza en la imagen para identificar la imagen según las variables medidas.

- Bien entrenado encontrará mejor que el humano las células positivas ya que tendrá un criterio estándar basado en medidas numéricas.

Detección automática con IA educada con interfaz de corrección

Definición: El ordenador va encontrando automáticamente las células sobre las imágenes guardadas utilizando inteligencia artificial. El usuario puede marcar las células encontradas automáticamente como negativas. El usuario puede marcar manualmente células para que sean añadidas. Marcar las células como negativas o añadir manualmente células se utiliza para educar la inteligencia artificial. La IA ya viene educada con tipos celulares.

- Se evita totalmente o parcialmente la necesidad de educar la IA.

Delimitar el contorno de las células

Delimitar manualmente en papel

Definición: El usuario mira por el microscopio en tiempo real, en una salida por pantalla o las imágenes capturadas en el ordenador. El usuario dibuja los contornos en un pliego de papel.

Ventaja:

- El cerebro puede realizar reconstrucciones morfológicas basadas en la forma y en su experiencia reconociendo objetos parecidos.

Desventaja:

- Si difiere muy poco del fondo, a ojo constará definir o encontrar el contorno ya que el hombre solo distingue 20 niveles de intensidad.

Problemas:

- La estimación a ojo de los contornos puede ser muy buena pero pierde su utilidad si no se fijan esas observaciones.

- Si no se fijan informáticamente perdemos gran capacidad para realizar medidas y la subsiguiente automatización.

- Sin registrarlo informáticamente la única posibilidad es recrearlo en papel, esto exige mucho tiempo y habilidad e introduce variabilidad.

Delimitar manualmente sobre imagen

Definición: En el ordenador el usuario va delimitando manualmente el contorno de las células sobre las imágenes con el ratón o una tableta gráfica.

Ventajas:

- Esta opción mantiene las ventajas de utilizar la capacidad del cerebro humano para realizar reconstrucciones morfológicas inteligentes y de utilizar su experiencia.

- Mantiene informatizado el borde para subsiguientes pasos informatizados.

- No requiere la habilidad de un dibujante basta con dibujar sobre la plantilla que es la imagen.

- Al hacerse sobre la imagen a modo de plantilla se mantiene gran fidelidad siempre que se atienda al detalle.

Desventajas:

- Puede requerir incluso más tiempo que el dibujo sobre papel. El dibujo sobre ordenador puede requerir más tiempo que el dibujo a mano alzada sobre papel.

- Si se realiza rápido se pierde la ventaja de la precisión del ojo y se introduce mucho error.

- Si no se realiza con suficiente aumento se introduce un error de varios píxeles al dibujar el borde.

- El cerebro presenta la ventaja de la reconstrucción inteligente, pero también puede introducir soluciones extrañas en algunos casos.

Delimitar manualmente sobre imagen con ajuste automático

Definición: En el ordenador el usuario va delimitando manualmente el contorno de las células sobre las imágenes de manera aproximada. El programa optimiza el ajuste de los contornos a la célula a nivel de píxel automáticamente.

Ventajas:

- Requiere bastante menos tiempo que la definición exacta a mano de los contornos.
- Puede ser más exacta a nivel de píxel que la definición manual sin ajuste.

Desventajas:

- Debe introducirse un parámetro que determina la distancia máxima del contorno definido manualmente al contorno encontrado por el ordenador. Si la distancia es muy corta el ordenador no encontrará el borde más óptimo, si es muy grande encontrará contornos que no son los que el usuario quería indicar.

- El algoritmo no entenderá las reconstrucciones morfológicas realizadas por el usuario, pudiendo introducir variables extrañas, limitando su compatibilidad con estos procesos inteligentes.

Variante:

- Se pueden añadir opciones más sofisticadas de tensiones y curvaturas para mantener las reconstrucciones morfológicas, pero esto puede añadir un grado importante de complejidad.

Detección automática sin IA

Definición: El ordenador determina una serie de contornos posibles para cada célula encontrada. De entre todos los contornos posibles el programa selecciona el contorno más óptimo utilizando parámetros fijos.

Ventajas:

- La detección automática es la opción más rápida.

- Si se da una combinación de parámetros correctos para esas células la detección será muy rápida y efectiva.

Desventajas:

- El funcionamiento dependerá de cómo se adecuen los parámetros a las células en esa imagen.

- Los parámetros deben ajustarse a mano

- Los parámetros normalmente discriminarán linealmente o por combinaciones lineales.

- Si el borde no es correcto el usuario no puede corregirlo, por ello solo es útil si la mayoría de los bordes seleccionados automáticamente son correctos o mayormente correctos. Esto es, que no presente grandes diferencias con el borde real.

Funcionamiento:

- Las células con malos bordes deben marcarse como descartadas para evitar introducir error. Debe comprobarse que las células marcadas como descartadas, no conformen una población en si misma, lo que podría alterar los resultados.

Detección automática sin IA con interfaz de selección

Definición: El ordenador determina una serie de contornos posibles para cada célula encontrada. De entre todos los contornos posibles el programa selecciona el contorno más óptimo utilizando parámetros fijos. Al usuario al seleccionar cada célula se le presenta un panel que contiene los posibles contornos para esa célula y el contorno seleccionado por el programa marcado. Si el usuario considera que otro contorno de los posibles es mejor lo puede seleccionar.

Variante:

- Al usuario además de ofrecérsele todos los contornos encontrados para cada célula se le ofrece una selección de los contornos más probables o interesantes para el usuario. La idea es ahorrarle tiempo al usuario si quiere elegir un contorno diferente al preseleccionado por el programa.

Ventajas:

- Normalmente entre los posibles contornos encontrados para un célula, especialmente entre la selección de más probables, se encontrará un contorno perfecto o muy cercano al real, convirtiendo esta opción en un buen equilibrio entre exactitud y tiempo requerido.

Funcionamiento:

- Aún después de presentarse todos los posibles contornos podría ser que alguna célula no presente ningún posible contorno suficientemente bueno. En este caso el usuario debe marcar la célula a descartar. En este proceso de descarte el usuario debe asegurarse de que las células descartadas no conformen una población en sí misma, lo que sesgaría el estudio.

- El programa ofrece busca un número mínimo de contornos posibles. No busca absolutamente todos los que podría encontrar para mantener un buen equilibrio entre las posibilidades que ofrece y el tiempo mínimo que tarde en ofrecerlos.

- El usuario puede pedir más contornos al seleccionar una célula si lo considera preciso.

Rendimiento:

- El tiempo total requerido dependerá de las siguientes variables:

- El número de células con contorno preseleccionado correcto elegido.

- El número de células con contorno preseleccionado incorrecto y con contorno correcto en la selección de contornos más probables.

- El número de células con contorno preseleccionado incorrecto, sin contorno correcto en la selección de contornos más probables y con contorno correcto entre el total de contornos encontrados.

- El número de células con contorno preseleccionado incorrecto, sin contorno correcto en el total de contornos encontrados inicialmente pero sí al pedir más contornos.

- El número de células con contorno preseleccionado incorrecto, sin contorno correcto en el total de contornos encontrados inicialmente y no aparece al pedir más contornos, requiere la corrección manual de algún contorno elegido.

Detección automática sin IA con interfaz de selección y corrección manual

Definición: El ordenador determina una serie de contornos posibles para cada célula encontrada. De entre todos los contornos posibles el programa selecciona el contorno más

óptimo utilizando parámetros fijos. Al usuario al seleccionar cada célula se le presenta un panel que contiene los posibles contornos para esa célula y el contorno seleccionado por el programa marcado. Si el usuario considera que otro contorno de los posibles es mejor lo puede seleccionar. Si ninguno de los contornos satisface al usuario puede seleccionar uno de los contornos posibles y modificarlo.

La inclusión de corrección manual ofrece:

- La posibilidad de corregir manualmente los contornos.

Ventajas:

- Esta opción permite alcanzar una identificación de contornos del 100% de corrección.

- Puede igualar al ojo humano e incluso superarlo al ofrecer resolución al nivel de pixel.

Desventajas:

- Se corrigen partes del contorno, por lo que la corrección es más rápida que dibujar todo el contorno, pero requiere más tiempo que seleccionar un contorno bueno.

Detección automática con IA con interfaz de selección y corrección manual

Definición: El ordenador determina una serie de contornos posibles para cada célula encontrada. De entre todos los contornos posibles el programa selecciona el contorno más óptimo utilizando IA. Al usuario al seleccionar cada célula se le presenta un panel que contiene los posibles contornos para esa célula y el contorno seleccionado por el programa marcado. Si el usuario considera que otro contorno de los posibles es mejor lo puede seleccionar. Estas selecciones del usuario se usan para educar la IA. Si ninguno de los contornos satisface al usuario puede seleccionar uno de los contornos posibles y modificarlo.

La inclusión de IA ofrece:

- Que los parámetros de selección de contornos en vez de ser fijos se ajusten por IA.

Ventajas:

- Inicialmente no responderá mejor que un modelo de parámetros fijos, pero según el usuario haga más correcciones aprenderá y conseguirá la mayor exactitud posible.

- Esta opción combina el 100% de máxima corrección con la mayor automatización

posible para una IA no educada.

Detección automática con IA educada con interfaz de selección y corrección manual

Definición: El ordenador determina una serie de contornos posibles para cada célula encontrada. De entre todos los contornos posibles el programa selecciona el contorno más óptimo utilizando IA. Al usuario al seleccionar cada célula se le presenta un panel que contiene los posibles contornos para esa célula y el contorno seleccionado por el programa marcado. Si el usuario considera que otro contorno de los posibles es mejor lo puede seleccionar. Estas selecciones del usuario se usan para educar la IA. Si ninguno de los contornos satisface al usuario puede seleccionar uno de los contornos posibles y modificarlo. La IA ya viene educada con tipos celulares y sus contornos óptimos y subóptimos.

La inclusión de IA educada ofrece:

- Que los parámetros de selección de contornos ya vengan en la y no requieran educación o requieran mucha menos educación IA.

Ventajas:

- Tiene en común con los parámetros fijos que ya vienen definidos de serie, pero en este caso ofrece combinaciones no lineales de gran complejidad.

- Responde de partida mucho mejor que una IA no educada.

- Esta opción combina el 100% de máxima corrección con la mayor automatización posible, un 100% de automatización si el tipo celular esta descrito en la educación de la IA.

Determinar las características de las células

Determinar subjectivamente

Definición: El usuario mira por el microscopio en tiempo real, en una salida por pantalla o las imágenes capturadas en el ordenador y realiza apreciaciones subjetivas sobre cada célula que encuentra.

Ventajas:

- Puede ser más rápido cuando hay que realizar pocas observaciones.

- No requiere equipo informático ni conocimientos técnicos sobre como utilizar este o sus herramientas.

Desventajas:

- Las apreciaciones solo pueden ser cualitativas.
- Las observaciones son subjetivas, dependen del usuario, momento, iluminación, etc.
- Se limita a aquellas apariciones o medidas que se puedan realizar nuestro ojo-cerebro y a su límite de precisión.
- No tiene ningún grado de estandarización o automatización.

Determinar manualmente con herramientas sobre la imagen

Definición: El usuario utiliza herramientas sencillas en el ordenador para tomar medidas manualmente sobre las imágenes.

Funcionamiento:

- El usuario se ayuda de reglas o escalas de color para realizar medidas sobre la imagen.

Ventajas:

- Permite alguna medida cuantitativa utilizando instrumentos básicos.
- Si hay alguna apreciación que no se pueda automatizar pero sí ayudarse de instrumentos esta es una buena opción.
- No requiere una búsqueda previa del contorno.

Desventajas:

- Se ve limitado a las medidas básicas que pueda realizar con esos instrumentos y a las apreciaciones cualitativas.
- Al interaccionar el usuario con las herramientas se pierde precisión en estas.
- Realizar estas medidas manejando las herramientas puede requerir mucho tiempo.
- Puede faltar estandarización de las medidas.

Medición automatizada

Definición: El ordenador realiza medidas automáticamente de cada célula con

contorno definido.

Funcionamiento:

- Es recomendable conocer el significado de cada variable medida. En algún caso no es fácil comprender algunas variables como “Las Invariantes de Hu”, que son muy útiles para diferenciar tipos celulares.

- Esta opción ofrece muchos datos, pero es necesario encontrarle el sentido a estos datos.

Ventajas:

- Las medidas están completamente estandarizadas y automatizadas.

- Permite una amplísima variedad de medidas y descriptores de la forma de la célula y de la variación de intensidad en la célula, que no es posible realizar a mano.

- El usuario puede crear sus propias variables, como el ratio entre dos colores.

- Mediante aproximaciones de *Data Mining* se pueden obtener patrones o reglas que no se descifran a primera vista.

- No requiere prácticamente tiempo y es fiable.

Desventajas:

- El posterior análisis requiere al usuario elegir las variables a estudiar si faltan grados de libertad. Esto es si existen pocas células medidas para el número de células.

- Las variables redundantes o aquellas que mantengan relación lineal con otras deben retirarse o combinarse. Esto requiere la aplicación de técnicas estadísticas de reducción de factores o componentes que pueden requerir conocimientos técnicos estadísticos o su automatización.

- Tener muchas variables de entrada no es bueno para la inteligencia artificial por lo que deben reducirse o seleccionarse. Este proceso puede requerir de la exploración de datos.

Medición automatizada con reducción de dimensiones

Definición: El ordenador realiza medidas automáticamente de cada célula con contorno definido. El programa detecta automáticamente las variables redundantes y las agrupa.

Ventajas:

- Este proceso facilita la comprensión de los datos y su aplicación a IA.

Desventajas:

- El agrupamiento y reducción de variables se realiza en base a estadística, no a conocimientos del usuario.

Medición automatizada con reducción de dimensiones con agrupamiento y ordenamiento manual de variables

Definición: El ordenador realiza medidas automáticamente de cada célula con contorno definido. El usuario agrupa las variables relacionadas o redundantes en un panel, las ordenarlas por importancia o seleccionar aquellas a utilizar. El programa detecta automáticamente otras variables redundantes y las agrupa.

Ventajas:

- El agrupamiento y reducción de variables se realiza en base a estadística y a conocimientos del usuario.
- La IA utiliza parte de los conocimientos del usuario.

Desventajas:

- Requiere interacción por parte del usuario.

Variante:

- El programa conoce diversas variables y las muestra agrupadas de serie.

Clasificar las células

Clasificar subjetivamente a mano

Definición: El usuario mira por el microscopio en tiempo real, en una salida por pantalla o las imágenes capturadas en el ordenador. El usuario asigna subjetivamente cada célula que observa a un tipo celular y cuenta cuantas células pertenecen a cada tipo.

Ventajas:

- No requiere métodos informáticos.
- Si los tipos son claramente diferenciables y el criterio se demuestra estable entre varios investigadores esta puede ser una solución rápida para contar número de células de distintos tipos.
- Puede basarse en medidas difícilmente automatizables.

Desventajas:

- Es muy subjetivo. Si los tipos celulares no son claramente separables entre sí a ojo o del fondo la valoración de cada usuario en cada momento puede variar mucho.
- No permite obtener otras medidas informatizadas de las células.
- No permite encontrar patrones ocultos de las poblaciones celulares.
- Otro usuario no puede cotejar o cambiar la clasificación.

Etiquetado subjetivamente sobre imagen

Definición: El usuario mira por el microscopio en tiempo real, en una salida por pantalla o las imágenes capturadas en el ordenador. El usuario asigna subjetivamente cada célula que observa a un tipo celular y la marca según su tipo en la imagen.

Respecto a clasificación subjetiva a mano:

Ventajas:

- Otro usuario o el mismo puede analizar la clasificación
- Permite identificar las células en tipos celulares y realizar medidas en base a estos.
- Permite realizar una búsqueda automática refinada por tipo celular.
- Permite alimentar métodos de IA.

Clasificar por clustering a posteriori

Definición: Al acabarse de encontrar las células y sus bordes se utilizan sus medidas para detectar *clusters*. Los *clusters* se detectan para variables individuales y variables agrupadas no redundantes. Las células son categorizadas según el *cluster* al que pertenecen y las variables implicadas.

Funcionamiento:

- Los *clusters* pueden corresponder a tipo o subtipos celulares.
- Se pueden contrastar los grupos encontrados con los descritos en la literatura.
- Los *clusters* son determinados por algún software como SPSS, SAS o R.

Ventajas:

- Los tipos celulares y las características significativas que los determinan son identificadas automáticamente, evitando subjetividad.
- Se pueden encontrar grupos, clasificaciones o variables que habían pasado

desapercibidas para el usuario.

- Si no vemos los resultados hasta el final tenemos menos probabilidades de influir en ellos, por ejemplo, descartando células dudosas.

Desventajas:

- El usuario puede tener que seleccionar las variables a utilizar o reducir el número de variables por análisis de componentes o factorial.

- Si se realiza offline, o sea al final de del proceso, no sabemos en tiempo real cual va siendo el resultado a no ser que exportemos continuamente los resultados de CellFinder y los comprobemos.

Clasificar por clustering en tiempo real

Definición: Mientras se encuentran las células y sus bordes se utilizan sus medidas para detectar *clusters*. Los *clusters* se detectan para variables individuales y variables agrupadas no redundantes. Las células son categorizadas según el cluster al que pertenecen, las variables implicadas y la ronda de clustering.

Respecto a clustering a posteriori:

Ventajas:

- No se requiere un software externo ni saber cómo se utiliza.
- El usuario puede observar los resultados según progresa el análisis.

Desventajas:

- El usuario puede ser menos imparcial al conocer los resultados antes de finalizar el análisis.

Clasificar por IA de etiquetado

Definición: El usuario asigna subjetivamente cada célula que observa a un tipo celular y la marca según su tipo en la imagen. Con esta información se educa la inteligencia artificial. La inteligencia artificial asigna a los células encontradas automáticamente, o sin tipo asignado, un tipo celular y una probabilidad de pertenecer a cada tipo.

Ventajas:

- Permite asignar las células encontradas automáticamente a un grupo.
- Permite al usuario señalar células sin asignarlas a un tipo y que este les sea

asignado automáticamente.

- Permite buscar automáticamente tipos celulares en la imagen.

Desventajas:

- La asignación automática de los tipos celulares puede presentar errores.

Clasificar por combinación de IA y clustering

Definición: El usuario asigna subjetivamente cada célula que observa a un tipo celular y la marca según su tipo en la imagen. Con esta información se educa la inteligencia artificial. A la vez se calculan *clusters* en tiempo real. Los *clusters* son asociadas a los tipos celulares asignados por el usuario. La pertenencia de una célula sin tipo a un cluster sirve para asignarle el tipo celular asociado a ese cluster y la probabilidad de pertenencia cada tipo.

Ventajas:

- Permite identificar los *clusters* descubiertos con los tipos asignados por el usuario.
- Permite juntar varios *clusters* en un tipo celular como subtipos celulares.
- Permite identificar varios tipos celulares en un cluster.

Desventajas:

- Puede ser complicado de representar e interpretar.

Clasificar por IA de etiquetado educada

Definición: El usuario asigna subjetivamente cada célula que observa a un tipo celular y la marca según su tipo en la imagen. Con esta información se educa la inteligencia artificial. La inteligencia artificial asigna a las células encontradas automáticamente, o sin tipo asignado, un tipo celular y una probabilidad de pertenecer a cada tipo. La IA ya viene educada con tipos celulares, sus contornos óptimos y subóptimos.

Ventajas:

- Extiende la funcionalidad del programa a varios tipos y clasificaciones celulares

Desventajas:

- Requiere que el usuario de muestras de cada tipo.

A.3.5.2. Las versiones de CellFinder

A.3.5.2.1. CellFinder v0.1

Resumen

La primera versión de *CellFinder* surgió de una manera un tanto fortuita: buscando una manera de aumentar el contraste de las células. Ya que las células tenían distintos niveles de intensidad, decidí umbralar la imagen con distintos niveles de intensidad. Al buscar en estas imágenes objetos de un tamaño determinado, el resultado fue en vez de un algoritmo de aumento de contraste un algoritmo de detección de objetos.

Tras observar la funcionalidad de este algoritmo decidí añadirle una vuelta de tuerca más. Para cada imagen umbralada realizar varias transformaciones y buscar objetos sobre ellas también.

Los objetos encontrados los iba sumando a una Imagen de Suma de objetos. Después de esta imagen se sustraen las células empezando por los niveles de intensidad más altos. Esto equivale a retirar primero los objetos que se encontraban más veces, con más niveles de grises y transformaciones. Esta solución relativamente elegante no estaba libre de problemas, principalmente relacionados con la detección de algunos contornos.

Además para manejar grandes imágenes como las Superimágenes de retinas el software lo que hace es trabajar por cuadrantes y luego poner en concordancia el trabajo en todos los cuadrantes.

El resultado final es la división de la imagen en secciones de un tamaño aproximado al de la célula. Aunque resultaba llamativo el dividir una retina en las secciones más probables del tamaño de una célula aparecían 2 problemas:

1) Al encontrar las células. A nosotros no nos interesan 200.000 posibles células. Sino las 2.000 células que podemos confirmar visualmente marcadas. Esto se solventó en CellFinder v0.2.

2) Los parámetros para seleccionar el contorno se encuentran en el código. Esto se solventó en CellFinder v0.2.

3) El contorno de las células en algún caso no eran correctos y no había manera de corregirlo. Esto se solventó en CellFinder v0.3.

A la hora de explicar esta versión aprovechamos para introducir unas

funcionalidades básicas de ImageJ que son invocables mediante macro y que utilizamos en nuestro software.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Detección automática sin IA

Delimitar el contorno de las células: Detección automática sin IA

Determinar las características de las células: Medición automatizada

Clasificar las células: Clasificar por clustering a posteriori

Estructura

Estructura resumida:

- 1) El usuario elige un diámetro celular
- 2) El usuario abre la imagen a analizar
- 3) El software localiza automáticamente objetos
- 4) El software elige automáticamente un objeto de varios objetos concéntricos
- 5) El software produce las medidas finales al acabar el proceso
- 6) El usuario analiza las medidas y clasifica las células

Estructura detallada:

- 1) El usuario elige una imagen y diámetro celular
- 2) El programa selecciona cuadrantes de la imagen.
Para cada cuadrante se van realizando las operaciones 3-12.
- 3) Se crea una Imagen de Suma de objetos.
- 4) Se calcula la frecuencia de aparición de cada intensidad de píxel en la región.
- 5) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.

Para cada umbral se realizan los pasos 6-12.

- 6) Se convierte la región a binario con ese umbral.

Para cada imagen binaria se realizan los pasos 7-12.

- 7) Se buscan objetos en la imagen umbralada
- 8) Se suman los objetos detectados en la imagen umbralada a la imagen de acumulación.

Para cada modificación (como *watershed* y *despeckling*) se realizan los pasos 10-12:

- 9) Se duplica la imagen umbralada
- 10) Se somete la imagen a la modificación.
- 11) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.
- 12) Se suman los objetos detectados en la imagen modificada a la Imagen de Suma.
- 13) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide qué objetos encontrados son contornos de una misma célula utilizando la imagen de suma de objetos en los pasos 14-19.

14) Se crea una imagen Resultado.

Para cada intensidad de la Imagen de Suma de objetos, empezando por la intensidad más alta:

- 15) Se duplica la Imagen de Suma.
- 16) Se buscan objetos en la imagen duplicada con el tamaño deseado.
- 17) Se añaden los objetos encontrados a la imagen resultado.
- 18) Se eliminan los objetos encontrados de la Imagen de Suma.
- 19) La imagen Resultado contiene las máscaras de las células encontradas.
- 20) Se mide sobre la imagen original con las máscaras de las células encontradas generando una tabla de medidas.
- 21) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

Célula

Una célula en el contexto de CellFinder, es cada una de las entidades que podemos observar en una imagen, cada conjunto de píxeles, que podemos reconocer como célula.

En un problema de Reconocimiento de Objetos orientado a Biología Celular, los objetos a encontrar serán las células. Por ello nuestro objetivo es encontrar unos objetos pero para que resulte más intuitivo se habla de células. En ocasiones es posible que se intercambien los términos Célula y Objeto, pero en nuestro contexto nos estaremos refiriendo a lo mismo.

Objeto

Como acabamos de decir en nuestro contexto de Biología Celular, usamos

indiferentemente los conceptos célula y objeto. Una definición más concreta de lo que es un objeto en una imagen sería un conjunto de píxeles conexos que el observador o el ordenador son capaces de entender como una entidad única. Un objeto en general será una entidad, un ítem que podamos identificar en una imagen. En una imagen los objetos normalmente vienen descritos por una máscara o ROI que contiene sus píxeles. Los ROIs se suelen representar como el borde o contorno del objeto, mientras que la máscara incluye todos los píxeles internos, no solo los del borde. El concepto ROI se encuentra explicada en más profundidad entre los conceptos de *Circadian Control Center*.

Contorno

Un contorno es el límite de un objeto o célula. Este límite se puede definir como un conjunto de píxeles que crean un conjunto cerrado, como es un ROI.

Posibles contornos

Al analizar visualmente una célula normalmente determinamos visualmente su límite o contorno. Cuando no tenemos tan claro cuál es su contorno. Esto es cuando no tenemos completamente clara la forma del objeto, sino que consideramos más de una forma posible, estamos considerando posibles contornos. Esto es muy común si los límites de un objeto no están claramente definidos en alguna zona respecto del fondo o si presenta formas extrañas. El ordenador también puede encontrar posibles contornos. Si por ejemplo como hace nuestro software busca contornos en distintos niveles de gris es muy probable que encuentre varios candidatos.

De esta manera los posibles contornos de una célula es la colección de contornos candidatos para definirla.

Contorno elegido

Cuando tenemos una colección de posibles contornos para una célula, de cara a realizar medidas y describir esa célula, debemos de determinar un contorno fijo para la célula. Este contorno fijo para la célula será el contorno elegido de los posibles contornos. Este contorno elegido puede determinarlo automáticamente el ordenador, determinarlo el usuario o determinarlo el ordenador y después confirmarlo o corregirlo el usuario. En el

caso de CellFinder v0.1 lo determina el ordenador y permanece inmutable. A partir de CellFinder v0.3 el ordenador determina el contorno y luego el usuario puede corregirlo. Hasta CellFinder v0.3 el criterio usado por el ordenador para elegir contorno es fijo, a partir de CellFinder v0.4 aprende de las preferencias del usuario mediante IA.

Medida de una célula

Cuando tenemos elegido un contorno para una célula podemos realizar medidas del objeto. Estas medidas definirán nuestro objeto. Las medidas se referirán a su posición, a las características de su forma o contorno y a la distribución de intensidades dentro del objeto. Un ejemplo de posición puede ser el centro del objeto en xyz. Un ejemplo de su forma su circularidad o tamaño. Un ejemplo de las intensidades internas, la mediana de intensidad de la célula.

Línea de medidas

Una línea de medidas de una célula contiene los valores obtenidos en una serie de variables o medidas sobre una célula concreta, junto con una etiqueta identificadora de esa célula.

Un ejemplo de línea sería:

Nombre: Cell1232; Borde: Bord3; Posición X: 230; Posición Y: 519; Posición Z: 3; Circularidad: 0.834; Área: 57; Intensidad Media: 103;

Tabla de medidas de células

Una tabla de medidas de células es un conjunto de líneas de medida para el contorno elegido de esas células. Esto es, las medidas obtenidas tomando el contorno elegido de esas células.

Un ejemplo de una parte de una tabla de medidas de células:

Nombre: Cell1232; Borde: Bord3; Posición X: 228; Posición Y: 520; Posición Z: 3; Circularidad: 0.834; Área: 57; Intensidad Media: 103;

Nombre: Cell1233; Borde: Bord1; Posición X: 237; Posición Y: 599; Posición Z: 3; Circularidad: 0.754; Área: 60; Intensidad Media: 134;

Nombre: Cell1234; Borde: Bord7; Posición X: 250; Posición Y: 594; Posición Z: 3;

Circularidad: 0.790; Área: 55; Intensidad Media: 121;

Operaciones morfológicas (Modificaciones)

Las operaciones o modificaciones morfológicas permiten cuantificar aspectos geométricos de la imagen intentando concordar con la reconstrucción que hace la mente de las formas.

Las reconstrucciones se aplican con más facilidad sobre imágenes binarias que sobre imágenes en escala de grises.

Dentro de estas operaciones se encuentran las operaciones de Cierre, Watershed y Despeckling.

Funcionalidades en imageJ

Umbralado

El umbralado o *thresholding* en inglés consiste en convertir una imagen con múltiples niveles de gris o color a imagen binaria, es decir a solo dos niveles. Para ello primero se elige un valor o nivel límite dentro de los niveles que abarca la imagen. Una vez elegido este valor umbral o threshold se convierten todos los píxeles que tengan un valor igual o mayor al umbral en 1 y los que tengan un valor menor al umbral en 0.

Esta operación se suele realizar porque así reducimos la dimensión intensidad a un solo bit, 0 o 1, con lo que es mucho más fácil implementar reglas lógicas y matemáticas con los píxeles. Este proceso también se conoce como binarizar. La operación binarizar una imagen se invoca mediante el comando “binarize” en el lenguaje de macros de ImageJ.

Un ejemplo de binarización de una imagen de 4 píxeles con 256 niveles(8bits), con el umbral en 80:

Im(8): 30,80,200,0->Im(1):0,1,1,0

Cierre

La operación de Cierre permite juntar dos o más regiones binarias en una región según variables geométricas básicas.

Esta operación realiza una operación de dilatación seguida de una operación de erosión. Esto suaviza los objetos y rellena pequeños agujeros. La operación de dilatación añade un píxel a los bordes de un objeto, la operación de erosión retira un píxel del borde

de los objetos.

En nuestro caso la operación de Cierre puede ser útil para rellenar un segmento de una célula, que completa o cierra su forma. La operación de cierre en una imagen binaria se invoca mediante el comando “close” en el lenguaje de macros de ImageJ.

Watershed

La operación de *watershed*, que en inglés significa línea o punto de corte, permite segmentar una región binaria en distintas regiones según variables geométricas para que sea interpretada como una superficie topográfica. Mediante la búsqueda de la continuidad de entre líneas superficiales el watershed da lugar a regiones cerradas y aisladas de origen geométrico. En este proceso hay que tener con que no se produzca sobresegmentación.

En nuestro caso la operación de Watershed puede ser útil para separar 2 células que aparezcan pegadas o con solapamiento en la imagen. La operación de watershed en una imagen binaria se invoca mediante el comando “*watershed*” en el lenguaje de macros de ImageJ.

Despeckle

La operación de *despeckle*, viene del inglés que equivale a peca o manchita. El proceso de despeckling consiste en eliminar estas pecas o manchitas que puedan aparecer en nuestra imagen. Es una técnica de eliminación de ruido. El proceso de *despeckling* estima cierto tamaño de partículas que parecen repetitivas y las elimina mediante un proceso de suavizado de la imagen.

En nuestro caso la operación de Despeckle puede ser útil para eliminar el ruido que aparece en la imagen. La operación despeckle en una imagen binaria se invoca mediante el comando “*despeckle*” en el lenguaje de macros de ImageJ.

Buscar partículas

La búsqueda de objetos o partículas en una imagen binaria consiste en encontrar las regiones aisladas presentes en la imagen. Estas regiones se caracterizarán por estar formadas todas por píxeles con valor 1 y su contorno estar rodeado por píxeles de valor 0.

Normalmente como se detectan estas regiones es buscando ordenadamente en la imagen un píxel con valor 1 que sirve como semilla. Desde esa semilla la región va creciendo con todos los píxels vecinos que tengan valor 1 durante varios ciclos hasta que no se añade ningún píxel a la región. El resultado de realizar esta operación en una imagen es identificar una serie de regiones individuales y los píxeles que las componen. Las regiones se reconocen por un identificador y los píxeles que las componen mediante un ROI o una máscara.

En nuestro caso la operación de buscar partículas es la utilizada para encontrar los objetos en cada imagen binaria. La operación buscar partículas en una imagen binaria se invoca mediante el comando “Particle Analyzer” en el lenguaje de macros de ImageJ.

Medida de una célula

Cuando hablamos del proceso de medir una célula en realizar nos referimos a medir diversos parámetros de la célula. Cada una de estas medidas procederá de un algoritmo particular que actúa sobre la célula. En ImageJ se puede realizar una batería de medidas con el comando “Measure”. Además de estas medidas se pueden realizar otras personalizadas o procedentes de otros macros o plugins. Cuando hablamos de medir un célula célula hablamos de ejecutar “Measure” sobre una célula el cual producirá una lista de valores para cada variable medida (posición, tamaño, intensidad media, etc).

Umbralado multinivel

El umbralado a un solo nivel convierte los píxeles por encima o iguales a un umbral en 1 y los que están por debajo en 0. En nuestro caso nos encontramos con que nuestras células presentan distintos niveles de expresión de la proteína y aparecen en un fondo variable. Al intentar aplicar un solo umbral el resultado no es satisfactorio. Si se aplica un umbral alto las células más oscuras se disciernen bien pero las células más claras dejan de discernirse y se convierten en fondo. Si se aplica un umbral bajo lo que ocurre es que aparecen las células más claras pero también aparece gran parte del fondo y tapa muchas células. De esta manera un solo umbral no es satisfactorio.

Si utilizamos 2 umbrales uno para las células claras y otro para las células oscuras mejoran los resultados, pero el resultado sigue sin ser satisfactorio. La razón es que las

células claras y oscuras en realidad cubren un amplio rango de escalas de grises entre ellas y los niveles del fondo de imagen también cubren una variedad de escalas de grises. Esto a su vez invalida cualquier opción de elegir arbitrariamente cualquier combinación fija de umbrales.

Si se piensa despacio, se llega a la conclusión de que lo más apropiado sería tener un umbral para cada célula. Este umbral tendría el valor justo para dejar la célula por encima y el fondo por detrás. De esta idea surge el umbralado multinivel. Ahora bien, en nuestra imagen no hemos detectado todavía ninguna célula, entonces como elegimos los umbrales apropiados para las distintas células. De la selección de estos umbrales se encarga el siguiente apartado.

Detectar los niveles a umbralar

Como se acaba de mencionar la opción más viable para detectar células de niveles de intensidad variable en fondo variable es utilizar varios umbrales. Pero cómo seleccionar esos niveles si no existe ningún ejemplo de célula para el programa ya es diferente. En ausencia de esta información optamos por una aproximación estadística que probó ser de gran utilidad. Para ello tomamos el histograma de la imagen. Esto es contar el número de píxeles de la imagen que se encuentran en cada uno de los niveles de gris. Con esta información en mano el programa busca un número de puntos de corte o umbrales, por ejemplo 20 en la escala de grises. Estos umbrales se eligen de manera que entre cada par de umbrales queden dentro de lo posible cantidades equivalentes de píxeles del histograma. Esta opción hace que cada umbral tenga una importancia significativa, ya que implicará un cambio respetable en los píxeles que quedan por encima y por debajo del umbral entre cada par de umbrales. Esto aumenta la probabilidad de dar con el umbral correcto para cada célula.

Por ejemplo, si usásemos esta técnica, sino simplemente asignar 8 umbrales equidistantes en la escala de grises sobre 256 niveles tendríamos siempre:

31, 63, 95, 127, 159, 191, 223, 255

Sin embargo con nuestra técnica tendríamos una distribución que variará para adaptarse a la imagen.

Si la imagen tiene una forma normal, con valores centrales predominantes:

70, 100, 120, 130, 135, 140, 180, 230

Si la imagen está saturada:

100, 160, 200, 230, 242, 248, 252, 255

Si la imagen está muy clara:

0, 5, 10, 20, 40, 60, 100, 180

Ahora, si presenta varios picos probablemente se entienda mejor con más valores pongamos 16:

Si la imagen tiene parte muy clara y parte saturada, formará tendrá forma hiperbólica en sus extremos:

0, 3, 6, 12, 20, 40, 60, 100, 160, 200, 230, 238, 245, 250, 253, 255

Si está saturada y presenta un máximo local cerca de la zona media:

0, 70, 90, 100, 105, 107, 110, 125, 150, 200, 230, 238, 245, 250, 253, 255

Si la imagen es muy clara y presenta un máximo local cerca de la zona media:

0, 3, 6, 12, 20, 40, 70, 90, 100, 105, 107, 110, 125, 150, 190, 255

Un caso muy común es que la imagen tenga zonas saturadas o muy oscuras, zonas claras correspondientes a ausencia de tejido y zonas medias con forma normal con un pico local con marcaje sin saturar:

0, 4, 8, 16, 50, 90, 130, 140, 144, 147, 150, 190, 224, 240, 250, 255

Como se puede ver, en aquellos niveles en los que hay más píxeles se realizan más divisiones, esto permite optimizar el rendimiento de los niveles de umbralado.

Detectar los niveles a umbralar local y globalmente

Inicialmente, la lógica nos decía que la mejor opción sería detectar los niveles de grises en las distintas zonas en las que se realizaría detección y usar estos valores como umbrales. Esto presenta una ventaja y una desventaja. La ventaja es que si la distribución de intensidades es similar en toda la zona se obtiene una buena selección de umbrales para nuestros intereses, por ejemplo en las zonas centrales del tejido. La desventaja es que si la distribución en la zona no es homogénea la mayor parte de los umbrales pueden centrarse en unos valores que no nos resultan de utilidad. Un ejemplo, tenemos un zona del borde del tejido, más de la mitad es zona clara, ya que no hay tejido, esta zona clara atraerá la mayoría de los umbrales, por lo que nos quedaremos sin umbrales en el rango que nos

interesa, el del tejido.

Para evitar este problema optamos por una solución híbrida. Por un lado calculamos los niveles de umbralado óptimos para cada zona, ya que ofrecen la mejor resolución en zonas homogéneas. Por otro calculamos los niveles para toda la muestra. En toda la muestra, el tejido tendrá un papel central, por lo que no se verá oscurecido por zonas claras o saturadas. Los umbrales finales usados en cada zona será una combinación de los umbrales calculados globalmente y los umbrales calculados localmente.

En muchas zonas los umbrales calculados globalmente y localmente pueden solaparse o ser muy cercanos, para evitar reincidir en umbrales muy cercanos que aportan poca información se calculan los umbrales locales en función de los umbrales globales. De esta manera el objetivo de los umbrales locales es identificar en esa zona los mayores espacios en esos umbrales globales, los pares de umbrales globales que acogen mayor cantidad de píxeles y crear umbrales entre ellos.

Ordenar los niveles de umbralado

En muchos casos queremos testear solo un número variable de umbrales y queremos saber cuáles serán los más informativos. Para ello lo que hacemos es ir calculando los umbrales de manera progresiva respecto al histograma. Primero se calcula un umbral que divide el número de píxeles en dos grupos con la mayor similitud posible en la cantidad de píxeles de ambos grupos. A continuación se busca el mejor umbral para separar en dos alguno de los dos grupos resultantes del primer umbral, y así hasta calcular un número determinado de umbrales, 40 por ejemplo. Esto genera una lista ordenada de umbrales de mayor a menor capacidad de discernir teniendo en cuenta que se hayan aplicado los umbrales precedentes.

Al combinar este ordenamiento de niveles de umbralado con la selección de umbrales locales y globales damos al sistema de umbralado precisión y flexibilidad.

El orden de umbrales determinado será el orden en que se obtengan los umbrales de las células. Si se piden 20 umbrales se realizará el umbralado de los 20 primeros en esta lista ordenada.

Umbralado multinivel con modificaciones morfológicas

Muchas veces puede ocurrir que al detectar células visualmente consciente o inconscientemente no nos guiamos solo por su intensidad sino que también realicemos determinadas reconstrucciones morfológicas. Al realizar estas reconstrucciones lo que hacemos es completar la forma de un objeto en nuestro cerebro. Por ejemplo si una pequeña zona de una célula no aparece marcada nuestro cerebro rellena el espacio. Si vemos ruido de fondo que se entrecruza con nuestros objetos el cerebro lo retirará. De igual manera si solo queremos detectar los somas de las células nuestro cerebro retirará los salientes como axones y dendritas. Estas modificaciones se pueden recrear a nivel de análisis de imagen. Completar una forma corresponde a la modificación de cerrado, retirar ruido despeckle y separar salientes o partes watershed.

En CellFinder se buscan objetos con cada umbral, pero no solo eso. A su vez con cada umbral se realizan estas modificaciones morfológicas y se buscan objetos para ellas. De esta manera no solo se cubre los diferentes niveles de intensidad de las células y el fondo, sino también las operaciones morfológicas más frecuentes que puede realizar el cerebro.

Si tenemos 20 umbrales y utilizamos las 3 modificaciones, se buscarán objetos con 80 combinaciones:

20 sin modificar

20 con *despeckle*

20 con *watershed*

20 con cerrado

Además se pueden combinar generando 80 combinaciones más:

20 *despeckle+watershed*

20 *despeckle+cerrado*

20 *watershed+cerrado*

20 *despeckle+watershed+cerrado*

Incluso se podrían generar más combinaciones alterando el orden en que se combinan, pero preferimos evitar añadir este grado de complejidad, porque no parece mejorar los resultados lo suficiente para incluirlas. Esto no significa que esta posibilidad no se puede tener en cuenta, igual que añadir otra serie de modificaciones. Algo que se hará en versiones posteriores de CellFinder al añadir el operador de Canny de reconstrucción de

bordes.

Agregado de objetos en la Imagen de Suma

Tras realizarse cada umbralado y su modificación morfológica se realiza el proceso de búsqueda de partículas. Para ello se tiene en cuenta el diámetro de las células. Este diámetro, en píxeles, es introducido por el usuario en una ventana de dialogo. Solo se incluirán aquellas partículas con una cierta desviación de este diámetro.

Los distintos objetos encontrados en cada umbral y modificación deben ser guardados con su posición en la imagen. De esta manera se pueden considerar los distintos umbrales concéntricos como contornos de un mismo objeto. Para ello se crea una imagen con todos los píxeles a valor cero llamada “Imagen de Suma” del tamaño de la zona a muestrear. En esta imagen se van superponiendo o sumando los objetos encontrados. Cada píxel de un objeto se sube en un nivel sobre 256 en la Imagen de Suma. El resultado es que cada vez que se encuentra un píxel en un objeto sube un nivel. De esta manera los objetos que más aparezcan en los distintos umbrales tendrán valores más altos.

Esta imagen de suma tendrá todos los objetos encontrados con los distintos umbrales y modificaciones morfológicas. Estos objetos en realidad serán todos los contornos posibles de una serie de células.

Extraer células de la Imagen de Suma y componer la Imagen Resultado

En la imagen de suma tenemos todos los objetos detectados en los umbrales. Entre estos objetos queremos considerar los objetos concéntricos como contornos de una misma célula.

Para ello se crea una Imagen Resultado con todos los píxeles a cero en la que se acumularán los objetos definitivos, que serán las células con sus contornos definitivos. Una vez tenemos la Imagen Resultado se calcula el histograma de la imagen. A continuación se umbrala la Imagen de Suma para cada nivel del histograma que tenga algún representante. Se empieza umbralando para los niveles más altos. Cada vez que se encuentra un objeto en la Imagen de Suma se añade el objeto a la Imagen Resultado y se resta el objeto de la Imagen de Suma. Al empezar por los objetos con niveles más altos estamos escogiendo aquellos objetos que aparecen con más umbrales y por lo tanto tienen más probabilidades

de ser los perfiles correctos. A su vez al restar los objetos de la Imagen de Suma se evita que una misma célula sea encontrada dos veces.

El resultado de estos algoritmos suele ser que la práctica totalidad del tejido se divide en zonas cuyo diámetro es similar al elegido por el usuario.

Este mecanismo de suma de objetos en la Imagen de Suma y posterior extracción en forma de células se cambia por un mecanismo distinto en siguientes versiones de CellFinder. En versiones posteriores se consideran otros parámetros que solo el área de las células procedentes de la medida de los objetos.

Recorrer la imagen por cuadrantes

Cuando se quiere analizar una imagen de gran tamaño o limitar el uso de memoria RAM la imagen debe de analizarse por zonas.

Para ello se seleccionan zonas cuyo ancho y alto es diez veces el diámetro de las células. En estas zonas se realiza todo el proceso de selección de umbrales, umbralado, modificación, búsqueda de partículas y extracción de células.

Para evitar efectos de corte de células que toquen el borde de la zona se eliminan aquellas células que se encuentren a menos de dos veces el diámetro de las células del borde de la zona. Las zonas se van tomando con solapamiento, de manera que el resultado final cubra toda el área original de la imagen sin que ningún objeto toque los bordes. Se puede ver como una ventana móvil que se va desplazando por la imagen buscando células.

Generar las medidas de las células

Una vez se divide la retina o tejido en células se ejecuta el comando de medida. Este comando obtiene una serie de valores para diversas variables para cada célula, que serán las medidas de una célula. Para cada célula se generará una línea de medidas. Las líneas de medida de las distintas células conforman la tabla de medidas de células que es guardada. Esta tabla de medidas se guarda para que pueda ser utilizada por el usuario.

A.3.5.2.2.CellFinder v0.2

Resumen

CellFinder v0.2. tenía como objetivo solventar un problema de CellFinder v0.1.

consistente en que encontraba demasiadas células. Queríamos limitar la medición a aquellas células que pudiésemos confirmar visualmente. Para ello decidimos modificar el método de detección de células. Mientras que en CellFinder v0.1 se detectaban todas las células posibles ahora solo buscamos las células marcadas por el usuario. Así el usuario utilizando un plugin de terceros: CellCounter, marca encima de la imagen con un punto cada célula.

Además se cambia el método en que se eligen los contornos. Ahora se realiza en base a las medidas de los objetos que corresponden a cada contorno. El usuario determina arbitrariamente qué parámetros y en qué medida aportan información para seleccionar el mejor contorno. Además se desarrolló un parámetro, la calidad del borde, de gran utilidad para seleccionar los mejores contornos.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Marcando sobre imagen

Delimitar el contorno de las células: Detección automática sin IA

Determinar las características de las células: Medición automatizada

Clasificar las células: Clasificar por clustering a posteriori

Estructura

Estructura resumida:

- 1) El usuario marca las células en CellCounter
- 2) El usuario abre la imagen a analizar
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula
- 4) El software mide la célula para cada contorno
- 5) El software selecciona un contorno basándose en parámetros fijos
- 6) El software produce las medidas finales.
- 7) El usuario analiza las medidas y clasifica las células

Estructura detallada:

- 1) El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.
- 2) El usuario marca con CellCounter las células.
- 3) El archivo guarda las marcas de CellCounter.

4) El usuario elige una imagen, diámetro celular y un archivo de marcas de CellCounter.

5) El programa lee el archivo de CellCounter y va creando cuadrantes de una célula.

Para cada cuadrante se van realizando las operaciones 5-13.

6) Se calcula la frecuencia de aparición de cada intensidad de píxel en la región.

7) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.

Para cada umbral se realizan los pasos 5-13.

8) Se convierte la región a binario con ese umbral.

Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-13.

9) Se buscan objetos en la imagen umbralada

10) Se miden los objetos detectados.

Para cada modificación (como watershed y despeckling) se realizan los pasos 10-13:

11) Se duplica la imagen umbralada

12) Se somete la imagen a la modificación.

13) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.

14) Se miden los objetos detectados.

15) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide cuál de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor basándose en parámetros fijos.

16) Se crea una imagen Resultado con las máscaras de todos los objetos elegidos y se guardan las medidas de los ROIs de los objetos elegidos.

17) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

Se recomienda familiarizarse con los Conceptos y terminología de CellFinder v0.1

Marcado

El concepto de marcado se refiere a señalar de manera permanente en una imagen la posición de una célula. El hecho de que este marcado sea permanente implica que podemos restaurar las marcas en cualquier momento, pero no implica que no se pueda corregir.

Para marcar una célula el usuario utiliza un interfaz para tal propósito y hace click

sobre algún punto de la superficie de la célula. La marca queda reflejada como un punto de un color característico sobre la célula.

Etiquetado

El etiquetado implica asignar a una célula un tipo celular o etiqueta que la caracterice. Cuando se etiquetan células normalmente primero se determina las categorías que se van a utilizar. Una vez determinadas estas categorías se procede a seleccionar una categoría y marcar las células que encajen en esa categoría. Así se irán cubriendo las células de las distintas categorías. También existe la posibilidad de cambiar las células de categoría a posteriori o simplemente marcarlas sin asignarles una categoría concreta y asignársela más tarde.

Marcado y etiquetado con *CellCounter*

CellCounter es un plugin de ImageJ desarrollado por terceros justo para el propósito de marcar y etiquetar las células (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>).

CellCounter permite al usuario seleccionar índices de tipo celular y marcar las células haciendo click localizándolas y asignándolas un tipo celular. Las marcas permiten localizar las células de los distintos tipos celulares. Las marcas individuales se pueden eliminar en caso de que el usuario desee realizar correcciones. Las marcas de las células se pueden guardar y recargar. La posición y tipo de las células se guarda en un archivo de texto que utiliza lenguaje de etiquetado al estilo XML.

Cuadrante de una célula

Una vez el usuario ha marcado todas las células en *CellCounter* y guardado las marcas pasa a utilizar la parte programada en *CellFinder* v0.2. Para ello se le pide al usuario que abra la imagen a analizar, que será la misma en la que realizó el marcado. Una vez abierta la imagen el usuario debe elegir un diámetro celular y la ruta del archivo donde se guardaron las marcas. Con esta información el programa va creando cuadrante de tres veces el diámetro celular centrados en cada marca. En cada uno de estos cuadrante buscará una célula que a ser posible toque con la marca. Estos cuadrantes serán cuadrantes de una célula.

Objetos concéntricos

Véase en *CellFinder* v0.1 “Objeto”.

Varios objetos concéntricos son aquellos objetos que mantienen una relación de solapamiento en el espacio xy. En nuestro contexto consideramos que dos objetos son concéntricos cuando el centro de un objeto se encuentra en el área del otro. En nuestro caso los objetos concéntricos surgen de buscar objetos en distintos umbrales y modificaciones morfológicas. Estos objetos concéntricos serán considerados posibles contornos de una misma célula. Uno de estos contornos deberá ser elegido para representar a la célula.

Línea de medidas

Véase en *CellFinder* v0.1 “Medidas de una célula”.

Una línea de medidas de una célula contiene los valores obtenidos en una serie de variables o medidas sobre una célula concreta, junto con una etiqueta identificadora de esa célula.

Un ejemplo de línea sería:

Nombre: Cell1232; Borde: Bord3; Posición X: 230; Posición Y: 519; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.834; Área: 57; Intensidad Media: 103;

Tabla de medidas de bordes

Véase en *CellFinder* v0.1 “Tabla de medidas de células”.

Una tabla de medidas de bordes es un conjunto de líneas de medida de una o varias células para todos sus contornos. Esto es, las medidas obtenidas tomando todos los contornos de una o varias células.

Un ejemplo de una parte de una tabla de medidas de bordes:

Nombre: Cell1232; Borde: Bord1; Posición X: 230; Posición Y: 519; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.915; Área: 47; Intensidad Media: 143;

Nombre: Cell1232; Borde: Bord2; Posición X: 229; Posición Y: 520; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.877; Área: 52; Intensidad Media: 129;

Nombre: Cell1232; Borde: Bord3; Posición X: 228; Posición Y: 520; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.834; Área: 57; Intensidad Media: 103;

Nombre: Cell1233; Borde: Bord1; Posición X: 237; Posición Y: 599; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.754; Área: 60; Intensidad Media: 134;

Nombre: Cell1233; Borde: Bord2; Posición X: 237; Posición Y: 602; Posición Z: 3;
Circularidad: 0.744; Área: 65; Intensidad Media: 124;

Lectura del archivo de *CellCounter*

La posición de las células marcadas en *CellCounter* se guarda en un archivo de texto. Este archivo utiliza lenguaje de etiquetas. Se leen las etiquetas que delimitan cada célula y se sustrae la posición marcada de cada célula. Estas posiciones se guardan. Para cada una de estas posiciones se realiza un cuadrante a su alrededor en la imagen abierta de un ancho y alto 3 veces mayor que el diámetro de las células. Cada área delimitada corresponde a un cuadrante de una célula. Cada uno de estos cuadrantes se duplica para buscar sobre él objetos que serán los posibles contornos de las células.

Búsqueda de objetos en el cuadrante de una célula

Para cada cuadrante de una célula se realiza una búsqueda de objetos con distintos umbrales y modificaciones. Cada objeto encontrado corresponderá a un posible contorno. Dentro de los objetos encontrados se priorizan aquellos que en su área contengan el punto inicial en el que la célula fue marcada. También se da prioridad a aquellos objetos cuyo centro se encuentre más cerca del punto marcado.

Uso de medidas para seleccionar un contorno

Cada objeto o contorno es medido para generar una línea de medidas. El usuario utiliza un criterio arbitrario para seleccionar el mejor contorno, este criterio puede combinar por ejemplo la distancia del centro del objeto respecto del punto marcado, la intensidad a la que se detecta o su circularidad. Cada contorno recibe una puntuación. El contorno con la mayor puntuación resulta el contorno elegido.

Las líneas de medida de todos los contornos para todas las células resulta en un tabla de medidas de bordes.

El parámetro calidad de borde

Para la selección de un contorno desarrollamos un parámetro que llamamos la calidad de borde. El objetivo de este parámetro es, una vez encontrado un contorno, determinar su capacidad para diferenciarse de su borde exterior. El borde exterior sería la línea de píxeles justo por fuera del contorno del objeto. La función de este algoritmo sería hasta cierto punto similar a sumar los distintos objetos para calcular cuántos umbrales cubren, como se hace en *CellFinder* v0.1.

Para realizar este cálculo primero se calcula la intensidad media de los píxeles en los píxeles en el borde interno, el límite del objeto. Tras esto se calcula la intensidad media de los píxeles en el borde exterior, los píxeles en contacto con el objeto por el exterior.

Para calcular la intensidad en ambos bordes primero debemos aislar los píxeles que los conforman. Para aislar los píxeles del borde interno se duplica la máscara del objeto encontrado y se erosiona, eliminando sus píxeles más externos. Tras esto se le resta al objeto original el objeto erosionado, el resultado es el borde interno. Para aislar los píxeles del borde externo se duplica la máscara del objeto encontrado y se dilata, ampliando el objeto a los píxeles en contacto con este. Tras esto se le resta al objeto dilatado el objeto original, el resultado es el borde externo.

La intensidad de los píxeles correspondientes al borde interno y al borde externo se obtienen de la imagen original. Se calcula la intensidad media para ambos bordes. Finalmente se resta a la intensidad del borde interno la intensidad del borde externo. El resultado es la calidad del borde, que viene dada por la diferencia de intensidad entre los píxeles que limitan el objeto por dentro y por fuera.

Obtener medidas finales

El programa, al acabar de buscar un contorno para cada célula marcada en *CellCounter*, graba tres archivos. Un archivo contiene los ROIs o contornos de todas las células. Otro archivo es un tabla de medidas de bordes que contiene las medidas de todos los bordes de todas las células. El último archivo es una tabla de medidas de células que solo contiene la línea de medida del contorno elegido para cada célula.

A.3.5.2.3. CellFinder v0.3

Resumen

CellFinder v0.3. tenía como objetivo solventar un problema de *CellFinder* v0.1., consistente en que no se podía corregir el contorno seleccionado para cada célula por el programa. Para aumentar la fiabilidad del software y de las medidas se debía dar al usuario la posibilidad de corregir el contorno elegido para cada célula. Para ello se desarrolló una interfaz en la que al usuario se le ofrecen todos los posibles contornos encontrados por el software para cada célula. En la interfaz hay una pestaña para marcar las células en la imagen y una pestaña para que el usuario corrija los contornos.

La pestaña de marcado de las células cumple una función similar a *CellCounter*. En la pestaña de corrección de contornos al seleccionar una célula se le muestra un panel con todos los contornos. Al seleccionar una célula también se muestra una serie de contornos más probables para el usuario. Entre estos contornos se destaca el preseleccionado por el software según parámetros fijos. El usuario puede cambiar el contorno seleccionado, marcar una selección como negativa o asignarle otra etiqueta que considere.

Finalmente se obtienen las medidas definitivas para los contornos elegidos.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Marcando sobre imagen

Delimitar el contorno de las células: Detección automática sin IA con interfaz de selección

Determinar las características de las células: Medición automatizada

Clasificar las células: Clasificar por clustering a posteriori

Estructura

Visión reducida:

- 1) El usuario abre la imagen a analizar.
- 2) El usuario marca las células a añadir.
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula.
- 4) El software mide la célula con cada contorno.
- 5) El software preselecciona un contorno basándose en parámetros fijos.
- 6) El usuario corrige los contornos erróneos.

- 7) El software produce las medidas finales a petición del usuario.
- 8) El usuario analiza las medidas y clasifica las células.

Visión ampliada:

- 1) El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.
- 2) El usuario marca en la imagen las células.
- 3) El programa busca los posibles contornos en cada célula en los pasos 4 a 10.

Para cada región de una célula se van realizando las operaciones 4-10.

- 4) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.

Para cada umbral se realizan los pasos 5-10.

- 5) Se convierte la región a binario con ese umbral.

Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-10.

- 6) Se buscan objetos en la imagen umbralada.

- 7) Se miden los objetos detectados.

Para cada modificación (como watershed y despeckling) se realizan los pasos 8-10:

- 8) Se duplica la imagen umbralada.

- 9) Se somete la imagen a la modificación.

- 10) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.

- 11) Se miden los objetos detectados.

12) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide cuál de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor basándose en parámetros fijos, ese será el contorno predeterminado por el programa.

13) Una vez encontrados los contornos posibles para cada célula y determinado su contorno preseleccionado. El usuario se dirige a la pestaña de corrección de contornos.

14) El usuario puede seleccionar un contorno diferente al preseleccionado.

15) El usuario pide las medidas finales que toman la línea de medida del contorno seleccionado para cada célula.

16) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

- Se recomienda primero familiarizarse con los conceptos y terminología de *CellFinder* v0.1 y *CellFinder* v0.2.

Interfaz de usuario y pestañas

La interfaz de usuario de *CellFinder* v0.3 consiste en una ventana con diversas pestañas. En esta ventana el usuario navega por las distintas pestañas para realizar las distintas funciones. Estas funciones son tanto de interacción con el programa como de observación y análisis visual de las salidas que va produciendo el programa.

Pestaña de muestreo

El objetivo de la pestaña de muestreo es contener la imagen de muestreo sobre la que el usuario selecciona células. En realidad la imagen de muestreo se encuentra en una ventana independiente. Sin embargo, las dimensiones de ambas ventanas se ajustan una a otra.

Imagen de muestreo

La imagen de muestreo es la imagen sobre la que el usuario marca las células. La imagen debe de estar abierta mediante ImageJ antes de lanzar *CellFinder*. Al utilizar los mecanismos de apertura de ImageJ, se soportan gran variedad de mecanismos de apertura.

***Hyperstack* de muestreo**

Cuando un usuario quiere analizar varias imágenes, debe abrir estas como *hyperstack*. Un *hyperstack* contiene todas las imágenes en una ventana con varios controles deslizantes. Los controles deslizantes corresponden a distintas dimensiones como el eje z o el canal de captura. Cada imagen del *set* de imágenes abierta corresponde a una combinación de estas dimensiones. Cuando se selecciona una célula, no solo se pasa la dimensión de la selección en xy, sino en todas las dimensiones como el eje z o el canal.

Selección

Para marcar una célula en *CellFinder* lo que se hace es crear un rectángulo en la Imagen de Muestreo. Estos rectángulos que hacen la función de células seleccionadas

también se conocen como muestras por su papel para definir el total de células. Por esta razón, a la pestaña se la conoce como “Pestaña de Muestreo”.

El usuario crea rectángulos que engloban las células asegurándose de contener sin recortar su área. El usuario crea estos rectángulos de manera intuitiva como crearía un área de selección en cualquier programa. Se imagina el rectángulo que debe dibujar, hace click en uno de los vértices y sin soltar se desplaza hasta el vértice opuesto. De esta manera, crea un rectángulo entre estos dos vértices.

Este rectángulo se copia como selección o muestra para ser analizado. Se guarda en el disco esta selección y se añade a la colección de objetos y a la cola de análisis.

Capa de selecciones y bordes

Cada vez que el usuario hace una selección sobre la imagen de muestreo, además de transferirse la selección a otros procesos, se fija un rectángulo que representa la selección. Esto evita que el usuario seleccione dos veces la misma célula. Además, cuando se analiza una selección y se obtienen sus bordes, el borde preseleccionado por el software aparece sobre la selección sustituyendo al rectángulo.

Este proceso, en realidad, no modifica la imagen, sino que se realiza en una capa sobre esta. Esta capa funciona al estilo de los programas de edición de imagen. A esta capa se van añadiendo las distintas selecciones formando una lista. Cuando se encuentra automáticamente el contorno de una célula, se saca de la lista el rectángulo que le correspondía y se introduce el contorno encontrado. Cuando el usuario selecciona un contorno diferente se hace lo propio, se saca el contorno que estaba seleccionado previamente y se introduce el nuevo contorno. En realidad, estos elementos que contiene la capa no son más que ROIs. Cada vez que cambia algún elemento de la lista de elementos de la capa se llama a que la capa sea redibujada.

Colección de objetos

La colección de objetos contienen todas las selecciones que realiza el usuario. Estas selecciones son analizadas para encontrar sus posibles contornos, medir los contornos y preseleccionar un contorno y una serie de contornos candidatos. Todos estos contornos, medidas y selecciones, se añaden como propiedades a cada objeto junto con la imagen del

área seleccionada.

Cola de análisis

Cuando se añade una selección a la colección de objetos, también se añade a la cola de análisis. La cola de análisis se encarga de gestionar que las distintas selecciones para las que todavía no se han buscado objetos sean analizadas para encontrar la célula, sus posibles contornos y sus medidas. La cola de análisis detecta cuando se han generado los contornos y medidas de una selección, es decir, cuando se ha acabado de analizar una selección y desencadena el análisis de la siguiente selección de la cola.

Pestaña de objetos

La pestaña de objetos es encargada de recoger todos los objetos detectados y sus contornos. El objetivo de este panel es que el usuario pueda contemplar los objetos seleccionados, el contorno que le asigna *CellFinder* automáticamente. A su vez, permite al usuario poder descartar objetos o cambiar su contorno seleccionado. La pestaña de objetos cumple estas funciones mediante los tres paneles que posee: el panel de objetos, el panel de contornos y el panel de contornos candidatos.

Panel de objetos

El panel de objetos muestra la imagen de todos los objetos, esto es el rectángulo seleccionado de cada objeto. Además de mostrar los objetos, cuando el objeto ha sido analizado muestra el contorno seleccionado. Este contorno será el contorno determinado por *CellFinder* tras el análisis o el contorno seleccionado por el usuario si decide cambiarlo. Cuando el usuario quiere trabajar sobre un objeto lo selecciona en este panel. Al seleccionar un objeto en este panel se muestran todos los contornos de este objeto en el panel de contornos y una serie de estos contornos en el panel de contornos candidatos.

Panel de contornos

El panel de contornos muestra todos los contornos que se han encontrado para el objeto seleccionado en el panel central. El contorno seleccionado se muestra marcado en este panel. Si se selecciona un contorno de los mostrados este pasará a ser el contorno de

ese objeto. Este nuevo contorno a su vez será el que se muestra para el objeto en el panel de objetos. Si este contorno está en el panel de contornos candidatos este también pasará a ser el contorno seleccionado en este panel. Si este contorno no está en el panel de contornos candidatos es añadido a este y seleccionado.

Panel de contornos candidatos

El panel de contornos candidatos muestra una selección de los contornos que se han encontrado para el objeto seleccionado en el panel central. El contorno seleccionado se muestra marcado en este panel de contornos candidatos. Si se selecciona un contorno de los mostrados en este panel de candidatos el nuevo contorno pasará a ser el contorno de ese objeto. El nuevo contorno será el que se muestra para el objeto en el panel de objetos y el seleccionado en el panel de contornos.

Contorno preseleccionado

La cola de análisis va pasando selecciones al módulo de análisis de imagen. Este módulo obtiene los posibles contornos. Para cada posible contorno se obtiene una serie de medidas. En función de las medidas de cada contorno y de una función determinada por el usuario se otorga a cada contorno una puntuación. La función será una combinación lineal de varios de los parámetros medidos. El contorno con mayor puntuación será el seleccionado por el programa y el primero que verá el usuario para cada objeto. A este contorno seleccionado tras el análisis por el *CellFinder* según una función arbitraria determinada por el usuario se le llama Contorno Preseleccionado.

Contorno elegido

El contorno elegido, o seleccionado por el usuario, es aquel que el usuario selecciona de los contornos ofrecidos. Para que un contorno sea elegido el usuario debe marcar un contorno distinto al preseleccionado o cambiar uno que ya hubiese elegido el usuario. El usuario también puede marcar el contorno preseleccionado como correcto, un rango de objetos como correctos o todos los que están sin cambiar como correctos.

Capturar la ventana de muestreo

Para iniciar el análisis el usuario tiene que tener abierta en ImageJ la imagen a analizar. Cada imagen abierta está en una ventana. En ImageJ cada ventana tiene un identificador o id único. Al iniciarse *CellFinder* se captura el id de esta ventana y sus dimensiones. Esto será utilizado para gestionar la sincronización entre esta ventana y el interfaz. El hecho de mantener la imagen como una imagen de ImageJ permite actuar sobre esta al software y al usuario con todas las opciones de ImageJ.

Gestionar las dimensiones, las pestañas y la imagen de muestreo

Al iniciarse *CellFinder* se crea una interfaz. Esta interfaz tendrá unas dimensiones que se ajustan a la ventana de muestreo. La pestaña seleccionada por defecto será la de muestreo que contendrá la imagen de muestreo. Cuando se selecciona una pestaña distinta se oculta la ventana de muestreo. Cuando se vuelve a seleccionar la ventana de muestreo se vuelve a traer al frente la imagen o ventana de muestreo.

Cuando se cambia las dimensiones de la ventana de muestreo también se cambian las dimensiones de la interfaz de usuario para mantener las proporciones. De igual manera al cambiar las dimensiones de la interfaz de usuario se cambian las dimensiones de la ventana de muestreo. Cuando la interfaz es minimizada o maximizada esta actividad es capturada y se minimiza o maximiza correspondientemente la ventana de muestreo. Lo mismo ocurre con la interfaz si se minimiza o maximiza la ventana. De igual manera, si una u otra son desplazadas por el usuario, este desplazamiento se captura y transfiere a la otra.

Crear selecciones y añadirlas a la colección de objetos

Para crear selecciones el usuario crea un rectángulo haciendo *click* y arrastrando sobre la imagen de muestreo. El programa captura cuando se realiza este tipo de movimiento sobre la imagen. Captura cuando se hace *click* y en qué punto xy (x_0y_0), captura que el click es sostenido y captura que el *click* es liberado y en qué punto xy (x_1y_1). Entre los puntos x_0y_0 y x_1y_1 se creará un rectángulo. La superficie de la imagen que se encuentra en ese rectángulo es copiada y guardada como una nueva selección. A la vez que se guarda esta nueva selección, la misma se añade a la colección de objetos y a la cola de análisis. Los objetos de la cola de análisis aparecen en la pestaña de objetos, en el panel central. Por supuesto, de momento, no poseen contornos, ya que no han sido

analizados.

Gestionar la cola de análisis

Al iniciarse *CellFinder* se arranca la cola de análisis. La cola de análisis es responsable de gestionar que las distintas selecciones que van llegando se pongan en la cola esperando para ser pasadas al macro de análisis de imagen. La cola de análisis va mandando en orden de llegada una a una las selecciones al macro de análisis. Cuando el macro acaba su análisis de una selección resulta en que se produzca un archivo con los posibles contornos de esa selección y otro con las medidas correspondientes a cada uno de esos contornos. Una vez la cola manda una selección a análisis, se pone a esperar continuamente a que aparezca el archivo de medidas con el mismo nombre que la selección. Cuando aparece su archivo de medidas recoge tanto este como el archivo de contornos, que también tiene el mismo nombre. Una vez recogidos los asigna a la selección de la que procedían y pide la preselección de un contorno y de contornos candidatos. Cuando la cola detecta el archivo de medidas de la selección que estaba en análisis automáticamente manda a análisis a la siguiente selección de la cola.

El macro de búsqueda de objetos y medida

El macro realiza una operación similar a la descrita en *CellFinder* v0.1 y *CellFinder* v0.2. Para cada selección se buscan los mejores umbrales. Con estos umbrales y con modificaciones para cada umbral se obtienen los distintos objetos que serán posibles contornos. Los posibles contornos encontrados son guardados en una carpeta de contornos con el mismo nombre que la selección. En el macro, tras encontrarse estos contornos, se realiza su medida. Además de medirse numerosos parámetros para cada contorno, calculamos otros parámetros como la calidad de borde. Las medidas son guardadas en un archivo con el mismo nombre que la selección. Estas medidas serán utilizadas para la preselección de un contorno y de contornos candidatos.

Selección de contorno preseleccionado y contornos candidatos

El análisis de imagen de una selección acaba con la generación de un archivo que contiene los posibles contornos y otro que contiene las medidas correspondientes a estos

posibles contornos. Cuando la cola de análisis detecta estos archivos, da por finalizado el análisis de imagen de esa selección, captura el archivo de contornos y de medidas y lo asocia a su selección. Una vez asociado, se pide al programa que determine un contorno preseleccionado y unos contornos candidatos. Para ello, utiliza una combinación arbitraria de los parámetros medidos que genera una puntuación para cada contorno. Por ejemplo, puede elegir: $\text{score}=0,7*\text{calidadDeBorde}+0,2*\text{regularidad}+0,1*\text{circularidad}$.

El contorno con mayor puntuación será elegido como contorno preseleccionado. Para elegir los contornos candidatos se buscan máximos locales en la secuencia de puntuaciones. La idea de esto es ofrecerle al usuario posibilidades con cierta diferencia. Si eligiésemos simplemente los contornos con mayor puntuación, la mayor parte de las veces acabaríamos ofreciendo los vecinos más cercanos al contorno preseleccionado. Esto no sería de utilidad para el usuario que quiere elegir otro contorno. Se buscan hasta un total de 5 máximos locales, si no se alcanza esta cantidad, entonces sí se completa hasta 5 con los valores más altos.

Adición de los contornos a la colección de objetos

Una vez una selección ha sido analizada, producidos sus contornos y medidas y preseleccionado un contorno y seleccionados unos contornos candidatos, se asocian los contornos a la imagen del objeto correspondiente. Al realizarse esa asociación, se notifica a la pestaña de objetos que debe actualizar la representación de ese objeto. En ese momento, el objeto aparecerá en el panel central con su contorno preseleccionado dibujado encima. Si hace *click* sobre ese objeto, aparecerán sus contornos en el panel de contornos sobre la imagen de la célula y los contornos candidatos también sobre la célula en el panel de candidatos.

Adición de selecciones y contornos a la imagen de muestreo

Cuando el usuario realiza una selección sobre la imagen de muestreo, el rectángulo dibujado por el usuario queda añadido sobre la imagen de muestreo. En realidad, el rectángulo no se dibuja sobre la imagen, sino que, al iniciarse la imagen, se crea una máscara o capa sobre esta, como ocurre en los programas de edición de imagen. En esta capa se van añadiendo las selecciones rectangulares hechas por el usuario, lo cual evita que

el usuario marque dos veces la misma célula. Cuando se añaden los contornos a un objeto de la colección y se preselecciona un contorno, este contorno preseleccionado aparece sobre la célula en la imagen de muestreo. De igual manera, si un usuario corrige un borde en la pestaña de objetos, el nuevo contorno seleccionado aparece en la imagen de muestreo. El que aparezca el contorno en la imagen de muestreo permite al usuario tener una referencia del progreso y calidad del análisis. Para cambiar el rectángulo inicial por el contorno se retira el elemento de la lista de elementos de la capa y se añade el nuevo elemento. La posición en la imagen de muestreo se calcula en función de la posición inicial de la selección.

Corrección de contornos y sincronización

Cuando una selección del usuario ya ha sido analizada, preseleccionado un contorno y elegidos unos contornos candidatos, estos contornos ya están disponibles y visibles en la pestaña de objetos.

En la pestaña de objetos en el panel central están todos los objetos correspondientes a las selecciones que ha ido realizando el usuario. Al seleccionar un objeto en el panel central, pasan a mostrarse sus contornos en los paneles de contornos y de contornos candidatos. El contorno seleccionado para cada célula está guardado en la información del objeto. Al seleccionar en uno de estos paneles de contornos un contorno diferente al contorno que ya estaba elegido, se desencadenan unos eventos. Primero, el contorno elegido guardado pasa a ser el nuevo. Segundo, si el contorno no estaba en el panel de candidatos se pasa a este. Tercero, se selecciona ese contorno en los 2 paneles de contornos. Cuarto, se muestra ese contorno como el contorno del objeto en el panel central. Quinto, se muestra ese contorno sobre la célula en la imagen de muestreo.

Guardado en tiempo real de selecciones

Los contornos seleccionados para los objetos son guardados continuamente. Concretamente, cada vez que el usuario hace una nueva corrección, desencadena que se vuelva a guardar la lista de contornos seleccionados. Concretamente, se guarda el índice de la posición que ocupa el contorno en la lista de contornos. Para los índices de los contornos candidatos se hace lo propio. Esto hace que la operación sea muy ligera a la vez que fiable.

De esta manera, el estado del análisis se está guardando él solo constantemente.

Recarga de análisis

En algunas ocasiones, el usuario puede querer continuar un análisis en otro momento o simplemente corregirlo o modificarlo a posteriori. Para ello, el programa ofrece la posibilidad de recargar un análisis ya iniciado. El usuario debe seleccionar entonces la carpeta en la que se estaba realizando el análisis. En esta carpeta primero se leen todas las fotos de las selecciones del usuario y se añaden a la colección de objetos. A continuación, se leen los archivos de contornos y sus medidas y se añaden al objeto correspondiente. Tras esto, se leen los índices de los contornos seleccionados y de los contornos candidatos y se añaden a cada objeto. Finalmente, se recrea la capa de selecciones y bordes sobre la imagen de muestreo.

Compilación de resultados finales

Cuando el usuario está contento con todos los contornos elegidos para las distintas células puede pasar a pedir los resultados finales. En este momento el programa considerará que el contorno elegido en cada célula es el correcto independientemente de que el usuario lo haya modificado o no.

El programa recorre los distintos objetos o células y busca su contorno seleccionado. El programa crea un archivo en el que guarda para cada célula las medidas del contorno seleccionado, esto es, una tabla de medidas de células. Además, guarda un archivo de ROIs que contiene el contorno elegido para cada célula. También guarda como referencia una tabla de medidas de contornos que contiene las medidas de todos los contornos de todas las células.

A.3.5.2.4.CellFinder v0.4

Resumen

CellFinder v0.4. incluye un módulo de inteligencia artificial (IA) de manera que el algoritmo de selección de bordes de objetos aprenda de las correcciones del usuario. Este módulo de IA devuelve una probabilidad para cada borde basada tanto en los parámetros medidos a nivel global como a nivel ordinal para cada célula. El sistema de IA crea una

diversidad de modelos y elige aquel que mejor respuesta da.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Marcando sobre imagen.

Delimitar el contorno de las células: Detección automática con IA con interfaz de selección y corrección manual.

Determinar las características de las células: Medición automatizada con reducción de dimensiones.

Clasificar las células: Clasificar por clustering a posteriori.

Estructura

Visión reducida:

- 1) El usuario abre la imagen a analizar.
- 2) Se añaden células en modo manual: el usuario marca las células.
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula.
- 4) El software mide la célula con cada contorno.
- 5) El software preselecciona un contorno basándose en la IA.
- 6) El usuario corrige los contornos erróneos.
- 7) El software educa la IA con las medidas en base a las correcciones.
- 8) El software corrige las preselecciones con la nueva IA.
- 9) El software produce las medidas finales a petición del usuario.
- 10) El usuario analiza las medidas y clasifica las células.

Visión ampliada:

- 1).El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.
- 2) El usuario marca en la imagen algunas células.
- 3) El programa busca los posibles contornos en cada célula en los pasos 4 a 10. Para cada región de una célula se van realizando las operaciones 4-10.
- 4) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.
Para cada umbral se realizan los pasos 5-10.
- 5) Se convierte la región a binario con ese umbral.

Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-10.

6) Se buscan objetos en la imagen umbralada

7) Se miden los objetos detectados.

Para cada modificación (como watershed y despeckling) se realizan los pasos 8-10:

8) Se duplica la imagen umbralada.

9) Se somete la imagen a la modificación.

10) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.

11) Se buscan contornos refinados en base a los contornos del paso 10.

12) Se miden los objetos detectados.

13) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide cual de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor basándose en IA. Se le pide a la IA una probabilidad para cada contorno, el que tenga mayor probabilidad será el contorno predeterminado por el programa.

14) Una vez encontrados los contornos posibles para cada célula y determinado su contorno preseleccionado. El usuario se dirige a la pestaña de corrección de contornos.

15) El usuario puede seleccionar un contorno diferente al preseleccionado. El usuario puede marcar células o rangos de células con contorno correcto. Cuando el usuario selecciona un contorno o marca contornos como correctos esta selección se pasa a la IA para educarla.

16) Se le vuelve a pedir a la IA una probabilidad para cada contorno, se cambia la preselección del contorno de cada célula si la IA así lo indica en aquellas células que usuario aún no ha revisado.

17) El usuario pide las medidas finales que toman la línea de medida del contorno seleccionado para cada célula.

18) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

Se recomienda familiarizarse con los Conceptos y terminología de *CellFinder* v0.1-v0.3.

Célula sin contorno elegido

Una célula sin contorno elegido es una célula con varios contornos de los que ninguno ha sido elegido todavía. Esta será la célula que produce el análisis de imagen compuesta por la imagen de una selección, los contornos y las medidas, pero en la que todavía no ha sido preseleccionado un contorno ni contornos candidatos. Una célula estará en este estado al salir del análisis de imagen antes de que mediante la inteligencia artificial se preseleccione un contorno.

Célula con contorno preseleccionado por IA

Al recibirse una célula del análisis de imagen esta no tendrá un contorno elegido. Para elegir un contorno se pide a la Inteligencia Artificial que dé una puntuación a cada contorno. El contorno con mayor puntuación resultará en el contorno preseleccionado para la célula. Así la célula pasará a tener un contorno preseleccionado.

Célula con contorno elegido por el usuario

El usuario puede cambiar el contorno preseleccionado por otro contorno en la pestaña de contornos. Cuando un usuario selecciona o elige un contorno el nuevo contorno pasa a ser el elegido. La selección de este contorno por el usuario se utiliza para educar a la inteligencia artificial.

EL contorno como línea de medida

Tras el análisis de imagen tenemos como resultado una serie de contornos y medidas de cada contorno. Estas medidas describen la forma y distribución de intensidades en el objeto o célula según cada contorno. Estas medidas son los valores obtenidos para una serie de parámetros o variables por cada contorno. Todas las medidas de un contorno, es decir, los valores de cada parámetro conforman una línea de medida. Para la inteligencia artificial cada contorno es una línea de medida. Lo que utilizará la inteligencia artificial para educarse, testarse y dar respuesta serán los valores de estas líneas de medida.

Línea de medida no clasificada

Un contorno (o línea de medida) no clasificado es aquel que forma parte de una célula sin contorno elegido. Esto quiere decir que estas líneas de medida solo las

encontraremos al final del análisis de imagen, antes de pasar por la inteligencia artificial. La IA nos dará una puntuación para estas líneas que será utilizada para preseleccionar una línea de medida.

Línea de medida clasificada por la IA

Al acabar el análisis de imagen, tenemos una serie de líneas de medida para cada célula, correspondientes a cada contorno. Estas líneas de medida son pasadas a la IA para que nos devuelva una puntuación de probabilidad de correspondencia al grupo de contornos correctos. El contorno de la línea que reciba la mayor puntuación será clasificado como contorno preseleccionado. El resto de contornos serán clasificados como contornos no preseleccionados.

Línea de medida clasificada por el usuario

Cuando el usuario realiza una corrección del contorno elegido esta en realidad clasificando un contorno como correcto y los demás como incorrectos. De esta manera una línea de medida es marcada como correcta y las demás como incorrectas. Esta clasificación realizada por el usuario al cambiar la selección de contorno se utiliza para educar o testear la inteligencia artificial.

Línea completa y línea incompleta

En ocasiones se utiliza el termino de línea completa para referirse a aquellas que tienen el feedback del usuario y se utilizan para educar la inteligencia artificial. Líneas incompletas serán aquellas que no han sido clasificadas por el usuario, las líneas incompletas son clasificadas mediante inteligencia artificial, pero eso no las convierte en completas.

La Inteligencia Artificial (IA)

La inteligencia artificial será explicada aquí desde un punto meramente practico. Baste decir que los métodos de inteligencia artificial como las redes neurales o los arboles de decisión permiten responder problemas de gran complejidad que no es posible resolver mediante una combinación lineal de variables.

La inteligencia artificial se caracteriza por dos pasos. En un primer paso la inteligencia artificial debe ser educada. Para educarla se utilizan las líneas de medida clasificadas por el usuario, estas contienen valores para numerosas variables y un índice para indicar si se trata del contorno elegido o no. En un segundo paso la inteligencia artificial ya educada sirve para clasificar las líneas de medida o para devolver un probabilidad para cada línea de corresponder al contorno correcto.

Modelos y testeo de modelos

Cuando decidimos utilizar inteligencia artificial para resolver un problema muchas veces no tenemos claro qué variables incluir en la creación de la inteligencia artificial. Cuantos ciclos necesitaremos para que la educación sea buena o qué tipo de análisis elegir. Para solventar esto creamos varias inteligencias con distintas variables y aproximaciones. Cada una de estas inteligencias se llama modelo. En realidad dependiendo de cómo se vea se puede decir que este set de modelos componen la inteligencia. Todos los modelos se educan con un set de entrenamiento. El set de entrenamiento son una colección de líneas completas. Los distintos modelos se testean y comparan con un set de testeo. El set de testeo es una colección de líneas completas distinta a la del set de entrenamiento. La idea es que los modelos intenten clasificar el set testeo en base a lo que han aprendido del set de entrenamiento. No tendría sentido usar alguna línea para ambos sets, ya que no nos ofrecería ninguna información de su capacidad para predecir líneas desconocidas. Una vez testado cada modelo, cada uno tendrá un porcentaje de acierto en la clasificación. El modelo que mayor porcentaje de acierto ofrezca será el utilizado para clasificar las líneas incompletas salidas del análisis de imagen.

Set de modelos

Un set o conjunto de modelos de inteligencia artificial son una serie de instancias de inteligencia artificial construidas en base a una selección diferencial de variables a usar en el modelo. Por ejemplo en un modelo podemos usar la intensidad media de las células y su eje mayor y en otro modelo la intensidad media de las células y el eje menor. Por supuesto se puede incluir un número indefinido de variables, pero cuantas más variables se introduzcan en un modelo más entrenamiento requerirá. También podemos elegir el tipo de

inteligencia a usar para el modelo, como razonamiento basado en memoria, árbol de decisión o red neural artificial. También se pueden crear varios modelos cambiando por ejemplo los parámetros de escisión de ramas en un árbol de decisión o la distribución de las neuronas de una red neural artificial.

Set de entrenamiento

El conjunto de líneas de medida utilizadas para entrenar los modelos se conoce como set de entrenamiento.

Set de testeo

El conjunto de líneas de medida utilizadas para testear y comparar distintos modelos se conoce como set de testeo.

Modelo elegido

El modelo elegido o mejor modelo es aquel que obtiene la mayor puntuación en la fase de testeo de modelos.

Probabilidad de una línea en una clase

Cuando queremos saber qué línea corresponde al mejor contorno le preguntamos a la IA. Esta, dependiendo del modelo, nos puede devolver una puntuación o probabilidad para cada línea de pertenecer a una clase. En esta caso será la clase contorno correcto. La línea con mayor probabilidad será la línea del contorno que se preseleccionara.

Clase asignada a una línea

En algunos casos, según el modelo, la IA en vez de devolver una probabilidad de pertenencia a una clase lo que devuelve es la clase más probable a la que pertenece la línea. En este caso esa clase puede ser simplemente de contorno correcto o incorrecto, en otros casos pueden ser múltiples clases. En este caso para decidir entre varias líneas se consulta a varios modelos y se elige aquella con mayor porcentaje de selección positiva.

Iniciar la IA

Al iniciarse CellFinder se arranca el motor de IA a este se le indica la localización del set de aprendizaje y del set de testeo.

Creación de modelos

Para la creación de modelos le transmitimos al módulo de IA el nombre del modelo, el tipo de modelo (árbol, red neural, etc.), la conformación del modelo y las variables a utilizar.

Rellenar la base de de aprendizaje y de testeo de modelos

Cada vez que un usuario corrige un contorno se utiliza esta selección y las líneas que califica para educar a los modelos. La variable de agrupación es la corrección o no de la línea, de esta manera para cada célula habrá un contorno o línea correcto y el resto incorrectos.

Educar modelos

A la IA se le pasan las líneas completas que vna a ser usadas para aprendizaje y no para testeo. La IA entrega cada una de estas líneas a todos los modelos para que todos tengan la misma base de aprendizaje. Línea tras línea los modelos van ajustando sus valores para separar los contornos correctos de los incorrectos.

Seleccionar un modelo

Para seleccionar un modelo se pide a todos los modelos que evalúen todas las líneas del set de testeo. Las evaluaciones de cada modelo son recogidas como positivas o negativas en caso de que acierten o fallen. El modelo con mayor acierto pasa a ser el modelo elegido. Este proceso se repite cada vez que se incrementa de manera significativa el número de elementos disponibles, esto permite asegurarse de que el modelo elegido sigue siendo el más óptimo. Es muy probable que al principio con pocos elementos de educación los modelos basados en una o dos variables dominen pero según se añaden elementos que otras variables secundarias le den mayor valor y precisión a otros modelos.

Preguntar a la IA, preselección de un contorno y contornos candidatos

Tras el análisis de imagen de las células uno de los contornos encontrados debe ser elegido. Para ello se le pasa la línea de cada contorno de la célula al modelo elegido de la IA en ese momento. Ese modelo proporciona una puntuación de cada línea. La línea con mayor puntuación será la elegida. De entre las puntuaciones se busca en la secuencia de contornos máximos locales de puntuación. Los máximos locales se eligen como contornos candidatos. Si los contornos candidatos no llegan a ser como mínimo cinco se completa hasta cinco con máximos absolutos según la lista de puntuaciones.

A.3.5.2.5.CellFinder v0.5

Resumen

CellFinder v0.5. integra la funcionalidad desarrollada en CellFinder v0.1. que permite encontrar objetos/células en zonas amplias de una imagen. Se obtienen zonas de la imagen original y se buscan objetos en ellas con distintos umbrales. De entre los objetos encontrados se asocian como distintos contornos de una misma célula aquellos que se superpongan. Los distintos contornos se contrastan con la IA, aquello que pudiesen ser células dan lugar a selecciones rectangulares que son procesadas como si fuesen selecciones del usuario.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Detección automática con IA con interfaz de corrección

Delimitar el contorno de las células: Detección automática con IA con interfaz de selección

Determinar las características de las células: Medición automatizada con reducción de dimensiones

Clasificar las células: Clasificar por clustering a posteriori

Estructura

Visión reducida:

1) El usuario abre la imagen a analizar

- 2) Se añaden células paralelamente por dos procedimientos:
 - 2.1) Manual: El usuario marca las células
 - 2.2) Automático: El software busca automáticamente células
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula
- 4) El software mide la célula con cada contorno
- 5) El software preselecciona un contorno basándose en la IA
- 6) El usuario corrige los contornos erróneos
- 7) El software educa la IA con las medidas en base a las correcciones
- 8) El software corrige las preselecciones con la nueva IA
- 9) El software produce las medidas finales a petición del usuario
- 10) El usuario analiza las medidas y clasifica las células

Visión ampliada:

- 1) El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.
- 2) El usuario marca en la imagen algunas células.
- 3) El programa busca los posibles contornos en cada célula en los pasos 4 a 10. Para cada región de una célula se van realizando las operaciones 4-10.
 - 4) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades.
Para cada umbral se realizan los pasos 5-10.
 - 5) Se convierte la región a binario con ese umbral.
Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-10.
 - 6) Se buscan objetos en la imagen umbralada
 - 7) Se miden los objetos detectados.
Para cada modificación (como watershed y despeckling) se realizan los pasos 8-10:
 - 8) Se duplica la imagen umbralada
 - 9) Se somete la imagen a la modificación.
 - 10) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.
 - 11) Se buscan contornos refinados en base a los contornos del paso 10.
 - 12) Se miden los objetos detectados.
 - 13) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los umbrales se decide cual de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor

basándose en IA. Se le pide a la IA una probabilidad para cada contorno, el que tenga mayor probabilidad será el contorno predeterminado por el programa.

14) Una vez encontrados los contornos posibles para cada célula y determinado su contorno preseleccionado. El usuario se dirige a la pestaña de corrección de contornos.

15) El usuario puede seleccionar un contorno diferente al preseleccionado. El usuario puede marcar células o rangos de células con contorno correcto. Cuando el usuario selecciona un contorno o marca contornos como correctos esta selección se pasa a la IA para educarla.

16) Se le vuelve a pedir a la IA una probabilidad para cada contorno, se cambia la preselección del contorno de cada célula si la IA así lo indica en aquellas células que usuario aún no ha revisado.

17) Se realiza la búsqueda automática en los pasos 18-21.

18) El programa selecciona cuadrantes de la imagen.

19) Para cada cuadrante se van realizando las operaciones 3-10 y 12.

20) Los contornos que se solapan pasan a ser contornos de una misma célula.

21) Se repiten los pasos 3-17 para cada célula y se le aplica la etiqueta auto a la célula.

22) El usuario pide las medidas finales que toman la línea de medida del contorno seleccionado para cada célula.

23) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

Se recomienda familiarizarse con los Conceptos y terminología de *CellFinder* v0.1-v0.4.

Célula manual o por selección

Una célula manual o por selección corresponde a una selección del usuario. Cada vez que el usuario realiza una selección en la imagen de muestreo se crea una célula manual sobre la que se buscarán contornos.

Objeto (Célula) (encontrado) automático (auto)

Una célula automática o “auto” corresponde a una célula encontrada por completo por el software. Este tipo de células es resultado de la búsqueda automática de contornos por cuadrantes y la asociación de contornos concéntricos en forma de células.

Cuadrantes de análisis

Al igual que ocurría en *CellFinder* v0.1 en él que el análisis también era automático, el análisis se realiza por cuadrantes. La imagen se divide en cuadrantes y sobre estos cuadrantes se realiza el análisis de imagen automático. Cada cuadrante puede equiparse a una selección del usuario en el esquema de cómo se procesa.

Cola de análisis automático

Al igual que ocurre con las selecciones que se gestionan en una cola de análisis los cuadrantes se gestionan en una cola de análisis. La cola de análisis de estos cuadrantes se llama aquí “Cola de análisis auto”.

Contornos en un cuadrante y un umbral

Igual que las selecciones los cuadrantes se someten a análisis de imagen. Al igual que con las selecciones para los cuadrantes se calculan unos umbrales óptimos. Para cada uno de de los cuadrantes se aplican estos umbrales. También se pueden aplicar modificaciones morfológicas a estos umbrales. Al aplicar un umbral a un cuadrante se genera una imagen binaria del cuadrante. Sobre este cuadrante se realiza la operación de búsqueda de partículas. Esto resulta en una serie de objetos encontrados. Los objetos encontrados en un cuadrante para un umbral serán posibles contornos de células.

Contornos en un cuadrante

Los contornos encontrados para un cuadrante en los distintos umbrales conforman los contornos totales de un cuadrante o contornos en un cuadrante a secas.

Contornos sin célula

En el análisis de una selección, todos los contornos encontrados en los distintos

umbrales se toman como posibles contornos de una célula. En el análisis de un cuadrante esta asunción no es posible. Los distintos contornos encontrados en cada umbral corresponden a distintas células. Los distintos umbrales encuentran contorno que pueden pertenecer a las mismas células. En general se considera que si dos contornos en distintos umbrales son concéntricos serán posibles contornos de una misma célula. Tras el análisis de imagen, antes de detectar qué contornos son concéntricos los contornos no tendrán una célula asignada, serán contornos sin célula.

Contornos concéntricos

El concepto concéntrico en nuestro caso no se utiliza respetando su acepción más purista. Para que dos objetos sean concéntricos según una definición exacta deben tener el mismo centro o eje exacto. Esto implicaría una exactitud a nivel de píxel. En nuestro caso damos por hecho que dos objetos son concéntricos cuando el centro geométrico del menor de ellos se encuentra en el área de otro. En realidad esta aproximación coincide más con una definición de solapamiento, pero el concepto concéntrico es más intuitivo.

Contornos con célula

Tras analizar por análisis de imagen un cuadrante en todos sus umbrales se tendrá una lista de contornos sin célula. A continuación se buscarán los contornos concéntricos. En este proceso se asignan los contornos a células de manera que los contornos concéntricos conformen células. Así, detectando los contornos concéntricos los contornos sin célula concéntricos pasan a ser contornos con célula.

Identificador (Id) de célula

Cada célula que se crea con los contornos concéntricos posee un Identificador o Id. Este Id se asigna a los contornos en el primer umbral estudiado. En los siguientes umbrales a los contornos encontrados se les asigna el id de los contornos con los que sea concéntrico.

Calcular los tamaños límite de análisis

Cuando se tienen 10 selecciones del usuario se realiza ajusta una distribución a estas buscando los límites superior e inferior que acogen el 99% de las células por área. Tras esto

se le resta un 50% al límite inferior y se le suma un 50% al límite superior. Estos serán considerados los límites de tamaño para las células.

Crear los cuadrantes de análisis

Tras tenerse los límites de tamaño superior e inferior de las células se toma el ancho y alto de cada cuadrante como diez veces el límite de tamaño mayor de las células.

Se calculan el inicio y final de cada cuadrante en xy y a continuación se guarda en una carpeta de cuadrantes una copia de cada uno de estos cuadrantes. Cada cuadrante guardado se añade a la cola de análisis auto.

Gestión de la cola de análisis auto

La cola de análisis auto se gestiona de la misma manera que la cola de análisis de las selecciones. Se añaden a la cola los cuadrantes y se pasan los elementos uno a uno al análisis de imagen. Cuando finaliza el análisis de imagen se habrán generado un archivo de contornos en forma de ROIs de cada cuadrante y un archivo de medidas de cada cuadrante. Al encontrar el archivo de medidas correspondiente a ese cuadrante se recogen esas medidas y los ROIs y se desencadena el análisis del siguiente cuadrante.

Sincronización entre colas

La cola de análisis de selecciones y la cola de análisis auto se sincronizan de manera que el análisis de selecciones siempre tiene prioridad sobre el análisis auto. Solo se desencadena el análisis auto de un cuadrante cuando no existen selecciones por analizar en la cola de análisis de selecciones.

El proceso de buscar contornos

El proceso de búsqueda de contornos es similar al de búsqueda de contornos para selecciones. Se calcula los mejores umbrales y se busca objetos en los umbrales y en los umbrales con modificaciones. Estos serán contornos sin célula. Cada objeto lleva en su nombre el umbral y modificaciones con los que se encontró. Esta información es utilizada a la hora de asignar los contornos a células.

Asociar contornos en células

Los contornos producto del análisis automático de un cuadrante son inicialmente contornos sin célula. Los contornos se asocian a células mediante la búsqueda de contornos concéntricos de distintos umbrales. La asignación de contornos a células se realiza consecutivamente de manera ordenada de los umbrales más altos a los más bajos. En el umbral más alto se le asigna un id de célula a cada contorno. En el siguiente umbral para cada contorno se busca si contiene el centro de alguna de las células definidas.

Cuando no contiene el centro de ninguna célula se crea una nueva célula con Id de la que este es el representante. Si solo contiene el centro de una célula se le asigna también el id de esta célula y su centro pasa a ser el centro de la célula. Si contiene el centro de varias células se asocia a aquella célula cuyo centro esté más cercano a su centro y se reasigna el centro de la célula con el nuevo contorno.

Así se van recorriendo todos los umbrales hasta que todos los contornos quedan asociados a una célula.

Crear las células auto

Una vez se han asignado todos los contornos a un id de célula se pasa a crear las células individuales como si fuesen selecciones. Primero tomando el área máxima calculado para las células se crea una captura de esa área de la imagen de muestreo con el su id. Tras esto se crea un archivo de contornos en forma de ROIs para cada célula y un archivo de medidas correspondientes para cada célula. Cuando se acaba este proceso se notifica a la cola de análisis de selecciones que recoja las células ya procesadas. La cola de análisis pide a la IA una puntuación de los contornos y evalúa para cada célula si debe buscar más contornos. Si no es así preselecciona para cada una un contorno y selecciona unos contornos candidatos.

Adición de las células auto a la colección de objetos

Las células procedentes del análisis automatizado son añadidas a la colección de objetos como un miembro más pero manteniendo una etiqueta identificación auto.

Representación de las células auto en el panel de objetos

En el panel de objetos se muestran las células encontradas automáticamente con la etiqueta auto.

Adición sobre la imagen de muestreo

En la imagen de muestreo se añaden las células encontradas automáticamente con su contorno preseleccionado en un color diferente al de las seleccionadas por el usuario. Si el usuario revisa su contorno el color cambia al mismo de las selecciones manuales.

A.3.5.2.6. CellFinder v0.6

Resumen

CellFinder v0.6. añade funcionalidad para asignar etiquetas, para mejorar los bordes a petición del usuario y para gestionar las diversas dimensiones de un hyperstack. El sistema de etiquetas permite al usuario mejorar el análisis posterior y prepara *CellFinder* para una futura fase en la que la inteligencia artificial se convierte en una inteligencia artificial pre-educada para una diversidad de células. La mejora de bordes solicitada por el usuario permite mejorar la resolución a costa de mayor tiempo de procesado. La medición en hyperstacks permite por ejemplo en nuestro caso medir en diversas capas y en diversos canales y permitiría analizar experimentos en escala temporal.

Técnica utilizada para cada problema

Encontrar las células en la imagen: Detección automática con IA con interfaz de corrección

Delimitar el contorno de las células: Detección automática con IA con interfaz de selección y corrección manual

Determinar las características de las células: Medición automatizada con reducción de dimensiones

Clasificar las células: Clasificar por IA de etiquetado educada

Estructura

Visión reducida:

1) El usuario abre la imagen a analizar

- 2) Se añaden células paralelamente por dos procedimientos:
 - 2.1) Manual: El usuario marca las células
 - 2.2) Automático: El software busca automáticamente células
- 3) El software encuentra los contornos de cada célula
- 4) El software mide la célula con cada contorno
- 5) El software preselecciona un contorno basándose en la IA
- 6) El usuario corrige los contornos erróneos
- 7) El usuario asigna etiquetas y mide en otras dimensiones si así lo desea.
- 8) El software educa la IA con las medidas en base a las correcciones
- 9) El software corrige las preselecciones con la nueva IA
- 10) El software produce las medidas finales a petición del usuario
- 11) El usuario analiza las medidas y clasifica las células

Visión ampliada:

- 1) El usuario abre en ImageJ la imagen a utilizar.
- 2) El usuario marca en la imagen algunas células.
- 3) El programa busca los posibles contornos en cada célula en los pasos 4 a 10. Para cada región de una célula se van realizando las operaciones 4-10.
 - 4) Se calculan los umbrales a usar según las frecuencias de las intensidades. Para cada umbral se realizan los pasos 5-10.
 - 5) Se convierte la región a binario con ese umbral. Para cada imagen binaria se realizan los pasos 6-10.
 - 6) Se buscan objetos en la imagen umbralada
 - 7) Se miden los objetos detectados. Para cada modificación (como watershed y despeckling) se realizan los pasos 8-10:
 - 8) Se duplica la imagen umbralada
 - 9) Se somete la imagen a la modificación.
 - 10) Se buscan objetos en la imagen sometida a la modificación.
 - 11) Se buscan contornos refinados en base a los contornos del paso 10.
 - 12) Se miden los objetos detectados.
 - 13) Al acabar de buscar objetos con todas las modificaciones para todos los

umbrales se decide cuál de los objetos encontrados para ese cuadrante es el mejor basándose en IA. Se le pide a la IA una probabilidad para cada contorno, el que tenga mayor probabilidad será el contorno predeterminado por el programa.

14) Una vez encontrados los contornos posibles para cada célula y determinado su contorno preseleccionado. El usuario se dirige a la pestaña de corrección de contornos.

15) El usuario puede aplicar etiquetas a las células. El usuario mide en otras dimensiones si así lo considera.

16) El usuario puede seleccionar un contorno diferente al preseleccionado. El usuario puede marcar células o rangos de células con contorno correcto. Cuando el usuario selecciona un contorno o marca contornos como correctos esta selección se pasa a la IA para educarla.

17) Se le vuelve a pedir a la IA una probabilidad para cada contorno, se cambia la preselección del contorno de cada célula si la IA así lo indica en aquellas células que usuario aún no ha revisado.

18) Se realiza la búsqueda automática en los pasos 19-22.

19) El programa selecciona cuadrantes de la imagen.

20) Para cada cuadrante se van realizando las operaciones 3-10 y 12.

21) Los contornos que se solapan pasan a ser contornos de una misma célula.

22) Se repiten los pasos 3-17 para cada célula y se le aplica la etiqueta auto a la célula.

23) El usuario pide las medidas finales que toman la línea de medida del contorno seleccionado para cada célula.

24) El usuario debe analizar los resultados de la tabla de medidas con software externo.

Conceptos y terminología

Etiqueta

Una etiqueta es un nombre que se le da a un conjunto de objetos con características comunes. Este concepto es el mismo que utilizamos en el mundo real para clasificar o etiquetar objetos. En este caso las etiquetas se utilizan para agrupar objetos con cualidades visuales que los describen o diferencian. Algunos ejemplos de etiqueta aplicables a nuestro contexto serían: “No etiquetado”, “Desconocido”, “Negativo”, “Biológico”, “Célula”,

“Núcleo”, “Dendrita”, “Glóbulo rojo”, “Neurona”, “Cono”, “Bastón”, “Bipolar”, “Amacrina”, “Ganglionar”, “ipRGC”, “oscuras”, “claras”, “M1”, “M2”, “M3”.

Célula etiquetada por el usuario

Una célula etiquetada por el usuario es aquella célula que ha recibido una etiqueta por parte del usuario. Ya sea porque se había elegido esa etiqueta durante la realización de selecciones o porque el usuario le ha aplicado etiquetas en la pestaña de objetos.

Célula no etiquetada

Una célula no etiqueta es aquella que ha sido seleccionada por el usuario sin seleccionar ninguna etiqueta. Esta célula puede recibir etiquetas a posteriori por parte del usuario o de la IA.

Clase

Una clase en este caso es en realidad equivalente a una etiqueta. Cada clase tiene una definición que permite comprobar la probabilidad de que un nuevo objeto o célula pertenezca a ella. Una clase puede englobar a su vez a otras clases. Los objetos etiquetados pertenecerán al menos a una clase.

Clases excluyentes

En muchos casos no podemos encontrar clases excluyentes, esto implica que si una célula pertenece a una clase no pertenecerá a otra. Por ejemplo, si pertenece a la clase “Neurona” no puede pertenecer a la clase “Glóbulo rojo”. Estas serán clases excluyentes. De igual manera los distintos tipos de ipRGC: M1, M2, etc, son excluyentes. Sin embargo las clases “Biológico”, “Célula”, “Neurona”, “Ganglionar”, “ipRGC”, “oscura” y “M1” no son excluyentes entre sí.

Clases obligatorias

En algunos casos la pertenencia a una clase implica obligatoriamente la pertenencia a una u otra clase. Por ejemplo si un objeto es identificado como “ipRGC” a la fuerza debe ser clasificado a la fuerza como “M1”, “M2”, “M3”, “desconocido”.

Probabilidad en clase

La IA no siempre determina la pertenencia a una clase, sino que ofrece un porcentaje de probabilidad de pertenencia a cada clase. Con esta probabilidad y las relaciones entre clases se establece la clase más probable de cada objeto o célula.

Clase preferente

Cuando existen varias clases excluyentes la clase que reciba mayor probabilidad será la clase preferente.

Jerarquía de clases

Para definir las relaciones entre tipos de objetos se establece una estructura jerárquica de árbol. De esta manera las clases del mismo nivel procedentes de la misma clase madre son excluyentes. A su vez las clases hijas y su hija madre mantienen relación de obligatoriedad.

Detección de bordes mediante contornos activos

El sistema de segmentación por modelos deformables o por contornos activos soporta la combinación de gran variabilidad en los objetos en escala de grises a la vez que la interacción del usuario. El sistema de contornos activos se basa en la geometría de los objetos a la vez que limitaciones de la variación de la forma de los objetos. Se basa en un sistema de ajuste de modelos a datos medidos de los píxeles de la imagen. Los contornos se ajustan según fuerzas internas y externas. La energía interna es el suavizado y elasticidad de la curva, la energía interna aumenta con el alargamiento y la doblez. La energía externa la determina la atracción de la curva a los lados del objeto, la energía externa aumenta al alejarse de los máximos locales en el gradiente del borde. La curva se estabiliza en su punto de mínima energía. El sistema de contornos activos depende de un contorno inicial otorgado como punto de salida para que se amolde el contorno. En nuestro caso los contornos detectados en los umbrales son utilizados como punto de partida para buscar los contornos mediante modelos deformables.

Crear etiquetas

En el menú de asignación de etiquetas de la pestaña de muestreo se pueden crear etiquetas. Las etiquetas creadas aquí se añaden a la lista de etiquetas disponibles. A partir de ese momento, el usuario podrá seleccionarlas para aplicarlas a las selecciones.

Asignar o quitar etiqueta a posteriori

En la pestaña de objetos, cuando el usuario elige un objeto en el panel central, tiene la opción en el panel de lateral de asignar o retirar etiquetas del objeto.

Mejorar bordes seleccionados

El usuario puede solicitar que se mejoren los bordes de aquellas células a las que el usuario haya asignado una calidad de borde menor que 1.0. La solicitud se pasa al núcleo, el núcleo selecciona las células que cumplen esta condición y las envía junto con la solicitud a la unidad de análisis de imagen. La unidad de análisis de imagen solicita que se realicen todos los pasos si la calidad está por debajo de 0.8. Si está por encima solo se piden más bordes refinados entorno al borde seleccionado.

Medir en la imagen actual

Para cada célula se captura una vista en la célula actual, cuando se ha añadido la captura a todas las células se envían al núcleo y el núcleo envía la petición al análisis de imagen. El análisis de imagen en este caso solo realiza el paso de medida con el borde seleccionado sobre la nueva vista para cada célula.

Medir a través del *hyperstack*

Para cada célula se captura una vista en la célula actual en cada desplazándose por todos los planos por canal, posición z y frame temporal. Cuando se han añadido todas las capturas a todas las células se envían al núcleo y el núcleo envía la petición al análisis de imagen. El análisis de imagen en este caso realiza el paso de medida con el borde seleccionado sobre cada nueva vista para cada célula.

Bibliografía

1. Hey T, *The Fourth Paradigm – Data-Intensive Scientific Discovery*, in *E-Science and Information Management*, S. Kurbanoglu, et al., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-1.
2. Collins JP (2010). Sailing on an ocean of 0s and 1s. *Science*. **327**(5972): p. 1455-1456.
3. Nielsen M (2009). A guide to the day of big data. *Nature*. **462**(7274): p. 722-723.
4. Buckow K, Quade M, et ál. (2014). Changing requirements and resulting needs for IT-infrastructure for longitudinal research in the neurosciences. *Neurosci Res*.
5. Vitaterna MH, Takahashi JS, et ál. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. **25**(2): p. 85-93.
6. Dawson KA (2004). Temporal organization of the brain: Neurocognitive mechanisms and clinical implications. *Brain Cogn*. **54**(1): p. 75-94.
7. Moore RY (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **119**: p. 1-28.
8. Lee C, Etchegaray JP, et ál. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*. **107**(7): p. 855-67.
9. Wright KP, Jr. y Czeisler CA (2002). Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees. *Science*. **297**(5581): p. 571.
10. Takahashi JS y Zatz M (1982). Regulation of circadian rhythmicity. *Science*. **217**(4565): p. 1104-11.
11. Shirakawa T y Moore RY (1994). Responses of rat suprachiasmatic nucleus neurons to substance P and glutamate in vitro. *Brain Res*. **642**(1-2): p. 213-20.
12. Welsh DK, Logothetis DE, et ál. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. **14**(4): p. 697-706.
13. Ibata Y, Tanaka M, et ál. (1993). Neuronal interaction between VIP and vasopressin neurones in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*. **4**(2): p. 128-30.
14. Cahill GM y Menaker M (1989). Effects of excitatory amino acid receptor antagonists and agonists on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys. *Brain Res*. **479**(1): p. 76-82.
15. Hannibal J, Ding JM, et ál. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci*. **17**(7): p. 2637-44.
16. LeSauter J y Silver R (1998). Output signals of the SCN. *Chronobiol Int*. **15**(5): p. 535-50.
17. Koch BC, Nagtegaal JE, et ál. (2009). Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. **5**(7): p. 407-16.
18. Robertson JB, Stowers CC, et ál. (2008). Real-time luminescence monitoring of cell-cycle and respiratory oscillations in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(46): p. 17988-93.
19. Golombek DA y Rosenstein RE (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*. **90**(3): p. 1063-102.
20. King DP y Takahashi JS (2000). Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci*. **23**: p. 713-42.

21. Inouye ST y Kawamura H (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**(11): p. 5962-6.
22. Wang R, Chen L, et ál. (2007). Detection of cellular rhythms and global stability within interlocked feedback systems. *Math Biosci*. **209**(1): p. 171-89.
23. Reppert SM y Weaver DR (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. **418**(6901): p. 935-41.
24. Wang C, Zhang ZM, et ál. (2014). Interplay between Dioxin-mediated signaling and circadian clock: a possible determinant in metabolic homeostasis. *Int J Mol Sci*. **15**(7): p. 11700-12.
25. Aschoff J (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol*. **49**(3): p. 225-49.
26. Madrid JA y de los Ángeles Rol de Lama M (2006). *Cronobiología básica y clínica*.: Editec@Rec.
27. Hastings MH, Duffield GE, et ál. (1997). Non-photoc signalling in the suprachiasmatic nucleus. *Biol Cell*. **89**(8): p. 495-503.
28. Acuna D, Fernandez B, et ál. (1990). Influence of the pituitary-adrenal axis on benzodiazepine receptor binding to rat cerebral cortex. *Neuroendocrinology*. **51**(1): p. 97-103.
29. Huang H, Wang Z, et ál. (2013). Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Prog Retin Eye Res*. **32**: p. 64-87.
30. Harris CD (2005). Neurophysiology of sleep and wakefulness. *Respir Care Clin N Am*. **11**(4): p. 567-86.
31. Sutton EL (2014). Psychiatric disorders and sleep issues. *Med Clin North Am*. **98**(5): p. 1123-43.
32. Hattar S (2014). The time of your life. Disponible en: <http://www.hopkinsmedicine.org/research/advancements-in-research/fundamentals/in-depth/the-time-of-your-life>.
33. Dubuc B (2016). Nos différents sommeils. Disponible en: http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_11/i_11_p/i_11_p_cyc/i_11_p_cyc.html.
34. Haus E (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev*. **59**(9-10): p. 985-1014.
35. Bailey SM, Udoh US, et ál. (2014). Circadian regulation of metabolism. *J Endocrinol*. **222**(2): p. R75-96.
36. Konturek PC, Brzozowski T, et ál. (2011). Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*. **62**(2): p. 139-50.
37. Gillette MU y Wang TA (2014). Brain circadian oscillators and redox regulation in mammals. *Antioxid Redox Signal*. **20**(18): p. 2955-65.
38. Curtis AM, Bellet MM, et ál. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*. **40**(2): p. 178-86.
39. Hermida RC, Ayala DE, et ál. (2014). Chronotherapeutics of conventional blood pressure-lowering medications: simple, low-cost means of improving management and treatment outcomes of hypertensive-related disorders. *Curr Hypertens Rep*. **16**(2): p. 412.
40. Sato M, Matsuo T, et ál. (2013). Possible contribution of chronobiology to cardiovascular health. *Front Physiol*. **4**: p. 409.

41. Wuerzner G, Firsov D, et ál. (2014). Circadian glomerular function: from physiology to molecular and therapeutical aspects. *Nephrol Dial Transplant.* **29**(8): p. 1475-80.
42. Filipski E, King VM, et ál. (2002). Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* **94**(9): p. 690-7.
43. Innominato PF, Roche VP, et ál. (2014). The circadian timing system in clinical oncology. *Ann Med.* **46**(4): p. 191-207.
44. Fu L y Kettner NM (2013). The circadian clock in cancer development and therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **119**: p. 221-82.
45. Blatter K y Cajochen C (2007). Circadian rhythms in cognitive performance: methodological constraints, protocols, theoretical underpinnings. *Physiol Behav.* **90**(2-3): p. 196-208.
46. Postolache TT, Hung TM, et ál. (2005). Sports chronobiology consultation: from the lab to the arena. *Clin Sports Med.* **24**(2): p. 415-56, xiv.
47. Monti JM y Monti D (2004). Sleep in schizophrenia patients and the effects of antipsychotic drugs. *Sleep Med Rev.* **8**(2): p. 133-48.
48. Seron-Ferre M, Mendez N, et ál. (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Mol Cell Endocrinol.* **349**(1): p. 68-75.
49. Campos Costa I, Nogueira Carvalho H, et ál. (2013). Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review. *Am J Neurodegener Dis.* **2**(4): p. 228-46.
50. Blask DE, Dauchy RT, et ál. (2009). Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther.* **8**(4): p. 347-53.
51. Dauchy RT, Dupepe LM, et ál. (2011). Eliminating animal facility light-at-night contamination and its effect on circadian regulation of rodent physiology, tumor growth, and metabolism: a challenge in the relocation of a cancer research laboratory. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* **50**(3): p. 326-36.
52. Emilay Melatonin (2015). Quality of sleep. Disponible en: <http://www.emilayusa.com/history/emilay-melatonin/>.
53. Pickard GE, Smeraski CA, et ál. (2002). Intravitreal injection of the attenuated pseudorabies virus PRV Bartha results in infection of the hamster suprachiasmatic nucleus only by retrograde transsynaptic transport via autonomic circuits. *J Neurosci.* **22**(7): p. 2701-10.
54. Berson DM, Dunn FA, et ál. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* **295**(5557): p. 1070-3.
55. Provencio I, Rodriguez IR, et ál. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* **20**(2): p. 600-5.
56. Schmidt TM, Chen SK, et ál. (2011). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* **34**(11): p. 572-80.
57. Menaker M, Roberts R, et ál. (1970). Extraretinal light perception in the sparrow. 3. The eyes do not participate in photoperiodic photoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **67**(1): p. 320-5.
58. Taylor DH (1972). Extra-optic photoreception and compass orientation in larval and adult salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Anim Behav.* **20**(2): p. 233-6.
59. Tamotsu S y Morita Y (1986). Photoreception in pineal organs of larval and adult lampreys, *Lampetra japonica*. *J Comp Physiol A.* **159**(1): p. 1-5.

60. Foster RG, Provencio I, et ál. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*. **169**(1): p. 39-50.
61. Provencio I, Wong S, et ál. (1994). Visual and circadian responses to light in aged retinally degenerate mice. *Vision Res*. **34**(14): p. 1799-806.
62. Czeisler CA, Shanahan TL, et ál. (1995). Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*. **332**(1): p. 6-11.
63. Klerman EB, Shanahan TL, et ál. (2002). Photic resetting of the human circadian pacemaker in the absence of conscious vision. *J Biol Rhythms*. **17**(6): p. 548-55.
64. Silva MM, Albuquerque AM, et ál. (2005). Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *J Circadian Rhythms*. **3**: p. 10.
65. Soucy E, Wang Y, et ál. (1998). A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron*. **21**(3): p. 481-93.
66. Freedman MS, Lucas RJ, et ál. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. **284**(5413): p. 502-4.
67. Lucas RJ, Freedman MS, et ál. (1999). Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. **284**(5413): p. 505-7.
68. Mrosovsky N, Lucas RJ, et ál. (2001). Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms*. **16**(6): p. 585-8.
69. Hannibal J, Moller M, et ál. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol*. **418**(2): p. 147-55.
70. Mintz EM, Marvel CL, et ál. (1999). Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci*. **19**(12): p. 5124-30.
71. Hannibal J, Vrang N, et ál. (2001). Light-dependent induction of cFos during subjective day and night in PACAP-containing ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Biol Rhythms*. **16**(5): p. 457-70.
72. Nielsen HS, Hannibal J, et ál. (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces period1 and period2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience*. **103**(2): p. 433-41.
73. Hannibal J, Hindersson P, et ál. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci*. **22**(1): p. RC191.
74. Sekaran S, Foster RG, et ál. (2003). Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol*. **13**(15): p. 1290-8.
75. Lucas RJ, Douglas RH, et ál. (2001). Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci*. **4**(6): p. 621-6.
76. Hattar S, Lucas RJ, et ál. (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. **424**(6944): p. 76-81.
77. Brainard GC, Hanifin JP, et ál. (2001). Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*. **21**(16): p. 6405-12.
78. Thapan K, Arendt J, et ál. (2001). An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol*. **535**(Pt 1): p. 261-7.

79. Lockley SW, Brainard GC, et ál. (2003). High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(9): p. 4502-5.
80. Hankins MW y Lucas RJ (2002). The primary visual pathway in humans is regulated according to long-term light exposure through the action of a nonclassical photopigment. *Curr Biol.* **12**(3): p. 191-8.
81. Provencio I, Jiang G, et ál. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(1): p. 340-5.
82. Hattar S, Liao HW, et ál. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* **295**(5557): p. 1065-70.
83. Gooley JJ, Lu J, et ál. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci.* **4**(12): p. 1165.
84. Hannibal J, Hindersson P, et ál. (2004). Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(11): p. 4202-9.
85. Lucas RJ, Hattar S, et ál. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science.* **299**(5604): p. 245-7.
86. Panda S, Provencio I, et ál. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science.* **301**(5632): p. 525-7.
87. Melyan Z, Tarttelin EE, et ál. (2005). Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature.* **433**(7027): p. 741-5.
88. Panda S, Nayak SK, et ál. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science.* **307**(5709): p. 600-4.
89. Qiu X, Kumbalasisri T, et ál. (2005). Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature.* **433**(7027): p. 745-9.
90. Arendt D (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol.* **47**(7-8): p. 563-71.
91. Koyanagi M, Kubokawa K, et ál. (2005). Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Curr Biol.* **15**(11): p. 1065-9.
92. Terakita A (2005). The opsins. *Genome Biol.* **6**(3): p. 213.
93. Bellingham J, Chaurasia SS, et ál. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol.* **4**(8): p. e254.
94. Pires SS, Shand J, et ál. (2007). Isolation and characterization of melanopsin (Opn4) from the Australian marsupial *Sminthopsis crassicaudata* (fat-tailed dunnart). *Proc Biol Sci.* **274**(1627): p. 2791-9.
95. Pires SS, Hughes S, et ál. (2009). Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *J Neurosci.* **29**(39): p. 12332-42.
96. Hatori M y Panda S (2010). The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med.* **16**(10): p. 435-46.
97. Dacey DM, Liao HW, et ál. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature.* **433**(7027): p. 749-54.

98. Newman LA, Walker MT, et ál. (2003). Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry*. **42**(44): p. 12734-8.
99. Borges R, Johnson WE, et ál. (2012). The role of gene duplication and unconstrained selective pressures in the melanopsin gene family evolution and vertebrate circadian rhythm regulation. *PLoS One*. **7**(12): p. e52413.
100. Koyanagi M, Takano K, et ál. (2008). Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(40): p. 15576-80.
101. Fu Y, Zhong H, et ál. (2005). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(29): p. 10339-44.
102. Isoldi MC, Rollag MD, et ál. (2005). Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(4): p. 1217-21.
103. Peirson SN, Oster H, et ál. (2007). Microarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. *Curr Biol*. **17**(16): p. 1363-72.
104. Sekaran S, Lall GS, et ál. (2007). 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity in vitro and in vivo. *J Neurosci*. **27**(15): p. 3981-6.
105. Tu DC, Zhang D, et ál. (2005). Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron*. **48**(6): p. 987-99.
106. Schmidt TM y Kofuji P (2009). Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci*. **29**(2): p. 476-82.
107. Yau KW y Hardie RC (2009). Phototransduction motifs and variations. *Cell*. **139**(2): p. 246-64.
108. Davies WI, Zheng L, et ál. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*. **68**(24): p. 4115-32.
109. Ye H, Daoud-El Baba M, et ál. (2011). A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*. **332**(6037): p. 1565-8.
110. Sekaran S, Lupi D, et ál. (2005). Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol*. **15**(12): p. 1099-107.
111. Provencio I, Cooper HM, et ál. (1998). Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol*. **395**(4): p. 417-39.
112. Benarroch EE (2011). The melanopsin system: Phototransduction, projections, functions, and clinical implications. *Neurology*. **76**(16): p. 1422-7.
113. Hattar S, Kumar M, et ál. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol*. **497**(3): p. 326-49.
114. Berson DM, Castrucci AM, et ál. (2010). Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol*. **518**(13): p. 2405-22.
115. Viney TJ, Balint K, et ál. (2007). Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr Biol*. **17**(11): p. 981-8.
116. Schmidt TM, Taniguchi K, et ál. (2008). Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J Neurophysiol*. **100**(1): p. 371-84.
117. Hughes S, Welsh L, et ál. (2012). Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One*. **7**(4): p. e34531.

118. Hatori M, Le H, et ál. (2008). Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One*. **3**(6): p. e2451.
119. Ecker JL, Dumitrescu ON, et ál. (2010). Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron*. **67**(1): p. 49-60.
120. Altimus CM, Guler AD, et ál. (2008). Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(50): p. 19998-20003.
121. Guler AD, Ecker JL, et ál. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*. **453**(7191): p. 102-5.
122. Belenky MA, Smeraski CA, et ál. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol*. **460**(3): p. 380-93.
123. Wong KY, Dunn FA, et ál. (2007). Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol*. **582**(Pt 1): p. 279-96.
124. Ostergaard J, Hannibal J, et ál. (2007). Synaptic contact between melanopsin-containing retinal ganglion cells and rod bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **48**(8): p. 3812-20.
125. Hoshi H, Liu WL, et ál. (2009). ON inputs to the OFF layer: bipolar cells that break the stratification rules of the retina. *J Neurosci*. **29**(28): p. 8875-83.
126. Pickard GE, Baver SB, et ál. (2009). Light-induced fos expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in melanopsin knockout (*opn4*) mice. *PLoS One*. **4**(3): p. e4984.
127. Vugler AA, Redgrave P, et ál. (2007). Dopamine neurones form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Exp Neurol*. **205**(1): p. 26-35.
128. Zhang DQ, Wong KY, et ál. (2008). Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(37): p. 14181-6.
129. Morin LP, Blanchard JH, et ál. (2003). Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol*. **465**(3): p. 401-16.
130. Gooley JJ, Lu J, et ál. (2003). A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci*. **23**(18): p. 7093-106.
131. Hannibal J y Fahrenkrug J (2004). Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res*. **316**(1): p. 99-113.
132. Sherin JE, Shiromani PJ, et ál. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*. **271**(5246): p. 216-9.
133. Vandewalle G, Schmidt C, et ál. (2007). Brain responses to violet, blue, and green monochromatic light exposures in humans: prominent role of blue light and the brainstem. *PLoS One*. **2**(11): p. e1247.
134. Gonzalez-Menendez I, Contreras F, et ál. (2010). Postnatal development and functional adaptations of the melanopsin photoreceptive system in the albino mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **51**(9): p. 4840-7.
135. Gonzalez-Menendez I, Contreras F, et ál. (2011). Perinatal development of melanopsin expression in the mouse retina. *Brain Res*. **1419**: p. 12-8.

136. Tarttelin EE, Bellingham J, et ál. (2003). Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res.* **76**(3): p. 393-6.
137. Strom RC y Williams RW (1998). Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number. *J Neurosci.* **18**(23): p. 9948-53.
138. Gonzalez-Menendez I, Contreras F, et ál. (2010). No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina. *Histol Histopathol.* **25**(1): p. 73-82.
139. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, et ál. (2010). Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain.* **133**(Pt 8): p. 2426-38.
140. Li SY, Yau SY, et ál. (2008). Enhanced survival of melanopsin-expressing retinal ganglion cells after injury is associated with the PI3 K/Akt pathway. *Cell Mol Neurobiol.* **28**(8): p. 1095-107.
141. Perez de Sevilla Muller L, Sargoy A, et ál. (2014). Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. *PLoS One.* **9**(3): p. e93274.
142. Speh JC y Moore RY (1993). Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Brain Res Dev Brain Res.* **76**(2): p. 171-81.
143. Leard LE, Macdonald ES, et ál. (1994). Ontogeny of photic-induced c-fos mRNA expression in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport.* **5**(18): p. 2683-7.
144. Weaver DR y Reppert SM (1995). Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res.* **33**(1): p. 136-48.
145. Meister M, Wong RO, et ál. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science.* **252**(5008): p. 939-43.
146. Lupi D, Sekaran S, et ál. (2006). Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4^{-/-}) mice: a developmental study. *Chronobiol Int.* **23**(1-2): p. 167-79.
147. Johnson J, Wu V, et ál. (2010). Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(40): p. 17374-8.
148. Berardi N, Pizzorusso T, et ál. (2000). Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol.* **10**(1): p. 138-45.
149. Renna JM, Weng S, et ál. (2011). Light acts through melanopsin to alter retinal waves and segregation of retinogeniculate afferents. *Nat Neurosci.* **14**(7): p. 827-9.
150. Gonzalez-Menendez I, Contreras F, et ál. (2009). Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front Cell Neurosci.* **3**: p. 3.
151. Sakamoto K, Liu C, et ál. (2004). Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci.* **24**(43): p. 9693-7.
152. Sakamoto K, Liu C, et ál. (2005). Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci.* **22**(12): p. 3129-36.
153. Hannibal J, Georg B, et ál. (2005). Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci.* **27**(2): p. 147-55.
154. Mathes A, Engel L, et ál. (2007). Daily profile in melanopsin transcripts depends on seasonal lighting conditions in the rat retina. *J Neuroendocrinol.* **19**(12): p. 952-7.
155. Wan J, Zheng H, et ál. (2006). Acute photoreceptor degeneration down-regulates melanopsin expression in adult rat retina. *Neurosci Lett.* **400**(1-2): p. 48-52.

156. Cameron MA, Pozdeyev N, et ál. (2009). Light regulation of retinal dopamine that is independent of melanopsin phototransduction. *Eur J Neurosci.* **29**(4): p. 761-7.
157. Semo M, Peirson S, et ál. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci.* **17**(9): p. 1793-801.
158. Manglapus MK, Iuvone PM, et ál. (1999). Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. *J Neurosci.* **19**(10): p. 4132-41.
159. Witkovsky P (2004). Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* **108**(1): p. 17-40.
160. Dumitrescu ON, Pucci FG, et ál. (2009). Ectopic retinal ON bipolar cell synapses in the OFF inner plexiform layer: contacts with dopaminergic amacrine cells and melanopsin ganglion cells. *J Comp Neurol.* **517**(2): p. 226-44.
161. Muller LP, Do MT, et ál. (2010). Tracer coupling of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to amacrine cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* **518**(23): p. 4813-24.
162. Morin LP y Studholme KM (2011). Separation of function for classical and ganglion cell photoreceptors with respect to circadian rhythm entrainment and induction of photosomnolence. *Neuroscience.* **199**: p. 213-24.
163. Warthen DM, Wiltgen BJ, et ál. (2011). Light enhances learned fear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(33): p. 13788-93.
164. Brown TM, Wynne J, et ál. (2011). Multiple hypothalamic cell populations encoding distinct visual information. *J Physiol.* **589**(Pt 5): p. 1173-94.
165. Brown TM, Tsujimura S, et ál. (2012). Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans. *Curr Biol.* **22**(12): p. 1134-41.
166. Estevez ME, Fogerson PM, et ál. (2012). Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *J Neurosci.* **32**(39): p. 13608-20.
167. Baver SB, Pickard GE, et ál. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci.* **27**(7): p. 1763-70.
168. Nieto PS, Valdez DJ, et ál. (2011). Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5. Presence of OPN5 in the rat retina. *PLoS One.* **6**(10): p. e26417.
169. Enezi J, Revell V, et ál. (2011). A "melanopic" spectral efficiency function predicts the sensitivity of melanopsin photoreceptors to polychromatic lights. *J Biol Rhythms.* **26**(4): p. 314-23.
170. Sackett DL (1979). Bias in analytic research. *J Chronic Dis.* **32**(1-2): p. 51-63.
171. Altman DG y Goodman SN (1994). Transfer of technology from statistical journals to the biomedical literature. Past trends and future predictions. *JAMA.* **272**(2): p. 129-32.
172. Rothman KJ (1976). Causes. *Am J Epidemiol.* **104**(6): p. 587-92.
173. Altman DG y Bland JM (1995). Statistics notes: the normal distribution. *BMJ.* **310**(6975): p. 298.
174. Wikispaces pc3 (2016). Central tendency. Statistical tools-percentage, graphical representation, frequency distribution, central tendency, variation, normal distribution, percentile rank, correlation and their interpretation; Disponible en: <http://pc3.wikispaces.com/Statistical+tools->

- [percentage,+graphical+representation,+frequency+distribution,+central+tendency,+variation,+normal+distribution,+percentile+rank,+correlation+and+their+interpretation.](#)
175. Lohninger H (2012). Zentraler Grenzwertsatz. Statistics4u; Disponible en: http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_central_limit.html.
 176. Mello-Moura AC, Fanaro J, et ál. (2011). Variability in the proportion of components of iodoform-based Guedes-Pinto paste mixed by dental students and pediatric dentists. *Indian J Dent Res.* **22**(6): p. 781-5.
 177. Shukla P (2013). Essentials of marketing research http://openlibrary.org/books/OL25879431M/Essentials_of_Marketing_Research; Bookboon.
 178. Upadhyay R (2015). Time Series Decomposition – Manufacturing Case Study Example (Part 2). YOU CANalytics; Disponible en: <http://ucanalytics.com/blogs/time-series-decomposition-manufacturing-case-study-example-part-2/>.
 179. Lema MA, Echave J, et ál. (2001). (Too Many) Mathematical Models of Circadian Clocks (?). *Biological Rhythm Research.* **32**(2): p. 285-298.
 180. Daan S, Beersma DG, et ál. (1984). Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol.* **246**(2 Pt 2): p. R161-83.
 181. Abecasis GR, Altshuler D, et ál. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* **467**(7319): p. 1061-73.
 182. Raney BJ, Cline MS, et ál. (2011). ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update). *Nucleic Acids Res.* **39**(Database issue): p. D871-5.
 183. Wikipedia (2015). Cross Industry Standard Process for Data Mining.; Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Cross_Industry_Standard_Process_for_Data_Mining&oldid=86652529.
 184. SKS Bi Consultancy (2016). Data mining. Disponible en: <http://www.sksbic.nl/toepassing-en-bi/datamining/>.
 185. NEC (2016). Big Data Processing Technologies. Disponible en: <http://www.nec.com/en/global/rd/research/cl/bdpt.html>.
 186. Giordani A (2011). A grid cooperative. ScienceNode; Disponible en: <https://sciencenode.org/feature/grid-cooperative.php>.
 187. Chen JM, Qu AP, et ál. (2015). New breast cancer prognostic factors identified by computer-aided image analysis of HE stained histopathology images. *Sci Rep.* **5**: p. 10690.
 188. Van Damme B (2012). Loop waveform visualizer. Disponible en: <https://www.bram.us/2012/02/22/loop-waveform-visualizer/>.
 189. Wallace W (2015). Algorithms for Deconvolution Microscopy. Disponible en: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/deconvolution/deconalgorithms.html>.
 190. Khaled A, Atia MRA, et ál.). Grey Cast Iron Categorization using Artificial Neural Network.
 191. Wang CW, Ka SM, et ál. (2014). Robust image registration of biological microscopic images. *Sci Rep.* **4**: p. 6050.
 192. SVI (2016). Seed-and-threshold segmentation. Disponible en: <https://svi.nl/SeedAndThreshold>.

193. Mathworks (2016). Segmentation methods in image processing and analysis. Disponible en: <http://es.mathworks.com/discovery/image-segmentation.html?requestedDomain=es.mathworks.com>.
194. Mathworks (2016). Morphological reconstruction. Disponible en: <http://es.mathworks.com/help/images/ref/imreconstruct.html>.
195. ImageJ (2016). Process Menu. Disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/menus/process.html>.
196. ImageJ (2016). Analyze menu. Disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html>.
197. Pitas I (2000). Digital image processing algorithms and applications New York: Wiley. 419 p.
198. Huang TS y Andrews HC (1975). Picture processing and digital filtering. Topics in applied physics v 6 Berlin ; New York: Springer-Verlag. xi, 289 p.
199. Rom R (1975). On the cepstrum of two-dimensional functions (Corresp.). Information Theory, IEEE Transactions on. **21**(2): p. 214-217.
200. McInerney T y Terzopoulos D (1996). Deformable models in medical image analysis: a survey. Med Image Anal. **1**(2): p. 91-108.
201. Vincent L (1993). Morphological grayscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms. Image Processing, IEEE Transactions on. **2**(2): p. 176-201.
202. Gonzalez RC y Woods RE (1992). Digital image processing Reading, Mass.: Addison-Wesley. xvi, 716 p.
203. Blum H (1964). A transformation for extracting new descriptors of shape.
204. Ming-Kuei H (1962). Visual pattern recognition by moment invariants. Information Theory, IRE Transactions on. **8**(2): p. 179-187.
205. Wootton R, Springall DR, et ál. (1995). Image analysis in histology : conventional and confocal microscopy. Postgraduate medical science Cambridge ; New York: Published in association with the Royal Postgraduate Medical School, University of London by Cambridge University Press. xv, 425 p., 7 p. of plates.
206. Dyer CR (1980). Computing the Euler number of an image from its quadtree. Computer Graphics and Image Processing. **13**(3): p. 270-276.
207. Simon S, Guthke R, et ál. (2012). Multivariate analysis of flow cytometric data using decision trees. Front Microbiol. **3**: p. 114.
208. Sandberg R (2014). Entering the era of single-cell transcriptomics in biology and medicine. Nat Methods. **11**(1): p. 22-4.
209. Bajic VB, Brusic V, et ál. *From informatics to bioinformatics*. in *Proceedings of the First Asia-Pacific bioinformatics conference on Bioinformatics 2003-Volume 19*. 2003. Australian Computer Society, Inc.
210. Fitsilis P, *Comparing PMBOK and Agile Project Management software development processes*, in *Advances in Computer and Information Sciences and Engineering* 2008, Springer. p. 378-383.
211. Gentleman RC, Carey VJ, et ál. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol. **5**(10): p. R80.
212. Jacobson I, Booch G, et ál. (1999). The unified software development process. Vol. 1. Addison-wesley Reading.

213. White Hat And Other Stuff Wt (2014). S-SDLC: Aplicando seguridad al ciclo de vida del Software. Disponible en: <http://wh0s.org/2014/12/07/s-sdlc-aplicando-seguridad-al-ciclo-de-vida-del-software/>.
214. Professorpm (2013). Practical Project Management Tips and Tools. Wellcome. Disponible en: <http://professorpm.com/2013/11/09/welcome-2/>.
215. Callegari DA y Bastos RM. *Project management and software development processes: integrating RUP and PMBOK*. in *Systems Engineering and Modeling, 2007. ICSEM'07. International Conference on*. 2007. IEEE.
216. Guide A. *Project Management Body of Knowledge (PMBOK® GUIDE)*. in *Project Management Institute*. 2001.
217. Floyd RW (1979). The paradigms of programming. *Communications of the ACM*. **22**(8): p. 455-460.
218. Gamma E, Helm R, et ál. (1994). *Design patterns: elements of reusable object-oriented software*: Pearson Education.
219. Shaw M y Garlan D (1996). *Software architecture: perspectives on an emerging discipline*. Vol. 1. Prentice Hall Englewood Cliffs.
220. Álvarez M (2014). Qué es MVC. Disponible en: <http://www.desarrolloweb.com/articulos/que-es-mvc.html>.
221. Sánchez González C (2004). ONess: un proyecto open source para el negocio textil mayorista desarrollado con tecnologías open source innovadoras. . Disponible en: <http://oness.sourceforge.net/proyecto/html/ch03s02.html>.
222. Mutterer J y Rasband W) *ImageJ Macro Language Programmer's Reference Guide v1*, 46d.
223. Bailer W (2006). *Writing ImageJ plugins—a tutorial*. Upper Austria University of Applied Sciences, Austria.
224. Shreiner D, Woo M, et ál. (2007). *OpenGL (R) programming guide: The official guide to learning OpenGL (R), version 2.1*: Addison-Wesley Professional.
225. Brooks RA (1991). Intelligence without representation. *Artificial intelligence*. **47**(1): p. 139-159.
226. Russell S y Norvig P (1995). *Artificial intelligence: a modern approach*.
227. Rosado Hernández M (2013). *Diseño de programas pseudocódigo y diagramas*. Disponible en: <http://informatica.iesvalledeljerteplascencia.es/wordpress/disenio-de-programas-pseudocodigo-y-diagramas/>.
228. Wikilibros Contributors (2008). *Programación en C++/Funciones*. Disponible en: https://es.wikibooks.org/w/index.php?title=Programaci%C3%B3n_en_C%2B%2B/Funciones&oldid=289140.
229. Quinlan JR (2014). *C4. 5: programs for machine learning*: Elsevier.
230. Berry MJ y Linoff G (1997). *Data mining techniques: for marketing, sales, and customer support*: John Wiley & Sons, Inc.
231. Sonka M, Hlavac V, et ál. (2014). *Image processing, analysis, and machine vision*: Cengage Learning.
232. Haralick RM y Shapiro LG (1992). *Computer and Robot Vision*: Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.
233. Colaboradores de Wikipedia (2016). *Visión artificial*. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Visi%C3%B3n_artificial&oldid=89115506.

234. Farber DB y Lolley RN (1974). Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science*. **186**(4162): p. 449-51.
235. Bowes C, Li T, et ál. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature*. **347**(6294): p. 677-80.
236. Hackam AS, Strom R, et ál. (2004). Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **45**(9): p. 2929-42.
237. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, et ál. (2008). Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol*. **38**(3): p. 253-69.
238. Strettoi E, Porciatti V, et ál. (2002). Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci*. **22**(13): p. 5492-504.
239. Kretz A, Marticke JK, et ál. (2007). A primary culture technique of adult retina for regeneration studies on adult CNS neurons. *Nat Protoc*. **2**(1): p. 131-40.
240. Matteucci A, Varano M, et ál. (2015). Primary retinal cultures as a tool for modeling diabetic retinopathy: an overview. *Biomed Res Int*. **2015**: p. 364924.
241. Xin H, Yannazzo JA, et ál. (2007). A novel organotypic culture model of the postnatal mouse retina allows the study of glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci Methods*. **159**(1): p. 35-42.
242. Cahill GM y Besharse JC (1991). Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci*. **11**(10): p. 2959-71.
243. Balsalobre A, Damiola F, et ál. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. **93**(6): p. 929-37.
244. Chen Z, Yoo SH, et ál. (2013). Small molecule modifiers of circadian clocks. *Cell Mol Life Sci*. **70**(16): p. 2985-98.
245. Altman DG (1990). *Practical statistics for medical research*: CRC Press.
246. Sroubek F, Cristobal G, et ál. (2008). Simultaneous super-resolution and blind deconvolution. *Journal of Physics: Conference Series*. **124**(1): p. 012048.
247. Zuiderveld K, *Contrast limited adaptive histogram equalization*, in *Graphics gems IV*, S.H. Paul, Editor 1994, Academic Press Professional, Inc. p. 474-485.
248. Pittendrigh C y Daan S (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology*. **106**(3): p. 223-252.
249. Azzi A, Dallmann R, et ál. (2014). Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation. *Nat Neurosci*. **17**(3): p. 377-82.
250. Alvarez-Lopez C, Cernuda-Cernuda R, et ál. (2006). The mPer1 clock gene expression in the rd mouse suprachiasmatic nucleus is affected by the retinal degeneration. *Brain Res*. **1087**(1): p. 134-41.
251. Pack W, Hill DD, et ál. (2015). Melatonin modulates M4-type ganglion-cell photoreceptors. *Neuroscience*. **303**: p. 178-88.
252. Van Hook MJ, Wong KY, et ál. (2012). Dopaminergic modulation of ganglion-cell photoreceptors in rat. *Eur J Neurosci*. **35**(4): p. 507-18.
253. Yamazaki S, Alones V, et ál. (2002). Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *J Biol Rhythms*. **17**(4): p. 315-29.
254. Wee R, Castrucci AM, et ál. (2002). Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in math5^{-/-} mice. *J Neurosci*. **22**(23): p. 10427-33.

255. Laemle LK, Hori N, et ál. (2002). Physiological and anatomical properties of the suprachiasmatic nucleus of an anophthalmic mouse. *Brain Res.* **953**(1-2): p. 73-81.
256. Lupi D, Cooper HM, et ál. (1999). Transgenic ablation of rod photoreceptors alters the circadian phenotype of mice. *Neuroscience.* **89**(2): p. 363-74.
257. Tosini G, Aguzzi J, et ál. (2007). Effect of photoreceptor degeneration on circadian photoreception and free-running period in the Royal College of Surgeons rat. *Brain Res.* **1148**: p. 76-82.
258. Yoshimura T, Nishio M, et ál. (1994). Differences in circadian photosensitivity between retinally degenerate CBA/J mice (rd/rd) and normal CBA/N mice (+/+). *J Biol Rhythms.* **9**(1): p. 51-60.
259. Sengpiel F y Kind PC (2002). The role of activity in development of the visual system. *Curr Biol.* **12**(23): p. R818-26.
260. Jameie SB, Abdolrahmani M, et ál. (2010). Effects of total light deprivation on dorsal lateral geniculate nucleus of male neonate rats. *Oman Med J.* **25**(3): p. 179-83.
261. Gallego M, Kang H, et ál. (2006). Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochem J.* **399**(1): p. 169-75.
262. Ruggiero L, Allen CN, et ál. (2010). Mice with early retinal degeneration show differences in neuropeptide expression in the suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Funct.* **6**: p. 36.
263. Lamb AH (1984). Motoneuron death in the embryo. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol.* **1**(2): p. 141-79.
264. Oppenheim RW (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* **14**: p. 453-501.
265. Linden R y Perry VH (1982). Ganglion cell death within the developing retina: a regulatory role for retinal dendrites? *Neuroscience.* **7**(11): p. 2813-27.
266. Wright LL y Smolen AJ (1987). The role of neuron death in the development of the gender difference in the number of neurons in the rat superior cervical ganglion. *Int J Dev Neurosci.* **5**(4): p. 305-11.
267. Tian N y Copenhagen DR (2003). Visual stimulation is required for refinement of ON and OFF pathways in postnatal retina. *Neuron.* **39**(1): p. 85-96.
268. McNeill DS, Sheely CJ, et ál. (2011). Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Dev.* **6**: p. 8.
269. Takatsuji K, Oyamada H, et ál. (1995). Postnatal development of the substance P-, neuropeptide Y- and serotonin-containing fibers in the rat suprachiasmatic nucleus in relation to development of the retino-hypothalamic projection. *Brain Res Dev Brain Res.* **84**(2): p. 261-70.
270. Gordon JA y Stryker MP (1996). Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci.* **16**(10): p. 3274-86.
271. Kirkwood A, Rioult MC, et ál. (1996). Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature.* **381**(6582): p. 526-8.
272. Shibata S y Moore RY (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **431**(2): p. 311-5.
273. Ban Y, Shigeyoshi Y, et ál. (1997). Development of vasoactive intestinal peptide mRNA rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* **17**(10): p. 3920-31.
274. Landgraf D, Koch CE, et ál. (2014). Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Front Neuroanat.* **8**: p. 143.

275. Botchkina GI y Morin LP (1995). Ontogeny of radial glia, astrocytes and vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res.* **86**(1-2): p. 48-56.
276. Munekawa K, Tamada Y, et ál. (2000). Development of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of the rat: with special reference to the involvement of the optic nerve. *Exp Neurol.* **166**(1): p. 44-51.
277. Girardet C, Blanchard MP, et ál. (2010). Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. *Eur J Neurosci.* **31**(2): p. 359-70.
278. Aton SJ, Block GD, et ál. (2004). Plasticity of circadian behavior and the suprachiasmatic nucleus following exposure to non-24-hour light cycles. *J Biol Rhythms.* **19**(3): p. 198-207.
279. Yellon SM, Thorn KJ, et ál. (1993). Retinal input to the suprachiasmatic nucleus before and after puberty in Djungarian hamsters. *Brain Res Bull.* **32**(1): p. 29-33.
280. Bedont JL y Blackshaw S (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front Syst Neurosci.* **9**: p. 74.
281. Meaney MJ y Ferguson-Smith AC (2010). Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci.* **13**(11): p. 1313-8.
282. Brown SA, Kunz D, et ál. (2008). Molecular insights into human daily behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(5): p. 1602-7.
283. Barclay NL, Eley TC, et ál. (2010). Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. *Chronobiol Int.* **27**(2): p. 278-96.
284. Ciarleglio CM, Axley JC, et ál. (2011). Perinatal photoperiod imprints the circadian clock. *Nat Neurosci.* **14**(1): p. 25-7.
285. Natale V, Adan A, et ál. (2009). Season of birth, gender, and social-cultural effects on sleep timing preferences in humans. *Sleep.* **32**(3): p. 423-6.
286. Scheer FA, Wright KP, Jr., et ál. (2007). Plasticity of the intrinsic period of the human circadian timing system. *PLoS One.* **2**(8): p. e721.
287. Jasser SA, Hanifin JP, et ál. (2006). Dim light adaptation attenuates acute melatonin suppression in humans. *J Biol Rhythms.* **21**(5): p. 394-404.
288. Mrugala M, Zlomanczuk P, et ál. (2000). Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **278**(4): p. R987-94.
289. Schaap J, Albus H, et ál. (2003). Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(26): p. 15994-9.
290. Inagaki N, Honma S, et ál. (2007). Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(18): p. 7664-9.
291. Chiesa JJ, Angles-Pujolras M, et ál. (2006). History-dependent changes in entrainment of the activity rhythm in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms.* **21**(1): p. 45-57.
292. Matsumoto S, Basil J, et ál. (1996). Regulation of the phase and period of circadian rhythms restored by suprachiasmatic transplants. *J Biol Rhythms.* **11**(2): p. 145-62.
293. Nagoshi E, Saini C, et ál. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell.* **119**(5): p. 693-705.

294. Guo H, Brewer JM, et ál. (2006). Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci.* **26**(24): p. 6406-12.
295. Molyneux PC, Dahlgren MK, et ál. (2008). Circadian entrainment aftereffects in suprachiasmatic nuclei and peripheral tissues in vitro. *Brain Res.* **1228**: p. 127-34.
296. Bittman EL, Costello MK, et ál. (2007). Circadian organization of tau mutant hamsters: aftereffects and splitting. *J Biol Rhythms.* **22**(5): p. 425-31.
297. Pendergast JS, Friday RC, et ál. (2010). Photic entrainment of period mutant mice is predicted from their phase response curves. *J Neurosci.* **30**(36): p. 12179-84.
298. Beaulieu C y Cheng HY (2011). The acetyltransferase Clock is dispensable for circadian aftereffects in mice. *J Biol Rhythms.* **26**(6): p. 561-4.
299. Doyle SE, Grace MS, et ál. (2002). Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci.* **19**(5): p. 593-601.
300. Kasahara T, Abe K, et ál. (2010). Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(14): p. 6412-7.
301. Martin XD, Malina HZ, et ál. (1992). The ciliary body--the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur J Ophthalmol.* **2**(2): p. 67-72.
302. Reiter RJ y Tan DX (2003). What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res.* **34**(1): p. 79-80.
303. Choi D (2013). Potency of melatonin in living beings. *Dev Reprod.* **17**(3): p. 149-77.
304. Wang JS y Kefalov VJ (2009). An alternative pathway mediates the mouse and human cone visual cycle. *Curr Biol.* **19**(19): p. 1665-9.
305. Wang X, Wang T, et ál. (2010). Requirement for an enzymatic visual cycle in *Drosophila*. *Curr Biol.* **20**(2): p. 93-102.
306. Goz D, Studholme K, et ál. (2008). Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS One.* **3**(9): p. e3153.
307. Ingham ES, Gunhan E, et ál. (2009). Immunotoxin-induced ablation of melanopsin retinal ganglion cells in a non-murine mammalian model. *J Comp Neurol.* **516**(2): p. 125-40.
308. Wiley RG, Harrison MB, et ál. (2003). Destruction of midbrain dopaminergic neurons by using immunotoxin to dopamine transporter. *Cell Mol Neurobiol.* **23**(4-5): p. 839-50.
309. Iuvone PM, Galli CL, et ál. (1978). Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science.* **202**(4370): p. 901-2.
310. Iuvone PM, Tosini G, et ál. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res.* **24**(4): p. 433-56.
311. Jackson CR, Ruan GX, et ál. (2012). Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. *J Neurosci.* **32**(27): p. 9359-68.
312. Altimus CM, Guler AD, et ál. (2010). Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nat Neurosci.* **13**(9): p. 1107-12.

313. Yang XF, Miao Y, et ál. (2011). Melatonin inhibits tetraethylammonium-sensitive potassium channels of rod ON type bipolar cells via MT2 receptors in rat retina. *Neuroscience*. **173**: p. 19-29.
314. Ping Y, Huang H, et ál. (2008). Melatonin potentiates rod signals to ON type bipolar cells in fish retina. *J Physiol*. **586**(11): p. 2683-94.
315. Hayasaka N, LaRue SI, et ál. (2010). Differential contribution of rod and cone circadian clocks in driving retinal melatonin rhythms in *Xenopus*. *PLoS One*. **5**(12): p. e15599.
316. Sheng WL, Chen WY, et ál. (2015). Co-expression of two subtypes of melatonin receptor on rat M1-type intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *PLoS One*. **10**(2): p. e0117967.
317. Puopolo M, Hochstetler SE, et ál. (2001). Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron*. **30**(1): p. 211-25.
318. Gustincich S, Feigenspan A, et ál. (1997). Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron*. **18**(5): p. 723-36.
319. Rosenblad C, Kirik D, et ál. (1999). Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci*. **11**(5): p. 1554-66.
320. Hannibal J, Georg B, et ál. (2013). Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp Eye Res*. **106**: p. 55-63.
321. Shirzad-Wasei N y DeGrip WJ (2016). Heterologous expression of melanopsin: Present, problems and prospects. *Prog Retin Eye Res*.
322. Blasic JR, Jr., Matos-Cruz V, et ál. (2014). Identification of critical phosphorylation sites on the carboxy tail of melanopsin. *Biochemistry*. **53**(16): p. 2644-9.
323. Jagannath A, Hughes S, et ál. (2015). Isoforms of Melanopsin Mediate Different Behavioral Responses to Light. *Curr Biol*. **25**(18): p. 2430-4.
324. Qiu X y Goz D (2010). New clues suggest distinct functional roles for M1 and M2 intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci*. **30**(5): p. 1580-1.
325. Schmidt TM y Kofuji P (2011). An isolated retinal preparation to record light response from genetically labeled retinal ganglion cells. *J Vis Exp*. (47).
326. Koteja P, Swallow JG, et ál. (2003). Different effects of intensity and duration of locomotor activity on circadian period. *J Biol Rhythms*. **18**(6): p. 491-501.
327. Vorhees CV, Acuff-Smith KD, et ál. (1992). A method for measuring locomotor behavior in rodents: contrast-sensitive computer-controlled video tracking activity assessment in rats. *Neurotoxicol Teratol*. **14**(1): p. 43-9.
328. Togasaki DM, Hsu A, et ál. (2005). The Webcam system: a simple, automated, computer-based video system for quantitative measurement of movement in nonhuman primates. *J Neurosci Methods*. **145**(1-2): p. 159-66.
329. Poirrier JE, Poirrier L, et ál. (2006). Gemvid, an open source, modular, automated activity recording system for rats using digital video. *J Circadian Rhythms*. **4**: p. 10.
330. Jud C, Schmutz I, et ál. (2005). A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biol Proced Online*. **7**: p. 101-16.
331. Verwey M, Robinson B, et ál. (2013). Recording and analysis of circadian rhythms in running-wheel activity in rodents. *J Vis Exp*. (71).

332. Schmid B, Helfrich-Forster C, et ál. (2011). A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *J Biol Rhythms*. **26**(5): p. 464-7.
333. Fourier JBJ (2009). *Théorie Analytique de la Chaleur*: Cambridge University Press.
334. Refinetti R, Lissen GC, et ál. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*. **38**(4): p. 275-325.
335. Harkin A, O'Donnell JM, et ál. (2002). A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav*. **77**(1): p. 65-77.
336. Pfeiffenberger C, Lear BC, et ál. (2010). Processing circadian data collected from the Drosophila Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harb Protoc*. **2010**(11): p. pdb prot5519.
337. Moore A, Zielinski T, et ál. (2014). Online period estimation and determination of rhythmicity in circadian data, using the BioDare data infrastructure. *Methods Mol Biol*. **1158**: p. 13-44.
338. Hughes ME, Hogenesch JB, et ál. (2010). JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. *J Biol Rhythms*. **25**(5): p. 372-80.
339. Santos EA, Marques TE, et ál. (2015). Diurnal Variation Has Effect on Differential Gene Expression Analysis in the Hippocampus of the Pilocarpine-Induced Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One*. **10**(10): p. e0141121.
340. Shaw PJ, Cirelli C, et ál. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**(5459): p. 1834-7.
341. Schaefer AT y Claridge-Chang A (2012). The surveillance state of behavioral automation. *Curr Opin Neurobiol*. **22**(1): p. 170-6.
342. Rihel J, Prober DA, et ál. (2010). Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*. **327**(5963): p. 348-51.
343. Gilestro GF y Cirelli C (2009). pySolo: a complete suite for sleep analysis in *Drosophila*. *Bioinformatics*. **25**(11): p. 1466-7.
344. Jhuang H, Garrote E, et ál. (2010). Automated home-cage behavioural phenotyping of mice. *Nat Commun*. **1**: p. 68.
345. Ohayon S, Avni O, et ál. (2013). Automated multi-day tracking of marked mice for the analysis of social behaviour. *J Neurosci Methods*. **219**(1): p. 10-9.
346. de Chaumont F, Coura RD, et ál. (2012). Computerized video analysis of social interactions in mice. *Nat Methods*. **9**(4): p. 410-7.
347. Gomez-Marin A, Partoune N, et ál. (2012). Automated tracking of animal posture and movement during exploration and sensory orientation behaviors. *PLoS One*. **7**(8): p. e41642.
348. Branson K, Robie AA, et ál. (2009). High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nat Methods*. **6**(6): p. 451-7.
349. Kabra M, Robie AA, et ál. (2013). JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nat Methods*. **10**(1): p. 64-7.
350. Stern U, Zhu EY, et ál. (2015). Long-duration animal tracking in difficult lighting conditions. *Sci Rep*. **5**: p. 10432.
351. Bo D, Ling S, et ál. *Deep learning for automatic cell detection in wide-field microscopy zebrafish images*. in *Biomedical Imaging (ISBI), 2015 IEEE 12th International Symposium on*. 2015.
352. Giese MA y Poggio T (2003). Neural mechanisms for the recognition of biological movements. *Nat Rev Neurosci*. **4**(3): p. 179-92.

353. Jhuang H, Serre T, et ál. *A Biologically Inspired System for Action Recognition*. in *Computer Vision, 2007. ICCV 2007. IEEE 11th International Conference on*. 2007.
354. Taylor P, Hobbs JN, et ál. (2015). The global landscape of cognition: hierarchical aggregation as an organizational principle of human cortical networks and functions. *Sci Rep*. **5**: p. 18112.
355. Perez-Escudero A, Vicente-Page J, et ál. (2014). idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat Methods*. **11**(7): p. 743-8.
356. Straw AD, Lee S, et ál. (2010). Visual control of altitude in flying *Drosophila*. *Curr Biol*. **20**(17): p. 1550-6.
357. Piccinini F, Bevilacqua A, et ál. (2013). Automated image mosaics by non-automated light microscopes: the MicroMos software tool. *J Microsc*. **252**(3): p. 226-50.
358. Thevenaz P y Unser M (2007). User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microsc Res Tech*. **70**(2): p. 135-46.
359. Legesse FB, Chernavskaia O, et ál. (2015). Seamless stitching of tile scan microscope images. *J Microsc*. **258**(3): p. 223-32.
360. Yang F, Deng ZS, et ál. (2013). A method for fast automated microscope image stitching. *Micron*. **48**: p. 17-25.
361. Karen P, Jirkovska M, et ál. (2003). Three-dimensional computer reconstruction of large tissue volumes based on composing series of high-resolution confocal images by GlueMRC and LinkMRC software. *Microsc Res Tech*. **62**(5): p. 415-22.
362. Preibisch S, Saalfeld S, et ál. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. **25**(11): p. 1463-5.
363. Emmenlauer M, Ronneberger O, et ál. (2009). XuvTools: free, fast and reliable stitching of large 3D datasets. *J Microsc*. **233**(1): p. 42-60.
364. Yang Y y Peng H. *Automated high speed stitching of large 3D microscopic images*. in *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on*. 2011.
365. Bria A y Iannello G (2012). TeraStitcher - a tool for fast automatic 3D-stitching of teravoxel-sized microscopy images. *BMC Bioinformatics*. **13**: p. 316.
366. Thevenaz P, Ruttimann UE, et ál. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process*. **7**(1): p. 27-41.
367. Forster B, Van De Ville D, et ál. (2004). Complex wavelets for extended depth-of-field: a new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microsc Res Tech*. **65**(1-2): p. 33-42.
368. Aguet F, Van De Ville D, et ál. (2008). Model-based 2.5-d deconvolution for extended depth of field in brightfield microscopy. *IEEE Trans Image Process*. **17**(7): p. 1144-53.
369. Pizer SM, Amburn EP, et ál. (1987). Adaptive histogram equalization and its variations. *Comput. Vision Graph. Image Process*. **39**(3): p. 355-368.
370. Vu N, Ghosh P, et ál. *Retina Layer Segmentation and Spatial Alignment of Antibody Expression Levels*. in *Image Processing, 2007. ICIP 2007. IEEE International Conference on*. 2007.
371. Bertelli L, Jiyun B, et ál. *A Variational Approach to Exploit Prior Information in Object-Background Segregation: Application to Retinal Images*. in *Image Processing, 2007. ICIP 2007. IEEE International Conference on*. 2007.

372. Bertelli L, Ghosh P, et ál. *Reference-based probabilistic segmentation as non-rigid registration using Thin Plate Splines*. in *Image Processing, 2008. ICIP 2008. 15th IEEE International Conference on*. 2008.
373. Byun J, Verardo MR, et ál. (2006). Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: application to retinal images. *Mol Vis*. **12**: p. 949-60.
374. Maidana DE, Tsoka P, et ál. (2015). A Novel ImageJ Macro for Automated Cell Death Quantitation in the Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **56**(11): p. 6701-8.
375. Hood DC y Raza AS (2014). On improving the use of OCT imaging for detecting glaucomatous damage. *Br J Ophthalmol*. **98 Suppl 2**: p. ii1-9.
376. Raza AS, Cho J, et ál. (2011). Retinal ganglion cell layer thickness and local visual field sensitivity in glaucoma. *Arch Ophthalmol*. **129**(12): p. 1529-36.
377. Yang Q, Reisman CA, et ál. (2010). Automated layer segmentation of macular OCT images using dual-scale gradient information. *Opt Express*. **18**(20): p. 21293-307.
378. Abramoff MD, Garvin MK, et ál. (2010). Retinal imaging and image analysis. *IEEE Rev Biomed Eng*. **3**: p. 169-208.
379. de Graaf CN, Vincken KL, et ál. (1991). A hyperstack for the segmentation of 3D images. *Prog Clin Biol Res*. **363**: p. 399-413.
380. Li F, Yin Z, et ál. (2013). Chapter 17: bioimage informatics for systems pharmacology. *PLoS Comput Biol*. **9**(4): p. e1003043.
381. Gilbert DF, Meinhof T, et ál. (2009). DetecTiff: a novel image analysis routine for high-content screening microscopy. *J Biomol Screen*. **14**(8): p. 944-55.
382. Fuchs TJ y Buhmann JM (2011). Computational pathology: challenges and promises for tissue analysis. *Comput Med Imaging Graph*. **35**(7-8): p. 515-30.
383. Daniel C, Garcia Rojo M, et ál. (2009). Standards to support information systems integration in anatomic pathology. *Arch Pathol Lab Med*. **133**(11): p. 1841-9.
384. Vapnik VN (1999). An overview of statistical learning theory. *IEEE Trans Neural Netw*. **10**(5): p. 988-99.
385. Celik H, Hanjalic A, et ál. *Online training of object detectors from unlabeled surveillance video*. in *Computer Vision and Pattern Recognition Workshops, 2008. CVPRW '08. IEEE Computer Society Conference on*. 2008.
386. Rojo MG, Bueno G, et ál. (2009). Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol*. **47**(3): p. 349-54.
387. Shin D, Pierce MC, et ál. (2010). A fiber-optic fluorescence microscope using a consumer-grade digital camera for in vivo cellular imaging. *PLoS One*. **5**(6): p. e11218.
388. Breslauer DN, Maamari RN, et ál. (2009). Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. *PLoS One*. **4**(7): p. e6320.
389. Eliceiri KW, Berthold MR, et ál. (2012). Biological imaging software tools. *Nat Methods*. **9**(7): p. 697-710.
390. Blum A, (1998) *On-line Algorithms in Machine Learning*, in *Developments from a June 1996 seminar on Online algorithms: the state of the art*1998, Springer-Verlag. p. 306-325.
391. Shamir L, Delaney JD, et ál. (2010). Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. *PLoS Comput Biol*. **6**(11): p. e1000974.

392. Ljosa V y Carpenter AE (2009). Introduction to the quantitative analysis of two-dimensional fluorescence microscopy images for cell-based screening. *PLoS Comput Biol.* **5**(12): p. e1000603.
393. Shariff A, Kangas J, et ál. (2010). Automated image analysis for high-content screening and analysis. *J Biomol Screen.* **15**(7): p. 726-34.
394. Schindelin J, Arganda-Carreras I, et ál. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* **9**(7): p. 676-82.
395. Sommer C, Straehle C, et ál. *Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit.* in *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on.* 2011.
396. Saalfeld S, Fetter R, et ál. (2012). Elastic volume reconstruction from series of ultra-thin microscopy sections. *Nat Methods.* **9**(7): p. 717-20.
397. Qu L, Long F, et ál. (2011). Simultaneous recognition and segmentation of cells: application in *C.elegans*. *Bioinformatics.* **27**(20): p. 2895-902.