

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE OPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

**Alteraciones oculares embrionarias por déficit dietario
materno de ácido fólico: análisis de imagen, caracterización
óptica y biológica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ouafa Sijilmassi

Directores

María del Carmen Barrio Asensio

Aurora del Río Sevilla

José Manuel López Alonso

Madrid



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Ouafa Sijilmassi,
estudiante en el Programa de Doctorado Óptica, Optometría y Visión,
de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Alteraciones oculares embrionarias por déficit dietario materno de ácido fólico:
análisis de imagen, caracterización óptica y biológica

y dirigida por: José Manuel López Alonso, María del Carmen Barrio Asensio
Aurora Del Río Sevilla

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 12 de julio de 2019

Fdo.: _____

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Óptica y Optometría



TESIS DOCTORAL

Alteraciones oculares embrionarias por déficit dietario materno de ácido fólico: análisis de imagen, caracterización óptica y biológica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ouafa Sijilmassi

Directores:

Departamento de Anatomía y Embriología Humana:

Dra. María del Carmen Barrio Asensio

Dra. Aurora del Río Sevilla

Departamento de Óptica:

Dr. José Manuel López Alonso

Madrid

Ed. electrónica 2019

© Ouafa Sijilmassi, 2019

TESIS DOCTORAL

Alteraciones oculares embrionarias por déficit dietario materno de ácido fólico: análisis de imagen, caracterización óptica y biológica



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ouafa Sijilmassi

Departamento de Anatomía y Embriología Humana & Departamento de Óptica

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Julio 2019

A mis padres y mi familia por su apoyo infinito, por su amor incondicional y por apoyarme en cada decisión que he tomado.

A mi pequeño campeón, Achraf, gracias por ser quién eres y por contagiarme tu alegría.

A Latifa, Najat, Bouchra y Nabil, por estar siempre ahí.

A Nour El Houda, Karim, Israe y Haroun, la alegría de la familia.

A Rachid y Nathalie, ¡Espero que os vaya bien en vuestra nueva aventura!

Agradecimientos

Quiero empezar dando las gracias a Dios por hacer posible este sueño y por poner en mi camino tanta gente maravillosa de quienes solamente voy a mencionar algunas.

Antes de nada, quiero dedicarles unas líneas a los directores de esta tesis doctoral:

- Dra. María del Carmen Barrio Asensio y Dra. Aurora del Río Sevilla del Departamento de Anatomía y Embriología Humana, gracias por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ellas, por confiar en mí, por sus consejos, apoyo y esfuerzo. Estoy muy agradecida, especialmente, por confiar en mi trabajo.
- Dr. José Manuel López Alonso, del Departamento de óptica, le agradezco de todo corazón su dedicación, su capacidad para guiar mis ideas y por enseñarme tanto en tan poco tiempo. Gracias por su paciencia y por sus infinitas aportaciones para el desarrollo de esta tesis.

Una tesis doctoral no puede desarrollarse sin una extensa bibliografía, así que quisiera agradecer a la directora de la biblioteca de la Facultad de Óptica y Optometría-UCM, M^a Jesús Santurtún de la Hoz, y a todos los bibliotecarios y bibliotecarias que he podido conocer y que hayan trabajado allí, por la labor que desarrollan, por ayudarme en mis búsquedas y por traerme en un tiempo récord todos los artículos y libros que les he pedido. Gracias de todo corazón.

Quiero terminar dando las gracias a mis queridísimas amigas, Nahla y Atocha, por abrirme las puertas de sus laboratorios y enseñarme todas las técnicas, cirugías, aparatos que utilizan en sus laboratorios, sin pedir nada a cambio. Aún a sabiendas de que esto no me sirve en el desarrollo de esta tesis y es solo para aprender cosas nuevas. Les agradezco su amistad, su amor y su alegría.

Por último, dar las gracias la Universidad Complutense de Madrid y al Banco de Santander por la beca predoctoral que me concedieron para realizar esta tesis.

Índice

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE	VIII
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	5
CAPÍTULO I	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1. EMBRIOGÉNESIS DEL OJO DE RATÓN	11
1.1 RETINA Y CUERPO VÍTREO.....	11
1.2 CRISTALINO	14
1.3 CÓRNEA	16
1.4 COROIDES, ESCLERA, CUERPO CILIAR, IRIS Y PÁRPADOS.....	17
2. EL PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS OCULARES... 19	
2.1 EL PAPEL DEL COLÁGENO IV Y LA LAMININA-1 EN EL DESARROLLO OCULAR	22
2.1.1 Colágeno IV: estructura y localización	22
2.1.2 Laminina-1: estructura y localización	25
3. EL ÁCIDO FÓLICO Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	28
3.1 EL ÁCIDO FÓLICO EN EL OJO	29
3.1.1 Receptores de folato	29
3.1.2 Transportador de folato reducido.....	31
3.1.3 Transportador de folato acoplado a protón	31
II. JUSTIFICACIÓN	32
III. OBJETIVOS	34
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. ANIMALES Y DIETAS	35
2. INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES	36
2.1 Tinción inmunohistoquímica para el colágeno IV	36
2.2 Tinción inmunohistoquímica para la laminina-1	38
3. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)	38
V. REFERENCIAS DEL 1º CAPÍTULO	40
CAPÍTULO II	51
I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MALFORMACIONES OCULARES CONGÉNITAS	52
1. TIPOS DE MALFORMACIONES OCULARES CONGÉNITAS OBSERVADAS	52
1.1 Malformaciones oculares observadas en los embriones del grupo D2.....	52
1.2 Malformaciones oculares observadas en los embriones del grupo D8.....	55
1.3 Alteración en la expresión de colágeno IV y laminina-1 en algunas MBs oculares.....	58
2. TÉCNICA DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	61
2.1 Tabla de contingencia.....	61
2.2 Prueba de chi-cuadrado de Pearson	63
2.3 Análisis e interpretación de los resultados.....	65

II. ESTUDIO DE LA BIOMETRÍA OCULAR USANDO LA TÉCNICA ESTADÍSTICA DE REMUESTRO: BOOTSTRAP	70
1. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO.....	70
2. PROCEDIMIENTO BOOTSTRAP.....	73
3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS BOOTSTRAP.....	78
3.1 <i>Resultados del cálculo del área</i>	78
3.2 <i>Resultados del cálculo de la circularidad</i>	88
III. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II.....	94
IV. REFERENCIAS DEL 2º CAPÍTULO	97
CAPÍTULO III	101
I. ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	102
1. MATERIAL Y MÉTODOS: ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES APLICADO A IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICAS	102
1.1 <i>Evaluación del patrón de expresión mediante el ACP</i>	105
1.2 <i>Representación de nuestras imágenes mediante el ACP</i>	108
II. APLICACIÓN DEL MÉTODO Y RESULTADOS	116
1. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN EL CRISTALINO .116	
1.1 <i>Resultados de la distancia de Mahalanobis</i>	116
1.2 <i>Expresión espacial del colágeno IV y laminina-1 en el cristalino</i>	117
1.2.1 <i>Expresión espacial del colágeno IV en el cristalino</i>	127
1.2.2 <i>Expresión espacial de la laminina-1 en el cristalino</i>	132
2. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN LA CÓRNEA	137
2.1 <i>Expresión espacial del colágeno IV en la córnea</i>	139
2.2 <i>Expresión espacial de la laminina-1 en la córnea</i>	148
3. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN LA RETINA	155
3.1 <i>Expresión espacial del colágeno IV en la retina</i>	157
3.2 <i>Expresión espacial de la laminina-1 en la retina</i>	163
III. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III.....	168
IV. REFERENCIAS DEL 3º CAPÍTULO	170
CAPÍTULO IV	176
I. ESTUDIO DE TEXTURA MEDIANTE EL ANÁLISIS FRACTAL.....	177
1. EL ANÁLISIS FRACTAL.....	177
1.1 <i>Concepto</i>	177
2. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO.....	182
2.1 <i>Los principales parámetros del análisis fractal</i>	182
2.2 <i>Procedimiento matemático para comparar espectros multifractales</i>	190
2.3 <i>Test de significancia estadística</i>	192
2.4 <i>Procesamiento digital de imágenes</i>	192
3. RESULTADOS	194
II. ESTUDIO DE TEXTURA: DIMENSIÓN FRACTAL LOCAL CONECTADA	204
1. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO.....	205
1.1 <i>Dimensión fractal conectada local</i>	205
1.2 <i>Procesado de imágenes</i>	206
2. RESULTADOS	207
III. ESTUDIO DE TEXTURA MEDIANTE EL PARÁMETRO “TAMAÑO DEL GRANO” Y LA TRANSFORMADA DE FOURIER	217

1.	MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	219
2.	RESULTADOS	222
2.1	<i>Cristalino: tamaño del grano</i>	222
2.2	<i>Cristalino: Transformada de Fourier</i>	225
2.3	<i>Córnea: tamaño del grano</i>	226
2.4	<i>Córnea: Transformada de Fourier</i>	229
2.5	<i>Retina: tamaño del grano</i>	230
2.6	<i>Retina: Transformada de Fourier</i>	232
IV.	DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO IV	233
V.	REFERENCIAS DEL 4º CAPÍTULO	236
	CAPÍTULO V	242
I.	CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS TEJIDOS: LUZ POLARIZADA	243
1.	LUZ POLARIZADA: MODELO MATEMÁTICO	244
1.1	<i>Parámetros de Stokes</i>	244
1.2	<i>Descripción del experimento</i>	251
1.3	<i>Calibración de los polarizadores cruzados</i>	255
2.	RESULTADOS	258
2.1	<i>Mapas de distribución de polarización</i>	258
2.2	<i>Evaluación del incremento del DOP en el cristalino</i>	267
II.	CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS TEJIDOS: IMÁGENES MULTIESPECTRALES	282
1.	CÁLCULO DE LA ABSORBANCIA O DENSIDAD ÓPTICA	284
1.1	<i>Ejemplo práctico de un ojo control</i>	285
1.2	<i>Caracterización de los tres grupos: control, D2 y D8</i>	287
1.3	<i>Análisis de abundancias</i>	318
III.	DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO V	341
IV.	REFERENCIAS DEL 5º CAPÍTULO	345
	CONCLUSIONES	347
	APÉNDICE: CÓDIGOS DE CÁLCULO	354

Abreviaturas

MEC: Matriz extracelular

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

MB: Membrana basal

MLI: Membrana limitante interna

AF: Ácido fólico

RF: Receptores de folato

TFR-1: Transportador de folato reducido

PCFT: Transportador de folato acoplado a protones

D2: Grupo D2 con déficit materno leve de AF

D8: Grupo D8 con déficit materno severo de AF

ROI: Región de interés

GEV: Distribución de los valores extremos generalizada

pdf: Función de distribución de probabilidad

mle: Estimación de máxima verosimilitud

ACP: Análisis de componentes principales

CP: Componente principal

cdf: Función de probabilidad acumulada

DF o D_F : Dimensión fractal

Lac: Lacunaridad

Div: Divergencia

DFCL: Dimensión fractal conectada local

DFL: Dimensión fractal local

TF: Transformada de Fourier

DOP: Grado de polarización

DOLP: Grado de polarización lineal

DOCP: Grado de polarización circular

NNLS: Mínimos cuadrados no negativos

Resumen

Introducción: La presente tesis doctoral que lleva por título “Alteraciones oculares embrionarias por déficit dietario materno de ácido fólico: análisis de imagen, caracterización óptica y biológica” aborda el estudio óptico y biológico de tejidos oculares de embriones de ratón cuyas madres fueron sometidas a una dieta carente en ácido fólico (AF). Los objetivos generales y específicos del estudio eran: identificar el tipo de malformaciones oculares congénitas producidas a causa del déficit materno de AF y realizar un estudio estadístico para conocer su frecuencia en los embriones, estudiar cambios producidos en la biometría de algunas estructuras oculares aplicando la técnica estadística de remuestreo de datos *Bootstrap*, determinar algunos mecanismos alterados implementando una metodología automatizada para cuantificar y regionalizar la expresión de dos moléculas de la matriz extracelular, colágeno IV y laminina-1, en el interior de algunas estructuras del ojo, utilizar las técnicas de procesado y de análisis de imagen para analizar los cambios producidos en la textura de los tejidos, utilizar la herramienta de análisis multifractal para, evaluar, cuantificar y compara los cambios en la textura de los tejidos. Finalmente, averiguar cambios en el comportamiento espectral de los tejidos mediante dos técnicas ópticas: polarización de la luz e imágenes multiespectrales.

Material y métodos: Mediante programas de procesado de imagen (ImageJ) y programas propios desarrollados en Matlab, se implementa un nuevo método para cuantificar y regionalizar el patrón de expresión de dos proteínas, colágeno IV y laminina-1, en el cristalino, retina neural y estroma corneal. Por otra parte, se aplica a varias estructuras oculares (córnea, cristalino, retina y vítreo), marcadas con anti-colágeno IV o anti-laminina-1, una comparación basada en el análisis multifractal para determinar si se producen cambios en la estructura fractal de dichas estructuras. Por último, se estudia la interacción luz-materia mediante dos experimentos realizados sobre tejidos oculares embebido en parafina (sin teñir). Para ello, hemos montado dos experimentos: el primero está basado en la polarización por transmisión en el cual se averiguan cambios en el estado de polarización de la luz tras incidir sobre los tejidos oculares del grupo control y los grupos con déficit materno de AF. El segundo experimento plantea aplicar el análisis de componentes principales a imágenes multiespectrales capturadas en la región visible del espectro a fin de aprovechar la información multiespectral para analizar las diferencias espectrales entre los grupos estudiados.

Resultados: los resultados confirman que el déficit dietético materno de AF produce en los embriones muchas malformaciones oculares estadísticamente significativas. Asimismo, produce alteración en la biometría ocular. En general, los ojos y cristalinos se vuelven más pequeños de lo normal, mientras que las retinas se hacen más gruesa. Por otra parte, hemos observado cambios en el patrón de expresión de las dos proteínas colágeno IV y laminina-1, especialmente en el interior del cristalino, retina neural y córnea. Dicha alteración en la expresión va acompañada de cambios en la textura de las estructuras oculares observada mediante el análisis multifractal y la autocorrelación. Finalmente, hemos podido comprobar cambios en el estado de polarización de los tejidos acompañados por diferencias espectrales entre los grupos.

Conclusión: en esta tesis, han sido utilizadas una amplia serie de técnicas, cada una de ellas ha aportado nuevos datos específicos sobre los cambios producidos en los tejidos oculares de los embriones debido al déficit materno de AF. La información que aportan estas técnicas conjuntamente puede ser empleada para entender los cambios en la organización de los tejidos debido a patologías.

Summary

Introduction: The present doctoral thesis entitled "Embryonic eye disorders due to maternal dietary deficiency of folic acid: image analysis, optical and biological characterization" addresses the optical and biological study of ocular tissues of mouse embryos whose mothers were subjected to a diet lacking in folic acid (FA). The general and specific objectives of the study were: identify the type of congenital eye malformations produced due to the maternal FA deficiency and perform a statistical study to know their frequency in embryos, to study changes in the biometry of some ocular structures by applying the bootstrap resampling technique, determine some altered mechanisms by implementing a methodology to quantify and regionalize the expression of two molecules of the extracellular matrix, collagen IV and laminin-1, inside some structures of the eye, use the techniques of image processing and analysis to analyze the changes produced in the texture of the tissues, use the multifractal analysis tool to evaluate, quantify and compare changes in the texture of tissues. Finally, find out changes in the spectral behavior of the tissues by means of two optical techniques: polarization of light and multispectral images.

Material and methods: Through image processing programs (ImageJ) and own programs developed in Matlab, a new method is implemented to quantify and regionalize the expression pattern of two proteins, collagen IV and laminin-1, in the lens, neural retina and corneal stroma. On the other hand, it is applied to several ocular structures (cornea, lens, retina and vitreous), marked with anti-collagen IV or anti-laminin-1, a comparison based on the multifractal analysis to determine if changes occur in the fractal structure of said structures. Finally, the light-matter interaction is studied through two experiments performed on paraffin-embedded tissue (unstained). To do this, we have set up two experiments: the first is based on transmission polarization in which changes in the polarization state of the incoming light after passing through the ocular tissues of the control group and the groups with maternal FA deficiency. The second experiment proposes to apply the analysis of principal components to multispectral images captured in the visible region of the spectrum in order to take advantage of the multispectral information to analyze the spectral differences between the groups studied.

Results: the results confirm that the maternal dietary deficit of FA produces in the embryos many statistically significant ocular malformations. Also, it produces alteration in ocular biometry. In general, eyes and lenses become smaller than normal, while retinas become thicker. On the other hand, we observed changes in the expression pattern of the two

proteins collagen IV and laminin-1, especially inside of the lens, neural retina and cornea. This alteration in the expression is accompanied by changes in the texture of the ocular structures observed through the multifractal analysis and autocorrelation. Finally, we have been able to verify changes in the polarization state of the tissues accompanied by spectral differences between the groups.

Conclusion: in this doctoral thesis, a wide range of techniques have been used, each of them has provided new specific data on the changes produced in the embryonic eye tissues due to the maternal FA deficiency. The information that these techniques contribute together can be used to understand the changes in the organization of tissues due to pathologies.

Capítulo I

I. INTRODUCCIÓN

1. EMBRIOGÉNESIS DEL OJO DE RATÓN

La embriogénesis es el desarrollo de un embrión a partir del gameto femenino fecundado. Durante el desarrollo embrionario, el embrión aumenta de tamaño, incrementa su complejidad morfológica y funcional debido a una serie de actividades celulares conocidas como mecanismos morfogenéticos entre otros, la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. Estos eventos están modulados a través de la comunicación entre las células y su entorno. La comunicación celular se inicia con ligandos extracelulares tales como factores de crecimiento o componentes de la matriz extracelular (MEC) [1].

El desarrollo del ojo se produce por interacciones coordinadas entre el neuroectodermo, el ectodermo superficial y el mesénquima, cuyo origen es de cresta neural y mesodermo [1].

La primera evidencia de desarrollo ocular en el ratón comienza en el octavo día de gestación, correspondiente al estadio embrionario E8 [2] (22 días de gestación en el humano), cuando el tubo neural aún está abierto. En este momento, los surcos ópticos surgen en la región más anterior de los pliegues neurales. Al fusionarse los pliegues neurales, los surcos ópticos quedan ubicados a nivel del prosencéfalo, y alrededor de E8.5, por evaginación de las paredes laterales del prosencéfalo aparecen las vesículas ópticas que quedan unidas a él por el tallo óptico. Entre E9 y E10 las vesículas ópticas inducen al ectodermo de superficie a engrosarse para formar la placoda del cristalino. Más adelante, aproximadamente entre E10-E11 (32 días de gestación en el humano), la placoda del cristalino y la superficie distal de la vesícula óptica se invaginan. La invaginación de la placoda del cristalino, la fusión de los extremos de la placoda invaginada, así como su separación del ectodermo de superficie dará lugar a la vesícula de la lente. De la invaginación de la vesícula óptica se formará la copa óptica, de la cual se desarrollarán la retina neural y el epitelio pigmentario de la retina (EPR) [1, 2].

1.1 Retina y cuerpo vítreo

La retina tiene un origen neural ya que deriva del prosencéfalo o cerebro anterior. Un cambio en la forma de las células de la superficie distal de la vesícula óptica es el que facilita la invaginación de la copa óptica. En E11, a lo largo de la superficie ventral de la copa óptica y del tallo óptico se desarrolla un surco llamado fisura coroidea, por donde pasan a la cavidad de la copa óptica células mesenquimatosas y vasos sanguíneos. Estos vasos hialoideos nutren la capa interna de la copa óptica y se ramifican anteriormente para formar la túnica vascular posterior del cristalino. A lo largo del desarrollo estos vasos desaparecen en su porción más distal, los de su porción proximal van a formar los vasos retinianos que

portan nutrientes a las capas más internas de la retina [1, 2]. En el ratón, esta fisura se cierra a finales de E12 [3], en el humano se cierra en la séptima semana; un fallo en el cierre produce colobomas, entre otras estructuras, de retina e iris [1].

El EPR se forma a partir de la capa externa de la copa óptica, de la capa interna se diferencia la retina neural [1, 2]. Aunque las dos estructuras derivan del mismo origen, son tejidos muy distintos [4]. Cabe señalar que el EPR empieza a diferenciarse antes que la retina neural [5]. Se considera necesario para mantener la estructura laminar de la retina embrionaria y es un tejido fundamental para la correcta morfogénesis de la retina neural [6].

En E11, aumenta la división celular en la parte neural de la retina dándole un aspecto más grueso y se compone ya de algunas capas celulares. Asimismo, en este periodo, el EPR consiste en una sola capa delgada de células con poco pigmento [7].

Desde aproximadamente E12, el espacio que se encuentra entre la retina neural y el EPR desaparece y ambas capas se unen sutilmente. En E13, la retina neural empieza a diferenciarse para dar lugar a dos capas neuroblásticas, interna y externa [2].

Entre E14-E15, gracias al crecimiento continuo de la retina su tamaño y grosor son notables. Así pues, las células de la capa neuroblástica externa adyacente al EPR muestran una mitosis muy activa y al parecer la mayoría de las células divididas mantienen su unión apical en todo momento, incluso durante la mitosis. Algunas células de la capa neuroblástica interna se convierten en las células ganglionares cuyos axones se diferencian rápidamente y por lo tanto a finales de E15 son abundantes en la mencionada capa [5, 7]. Estos axones crecen hacia el futuro nervio óptico [3].

Otras células localizadas en la zona basal de la retina comienzan también a proliferar y se convierten en las células de Müller [5]. Dichas células, son células gliales especializadas que abarcan todo el grosor de la retina llenando todo el espacio retiniano no ocupado por neuronas [8]. Los extremos internos de las células de Müller están íntimamente unidos con una Membrana Basal (MB) denominada Membrana Limitante Interna (MLI) localizada en la superficie interna de la retina [9]. Cajal señaló la primera aparición de las células de Müller en el ratón cuando éste tiene aproximadamente 15 mm de longitud (~E12.5-E13) [10].

Por otro lado, se ha observado que desde el inicio del desarrollo de la retina, tanto el EPR como la retina neural tienen una MB [5]. La MB del EPR forma la capa más interna de la membrana de Bruch de la coroides; en cambio, la MB de la coriocapilar forma la capa más externa de dicha membrana, cuya localización entre la coroides y el EPR le permite obtener componentes derivados de ambas estructuras [3]. La siguiente figura (Fig. I-1) muestra una

representación esquemática de las células y capas constituyentes de la retina ya desarrollada.

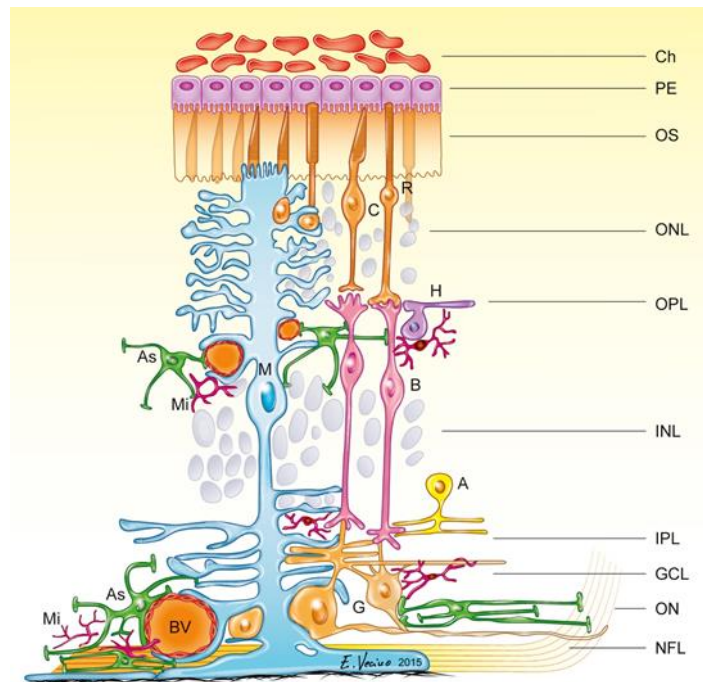


FIGURA I- 1: Representación esquemática de los componentes celulares de la retina: glía y neuronas. Células amacrinas (A). Astrocitos (As). Células bipolares (B). Vasos sanguíneos (BV). Conos (C). Células ganglionares (G). Células horizontales (H). Células de Müller (M). Microglía (Mi). Bastones (R). Las localizaciones de las diferentes capas de la retina (desde las capas más internas hasta las más externas): Capa de las fibras del nervio óptico (NFL). Capa de las células ganglionares (GCL). Capa plexiforme interna (IPL). Capa nuclear interna (INL). Capa plexiforme externa (OPL). Capa nuclear externa (ONL). Capas del segmento externo (OS). Epitelio pigmentario (PE). Nervio óptico (ON). Coroides (Ch) (adaptada a partir de [11] con permiso de Elsevier).

Respecto al vítreo, es una estructura que se encuentra en la parte posterior del ojo entre el cristalino y la retina. A partir del día E11, el vítreo primario comienza a llenar la cavidad vítrea [3, 7].

En E14, los vasos sanguíneos que ocupaban la cámara vítrea en los estadios iniciales, se encuentran desplazados en dos zonas: en la parte posterior del cristalino y a lo largo de la superficie interna de la retina [2, 7], ésta es la MLI. Este proceso está mediado por la inducción de apoptosis por parte de macrófagos [12].

La siguiente figura (Fig. I-2) representa el vítreo de un embrión de ratón control E14.5.

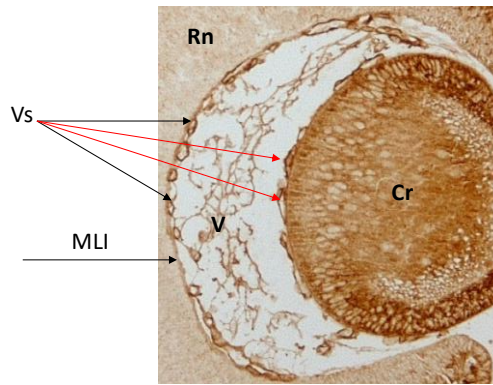


FIGURA I- 2: Vítreo de un embrión de ratón control E14.5 procesada en nuestro laboratorio mediante la técnica inmunohistoquímica con anticuerpo anti-colágeno IV. Cristalino (Cr). Membrana Limitante Interna (MLI). Retina neural (Rn). Vítreo (V). Vasos sanguíneos (Vs).

1.2 Cristalino

La placoda del cristalino se forma a partir del crecimiento y la diferenciación de las células ectodérmicas [2]. En E9, la MB que rodea la placoda del cristalino, en el ratón, tiene un grosor de 40 nm aproximadamente [13].

A continuación, la placoda se invagina y se forma la vesícula del cristalino con una gran cavidad central. Las células que se encuentran en el segmento anterior de la vesícula se diferencian para formar el epitelio del cristalino, mientras que las que se encuentran en el segmento posterior se alargan hacia el anterior llenando el lumen de la vesícula del cristalino y pasan a denominarse fibras primarias del cristalino. Dichas fibras pronto pierden su capacidad proliferativa a medida que avanza la diferenciación celular de las fibras. La proliferación inicialmente se produce en todo el sector epitelial, pero durante el desarrollo este proceso se restringe a un pequeño grupo de células localizadas en una zona ligeramente por delante del ecuador de la lente, conocida como la zona germinativa. La progenie de células que se desplazan por delante del ecuador entra en una región llamada zona de transición [14].

Entre E14 y E15, el cristalino continúa creciendo y en este periodo la cápsula del cristalino tiene un aspecto más grueso [3]. Según avanza el desarrollo, las fibras secundarias se forman a partir de las células en la zona ecuatorial. Estas células se elongan en la dirección anteroposterior, creando de ese modo capas de células muy alargadas que constituirán el núcleo y a la corteza del cristalino. Las fibras del cristalino abarcarán el 99% del contenido de la lente [15]. La siguiente figura (Fig. I-3) muestra un esquema representativo del desarrollo embrionario del cristalino.

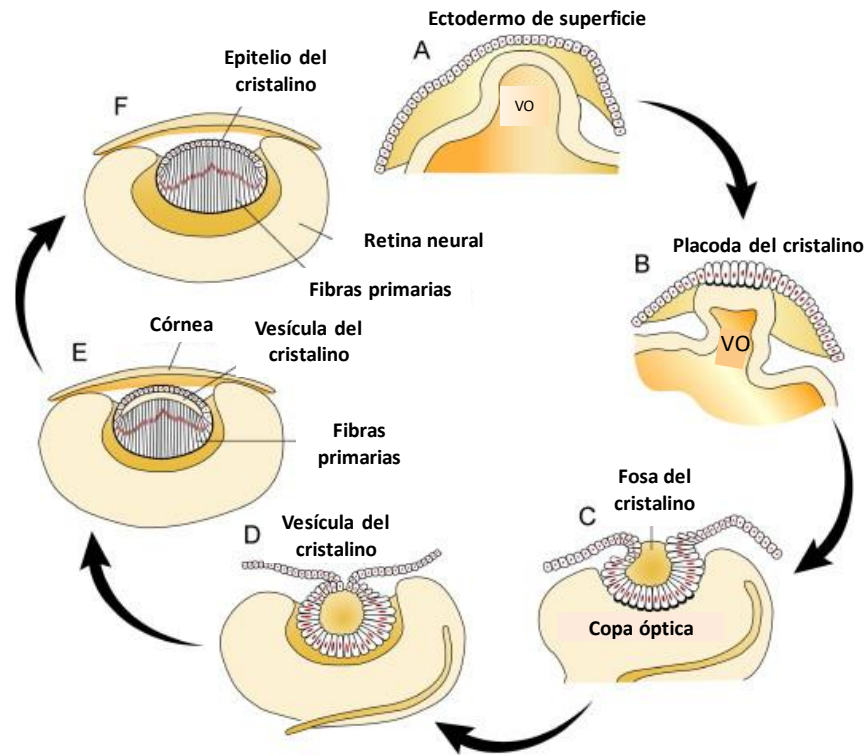


FIGURA I- 3: Desarrollo embrionario del cristalino. A, Las células del ectodermo de superficie crecen y se diferencian para formar la placoda del cristalino. B, placoda del cristalino. C, invaginación de la placoda del cristalino. D, vesícula del cristalino. E, diferenciación de las fibras primarias del cristalino. F, el cristalino crece a lo largo de la vida mediante la adición continua de células de fibra del cristalino sobre las células de fibra más antiguas. (Adaptada y modificada a partir de [14] con permiso de Elsevier).

Cabe señalar la importancia de las uniones celulares dentro del cristalino. Aunque la lente es avascular, cada célula se une a su vecina por los canales intercelulares que son uniones gap (uniones intercelulares que facilitan el paso de iones y pequeñas moléculas solubles de agua) [16].

Estudios experimentales realizados en cristalinos de embriones muestran la existencia de diversas uniones gap: entre las células epiteliales, entre las fibras, y entre las células epiteliales y fibras. El alto número de uniones tipo gap localizadas dentro del cristalino está relacionado con una diferenciación normal de las fibras y son sumamente importantes para el crecimiento postnatal de la lente y el mantenimiento de su transparencia [17-19].

1.3 Córnea

El epitelio corneal deriva de la diferenciación del ectodermo de superficie [20]; en cambio, los queratocitos estromales y las células endoteliales provienen de las células mesenquimáticas de la cresta neural [21].

En E11, el epitelio anterior de la córnea se desarrolla cuando el cristalino induce al ectodermo de superficie. Al inicio, dicho epitelio consiste en una capa basal de células cúbicas recubierta de una capa de células planas [1]. A microscopia electrónica se observan pocas microvellosidades dispersas sobre la parte superficial del epitelio corneal y una MB se encuentra debajo de su parte basal [22]. Las células de la capa basal del epitelio corneal son las responsables de sintetizar los componentes de la MEC para la formación del estroma primario, acelular, [1, 3] que posteriormente será invadido por dos oleadas de migración de las células mesenquimatosas. En el ratón, la primera oleada de células ocurre alrededor de E12.5. Estas células mesenquimatosas migran sobre el estroma primario y se diferencian en el epitelio posterior de la córnea o endotelio [1, 21].

Las células mesenquimatosas de la segunda oleada penetrarán en el estroma primario y se convertirán en los queratocitos o fibroblastos que son los responsables de la formación del estroma secundario, que es celular. Estos fibroblastos sintetizan y secretan los elementos extracelulares de la córnea [1].

En E14-E15, la córnea empieza a parecerse a una córnea madura, aunque sus células estromales están dispuestas con menos regularidad [2]. Las uniones celulares de las capas superficiales, intermedias y basales del epitelio corneal han completado su desarrollo. Hay uniones estrechas en la superficie libre y desmosomas entre las células de las capas internas. Sin embargo, aún no hay uniones celulares especializadas tipo hemidesmosomas en el extremo basal. Estas uniones desarrolladas, proporcionan la cohesión necesaria de las células epiteliales para que puedan mantener su forma y las relaciones estructurales [22]. La siguiente figura (Fig. I-4) representa una córnea de un embrión de ratón control E14.5.



FIGURA I- 4: Córnea de un embrión de ratón control E14.5 procesada en nuestro laboratorio mediante la técnica inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-laminina-1 (A) y posteriormente con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (B). Epitelio (Ep), Endotelio (En) y Estroma (Es).

Mantener una córnea transparente requiere la expresión espacial y temporal coordinada de varias moléculas durante el desarrollo embrionario, lo cual precisa una organización sublime de los componentes de la MEC en el estroma para una diferenciación adecuada de las células epiteliales y endoteliales, así como de los queratocitos. Se cree que la migración y la diferenciación celular están perfectamente ordenadas debido a que están controladas por señales de diversos factores de crecimiento y por los componentes de la MEC, que se someten a la remodelación constante durante el desarrollo embrionario [23, 24].

1.4 Coroides, esclera, cuerpo ciliar, iris y párpados

El desarrollo de la retina requiere, como las demás estructuras del ojo, la formación de un complejo sistema vascular lo cual va a proporcionar a los tejidos, que en estos periodos del desarrollo se encuentran en plena diferenciación celular, oxígeno y nutrientes [25]. En el ojo, el desarrollo de la vascularización coroidea comienza en el día E14 [3]. La coroides es la que se encarga de nutrir a la retina y se localiza entre ésta y la esclerótica. Tanto la coroides como la esclerótica se desarrollan a partir de una capa de células mesenquimatosas cuyo origen es la cresta neural [1]. La coroides está formada por un tejido conectivo muy vascularizado con abundantes melanocitos [1], constituido a partir de las células más internas de la capa mesenquimática. Durante el desarrollo embrionario, el sistema vascular ocular emerge del mesodermo que rodea la copa óptica [25]. La esclerótica la forman las células más externas de la capa mesenquimatosas que circundarán la copa óptica formando un tejido conectivo [20].

El cuerpo ciliar, el iris y la red trabecular son estructuras tardías en el desarrollo. La diferenciación del cuerpo ciliar y del iris tiene lugar en los bordes de la copa óptica. El estroma del iris y del cuerpo ciliar, entre E17 y E19, está representado por células relativamente indiferenciadas inseparables de la formación de la red trabecular. La capa anterior del epitelio del iris está pigmentada, pero la capa posterior sólo tiene unos pocos gránulos de melanina cerca del borde pupilar. El ángulo iridocorneal queda ocupado por una masa densa de células mesenquimatosas. Más tarde, después del nacimiento, estas células se alargan, se aplanan y quedan separadas por pequeños espacios abiertos parcialmente rellenos de fibras extracelulares. A continuación, las fibras extracelulares del ángulo de la cámara se organizan en láminas o tabiques que se cubren de células planas parecidas a las endoteliales. Entonces se forma la red trabecular, que consta de tabiques trabeculares separados por espacios intertrabeculares a través de los cuales se filtra el humor acuoso [20].

Los párpados comienzan a desarrollarse en E13 (la séptima semana de gestación en el humano) mediante pliegues de ectodermo, en cuyo interior se localiza mesénquima. Entre E14 y E15 estos pliegues crecen y van cubriendo la córnea. Alrededor de E15 (novena semana en el humano) los párpados se fusionan. En el caso del ratón, los párpados no se separan hasta después del nacimiento, sin embargo, en el humano lo hacen en el séptimo mes [1, 3].

El ojo del ratón al nacer no está totalmente desarrollado. El estroma corneal es más celular que en el adulto. El cuerpo ciliar, iris y red trabecular tienen una apariencia primitiva. El sistema hialoideo aún no ha desaparecido, la retina no tiene todas sus capas diferenciadas y los párpados están cerrados [3].

2. EL PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS OCULARES

La matriz extracelular (MEC) es una red organizada de materiales extracelulares que se encuentra en íntima asociación con la superficie de la célula que la produce [26]. La MEC se considera una estructura intrínsecamente dinámica en el desarrollo, ya que proporciona espacios intersticiales entre las células y actúa como andamio para la adhesión celular. Sin olvidarse de su papel principal en la migración celular y en permitir que las células ejercen fuerzas mecánicas [27]. Por lo tanto, el entorno local de la MEC puede influir en la polaridad, supervivencia, proliferación y diferenciación celular [28]. Según la composición, la estructura y la localización de la MEC, ésta se puede clasificar en dos tipos: intersticial y pericelular [29](Fig. I-5).

La matriz intersticial se localiza en los tejidos conjuntivos, rodea las células y contiene varios tipos de proteínas que proporcionan un andamiaje estructural para los tejidos [30]. En los espacios intersticiales del mesénquima embrionario, la arquitectura y el ensamblaje de las MECs podrían aportar la integridad estructural necesaria para promover o restringir los movimientos celulares, además de proporcionar sitios de unión para receptores especializados en la superficie celular para la MEC, los cuales pueden detectar información incrustada en la MEC lo que influiría profundamente en los comportamientos celulares afectando a la función de adhesión, polaridad y migración celular. Asimismo, a otras señales intracelulares que regulan la supervivencia, proliferación y diferenciación celular [28].

Por otra parte, la matriz pericelular suele contactar íntimamente con la célula. Un ejemplo de dicha matriz es la membrana basal (MB) [29]. Las MBs se consideran MECs altamente especializadas que forman capas acelulares y delgadas que subyacen a las células y las conectan a su matriz intersticial [31]. Por lo tanto, proporcionan un soporte estructural a las células influyendo y modificando el comportamiento celular a través de señalizaciones externas [32]. Los principales componentes de la MB son especialmente el colágeno IV y la laminina. Estas dos proteínas se detallarán más adelante en la próxima sección. Cabe señalar, que estas dos moléculas, junto con otras, son las que otorgan a las MBs papeles tan importantes como la regularización de la supervivencia y de la migración de las células durante el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular, la respuesta a la infección, lesión y enfermedad. Así como, sirve como una barrera selectiva y andamio estructural [33].

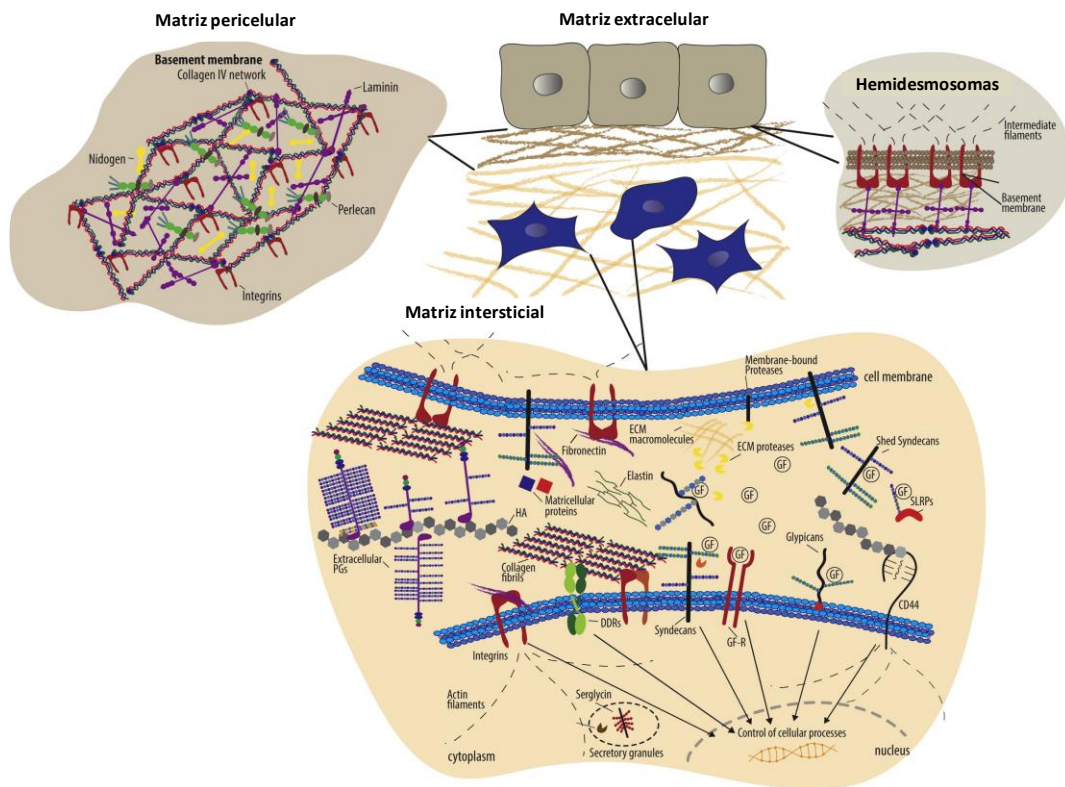


FIGURA I-5: Descripción esquemática de las matrices extracelulares: pericelular e intersticial. Con sus principales componentes y receptores celulares (adaptada y modificada apartir de [29] con permiso de Elsevier)

A nivel ocular, las MBs localizadas en el periodo embrionario se hallan en las siguientes estructuras:

- » MB del epitelio corneal, localizada entre las células epiteliales basales y el estroma corneal. Su función es anclar las células epiteliales al estroma. A su vez, proporciona andamios durante el desarrollo embrionario, la migración, diferenciación y el mantenimiento del fenotipo epitelial [34].
- » La cápsula del cristalino es una MB que rodea completamente el cristalino. En el embrión, tanto las células epiteliales como las fibras de la lente sintetizan y secretan moléculas de MB que facilitan el crecimiento de la cápsula de la lente [13, 35-37].
- » La membrana limitante interna (MLI) es la MB de la retina neural, sirve como un sitio de unión para el pie terminal de las prolongaciones de las células gliales de Müller y astrocitos. Además, evita el crecimiento aberrante de los axones [38].
- » La membrana de Bruch se localiza entre el EPR y la coriocapilar de la coroides y está compuesta por 5 capas, la más interna corresponde a la MB del EPR y la capa más

externa es la MB de los capilares de la coroides. Los componentes de la membrana de Bruch proceden tanto del EPR como de la coroides [3, 39].

- » Por último, la MB que rodea a los vasos sanguíneos [40]. A nivel ocular se sitúan entre otras estructuras en la coriocapilar, la parte posterior del cristalino y a lo largo de la MLI.

2.1 El papel del colágeno IV y la laminina-1 en el desarrollo ocular

2.1.1 Colágeno IV: estructura y localización

A) Estructura

El colágeno es una familia de glucoproteínas fibrosas que sólo está presente en la MEC. Se produce sobre todo en los fibroblastos, en las células del músculo liso y en las células epiteliales. Varios colágenos, como el colágeno tipo I, se describen como colágenos fibrilares porque se disponen en fibrillas rígidas que a su vez se disponen en fibras más gruesas [41].

El colágeno IV es una proteína no fibrilar específica de las MBs [42]. Según el tipo de molécula de colágeno, ésta forma parte de los colágenos formadores de redes. Por lo tanto, el colágeno IV forma redes bidimensionales en las láminas basales proporcionando un andamio para el depósito de otras moléculas en la MEC. Asimismo, juega un papel importante en la interacción de la MB con las células. Por último, interactúa con varias moléculas de la MB y con algunos factores de crecimiento [43-45].

Los genes *Col4a1*, *Col4a2*, *Col4a3*, *Col4a4*, *Col4a5* y *Col4a6* son los que codifican las 6 cadenas alfa del colágeno IV ($\alpha 1(IV) - \alpha 6(IV)$), llamadas monómeros, que se ensamblan en tres protómeros diferentes $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(IV)$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(IV)$ y $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(IV)$ [46, 47] (Fig. I-6). Los cromosomas implicados en la síntesis de estas cadenas alfa en el humano son el cromosoma 2 donde se sitúan los genes para *a3* y *a4*, el cromosoma 13 (en el ratón corresponde al cromosoma 8) donde se localizan los genes para *a1* y *a2* y el cromosoma sexual X donde se localizan los genes para *a5* y *a6* [48]

Lo cierto es que el colágeno IV es el componente más abundante de las MBs [49]. En este caso, la cadena más común es $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(IV)$. Las moléculas del colágeno IV se agregan entre sí para generar una red extracelular flexible, plana y en forma de lámina (Fig. I-7) que proporciona gran resistencia a la tracción en los tejidos epiteliales y une las diversas moléculas de la MEC [50].

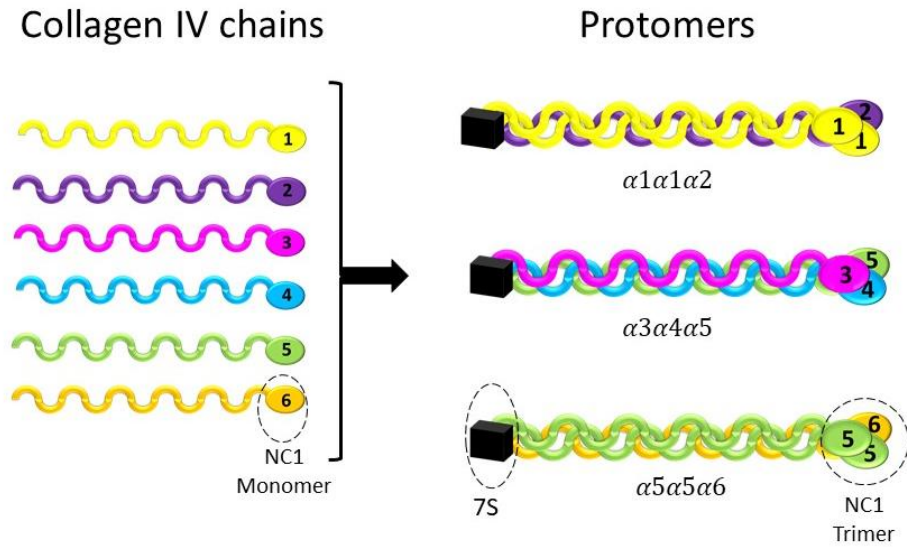


FIGURA I-6: Colágeno IV, representación esquemática de la formación de la triple hélice de los protómeros

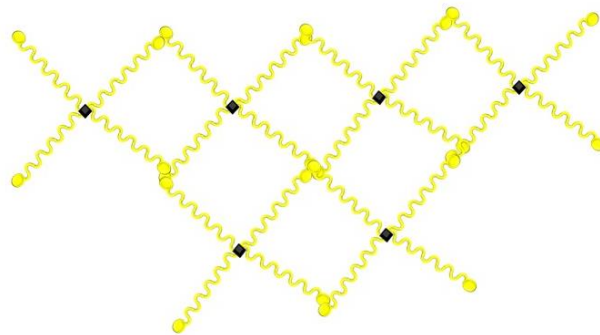


FIGURA I-7: Red de moléculas de colágeno IV

B. Localización en el ojo

Según Dziadek y Timpl [51], la isoforma $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ empieza a detectarse en el ratón durante el desarrollo embrionario temprano, concretamente en la etapa de 32-64 células. Varios estudios han examinado la distribución de las distintas isoformas del colágeno IV en las estructuras del ojo durante el desarrollo embrionario. La tabla I-1 resume la distribución de las 6 isoformas del colágeno IV en las MBs oculares del ratón durante el desarrollo embrionario.

Tabla I-1: La intensidad relativa de la señal fluorescente entre tejidos para cada uno de los anticuerpos se indica como:

-, negativo; ±, débilmente positivo; +, positivo; ++, positivo fuerte; +++, positivo muy fuerte. MLI: membrana limitante interna; ND: no disponible; EPR: epitelio pigmentario de la retina.

^a expresado solo en el polo posterior. ^b expresado solo en el polo anterior. (Tabla adaptada y modificada a partir de [52] con permiso de Elsevier). Está resaltado en amarillo el periodo objeto de estudio en esta tesis doctoral.

Isoformas del colágeno IV	Periodo gestacional	Membranas basales oculares								
		Conjuntiva	Epitelio corneal	Endotelio corneal	Cuerpo ciliar y ángulo Iridocorneal	Cápsula del cristalino	MLI	Vasos hialoideos	Membrana de Bruch	
									EPR	Coriocalilar
$\alpha 1/\alpha 2(\text{IV})$	E12.5	ND	++	ND	ND	++	++	++	++	++
	E14.5	ND	+	+	ND	+++	++	+++	++	++
	E16.5	ND	+	+	+	+++	+	+++	++	++
	E18.5	+	+	+	+	+++	+	+++	++	++
	P1	++	++	++	++	+++	+	+++	++	++
	P4	++	++	++	++	+++	+	+++	++	++
$\alpha 3/\alpha 4(\text{IV})$	E12.5	ND	-	ND	ND	-	-	-	±	-
	E14.5	ND	-	-	ND	-	-	-	+ ^a	-
	E16.5	ND	-	-	-	-	-	-	+	-
	E18.5	-	-	±	-	±	-	-	++	-
	P1	-	-	++	-	++ ^b	-	-	++	-
	P4	-	-	+++	-	+++	-	-	++	-
$\alpha 5(\text{IV})$	E12.5	ND	-	ND	ND	++	++	-	+ ^b	-
	E14.5	ND	+	±	ND	++	++	-	+	-
	E16.5	ND	+	+	++	+++	++	-	++	-
	E18.5	++	++	++	+++	+++	++	-	++	-
	P1	++	++	+++	+++	+++	++	-	++	-
	P4	++	++	+++	+++	+++	++	-	++	-
$\alpha 6(\text{IV})$	E12.5	ND	-	ND	ND	++	++	-	+ ^b	-
	E14.5	ND	+	±	ND	+++	++	-	+ ^b	-
	E16.5	ND	+	+	++	+++	++	-	-	-
	E18.5	+	+	+	++	+++	++	-	-	-
	P1	++	++	++	+++	+++	++	-	-	-
	P4	++	++	++	+++	+++	++	-	-	-

Cabe señalar que varios estudios mostraron la distribución de dichas isoformas en las matrices intersticiales de varias estructuras oculares. En el cristalino del embrión, por ejemplo, se ha observado que tanto las fibras del cristalino como sus células epiteliales sintetizan y secretan las moléculas de las MBs tal como el colágeno IV facilitando así el crecimiento de la cápsula del cristalino [36, 37]. Por otra parte, en la retina, se ha observado que esta proteína se expresa en el interior de la capa neuroblástica [53]. Ciertamente, el colágeno IV no es una molécula estrictamente de las MBs, se ha demostrado que se expresa además en los tejidos conectivos como por ejemplo el estroma corneal [54, 55].

Todo lo anterior parece confirmar la importancia funcional del colágeno tipo IV en las distintas estructuras oculares. Varios estudios han constatado que la mutación o alteración de una o varias isoformas que constituyen esta molécula provoca trastornos multisistémicos tanto en ratones como en humanos [56, 57].

2.1.2 Laminina-1: estructura y localización

A. Estructura

Las lamininas son una familia de glucoproteínas heterotriméricas compuestas por tres tipos de cadenas α , β y γ . Actualmente, se han identificado 5 genes que codifican la subunidad α , 4 codifican β y 3 codifican γ . La combinación entre estas subunidades puede formar al menos 16 formas de laminina [58, 59].

Se ha observado que las lamininas poseen varias actividades biológicas, Kleinman et al. los han resumido en el siguiente artículo [60], donde destacan el papel de la laminina en la adhesión, crecimiento, diferenciación y migración celular, sin olvidar su labor sustancial en el ensamblaje de la matriz. Igualmente, las lamininas desempeñan un papel importante en la morfogénesis y la homeostasis de los tejidos [61].

La laminina-1 (laminina 111) (Fig. I-8) es de las primeras expresadas en el embrión durante la preimplantación temprana [62] y está formada por las siguientes cadenas $\alpha1\beta1\gamma1$.

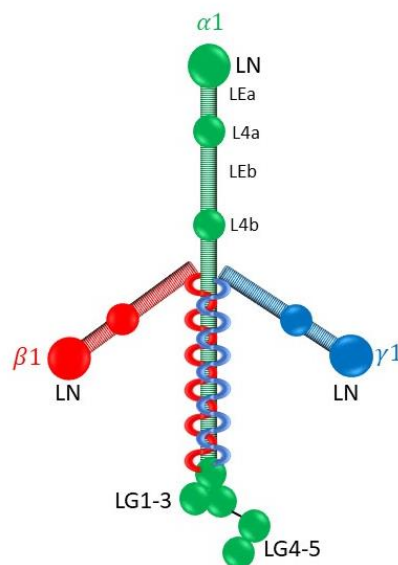


FIGURA I-8: La estructura proteica de la laminina-1, formada a partir de las tres cadenas $\alpha1\beta1\gamma1$.

La estructura de la laminina-1, contiene la repetición de dominios lineales denominado dominio EGF o dominio LE dispuestos en tándem, además de dominios globulares internos (L4) con una distribución idéntica. Posee también tres brazos cortos con dominios globulares N-terminales (LN) esenciales para la incorporación a la MB, y un brazo largo en forma de espiral enrollada acabada con un domino denominado G (LG). Los dominios LG se unen a varios receptores de la superficie celular y a algunas moléculas de la MEC [58, 59, 63].

Al igual que el colágeno IV, la laminina-1 es capaz de auto-ensamblarse por medio de interacciones entre los dominios globulares LN y forma redes poliméricas hexagonales [64] (Fig. I-9).

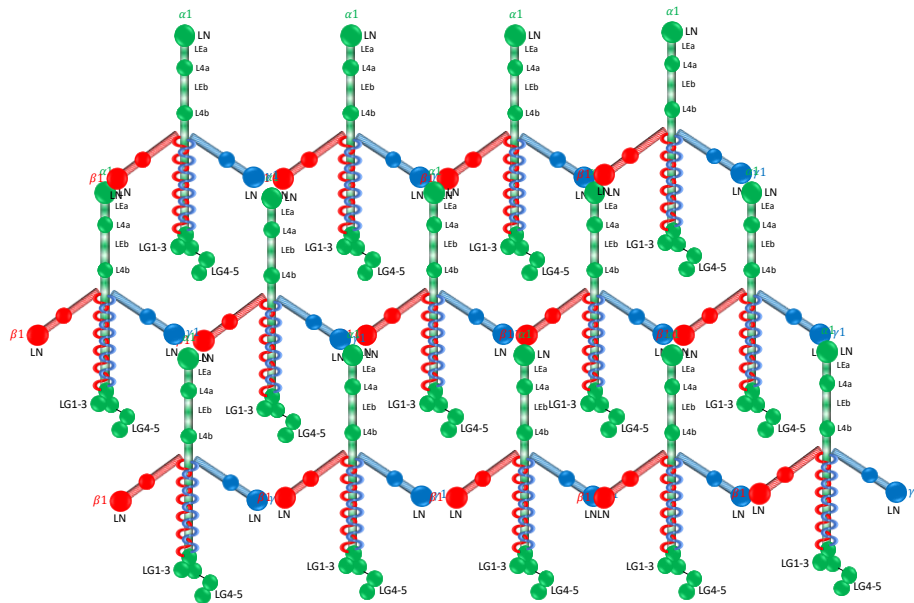


FIGURA I-9: Red de moléculas de laminina-1

Hay que subrayar que tanto la red del colágeno IV como la laminina-1 se auto-ensamblan en una red tridimensional independiente la una de la otra [64]. La laminina media el anclaje de las células epiteliales y endoteliales a la red del colágeno IV [65].

B. Localización en el ojo

La laminina-1 forma parte de las MBs. A nivel ocular, varios estudios observaron que la laminina-1 se encuentra ubicada en la MB del epitelio corneal [66, 67], en la MB de las dos conjuntivas bulbar y palpebral [66] y en la cápsula del cristalino [35, 67, 68], en esta zona, se ha observado que a medida que el periodo de gestación vaya avanzando, el marcaje de dicha molécula se incrementa en las regiones ecuatorial y posterior del cristalino donde la cápsula es más gruesa [69]. Asimismo, se ha demostrado la localización de la laminina-1 en la MB de los vasos hialoideos y en la MLI [69, 70]. La membrana de Bruch contiene también la laminina-1 [67] sintetizada por las células del EPR [71]. Por otra parte, se ha detectado una notable inmunoreactividad de la isoformas alfa-1, beta-1 y gamma-1 que forman la laminina-1 en la membrana de Descemet corneal en el embrión humano [67].

Asimismo, la laminina-1 se ha localizado en el estroma corneal [72] y en todo el epitelio del cristalino [70]. Como se ha dicho anteriormente, las células epiteliales y las fibras del cristalino son las que sintetizan y secretan las moléculas de la MEC [35].

Para terminar, se ha observado que durante el desarrollo embrionario de la retina el crecimiento de las células ganglionares depende de la presencia de las moléculas de la MEC, sobre todo la laminina [70].

3. EL ÁCIDO FÓLICO Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

El ácido fólico (AF), también conocido como vitamina B9 o folato (en su estado natural), es una vitamina hidrosoluble esencial para las mujeres embarazadas y para las que están en edad fértil. El AF, a diferencia del folato, no está presente de forma natural en los alimentos, sino que se produce sintéticamente. El ser humano no puede sintetizar folato por lo tanto tiene que ingerirlo en la dieta [73], por el contrario, los roedores pueden sintetizarlo por bacterias de su flora intestinal [74]. En general, el AF es la forma más común del folato utilizada como suplemento nutricional [75].

El folato puede encontrarse en muchos alimentos naturales, tales como legumbres, levadura, frutas y verduras de hoja verde. De igual forma, está presente en algunos alimentos de origen animal como el hígado y el riñón [76]. Sin embargo, parte del folato en los alimentos naturales puede destruirse durante el proceso de cocción, especialmente con altas temperaturas y tiempos prolongados de cocción [77].

Durante el embarazo, el requerimiento de AF aumenta y se vuelve crucial tanto para la salud de la madre como para el desarrollo del feto. Por lo tanto, se debe tomar un suplemento de AF (400 μg / día) durante el primer trimestre de embarazo [78].

Varios estudios en la literatura han examinado el efecto del bajo nivel del folato, tanto antes como durante la gestación, en la salud de la progenie. Como resultado, los estudios mostraron que los niveles bajos de AF están asociados con varios defectos congénitos, como por ejemplo los defectos de tubo neural (especialmente anencefalia y espina bífida) [79, 80], malformación craneofacial [81], paladar hendido [82], entre otros. No obstante, algunos estudios han demostrado que la administración preconcepcional del AF ayuda a prevenir la aparición y la recurrencia de muchas de estas anomalías congénitas [83], especialmente aquellas relacionadas con el tubo neural del cual se origina el sistema nervioso central.

Así pues, el AF es esencial para el desarrollo normal del sistema nervioso y sus estructuras derivadas como el ojo [84, 85]. Su importancia reside en su contribución en la regulación regional de la apoptosis y la proliferación celular [86]. Asimismo, es imprescindible para el crecimiento y la diferenciación celular normal [87].

El derivado activo del AF es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico conocido por tetrahidrofolato, una coenzima que desempeña un papel vital en la transferencia de unidades de un solo átomo de carbono. El metabolismo de un carbono es requerido para diversas reacciones biosintéticas tales que la síntesis de purinas y pirimidinas para la biosíntesis de ácidos nucleicos y la metilación de homocisteína a metionina [88, 89].

3.1 El ácido fólico en el ojo

El folato y sus derivados de un carbono no pueden penetrar las membranas biológicas por simple difusión. Por esta razón, utilizan tres tipos de procesos de transporte para entrar en las células: los receptores de folato (RF), el transportador de folato reducido (TFR-1), y el transportador de folato acoplado a protón (PCFT) [90-93], (Fig. I-10).

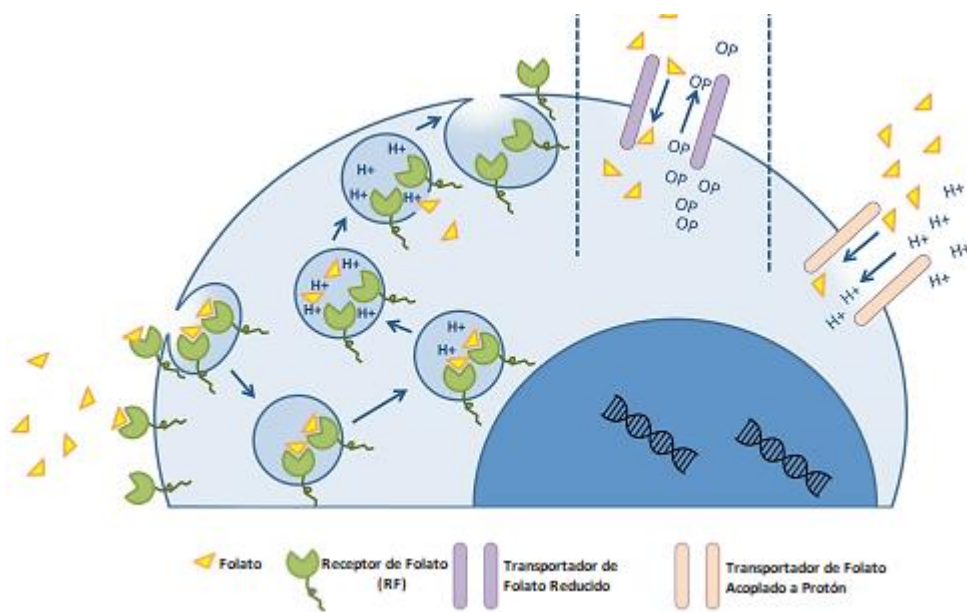


FIGURA I-10: El folato es transportado a la célula por tres proteínas diferentes: el Receptor de folato (RF), el Transportador de Folato Reducido y el Transportador de Folato Acoplado a Protón. (Imagen adaptada y modificada a partir de [94] con permiso de Springer Nature).

3.1.1 Receptores de folato

A. Definición

El receptor de folato (RF), también conocido como proteína de unión a folato, se expresa en la superficie celular. Se han identificado las siguientes isoformas de RF (α , β , γ , δ) en el humano [95-97]. Sus respectivos análogos en los roedores son las proteínas de unión a folato (folate-binding proteins-FBP o Folbp): FBP1 y FBP2 [98, 99], análogos a $RF\alpha$ y $RF\beta$ humanos, respectivamente. Por otra parte, Folbp3 es el análogo de $RF\delta$ humano [97], no obstante los ortólogos del $RF\gamma$ no se han descrito aún en ratones o ratas [100].

La primera isoforma $RF\alpha$, también conocida como Receptor de folato-1 (Folr1), es una glicoproteína unida a la membrana celular apical de las células epiteliales [101].

Por otra parte, $RF\beta$, conocida como Receptor de folato-2 (Folr2), es el receptor de folato más común. Se localiza en la superficie de la mayoría de las células. Su expresión es más alta en las células fetales y del sistema nervioso [102]. $RF\beta$ está presente especialmente en la placenta y los macrófagos activados [103, 104]. Evidentemente, los macrófagos están presentes en todos los tejidos oculares [105].

Poco se ha publicado sobre el receptor $RF\gamma$ y su papel en el transporte de folato [106]. Parece que se encuentra en los tejidos hematopoyéticos y otros fluidos fisiológicos [107].

Por último, estudios recientes sobre el receptor $RF\delta$, indican que se expresa predominantemente en las células T reguladoras (células Treg) [108], desempeñando así un importante papel en el control de la respuesta inmune [109]. A nivel ocular, los tejidos pigmentarios poseen la capacidad de usar las células Treg para establecer la regulación inmune en el ojo [110].

B. Localización en el ojo

Numerosos estudios han demostrado que $RF\alpha$ es presente en todas las capas de la retina [111, 112]. Se ha detectado en zonas específicas tales como la capa de las células ganglionares y en las células de Müller, en la membrana limitante externa y en la capa plexiforme externa [113, 114] y en la región basolateral del EPR [115].

Por otra parte, el AF es un metabolito necesario para el desarrollo del cristalino, sobre todo el receptor $RF\alpha$ [116]. Se ha observado que $RF\alpha$ ejerce un papel importante durante la embriogénesis. La primera aparición de este receptor en el desarrollo embrionario del globo ocular del ratón se manifiesta en el periodo E10.5 concretamente en las vesículas ópticas. Más tarde en E12.5 y E15.5, se restringe al epitelio del cristalino y a los bordes de la retina [117].

Hay que mencionar además, la presencia funcional y molecular del receptor $RF\alpha$ en el epitelio corneal [118].

Hasta la actualidad, sólo se ha encontrado un único estudio que haya investigado la localización del receptor $RF\beta$ en el ojo [119]. En este estudio, se detectó dicho receptor en los macrófagos activados en la retina.

Finalmente, respecto al receptor $RF\delta$, se ha ubicado en las células del EPR [113].

3.1.2 Transportador de folato reducido

A. Definición

Al igual que $RF\alpha$, el TFR-1 regula el transporte del folato a través de la membrana. Sin embargo, a diferencia de $RF\alpha$ la expresión de TFR-1 se limita a aquellas células que están involucradas en la transferencia vectorial de los folatos de un lado de la célula al otro [92].

B. Localización en el ojo

TFR-1 se distribuye en la membrana apical del EPR [111, 112, 115]. Smith et al. [112] han demostrado que este receptor media el eflujo del folato desde la células del EPR hacia el espacio subretiniano a través de la membrana apical. Los autores concluyeron, al igual que muchos otros, que la expresión de TFR-1 exclusivamente se limita al EPR. Las células de este epitelio son las que median el transporte vectorial de nutrientes, como el folato, desde la sangre coroidea hasta las células fotorreceptoras de la retina [115, 120].

3.1.3 Transportador de folato acoplado a protón

A. Definición

El PCFT se expresa en el intestino delgado, placenta e hígado. Media tanto la absorción intestinal de folatos como el transporte de folatos al sistema nervioso central [121]. Tanto en humanos como en roedores, el intestino delgado proximal es el sitio principal de absorción de folato y el PCFT se expresa altamente en él [121].

B. Localización en el ojo

La expresión del ARNm de PCFT en la retina humana fue investigado por Umapathy et al. [122] donde observaron que todas las capas celulares de la retina expresan este receptor. El PCFT fue detectado en las células de la capa ganglionar, la membrana limitante externa, la capa nuclear interna, los segmentos internos de los fotorreceptores y en las células del EPR. En 2010, Bozard et al. [114] sugirieron que los dos receptores PCFT y $RF\alpha$ funcionan en coordinación para mediar la absorción de folato en las células de Müller.

Por último, a nivel corneal, se ha demostrado que la proteína PCFT junto con $RF\alpha$ ambas están involucradas en el flujo de AF en las células epiteliales corneales [118].

II. JUSTIFICACIÓN

El AF es un nutriente fundamental durante las primeras etapas del desarrollo humano. Como se afirmó anteriormente, el requerimiento del AF aumenta durante el embarazo, sobre todo para mantener la rápida proliferación celular y para el crecimiento normal del tejido fetal. Un bajo nivel de AF materno está asociado con mayor riesgo de tener fetos con defectos del tubo neural como consecuencia del desarrollo incompleto del sistema nervioso central [79]. En el ser humano, el cierre del tubo neural tiene lugar en el vigésimo octavo día de gestación [123], a menudo antes de que la madre sepa que está embarazada.

Dado que el déficit de AF ocasiona diversas alteraciones a nivel del tubo neural, y en vista de que la formación de las vesículas ópticas comienza en el momento del cierre del tubo neural [124], es de esperar la ocurrencia de malformaciones oculares congénitas en situaciones de deficiencia de AF.

Algunos estudios relacionaron el déficit de AF con varias alteraciones oculares entre las cuales cabe citar la ambliopía nutricional [125, 126] y la neuropatía óptica nutricional [127], ambas alteraciones visuales suelen manifestarse en el adulto. Hoy en día, existe una escasa bibliografía que relacione las malformaciones oculares congénitas con el déficit de AF [128, 129]. Sin embargo, no ha sido objeto de estudio el cómo interfiere el déficit de AF en el desarrollo de las estructuras oculares ni de qué manera altera a la MEC.

Pocos órganos del cuerpo humano tienen una MEC tan extensa como el ojo [130]. En el caso particular del colágeno IV y la Laminina-1, ambas moléculas forman una red tridimensional que proporciona fuerza y estabilidad al propio tejido [35]. Son dos proteínas cruciales para las MBs y son responsables de mantener la adhesión y la migración celular [131].

Se desconoce si el déficit de AF afecta a la expresión de estas dos moléculas. Sin embargo, algunos estudios han observado que la alteración de su expresión conduce a varias anomalías oculares, como por ejemplo cataratas y defectos severos del cristalino [132-134], displasia retiniana [135] y otros defectos oculares [136].

Mediante esta tesis, se pretende comprender mejor cómo afecta el déficit de AF a la expresión del colágeno IV y laminina-1 y, lo más importante, cómo daña a la integridad de las estructuras oculares. Para ello, se plantea el estudio de las malformaciones oculares congénitas producidas en embriones de ratón debido al déficit dietético materno de AF durante dos periodos, corto (2 semanas) y largo (8 semanas). Asimismo, estudiar los cambios producidos en la textura de dichos tejidos. Con este propósito, se llevan a cabo

varios experimentos inmunohistoquímicos y ópticos con el fin de aportar datos relevantes en este área de investigación.

A continuación, se describe la estructura de la tesis:

Capítulo I: contiene la introducción, justificación, objetivos y materiales y métodos.

Capítulo II: describe el estudio estadístico de las malformaciones oculares y cambios en la biometría ocular.

Capítulo III: representa un nuevo método automatizado para cuantificar y regionalizar el patrón de expresión de colágeno IV y laminina-1 en el cristalino, retina neural y en el estroma corneal.

Capítulo IV: se aplica a varias estructuras oculares, marcadas con anti-colágeno IV o anti-laminina-1, una comparación basada en el análisis multifractal para determinar cambios en la estructura fractal en estas estructuras.

Capítulo V: estudia la interacción luz-materia mediante dos experimentos realizados sobre tejidos oculares embebido en parafina. El primer experimento está basado en la polarización por transmisión en el cual se averiguan cambios en el estado de polarización de la luz tras incidir sobre los tejidos oculares del grupo control y los grupos con déficit materno de AF. El segundo experimento aplica el análisis de componentes principales (ACP) a imágenes multiespectrales a fin de aprovechar la información multiespectral para analizar las diferencias espectrales entre los grupos estudiados.

Hay que señalar que, en el apartado de materiales y métodos, expuesto en el capítulo I, solo hemos descrito las técnicas de marcaje que hemos utilizado en esta tesis. Dado que cada capítulo consta de una método distinto, hemos optado por explicar detalladamente en cada uno de ellos el procedimiento seguido.

Justificación

III. OBJETIVOS

La finalidad de esta tesis es investigar la relación que existe entre el déficit dietario materno de AF y las alteraciones oculares congénitas. Para ello, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

i. **Objetivo 1:**

Evaluar las posibles malformaciones oculares en los embriones de ratón de 14.5 días de gestación, cuyas madres fueron sometidas a dieta deficitaria de AF en periodo corto (2 semanas) y largo (8 semanas). Por eso, nos proponemos investigar los siguientes puntos:

- 1) Identificar el tipo de malformaciones oculares congénitas producidas a consecuencia del déficit materno de AF, y realizar un estudio estadístico para conocer su frecuencia en los embriones.
- 2) Estudiar cambios producidos en la biometría de algunas estructuras oculares. En este caso, se aplicará la técnica estadística de remuestreo de datos conocida como *Bootstrap*.
- 3) Determinar algunos mecanismos alterados. Por este motivo, se analizará el patrón de expresión de dos moléculas de MEC, colágeno IV y laminina-1.

ii. **Objetivo 2:**

Estudiar las características ópticas de los tejidos y evaluar numéricamente los cambios producidos en los tejidos. Para llevarlo a cabo, se investigarán los siguientes puntos:

- 1) Implementar una metodología automatizada para cuantificar y regionalizar la expresión del colágeno IV y la laminina-1 en el interior de algunas estructuras del ojo.
- 2) Utilizar las técnicas de procesado y de análisis de imagen a fin de analizar los cambios producidos en la textura de los tejidos a causa del déficit materno de AF.
- 3) Utilizar la herramienta de análisis multifractal para, evaluar, cuantificar y comparar los cambios en la textura de los tejidos.
- 4) Averiguar cambios en el comportamiento espectral de los tejidos mediante varias técnicas ópticas: imágenes multiespectrales y polarización de la luz.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES Y DIETAS

Este material ha sido obtenido, elaborado y cedido por el Grupo de Investigación UCM 920202, al que pertenecen las directoras de la tesis, para la realización de esta tesis doctoral. Los animales utilizados en esta tesis son ratones silvestres C57/BL/6J (Harlan, Inglaterra) de ocho semanas de edad. Fueron alojados en el Animalario de la Facultad de Medicina a temperatura constante de 22 ± 2 °C y a ciclos de 12/12 horas de luz/oscuridad. Los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Las hembras se dividieron en dos grupos según la dieta administrada [137]:

- » Grupo control en el cual las hembras tomaron una dieta estándar para roedores (SAFEA04/A03 Harlan), con $2\text{mgAF} / \text{kg}$ dieta.
- » Grupo deficitario, dividido a su vez en dos grupos:
 - ✓ El grupo D2: grupo deficitario que tomaron una dieta carente de AF, $0\text{mgAF} / \text{kg}$ dieta + 1% de Succinil Sulfatiazol, que fue administrada durante las dos semanas gestacionales.
 - ✓ El grupo D8: grupo deficitario que tomaron una dieta carente de AF, $0\text{mgAF} / \text{kg}$ dieta + 1% de Succinil Sulfatiazol, fue administrada durante 8 semanas: seis semanas previas a la preñez y 2 gestacionales.

Los cruces se realizaron durante una noche, retirando por la mañana al macho. Este momento se considera día de gestación 0 (0DG). Las hembras preñadas, se sacrificaron en el día 14.5 de gestación que corresponden al Estadio E14.5.

Los sacrificios por dislocación cervical tuvieron lugar tras la anestesia con monóxido de carbono. Los embriones fueron extraídos y lavado en PBS al 1% y fijados en paraformaldehído al 4% durante 48 horas.

El proceso de fijación, inclusión en parafina, protocolo de desparafinado y rehidratación de los tejidos se puede consultar en [137].

2. INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES

La inmunohistoquímica, es la identificación y localización de un constituyente tisular (antígeno) in situ mediante una reacción específica de antígeno-anticuerpo. Se utilizará esta técnica para estudiar la expresión de las dos proteínas: colágeno IV y laminina-1.

2.1 Tinción inmunohistoquímica para el colágeno IV

2.1.1 Inhibición de la peroxidasa endógena

Una vez los tejidos están hidratados, se lavan en solución tampón PBS durante 5 minutos en dos pases, y se procede a inhibir la enzima del anticuerpo secundario para minimizar el número de falsos positivos. En el caso del colágeno IV, la enzima del anticuerpo secundario utilizada es la peroxidasa, por ende, hay que bloquear primero los sitios donde haya actividad peroxidasa endógena del tejido.

Se prepara una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac) al 2% en metanol, los portas se sumergen en esta solución durante 10 minutos en oscuridad, después se lavan con agua destilada (2 pases de 5 minutos).

2.1.2 Desenmascaramiento del colágeno IV con pepsina

Para realizar el marcaje con anti-colágeno IV, primero se prepara una dilución de Pepsina (Sigma, N.º de catálogo: P-7012) al 0.2% en ácido clorhídrico 0.1N (Panreac). Hay que incubar los portas en la solución durante una hora a 37°C en una cámara húmeda. Se lavan los portas en Buffer TRIS durante 5 minutos en dos pases (Tabla I-2).

TABLA I-2: Preparación del BUFFER TRIS (PH=7.4-7.6). Cantidad para preparar un litro.

Solución	Cantidad
TRIS base (Sigma)	6.05 g
Cloruro sódico (Panreac)	8.76 g
Ácido clorhídrico 1N	40 ml
Tritón X-100:	1ml
Agua destilada	Hasta obtener 1l

2.1.3 Bloqueo de la tinción de fondo y las uniones inespecíficas con suero bloqueante

Uno de los problemas de las tinciones inmunohistoquímicas es la tinción de fondo que aparece en sitios donde no debería haberla. Por ello, primero hay que bloquear dicha tinción de fondo, el procedimiento seguido es el siguiente:

Se incuban los portas en una solución de BSA (Bovine Serum Albumin), al 1% en TRIS durante 10 minutos en una cámara húmeda y en oscuridad. Después hay que decantar el BSA y se procede a incubar con el anticuerpo primario.

2.1.4 Anticuerpo primario

Se ha usado el anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno IV de humano isotipo IgG (ICN Immunobiologicals, N.º de catálogo:68-124-1). Dilución 1:200 en TRIS, incubando los portas durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad. Tras la incubación, se lavan en TRIS en dos pases de 10 minutos.

2.1.5 Anticuerpo secundario

Se emplea el policlonal (N.º de catálogo: K-4003) del sistema EnVision® de Dako. Es un polímero de dextrano conjugado al anticuerpo secundario y a la enzima peroxidasa.

Se incuban los portas con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Después, se vuelven a lavar con TRIS en dos pases de 10 minutos cada uno.

2.1.6 Revelado con el cromógeno

Para revelar se utiliza el kit DAB (Diaminobencidina) de Dako (N.º de catálogo: K-3468) como cromógeno. Se mezcla 1 ml de Buffer sustrato con 20 μ l del DAB. Luego, se lava con TRIS en dos pases de 10 minutos cada uno, con agua corriente y con agua destilada.

2.1.7 Deshidratar y montar con Eukitt

Las preparaciones se mantienen en agua destilada durante 10 minutos. Después, se deshidratan realizando pases de 5 minutos en alcoholes crecientes 70°, 80°, 90°, 100° repitiendo cada pase 2 veces. Más adelante, se realizan 2 pases de xilol de 10 minutos cada uno. Finalmente, se montan con medio Eukitt (Eukitt mounting médium; Electro Microscopy Sciences, Hatfield, Reino Unido).

2.2 Tinción inmunohistoquímica para la laminina-1

En primer lugar, hay que inhibir la peroxidasa endógena, por ello se seguirán los mismos pasos detallados que en el caso del colágeno IV en la sección (2.1.1).

2.2.1 Desenmascaramiento de la laminina-1 con EDTA 1Mm

Primero, se prepara una solución con 600 ml de agua destilada y 1.2 ml de EDTA (Sigma, N.º de catálogo: E7889), ajustando su pH a 8-8.2. La solución se calienta durante 10 minutos en microondas (hasta su ebullición). A continuación, se sumergen los portas en esta solución y se mantiene en estufa a 140-150 °C durante 40 minutos. Luego, se deja enfriar 10 minutos a temperatura ambiente y otros 10 en hielo. Finalmente, se lavan en TRIS durante 10 min (5 minutos por pase).

En el siguiente paso, se bloquea la tinción de fondo y las uniones inespecíficas según se ha descrito en la sección (2.1.3).

2.2.2 Anticuerpo primario

Se ha utilizado el anticuerpo policlonal de conejo anti-laminina-1 de ratón isotipo IgG (Sigma Immunochemicals, N.º de catálogo: L-9393). Dilución 1:200 en TRIS, incubándose los portas durante 2 horas a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Después de la incubación se lava otra vez en TRIS en dos pases de 5 minutos cada uno.

Por último, para terminar, se realizan los mismos pasos descritos en las secciones (2.1.5), (2.1.6) y (2.1.7).

3. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)

El protocolo de esta tinción se inicia desparafinando los tejidos en Xileno durante 30 min. A continuación, los cortes se hidratan mediante baños sucesivos en alcoholes de concentración decreciente: 100°, 96° y 80°. Se lavan en agua destilada en dos pases de 10 minutos. Se tiñen 5 minutos en hematoxilina, se lavan en agua destilada en dos pases de 10 minutos, se tiñen de 15 a 30 segundos en Eosina, se realiza un lavado en agua destilada en dos pases de 10 minutos, se efectúa la deshidratación de los cortes mediante baños sucesivos de 5 minutos en alcoholes de concentración creciente: 80°, 96° y 100°. Finalmente se sumergen en un baño de Xileno y se procede a montarlos.

Una vez finalizada la inmunohistoquímica y la H&E, todos los portas se examinan mediante un microscopio óptico Leica DMR y acto seguido se fotografían con una cámara digital Leica DFC320 (Leica Geosystems AG). Estas fotografías son las que se utilizarán en esta tesis para

la evaluación de las malformaciones, del patrón de expresión del colágeno IV y la laminina-1. Posteriormente, se utilizarán en el procesamiento de imágenes para el estudio de la morfología y la textura de los tejidos. Algunos portas sin teñir/marcar se utilizarán para estudiar el grado de polarización y para la toma de imágenes multiespectrales.

Materiales y Métodos

V. REFERENCIAS DEL 1º CAPÍTULO

1. Arteaga Martínez M: **Embriología Humana y Biología Del Desarrollo**, 2nd ed edn; 2017.
2. Pei Y, Rhodin J: **The prenatal development of the mouse eye**. *The Anatomical Record* 1970, **168**(1):105-125.
3. Smith RS, John SW, Nishina PM, Sundberg JP: **Systematic evaluation of the mouse eye: anatomy, pathology, and biomethods**: CRC press; 2001.
4. Ryan SJ, Schachat AP, Wilkinson CP: **Ryan retina**: Marbán; 2008.
5. KUWABARA T, WEIDMAN TA: **Development of the prenatal rat retina**. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1974, **13**(10):725-739.
6. Raymond SM, Jackson IJ: **The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina**. *Current Biology* 1995, **5**(11):1286-1295.
7. Michael M, Khalil S, Matta C, Rizk T: **Normal development of the prenatal mouse eye**. *Folia morphologica* 1987, **35**(3):228.
8. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A: **Müller cells in the healthy and diseased retina**. *Progress in retinal and eye research* 2006, **25**(4):397-424.
9. FINE BS: **Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium: an electron microscopic study**. *Archives of Ophthalmology* 1961, **66**(6):847-860.
10. Ramón y Cajal S: **The structure of the retina**. *Translated by SA Thorpe and M Glickstein CC Thomas, Springfield, Illinois* 1972.
11. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC: **Glia-neuron interactions in the mammalian retina**. *Progress in retinal and eye research* 2016, **51**:1-40.
12. Lang RA, Bishop JM: **Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye**. *Cell* 1993, **74**(3):453-462.
13. Csato W: **Development and characterization of the lens capsule of mouse embryos (day 12 to day 19 of gestation)**. *Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung* 1989, **103**(6):971-984.
14. Andley UP: **The lens epithelium: Focus on the expression and function of the α -crystallin chaperones**. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008, **40**(3):317-323.
15. Wride MA: **Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity**. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2011, **366**(1568):1219-1233.
16. Goodenough DA, Dick J, Lyons JE: **Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy**. *The Journal of cell biology* 1980, **86**(2):576-589.
17. Mathias R, Rae J, Baldo G: **Physiological properties of the normal lens**. *Physiological reviews* 1997, **77**(1):21-50.
18. Baldo GJ, Gong XH, Martinez-Wittinghan FJ, Kumar NM, Gilula NB, Mathias RG: **Gap junctional coupling in lenses from alpha(8) connexin knockout mice**. *Journal of General Physiology* 2001, **118**(5):447-456.
19. Miller TM, Goodenough DA: **Evidence for two physiologically distinct gap junctions expressed by the chick lens epithelial cell**. *The Journal of cell biology* 1986, **102**(1):194-199.
20. Cvekl A, Tamm ER: **Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases**. *Bioessays* 2004, **26**(4):374-386.
21. Hay ED: **Development of the vertebrate cornea**. *International review of cytology* 1980, **63**:263-322.

22. Pei Y, Rhodin J: **Electron microscopic study of the development of the mouse corneal epithelium.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1971, **10**(11):811-825.
23. Hay ED: **Extracellular matrix alters epithelial differentiation.** *Current opinion in cell biology* 1993, **5**(6):1029-1035.
24. Tripathi BJ, Tripathi RC, Livingston AM, Borisuth N: **The role of growth factors in the embryogenesis and differentiation of the eye.** *Developmental Dynamics* 1991, **192**(4):442-471.
25. Saint-Geniez M, D'amore PA: **Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature.** *International Journal of Developmental Biology* 2004, **48**(8-9):1045-1058.
26. Alberts B: **Biología molecular de la célula, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter.** 2004.
27. Alberts B: **Molecular Biology of the Cell: Reference edition:** Garland Science; 2008.
28. Rozario T, DeSimone DW: **The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view.** *Developmental biology* 2010, **341**(1):126-140.
29. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK: **Extracellular matrix structure.** *Advanced drug delivery reviews* 2016, **97**:4-27.
30. Bonnans C, Chou J, Werb Z: **Remodelling the extracellular matrix in development and disease.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2014, **15**(12):786.
31. Timpl R, Brown JC: **Supramolecular assembly of basement membranes.** *Bioessays* 1996, **18**(2):123-132.
32. LeBleu VS, MacDonald B, Kalluri R: **Structure and function of basement membranes.** *Experimental biology and medicine* 2007, **232**(9):1121-1129.
33. Schwarzbauer J: **Basement membrane: Putting up the barriers.** *Current Biology* 1999, **9**(7):R242-R244.
34. Torricelli AA, Singh V, Santhiago MR, Wilson SE: **The Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function, and Disease** *Corneal Basement Membrane. Investigative ophthalmology & visual science* 2013, **54**(9):6390-6400.
35. Danysh BP, Duncan MK: **The lens capsule.** *Experimental eye research* 2009, **88**(2):151-164.
36. Young RW, Ocumpaugh DE: **Autoradiographic studies on the growth and development of the lens capsule in the rat.** *Invest Ophthalmol* 1966, **5**(6):583-589.
37. Haddad A, Bennett G: **Synthesis of lens capsule and plasma membrane glycoproteins by lens epithelial cells and fibers in the rat.** *Developmental Dynamics* 1988, **183**(3):212-225.
38. Halfter W: **Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth.** *Journal of Comparative Neurology* 1998, **397**(1):89-104.
39. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA: **The dynamic nature of Bruch's membrane.** *Progress in retinal and eye research* 2010, **29**(1):1-18.
40. Rhodes JM, Simons M: **The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2007, **11**(2):176-205.
41. Karp G: **Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos.,** 4^º edición edn; 2006.
42. Timpl R, Dziadek M: **Structure, development, and molecular pathology of basement membranes.** *International review of experimental pathology* 1986, **29**:1-112.
43. Futter CE, Crowston JG, Allan BD: **Interaction with collagen IV protects lens epithelial cells from Fas-dependent apoptosis by stimulating the production**

- of soluble survival factors.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, **46**(9):3256-3262.
44. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi A: **Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development.** *Developmental biology* 1991, **143**(2):303-308.
 45. Kühn K: **Basement membrane (type IV) collagen.** *Matrix Biology* 1995, **14**(6):439-445.
 46. Borza D-B, Bondar O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, Hudson BG: **The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ chains in smooth muscle basement membranes.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(30):28532-28540.
 47. Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG: **Glomerular Basement Membrane IDENTIFICATION OF A NOVEL DISULFIDE-CROSS-LINKED NETWORK OF $\alpha 3$, $\alpha 4$, AND $\alpha 5$ CHAINS OF TYPE IV COLLAGEN AND ITS IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF ALPORT SYNDROME.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(15):8767-8775.
 48. Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB: **COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets.** *Human molecular genetics* 2012, **21**(R1):R97-R110.
 49. Timpl R: **Structure and biological activity of basement membrane proteins.** *The FEBS Journal* 1989, **180**(3):487-502.
 50. Cummings CF, Pedchenko V, Brown KL, Colon S, Rafi M, Jones-Paris C, Pokydeslava E, Liu M, Pastor-Pareja JC, Stothers C: **Extracellular chloride signals collagen IV network assembly during basement membrane formation.** *J Cell Biol* 2016, **213**(4):479-494.
 51. Dziadek M, Timpl R: **Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells.** *Developmental biology* 1985, **111**(2):372-382.
 52. Bai X, Dilworth DJ, Weng Y-C, Gould DB: **Developmental distribution of collagen IV isoforms and relevance to ocular diseases.** *Matrix Biology* 2009, **28**(4):194-201.
 53. Taylor L, Arnér K, Engelsberg K, Ghosh F: **Scaffolding the retina: The interstitial extracellular matrix during rat retinal development.** *International Journal of Developmental Neuroscience* 2015, **42**:46-58.
 54. Guerriero E, Chen J, Sado Y, Mohan RR, Wilson SE, Funderburgh JL, SundarRaj N: **Loss of alpha3 (IV) collagen expression associated with corneal keratocyte activation.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(2):627-635.
 55. Saito K, Yonezawa T, Minaguchi J, Kurosaki M, Suetsugu S, Nakajima A, Nomoto H, Morizane Y, Sado Y, Sugimoto M: **Distribution of α (IV) collagen chains in the ocular anterior segments of adult mice.** *Connective tissue research* 2011, **52**(2):147-156.
 56. Alavi MV, Mao M, Pawlikowski BT, Kvezereli M, Duncan JL, Libby RT, John SW, Gould DB: **Col4a1 mutations cause progressive retinal neovascular defects and retinopathy.** *Scientific reports* 2016, **6**.
 57. Papazachariou L, Papagregoriou G, Hadjipanagi D, Demosthenous P, Voskarides K, Koutsofti C, Stylianou K, Ioannou P, Xydakis D, Tzanakis I: **Frequent COL4 mutations in familial microhematuria accompanied by later-onset Alport nephropathy due to focal segmental glomerulosclerosis.** *Clinical genetics* 2017.
 58. Miner JH, Yurchenco PD: **Laminin functions in tissue morphogenesis.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:255-284.
 59. Durbeej M: **Laminins.** *Cell and tissue research* 2010, **339**(1):259.
 60. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M: **Biological activities of laminin.** *Journal of cellular biochemistry* 1985, **27**(4):317-325.

61. Sztal T, Berger S, Currie PD, Hall TE: **Characterization of the laminin gene family and evolution in zebrafish.** *Developmental Dynamics* 2011, **240**(2):422-431.
62. Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE: **Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation.** *Development* 2004, **131**(10):2247-2256.
63. Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E: **Structure and function of laminin LG modules.** *Matrix biology* 2000, **19**(4):309-317.
64. Yurchenco PD, Cheng Y-S, Colognato H: **Laminin forms an independent network in basement membranes.** *The Journal of Cell Biology* 1992, **117**(5):1119-1133.
65. Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR: **Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen.** *Cell* 1980, **22**(3):719-726.
66. Qin P, Piechocki M, Lu S, Kurpakus MA: **Localization of basement membrane-associated protein isoforms during development of the ocular surface of mouse eye.** *Developmental dynamics* 1997, **209**(4):367-376.
67. Byström B, Virtanen I, Rousselle P, Gullberg D, Pedrosa-Domellöf F: **Distribution of laminins in the developing human eye.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(3):777-785.
68. Roediger M, Miosge N, Gersdorff N: **Tissue distribution of the laminin β 1 and β 2 chain during embryonic and fetal human development.** *Journal of molecular histology* 2010, **41**(2-3):177-184.
69. Parmigiani C, McAvoy J: **Localisation of laminin and fibronectin during rat lens morphogenesis.** *Differentiation* 1984, **28**(1):53-61.
70. Sarthy PV, Fu M: **Localization of laminin B1 mRNA in retinal ganglion cells by in situ hybridization.** *The Journal of cell biology* 1990, **110**(6):2099-2108.
71. Aisenbrey S, Zhang M, Bacher D, Yee J, Brunken WJ, Hunter DD: **Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through α 3- and α 6-containing integrins.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(12):5537-5544.
72. Hassell JR, Schrecengost P, Rada JA, SundarRaj N, Sossi G, Thoft R: **Biosynthesis of stromal matrix proteoglycans and basement membrane components by human corneal fibroblasts.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1992, **33**(3):547-557.
73. Lucock M: **Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes.** *Molecular genetics and metabolism* 2000, **71**(1):121-138.
74. Teply L, Krehl W, Elvehjem C: **The intestinal synthesis of niacin and folic acid in the rat.** *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1947, **148**(1):91-97.
75. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu Y-h: **Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention.** *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 2011, **4**(2):52.
76. Joint F, Organization WH: **Vitamin and mineral requirements in human nutrition.** 2005.
77. Schweigert B, Pollard A, Elvehjem C: **The folic acid content of meats and the retention of this vitamin during cooking.** *Arch Biochem* 1946, **10**:107-111.
78. Talaulikar V, Arulkumaran S: **Folic acid in pregnancy.** *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 2013, **23**(9):286-288.
79. Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ, Jonas PA, Burgess T, Binks K, Tawn EJ, Burn J: **Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy.** *Molecular genetics and metabolism* 2004, **81**(4):273-281.
80. Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS: **Spina bifida.** *The Lancet* 2004, **364**(9448):1885-1895.
81. Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, Van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RG, Finnell RH: **Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are**

- defective in early embryonic development.** *Nature genetics* 1999, **23**(2):228-232.
82. Maldonado E, Murillo J, Barrio C, del Rio A, Perez-Miguelsanz J, Lopez-Gordillo Y, Partearroyo T, Paradas I, Maestro C, Martinez-Sanz E *et al*: **Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of Tgf-beta(3) Expression and the Mechanisms Leading to Palatal Fusion in Mice following Dietary Folic-Acid Deficiency.** *Cells Tissues Organs* 2011, **194**(5):406-420.
 83. Czeizel AE: **Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation.** *Bmj* 1993, **306**(6893):1645-1648.
 84. Tang LS, Finnell RH: **Neural and orofacial defects in Folbp1 knockout mice.** *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2003, **67**(4):209-218.
 85. Reynolds E: **Vitamin B12, folic acid, and the nervous system.** *The lancet neurology* 2006, **5**(11):949-960.
 86. Tang LS, Santillano DR, Wlodarczyk BJ, Miranda RC, Finnell RH: **Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies.** In: *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics: 2005*: Wiley Online Library; 2005: 48-58.
 87. Hwang SY, Kang YJ, Sung B, Kim M, Kim DH, Lee Y, Yoo M, Kim CM, Chung HY, Kim ND: **Folic acid promotes the myogenic differentiation of C2C12 murine myoblasts through the Akt signaling pathway.** *International journal of molecular medicine* 2015, **36**(4):1073-1080.
 88. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: **Biochemistry New York. NY: WH Freeman** 2002.
 89. Fox JT, Stover PJ: **Folate-mediated one-carbon metabolism.** *Vitamins & hormones* 2008, **79**:1-44.
 90. Antony AC: **Folate receptors.** *Annual review of nutrition* 1996, **16**(1):501-521.
 91. Antony AC: **The biological chemistry of folate receptors.** *Blood* 1992, **79**(11):2807-2820.
 92. Sirotinak F, Tolner B: **Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells.** *Annual review of nutrition* 1999, **19**(1):91-122.
 93. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID: **Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia.** *Annual review of nutrition* 2011, **31**:177-201.
 94. Vergote IB, Marth C, Coleman RL: **Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications.** *Cancer and Metastasis Reviews* 2015, **34**(1):41-52.
 95. Elnakat H, Ratnam M: **Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy.** *Advanced drug delivery reviews* 2004, **56**(8):1067-1084.
 96. Spiegelstein O, Mitchell LE, Merriweather MY, Wicker NJ, Zhang Q, Lammer EJ, Finnell RH: **Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation.** *Developmental dynamics* 2004, **231**(1):221-231.
 97. Spiegelstein O, Eudy JD, Finnell RH: **Identification of two putative novel folate receptor genes in humans and mouse.** *Gene* 2000, **258**(1):117-125.
 98. Gates SB, Mendelsohn LG, Shackelford KA, Habeck LL, Kursar JD, Gossett LS, Worzalla JF, Shih C, Grindey GB: **Characterization of folate receptor from normal and neoplastic murine tissue: influence of dietary folate on folate receptor expression.** *Clinical cancer research* 1996, **2**(7):1135-1141.
 99. Barber RC, Bennett GD, Greer KA, Finnell RH: **Expression patterns of folate binding proteins one and two in the developing mouse embryo.** *Molecular genetics and metabolism* 1999, **66**(1):31-39.
 100. [<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/mab5319.pdf>]

101. Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA: **Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis.** *Cancer research* 1992, **52**(23):6708-6711.
102. Spreadbury J: **Folic Acid and Its Receptors.** 2013.
103. Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M: **Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications.** *Cancer* 1994, **73**(9):2432-2443.
104. Xia W, Hilgenbrink AR, Matteson EL, Lockwood MB, Cheng J-X, Low PS: **A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages.** *Blood* 2009, **113**(2):438-446.
105. Chinnery HR, McMenamin PG, Dando SJ: **Macrophage physiology in the eye.** *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2017, **469**(3-4):501-515.
106. O'Byrne MR, Au KS, Morrison AC, Lin JI, Fletcher JM, Ostermaier KK, Tyerman GH, Doebel S, Northrup H: **Association of folate receptor (FOLR1, FOLR2, FOLR3) and reduced folate carrier (SLC19A1) genes with meningocele.** *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2010, **88**(8):689-694.
107. Wang H, Ross JF, Ratnam M: **Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type γ/γ' .** *Nucleic acids research* 1998, **26**(9):2132-2142.
108. Tian Y, Wu G, Xing J-C, Tang J, Zhang Y, Huang Z-M, Jia Z-C, Zhao R, Tian Z-Q, Wang S-F: **A novel splice variant of folate receptor 4 predominantly expressed in regulatory T cells.** *BMC immunology* 2012, **13**(1):30.
109. Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K: **Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon.** *The Journal of Immunology* 2012, **189**(6):2869-2878.
110. Mochizuki M: **Regional immunity of the eye.** *Acta ophthalmologica* 2010, **88**(3):292-299.
111. Huang W, Prasad PD, Kekuda R, Leibach FH, Ganapathy V: **Characterization of N5-methyltetrahydrofolate uptake in cultured human retinal pigment epithelial cells.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1997, **38**(8):1578-1587.
112. Smith SB, Kekuda R, Gu X, Chancy C, Conway SJ, Ganapathy V: **Expression of folate receptor alpha in the mammalian retinal pigmented epithelium and retina.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1999, **40**(5):840-848.
113. Dun Y, Prasad P, Mysona B, Van Ells T, Ganapathy V, Smith S: **Analysis of folate receptor (FR) alpha in ganglion and Müller cells and FR delta in RPE.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005, **46**(13):2969-2969.
114. Bozard BR, Ganapathy PS, Duplantier J, Mysona B, Ha Y, Roon P, Smith R, Goldman ID, Prasad P, Martin PM *et al*: **Molecular and Biochemical Characterization of Folate Transport Proteins in Retinal Muller Cells.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010, **51**(6):3226-3235.
115. Chancy CD, Kekuda R, Huang W, Prasad PD, Kuhnel J-M, Sirotnak FM, Roon P, Ganapathy V, Smith SB: **Expression and differential polarization of the reduced-folate transporter-1 and the folate receptor α in mammalian retinal pigment epithelium.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(27):20676-20684.
116. Muccioli M, Plageman TF: **Requirements for cellular folate during lens development.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2016, **57**(12):3062-3062.
117. Saitsu H, Ishibashi M, Nakano H, Shiota K: **Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (Fbp 1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice.** *Developmental Dynamics* 2003, **226**(1):112-117.
118. Jwala J, Boddu S, Paturi D, Shah S, Smith SB, Pal D, Mitra A: **Functional characterization of folate transport proteins in Staten's Seruminstitut rabbit corneal epithelial cell line.** *Current eye research* 2011, **36**(5):404-416.

119. Lu Y, Wollak KN, Cross VA, Westrick E, Wheeler LW, Stinnette TW, Vaughn JF, Hahn SJ, Xu L-C, Vlahov IR: **Folate receptor-targeted aminopterin therapy is highly effective and specific in experimental models of autoimmune uveitis and autoimmune encephalomyelitis.** *Clinical Immunology* 2014, **150**(1):64-77.
120. Hughes B, Gallemore R, Miller S: **Transport mechanisms in the retinal pigment epithelium.** *The retinal pigment epithelium* 1998:103-134.
121. Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID: **The intestinal absorption of folates.** *Annual review of physiology* 2014, **76**:251-274.
122. Umapathy NS, Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Mysona B, Dun Y, Smith SB, Ganapathy V, Prasad PD: **Cloning and functional characterization of the proton-coupled electrogenic folate transporter and analysis of its expression in retinal cell types.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(11):5299-5305.
123. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH: **Neural tube defects and folate: case far from closed.** *Nature Reviews Neuroscience* 2006, **7**(9):724-731.
124. Barishak YR: **Embryology of the eye and its adnexae.** *Developments in ophthalmology* 1992, **24**:1-142.
125. Semba RD: **Nutritional Amblyopia and B Complex Vitamin Deficiencies.** *Handbook of Nutrition and Ophthalmology* 2007:281-354.
126. Knox DL, Chen MF, Guilarte TR, Dang CV, Burnette J: **Nutritional amblyopia: folic acid, vitamin B-12, and other vitamins.** *Retina* 1982, **2**(4):288-293.
127. De Silva P, Jayamanne G, Bolton R: **Folic acid deficiency optic neuropathy: a case report.** *Journal of medical case reports* 2008, **2**(1):299.
128. Armstrong RC, Monie I: **Congenital eye defects in rats following maternal folic acid deficiency during pregnancy.** *Development* 1966, **16**(3):531-542.
129. Maestro-de-las-Casas C, Pérez-Miguelsanz J, López-Gordillo Y, Maldonado E, Partearroyo T, Varela-Moreiras G, Martínez-Álvarez C: **Maternal folic acid-deficient diet causes congenital malformations in the mouse eye.** *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2013, **97**(9):587-596.
130. Hausman RE: **Ocular extracellular matrices in development.** *Progress in retinal and eye research* 2007, **26**(2):162-188.
131. Olivero DK, Furcht LT: **TYPE-IV COLLAGEN, LAMININ, AND FIBRONECTIN PROMOTE THE ADHESION AND MIGRATION OF RABBIT LENS EPITHELIAL-CELLS IN-VITRO.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1993, **34**(10):2825-2834.
132. Semina EV, Bosenko DV, Zinkevich NC, Soules KA, Hyde DR, Vihtelic TS, Willer GB, Gregg RG, Link BA: **Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish.** *Developmental biology* 2006, **299**(1):63-77.
133. Gross J, Dowling J: **Laminin Beta 1 and Laminin Gamma 1 Are Essential for Normal Lens and Retinal Development in Zebrafish.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005, **46**(13):2441-2441.
134. Takei K, Furuya A, Hommura S, Yamaguchi N: **Ultrastructural fragility and type IV collagen abnormality of the anterior lens capsules in a patient with Alport syndrome.** *Japanese journal of ophthalmology* 2001, **45**(1):103-104.
135. Pinzon-Duarte G, Daly G, Li YN, Koch M, Brunken WJ: **Defective Formation of the Inner Limiting Membrane in Laminin beta 2-and gamma 3-Null Mice Produces Retinal Dysplasia.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010, **51**(3):1773-1782.
136. Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, Klempt M, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Schmahl W, Quintanilla-Fend L: **Type IV procollagen missense mutations associated with defects of the eye, vascular stability, the brain, kidney function and embryonic or postnatal viability in the mouse, *Mus musculus*: An extension of the Col4**

- alpha 1 allelic series and the identification of the first two Col4a2 mutant Alleles.** *Genetics* 2007, **175**(2):725-736.
137. Bautista EM: **Papel del ácido fólico dietético en el desarrollo del paladar de ratón.** Universidad Complutense de Madrid; 2012.

RESULTADOS

Capítulo II

I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MALFORMACIONES OCULARES CONGÉNITAS

1. TIPOS DE MALFORMACIONES OCULARES CONGÉNITAS OBSERVADAS

Para la evaluación de las alteraciones oculares congénitas debidas a una dieta materna carente en AF, fueron evaluados 19 embriones de cada grupo (Control, D2 y D8). Lo que constituye un total de 57 individuos de 14,5 días de gestación (E14.5).

El material analizado está formado por cortes coronales de cabezas de los embriones. Mediante los diferentes aumentos del microscopio se procede a identificar las distintas malformaciones congénitas.

1.1 Malformaciones oculares observadas en los embriones del grupo D2

La administración de una dieta carente en AF a las hembras durante las dos primeras semanas de gestación produce varios tipos de alteraciones oculares en los embriones, en su mayoría del segmento anterior del globo ocular, tabla II-1.

A través de estos datos se ha visto que el engrosamiento corneal es la alteración observada con mayor frecuencia afectando al 57.9% de los embriones (Fig. II-1B) comparada con el grupo control (Fig. II-1A). Seguida por la adherencia entre la retina y el cristalino que afecta al 52.6% de los embriones (flecha en la Fig. II-1B y II-1F) comparada con el control (Fig. II-1E). El aumento del tamaño de los vasos sanguíneos coroideos fue observado en el 47.4% de los embriones (flechas en la Fig. II-1J), estos vasos son más grandes que los del control (Fig. II-1I). Por otro lado, las alteraciones morfológicas del cristalino han tenido la misma prevalencia (47.4%), donde los cristalinos de los embriones exhiben defectos en la forma y el tamaño, con la presencia de vacuolas. Además, se han observado microftalmias unilaterales o bilaterales en el 42.1% de los embriones (Fig. II-1H). La prevalencia de las alteraciones oculares restantes era la siguiente: adherencias entre la córnea y el cristalino en el 36.8% de los embriones, la cámara anterior era prácticamente ausente en la mayoría de los casos (Fig. II-1D), adherencia entre el párpado y el ojo en el 31.6% (Fig. II-1L), normalmente en un ojo control existe un espacio entre el párpado y la conjuntiva (Fig. II-1K), cámara anterior reducida en el 26.3% de los casos (Fig. II-1C). Finalmente, se ha observado en el 21.05% de los embriones cámaras vítreas reducidas (Fig. II-1F) y la misma prevalencia con desprendimiento de retina.

TABLA II- 1: Prevalencia de las malformaciones oculares congénitas presentes en el grupo D2 debido al déficit materno de AF. DR: Desprendimiento de Retina. VR: Vítreo Reducido.

Grupo D2	Malformación/Alteración									
	Adherencia córnea- cristalino	Adherencia retina- cristalino	Adherencia párpado-ojo	Córnea gruesa	Alteraciones morfológicas del cristalino	Cámara anterior reducida	VR	Microftalmia	DR	Grandes vasos sanguíneos coroideos
N	7	10	6	11	9	5	4	8	4	9
%	36.8	52.6	31.6	57.9	47.4	26.3	21.05	42.1	21.05	47.4

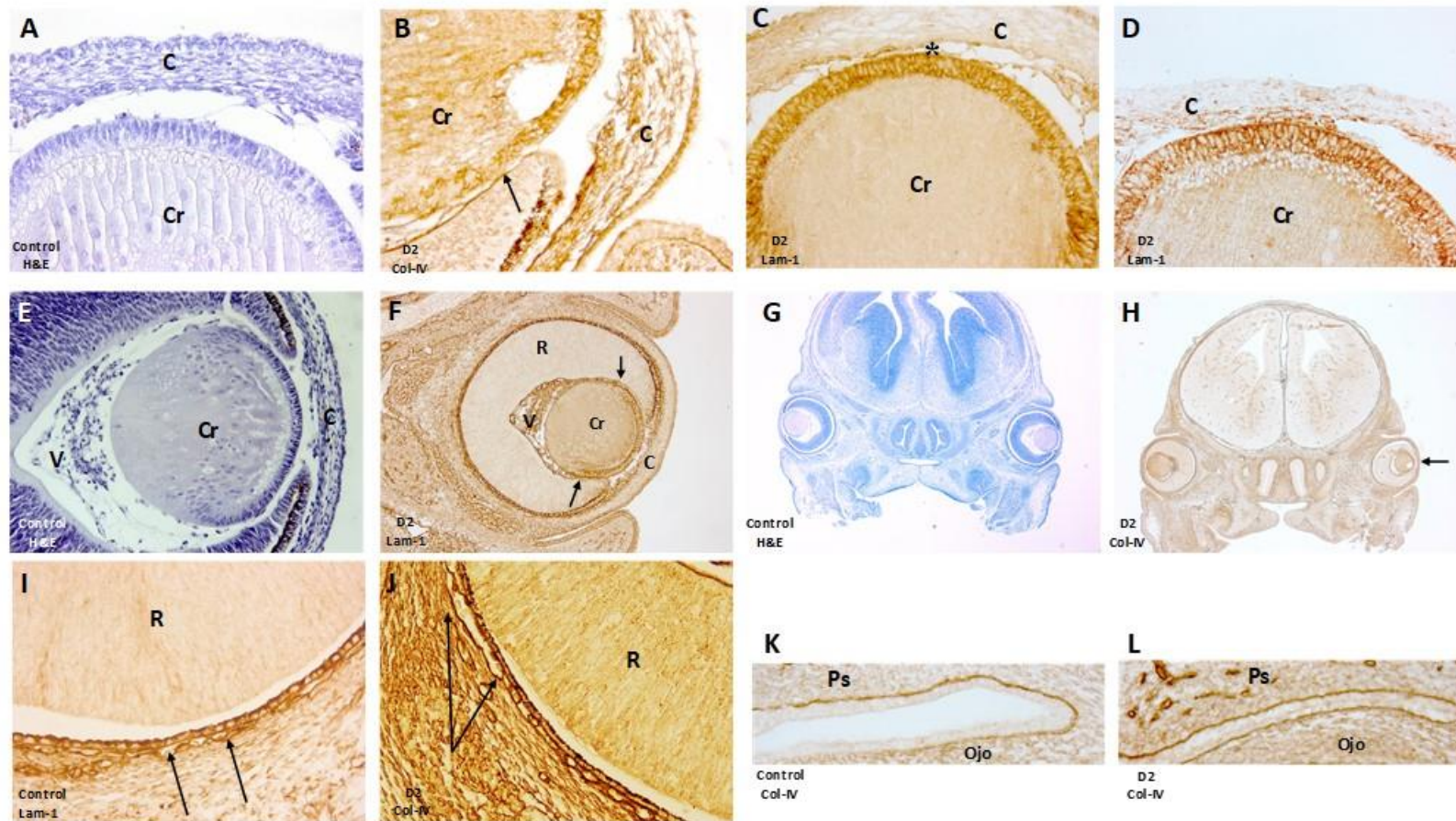


Figura II- 1: A, E, G, I, y K cortes de cabeza de embriones control E14,5. B, C, D, F, H, J, y L cortes de cabeza de embriones del grupo D2. A, control con buen desarrollo corneal y del cristalino. B, la córnea es gruesa, presenta también adherencia entre la retina y el cristalino (flecha). C, cámara anterior reducida (*). D, presenta adherencia entre la córnea y el cristalino con ausencia de la cámara anterior. E, ojo control bien desarrollado. F, presenta cámara vítrea reducida, adherencia entre la retina y el cristalino (flecha) y un ojo rotado. (G-H), visión general de la cabeza mostrando una microftalmia unilateral (flecha). I, vascularización coroidea bien desarrollada. J, se observan grandes vasos sanguíneos coroideos anómalos (flechas). K, distancia normal entre el párpado superior y el ojo. L, adherencia entre el epitelio del párpado y el ojo. G y H ampliación original $\times 5$. F, ampliación original $\times 10$. E, ampliación original $\times 20$. A, B, C, D, I, J, K y L ampliación original $\times 40$. A, E y G, secciones teñidas con H&E. B, H, J, K y L secciones marcadas con anti-colágeno IV. C, D, F y I secciones marcadas con anti-laminina-1. Abreviaciones: córnea (C), cristalino (Cr), párpado superior (Ps), retina (R) y vítreo (V).

1.2 Malformaciones oculares observadas en los embriones del grupo D8

La administración de una dieta severa carente de AF a las hembras durante 8 semanas (seis semanas previas a la preñez, más dos semanas gestacionales) ocasiona en la progenie malformaciones oculares mucho más graves. En este grupo, D8, las alteraciones observadas en los embriones son tanto del segmento anterior como del posterior, tabla II-2.

TABLA II- 2: Prevalencia de las malformaciones oculares congénitas presentes en el grupo D8 debido al déficit materno de AF. CG: Córnea Gruesa. CAR: Cámara Anterior Reducida. DR: Desprendimiento de Retina. VR: Vítreo Reducido.

Grupo D8	Malformación/Alteración										
	Adherencia córnea-cristalino	Adherencia retina-cristalino	Adherencia párpado-ojo	CG	Alteraciones morfológicas del cristalino	CAR	VR	Grandes vasos sanguíneos coroideos	Microftalmia	DR	Ojo girado hacia abajo
N	7	10	10	10	12	7	8	13	13	12	4
%	36.8	52.6	52.6	52.6	63.1	36.8	42.1	68.4	68.4	63.1	21.05

En el grupo D8 se observan una gran variedad de anomalías oculares (tabla II-2). Las más frecuentes son microftalmias (Fig. II-2C) y vasos sanguíneos coroideos de gran calibre (Fig. II-2B) que afectan a un 68,4% de los embriones. Por otra parte, y como se puede observar en la figura II-2C, además de las alteraciones oculares hay diversas alteraciones del sistema nervioso. Por otro lado, se ha observado que el tamaño de los vasos coroideos cambia dependiendo de su localización (Fig. II-2D): cuando se produce un desprendimiento de retina el tamaño de los vasos, en la mayoría de los casos, es similar al del grupo control (Fig. II-2E comparada con II-2A), a veces, incluso pueden estar ausentes, sin embargo, si no hay desprendimiento de retina los vasos coroideos tienen un calibre más grande que el control (Fig. II-2B y II-2F). El desprendimiento de retina (Fig. II-2D y II-2E), por una parte, y las alteraciones morfológicas del cristalino (Fig. II-2G y II-2H), por otra parte, ocurren en 63.1% de los embriones.

En cambio, el engrosamiento corneal (Fig. II-2G y II-3) y las adherencias: entre la retina y el cristalino y entre el párpado y el ojo (Fig. II-2D) se han visto en el 52.6% de los embriones. En cuanto a la reducción del tamaño de la cámara vítrea, ésta se ha observado en el 42.1% de los embriones al compararlos con el control. En algunos casos, como por ejemplo en la figura II-2H, el tamaño del vítreo se redujo drásticamente.

En cuanto a la adherencia entre córnea-cristalino (Fig. II-2D y II-2H), por una parte, y la disminución del espacio anterior que les separa, por otra, se ha visto que afecta al 36.8% de los embriones. Por último, se ha comprobado que 4 de los embriones (21.05%) han tenido al menos uno de los ojos totalmente rotado (Fig. II-2C y II-2G).

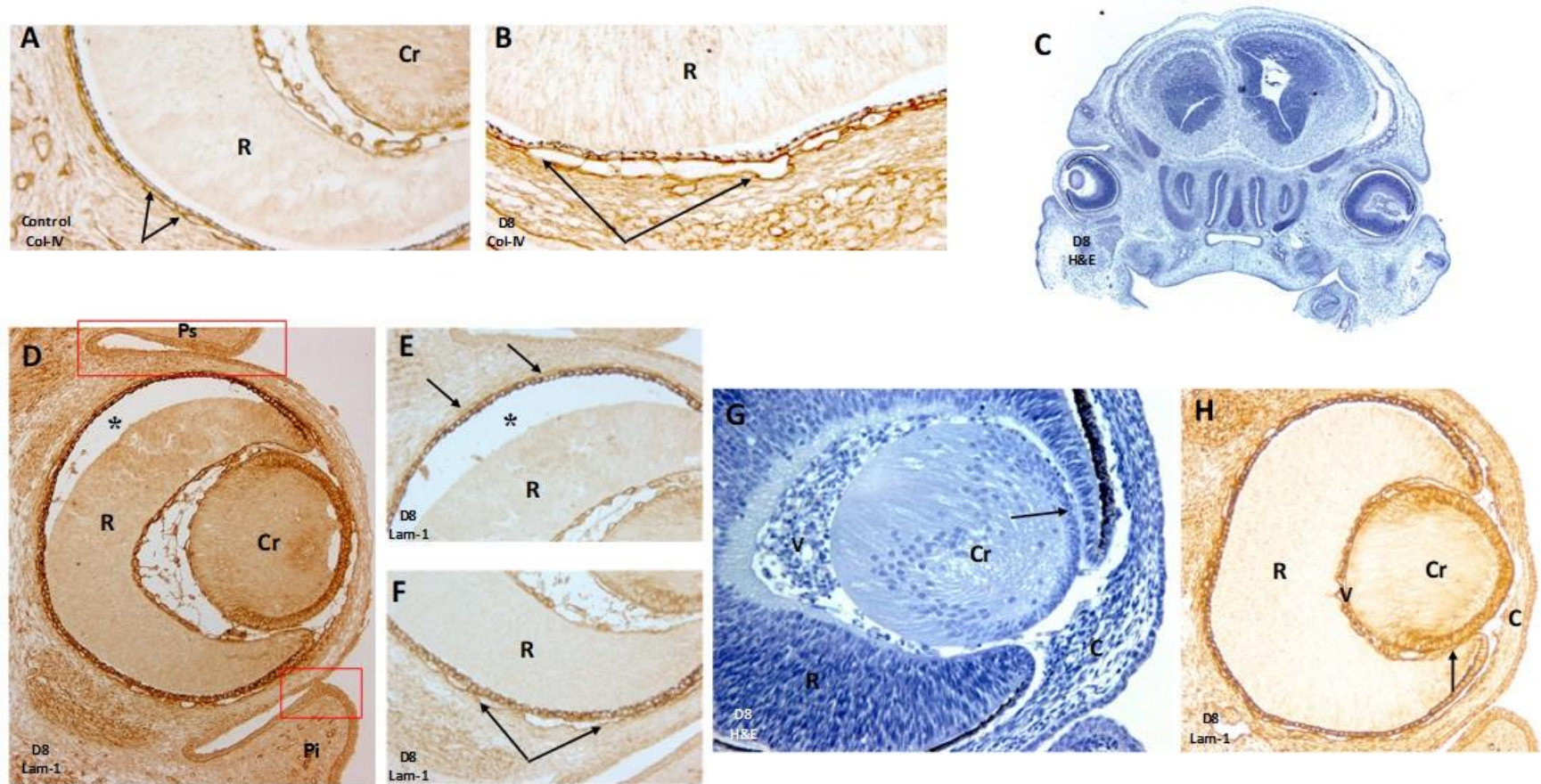


Figura II- 2: A, corte frontal de la cabeza de un embrión control E14,5. B, C, D, E F, G, y H, embriones del grupo D8. A, control con desarrollo normal de la vascularización coroidea. B, vasos coroideos más grandes de lo normal (flecha). C, alteraciones oculares con desarrollo anómalo del sistema nervioso. D, adherencia córnea-cristalino con ausencia de la cámara anterior. Adherencia párpado-ojo (área seleccionada) y desprendimiento de retina (*). E, desprendimiento de retina (*) asociado con pequeños vasos sanguíneos coroideos (flechas). F, vasos sanguíneos coroideos más grandes de lo normal (flechas) donde no hay desprendimiento de retina. G, córnea gruesa, cámara vítrea reducida y ojo rotado. Adherencia retina-cristalino (flecha). H, adherencia córnea-cristalino con ausencia de la cámara anterior y del vítreo. Adherencia retina-cristalino (flecha). C, amplificación original $\times 5$. D y H, amplificación original $\times 10$. E, F y G amplificación original $\times 20$. A y B amplificación original $\times 40$. C y G secciones teñidas con H&E. A y B secciones marcadas con anti-colágeno-IV. D, E, F y H secciones marcadas con anti-lamina-1. Abreviaciones: córnea (C), cristalino (Cr), párpado superior (Ps), párpado inferior (Pi), retina (R), vítreo (V).

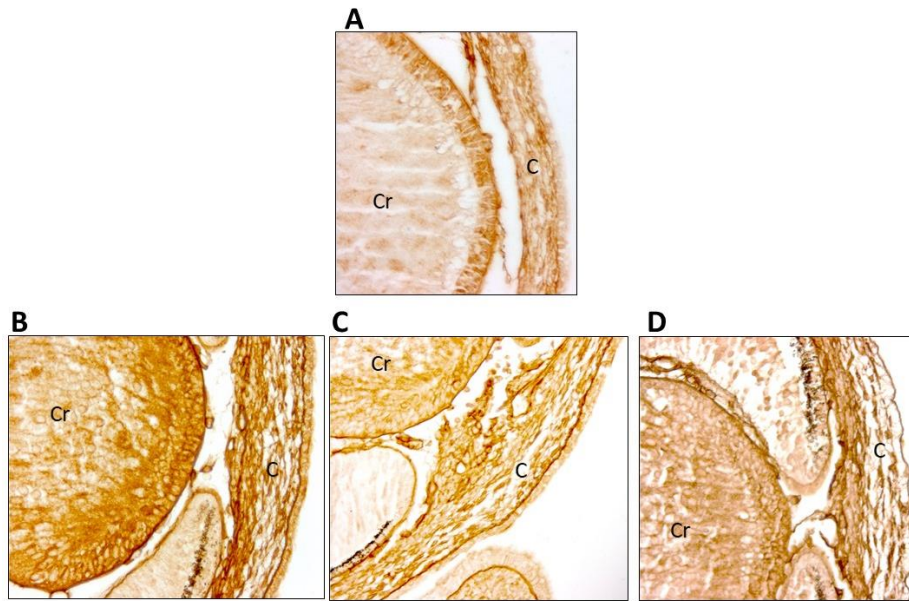


Figura II- 3: Corte frontal de la cabeza de un embrión control de E14.5 (A) y grupo deficitario D8 (B, C, y D), marcado con anti-colágeno IV. Figuras A, B, C y D con aumento de $\times 40$. Figura A, la córnea del control es más fina y sus células son más organizadas. Figuras B, C, y D representan córneas más gruesas y desorganizadas.

1.3 Alteración en la expresión de colágeno IV y laminina-1 en algunas MBs oculares

La inmunohistoquímica para el colágeno IV revela que una corta duración de déficit materno de AF (grupo D2) altera la expresión de colágeno IV en todas las MBs del ojo. La intensidad de marcaje se ha visto aumentada en los embriones de este grupo (Fig. II-4B, 4C, 4E y 4G) respecto al control (Fig. II-4A, 4D, 4F). Asimismo, se ha observado que el patrón de distribución de colágeno IV en varias MBs tiene un aspecto corrugado y rizado, apreciable especialmente en la cápsula del cristalino (Fig. II-4C y 4E), en la MLI (Fig. II-4E), MB del epitelio palpebral (Fig. II-4G) y en la MB del epitelio corneal (Fig. II-4B) respecto al control (Fig. II-4A, 4D y 4F). Otro hallazgo entorno a la córnea es la fragmentación o pérdida de continuidad de colágeno IV en la MB (Fig. II-4B). Curiosamente en las zonas de adherencia entre las conjuntivas palpebral y bulbar, el patrón de distribución espacial del colágeno IV es claramente distinto del control (Fig. II-4G comparada con II-4F).

Respecto a la distribución de la laminina-1, se ha observado en su caso también cambios en el patrón de marcaje. En epitelios oculares normales, se observa una línea delgada y continua que representa el marcaje de la laminina-1. Generalmente, es apreciable en la MB epitelial de la córnea, donde aparece extremadamente delgada (Fig. II-4H). También se

observa en la MLI de la retina (Fig. II-4J) así como en la cápsula del cristalino y epitelio conjuntival.

No obstante, con el déficit de AF, la laminina-1 exhibe un marcaje muy intenso en las MBs del ojo. Se aprecia sobre todo en la MB del epitelio corneal (Fig. II-4I, flecha) y en MLI (Fig. II-4K, flecha). El incremento en la intensidad del marcaje también se observa entre las células del epitelio del cristalino.

Por último, la lámina basal del endotelio que rodea los vasos hialoideos de los embriones con déficit materno de AF muestra más positividad para colágeno IV y laminina-1 (Fig. II-4E y 4K) que el control (Fig. II-4D y 4J). Se ha detectado el mismo incremento en la expresión de ambas moléculas en la MB de los vasos coroideos (Fig. II-1J) comparado con el control II-1I). Estos vasos fueron más abundantes y con gran calibre en los embriones de los grupos D2 y D8.

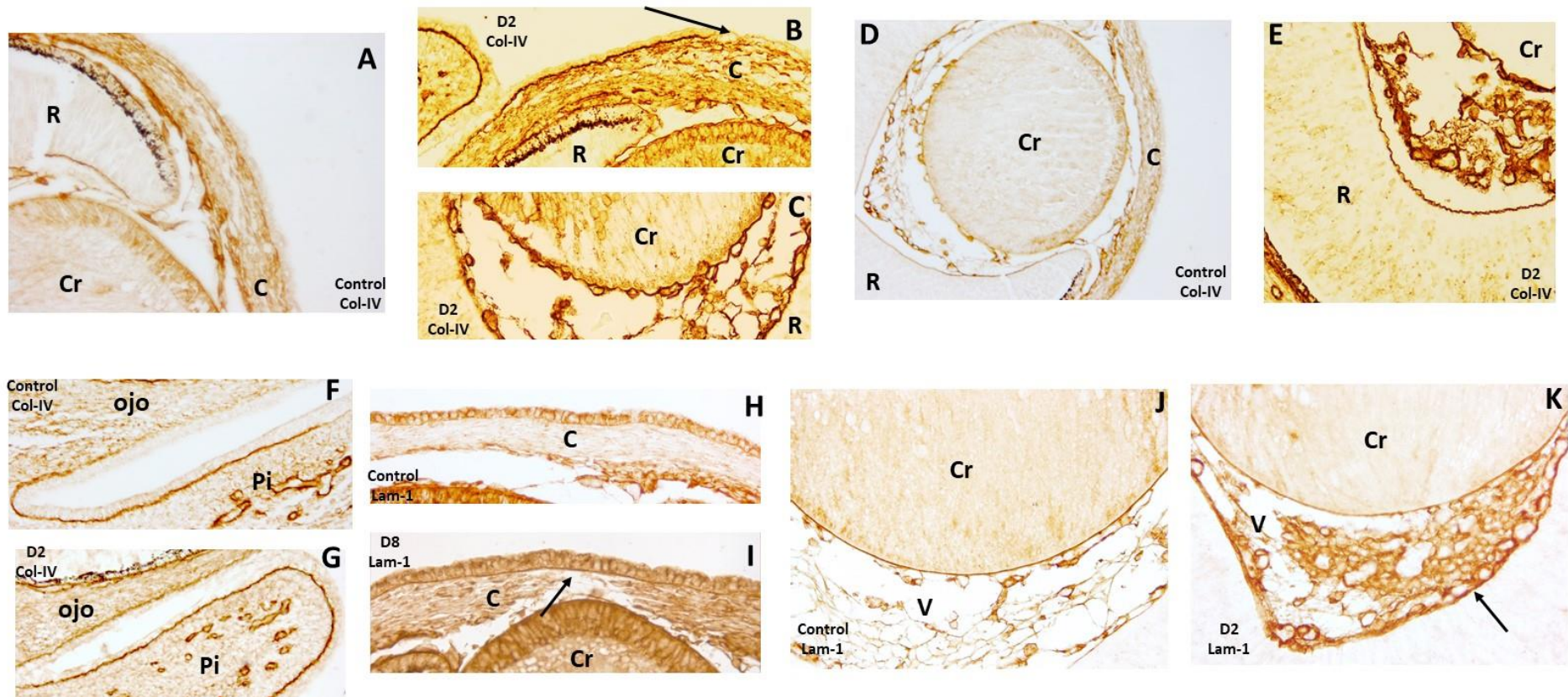


Figura II- 4: Análisis de la expresión de colágeno IV y laminina-1 en las MBs oculares. A, D, F, H y J, embriones control E14,5. B, C, E, G, y K embriones del grupo D2. I, embrión del grupo D8. A y D muestran distribución normal de colágeno IV en la MB del epitelio corneal, cápsula del cristalino y MLI. B, mayor intensidad en el marcaje de colágeno IV en epitelio corneal, con aspecto corrugado y rizado, la flecha muestra discontinuidad de la MB. C y E, muestran mayor intensidad en el marcaje de colágeno IV en la cápsula del cristalino y la MLI de la retina con aspecto rizado, comparados con el control (D). F, distribución normal del colágeno en la MB palpebral y bulbar. G, el patrón del marcaje de colágeno IV es corrugado y rizado. La distribución espacial también es distinta del control. H y J, muestran una línea fina y continua que representa el marcaje de laminina-1 en la MB del epitelio corneal y en la MLI de la retina. I y K, marcaje muy intenso de la laminina-1 en la MB del epitelio corneal (I, flecha) de D8 y MLI (K, flecha) de D2. D, ampliificación original $\times 20$. A, B, C, E, F, G, H, I, J, y K ampliificación original $\times 40$. Abreviaciones: córnea (C), cristalino (Cr), retina (R), vítreo (V), Párpado inferior (Pi).

2. TÉCNICA DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

2.1 Tabla de contingencia

La técnica empleada para este tipo de datos es el análisis de *tablas de contingencia*. Es un método destinado a estudiar la intensidad de asociación entre dos o más variables cualitativas categóricas. Mediante este método se puede identificar y confirmar estadísticamente la conexión entre las malformaciones oculares congénitas y el déficit materno de AF.

Por definición, una *tabla de contingencia* también denominada *tabla de clasificación cruzada* está definida por el número de variables categóricas analizadas y el número de categorías o modalidades de estas.

Sean X e Y dos variables categóricas donde X tiene I categorías e Y tiene J categorías. La tabla de contingencia es entonces una distribución de frecuencias colocadas en I filas para las categorías de X y J columnas para las categorías de Y. Una tabla de contingencia con I filas y J columnas se denomina una tabla *I x J* [1].

De este modo, el resultado total observado en la fila I, columna J sería $n_{i,j}$ que refleja la distribución conjunta de X e Y, con $i = 0,1,2...I$ y $j = 0,1,2...J$ (tabla II-3).

TABLA II- 3: Tabla de contingencia. El subíndice '+' denota la suma sobre ese índice.

		Y						MARGINAL
		y_1	y_2	...	y_j	...	y_J	
X	x_1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1j}	...	n_{1J}	n_{1+}
	x_2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2j}	...	n_{2J}	n_{2+}

	x_i	n_{i1}	n_{i2}	...	n_{ij}	...	n_{iJ}	n_{i+}

	x_I	n_{I1}	n_{I2}	...	n_{Ij}	...	n_{IJ}	n_{I+}
MARGINAL		n_{+1}	n_{+2}	...	n_{+j}	...	n_{+J}	n

Teniendo en cuenta que las distribuciones marginales son los valores totales de filas o columnas que resultan al sumar las probabilidades conjuntas [1]. De este modo, los márgenes totales se podrían calcular mediante las siguientes formulas:

$$n_{i+} = \sum_{j=1}^J n_{ij} , \quad (2.1)$$

Es la frecuencia marginal de $X = x_i$ que representa el número de casos con $X = x_i$.

$$n_{j+} = \sum_{i=1}^I n_{ij} , \quad (2.2)$$

Es la frecuencia marginal de $Y = y_j$ que representa el número de casos con $Y = y_j$.

$$n = \sum_{i=1}^I n_{i+} = \sum_{j=1}^J n_{j+} , \quad n \text{ es la suma total,} \quad (2.3)$$

Las variables cualitativas que se utilizarán en nuestro caso son:

- » X= tipo de malformación congénita.
- » Y= grupo: Control, D2 y D8.

Analizaremos la relación entre cada una de las malformaciones, por separado, con los tres grupos en varias tablas de contingencia, véase ejemplo en tabla II-4. Se han utilizado tablas tipo 2x3 para reducir el número de tablas representadas. Sin embargo, a la hora de realizar el estudio mediante el programa estadístico SPSS se utilizarán tablas de contingencia 2x2 para comparar el control con D2 y otras tablas de contingencia 2x2 para comparar el control con D8.

TABLA II- 4: Un ejemplo de tabla de contingencia 2x3, adherencia entre el cristalino y la córnea

		Grupo			Marginal
		C (n=19)	D2 (n=19)	D8 (n=19)	
Adherencia entre cristalino y córnea	SI	0	7	7	14
	NO	19	12	12	43
Marginal		19	19	19	57

Para constatar si existe una relación de asociación entre el déficit de AF y las malformaciones oculares congénitas, formularemos las siguientes hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_a):

- » H_0 : las malformaciones oculares congénitas son independientes del déficit de AF.
- » H_a : existe una asociación entre las malformaciones oculares congénitas y el déficit de AF, es decir ambas variables no son independientes.

Para analizar si existe una relación de dependencia o independencia entre ambas variables de nuestro estudio, hay que contrastar la hipótesis. Para ello, realizaremos la prueba de independencia de chi-cuadrado de Pearson χ^2 . Mediante este estadístico podríamos conocer el grado de asociación entre las dos variables X e Y . Previamente, seleccionamos un nivel de significancia de 0.05, es decir la probabilidad de que se rechace la hipótesis nula es del 5%.

2.2 Prueba de chi-cuadrado de Pearson

Este estadístico fue introducido por Karl Pearson en 1900, compara entre las frecuencias observadas en el experimento (n_{ij}) con las frecuencias esperadas teóricamente (m_{ij}) bajo la hipótesis nula de independencia [2].

Matemáticamente, los valores esperados se pueden calcular mediante la fórmula:

$$m_{ij} = \frac{n_{i+} \times n_{+j}}{n}, \quad (2.4)$$

Donde n es el número total de casos analizados.

Por lo tanto, el valor del estadístico chi-cuadrado de Pearson se puede obtener mediante la fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{(n_{ij} - m_{ij})^2}{m_{ij}}, \quad (2.5)$$

Con $(I - 1) \times (J - 1)$ grados de libertad y para una significación de 0.05.

Para el caso de la tabla II-4, la representación gráfica de la distribución chi-cuadrado se observa en la figura II-5A y II-5B:

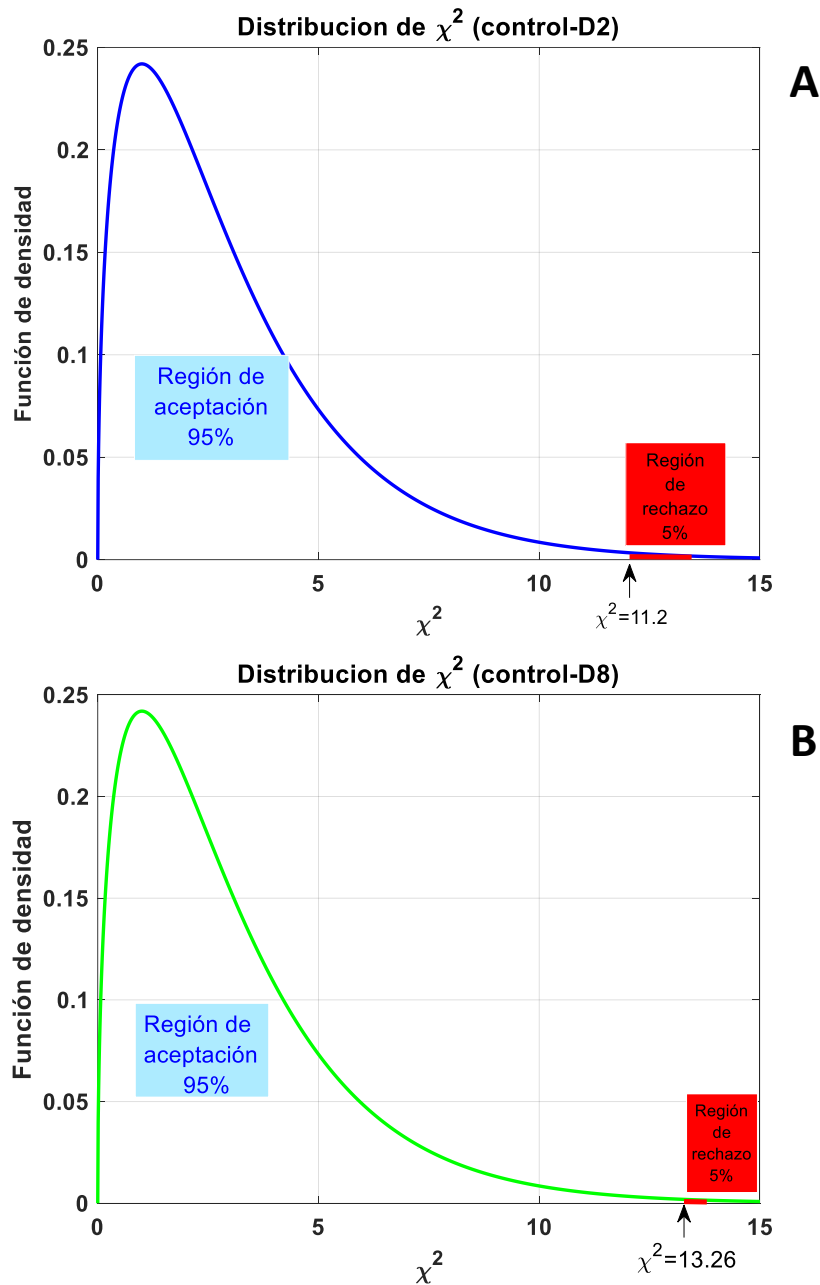


Figura II- 5: Representación gráfica de la distribución chi-cuadrado para el ejemplo de la tabla II-4.

Estas gráficas se obtienen calculando el valor de χ^2 y su *p-valor* mediante la función “*chisquarecont.m*” que proporciona Matlab® [3]. El *p-valor* obtenido al comparar esta malformación entre Control-D2 y Control-D8 es, $(8,2 \cdot 10^{-4} \approx 0)$ y $(2,7 \cdot 10^{-4} \approx 0)$ respectivamente. Un *p-valor* < 0.05 afirma que la asociación entre las adherencias cristalino-córnea y el déficit materno de AF es significativa.

De ahora en adelante, analizaremos la distribución estadística de chi-cuadrado para todas las malformaciones mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19 [4].

2.3 Análisis e interpretación de los resultados

2.3.1 Comparación entre el grupo control y D2

La tabla II-5 muestra los resultados del análisis estadístico realizado. La aceptación o rechazo de la hipótesis nula que hemos establecido va a depender en todo caso del valor de la significación estadística fijado (5%). Ésta, comúnmente conocida por *p-valor* (p), indica la probabilidad a partir de la cual se acepta la hipótesis nula. Si este valor es pequeño, es decir $p \leq 0.05$, se rechaza la hipótesis nula de independencia; y si es mayor, $p > 0.05$, se acepta H_0 [5].

En los resultados mostrados en la tabla, la prueba de chi-cuadrado nos indica que el *p-valor* es extremadamente pequeño, $p \leq 0.05$ lo que indica que todas las anomalías oculares congénitas detectadas en este grupo son estadísticamente significativas.

TABLA II- 5: Malformaciones oculares congénitas presentes en el grupo D2 debido al déficit materno de AF y su grado de significación estadística (p-valor).

Grupo D2	Malformación/Alteración									
	Adhesión Córnea- cristalino	Adhesión Retina- cristalino	Adhesión Párpado- Ojo	Córnea gruesa	Alteraciones morfológicas del cristalino	Reducción cámara anterior	Vítreo reducido	Microftalmia	Desprendimiento de retina	Grandes vasos sanguíneos coroideos
N	7	10	6	11	9	5	4	8	4	9
χ²	8.581	13.571	7.125	15.481	11.793	5.758	4.471	10.133	4.471	11.793
p- valor	0.003	0.000	0.008	0.000	0.001	0.016	0.034	0.001	0.034	0.001

2.3.2 Comparación entre el grupo control y D8

Los resultados de la prueba chi-cuadrado para los grupos control y D8 se observan en la tabla II-6. La prueba de significación estadística determina que todas las malformaciones oculares observadas en el grupo D8 son estadísticamente significativas ya que todos los *p-valores* son muy pequeños (inferiores a 0.05). Estos resultados significan que la hipótesis nula es totalmente increíble.

Para este grupo, concluimos que se rechaza totalmente la hipótesis nula de independencia y aceptamos la hipótesis alternativa de asociación entre el déficit materno severo de AF y la ocurrencia de las malformaciones oculares citadas anteriormente.

En resumen, podemos condensar lo dicho hasta aquí en lo siguiente: el déficit de AF en periodos cortos o largos tiene una consecuencia en los embriones de ratón que se traduce en varios tipos de malformaciones oculares congénitas. Todas las alteraciones son estadísticamente significativas y con una importante trascendencia a nivel clínico.

TABLA II- 6: Malformaciones oculares congénitas presentes en el grupo D8 debido al déficit materno de AF y su grado de significación estadística (p-valor).

Grupo D8	Malformación/Alteración										
	Adherencia córnea- cristalino	Adherencia retina- cristalino	Adherencia párpado-ojo	Córnea gruesa	Alteraciones morfológicas del cristalino	Cámara anterior reducida	Vítreo reducido	Grandes vasos sanguíneos coroideos	Microftalmia	Desprendimiento de retina	Ojo girado hacia abajo
N	7	10	10	10	12	7	8	13	13	12	4
χ²	8.581	13.571	13.751	13.571	17.538	8.581	10.133	19.760	19.760	17.538	4.471
p- valor	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.034

II. ESTUDIO DE LA BIOMETRÍA OCULAR USANDO LA TÉCNICA ESTADÍSTICA DE REMUESTREO: BOOTSTRAP

En esta sección se va a cuantificar si se producen cambios en la biometría de algunas estructuras oculares como consecuencia del déficit materno de AF. Con este propósito, estudiamos dos parámetros de tres estructuras concretas: área y circularidad del cristalino, área y circularidad del ojo y para finalizar medimos el área de la retina.

Para llevar a cabo estas medidas, utilizamos el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ® [6, 7]. Este programa es una herramienta versátil que facilita la selección de la región de interés (ROI-de sus siglas en inglés Region Of Interest) en la imagen y cuantificarla.

1. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO

Mediante el programa ImageJ® procedemos a realizar las medidas indicadas. Nuestra muestra (n) está compuesta por ojos pertenecientes a los tres grupos mencionados en la sección anterior: control (n=19), D2 (n=19) y D8 (n=19). Todas las imágenes analizadas tienen un aumento de X10 y un tamaño de 2088x1550 píxeles.

La selección de las regiones que nos interesan se realiza manualmente usando los comandos del ImageJ®. De modo que, marcamos las ROI en cada uno de los ojos (Fig. II-6), seleccionando para cada globo ocular: el ojo entero, el cristalino y la retina neural.



Figura II- 6: Corte frontal de la cabeza de un embrión control de E14.5 marcado con anti-colágeno IV. Medidas de los parámetros área y circularidad del ojo (A) y del cristalino (B) y el área de la retina (C) usando el programa ImageJ®.

La realización de este tipo de experimentos manuales requiere mucha concentración para no cometer errores en la medida. Con miras a minimizar el margen de error que pueda afectar a los resultados, todas las medidas se realizan por la misma persona. Por otro lado,

con el fin de obtener una validez estadística en los resultados de las medidas, se realiza una prueba con los cristalinos control, eso quiere decir, repetir la medición del área y la circularidad en el cristalino de cada individuo control 4 veces y calcular su media aritmética y su desviación estándar. De esta manera, comprobamos si el error cometido por el observador es muy pequeño. Si es así, entonces consideramos que las medidas se realizan con precisión y para ello sólo hay que realizar una única medida para cada ROI.

Las siguientes tablas (tablas II-7 y II-8) muestran los resultados. Tras realizar las cuatro medidas es el propio programa que nos calcula el valor medio (del área o circularidad) y la desviación estándar (el error cometido por la persona al realizar las 4 medidas).

TABLA II- 7: Representación de los valores obtenidos de las cuatro medidas del área del cristalino y su desviación estándar.

Individuo	Valor medio de las 4 medidas realizadas (área del cristalino en pixeles)	Error cometido por el observador al realizar las cuatro medidas (área del cristalino en pixeles)
1	315200	546.7
2	299500	848.4
3	297800	989.3
4	319600	1383
5	301300	1807
6	307200	661.5
7	352900	1285
8	169400	1195
9	285000	1498
10	274000	1449
11	215800	1177
12	210700	933.3
13	287800	1417
14	307900	1360
15	294600	1217
16	337100	1862
17	235600	3317
18	286000	1234
19	330000	1275
Valor medio	285653 ± 45562	1340 ± 569

TABLA II- 8: Representación de los valores obtenidos de las cuatro medidas de la circularidad del cristalino y su desviación estándar.

Individuo	Valor medio de las 4 medidas realizadas (circularidad del cristalino en pixeles)	Error cometido por el observador al realizar las cuatro medidas (circularidad del cristalino en pixeles)
1	0.9646	0.003803
2	0.9542	0.03432
3	0.9564	0.002182
4	0.9563	0.05256
5	0.9737	0.00295
6	0.9659	0.00845
7	0.9758	0.00377
8	0.9728	0.00437
9	0.9684	0.0151
10	0.9574	0.0355
11	0.9749	0.00448
12	0.9719	0.00523
13	0.9746	0.0053
14	0.9725	0.00433
15	0.9802	0.00134
16	0.9738	0.00773
17	0.9714	0.0047
18	0.9799	0.0021
19	0.9675	0.0034
Valor medio	0.970 ± 0.008	0.01 ± 0.01

Según estos resultados, la desviación estándar de la media del área del cristalino es mucho mayor que el error medio cometido por la persona que realiza las medidas $45562 > 1340$ (pixeles). Lo que significa que las mediciones son precisas, por ello hay que descartar el error cometido por el observador. De ahora en adelante, se realizará una única medida del área para cada ROI.

En el caso de la circularidad, el error cometido por el observador es ligeramente mayor que la desviación estándar entre individuos. Por ende, se tomará en cuenta también este error. La incertidumbre total sería:

$$\delta_T = \sqrt{(0.008)^2 + (0.01)^2 + (0.01)^2} = 0.02, \quad (2.6)$$

Por consiguiente, después de comprobar que la incertidumbre se mantiene evitaremos la repetición de las mediciones. Solo se realizará una medida de circularidad a cada individuo

y se tomará el error cometido por el observador como el mismo para todos los individuos ($\sqrt{2 * (0.01)^2}$).

Hecha esta comprobación, proseguimos nuestro trabajo seleccionando las estructuras oculares antes mencionadas guardando los valores de sus áreas y circularidades. Una vez terminadas todas las medidas se tratarán estos datos mediante un análisis estadístico utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19. Para tener un análisis más preciso de los resultados, se van a estudiar 4 parámetros estadísticos: por una parte, la media y desviación estándar, y por otra parte los estadísticos de orden superior: skewness y curtosis. Un segundo análisis usando Matlab se efectúa para estimar los parámetros anteriores (media, desviación estándar, skewness y curtosis) utilizando un método de remuestreo denominado *Bootstrap*. A continuación, se describe brevemente este método.

2. PROCEDIMIENTO BOOTSTRAP

La técnica estadística de remuestreo de datos denominada *Bootstrap* se basa en la estimación de probabilidades empíricas a partir de datos experimentales originales. Es un método estadístico computacional no paramétrico que fue propuesto por Efron en 1979 [8] a fin de realizar ciertos tipos de inferencias estadísticas. Este método se utiliza como alternativa cuando el tamaño de la muestra original es muy pequeño, como en nuestro caso. Es una nueva forma para estimar la variabilidad del parámetro que se desea evaluar.

Básicamente el procedimiento consiste en realizar un remuestreo sobre los datos originales (n), aplicando el método de Monte Carlo, y sobre los nuevos datos se realiza la inferencia [9], véase figura II-7.

El procedimiento del método es el siguiente [10]:

- a) Dada una muestra n que toma los x valores posibles (n_1, \dots, n_x), el remuestreo se realiza al extraer una muestra aleatoria de tamaño x de la original mediante el método de Monte Carlo. La muestra extraída no coincidirá con la original y se llamaría *muestra Bootstrap* (y_1, \dots, y_x). La *muestra Bootstrap* está definida como una muestra aleatoria de tamaño x .
- b) Se calcula en la *muestra Bootstrap* el parámetro o estimador que se desea estimar $\hat{\vartheta}_1 = \hat{\vartheta}(y_1, \dots, y_x)$. De los parámetros que se pueden estimar mediante este método podríamos mencionar: los intervalos de confianza, la distribución muestral de la media y del error estándar... etc.

- c) Se repiten los pasos a) y b) sucesivas veces (en nuestro caso 100 veces), el número de repeticiones S debe ser muy grande. Al final, se obtiene una secuencia de S valores del estimador, $\hat{\vartheta}_1, \dots, \hat{\vartheta}_S$ lo cual se considerará como la distribución de valores de $\hat{\vartheta}$. El cálculo de su media se obtiene mediante la fórmula:

$$\hat{\vartheta}_\mu = \frac{1}{S} \sum \hat{\vartheta}_i, \quad (2.7)$$

Donde $i = 1, \dots, S$.

Por otra parte, se estima la desviación estándar como el error estándar de las S réplicas, su fórmula será:

$$\hat{\sigma}_{\hat{\vartheta}} = \sqrt{\frac{1}{S-1} \sum_{i=1}^S (\hat{\vartheta}_i - \hat{\vartheta}_\mu)^2}, \quad (2.8)$$

El número de réplicas necesarias para estimar la desviación estándar no es tan grande como lo propuesto en el punto c), según Efron y Tibshirani, con $S=50$ se obtendría una buena estimación [9]. Aunque a mayor S , más se aproxima el estimador de la desviación estándar a su valor real.

Finalmente, la estimación de los intervalos de confianza se obtiene de la siguiente forma:

$$P(\hat{\vartheta}_{inf} \leq \hat{\vartheta}_i \leq \hat{\vartheta}_{sup}) = 1 - \alpha, \quad (2.9)$$

$(\hat{\mathcal{G}}_{inf})$ y $(\hat{\mathcal{G}}_{sup})$ son límites de confianza inferior y superior, respectivamente. Entonces el intervalo de confianza viene dado por $[\hat{\mathcal{G}}_{inf}, \hat{\mathcal{G}}_{sup}]$ con nivel $1 - \alpha$.

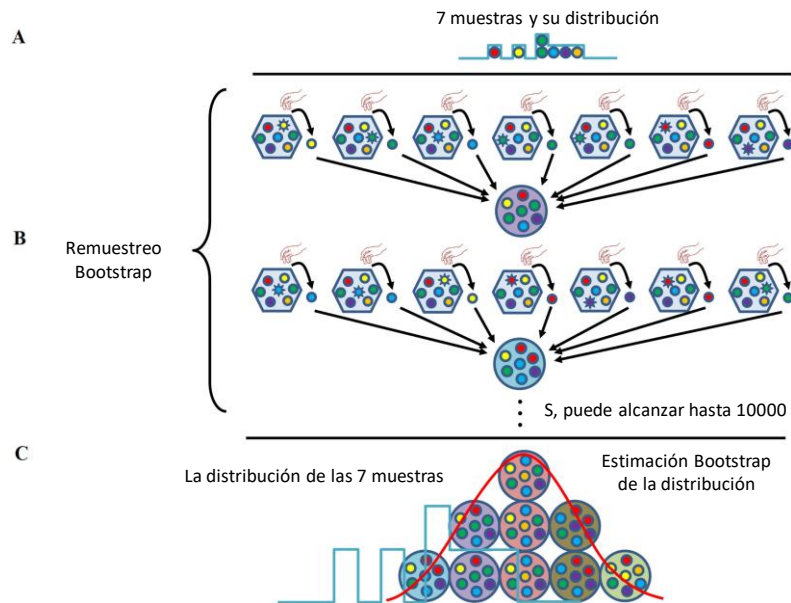


Figura II- 7: Ilustración esquemática del método Bootstrap [11]. (A) Los datos originales (para este ejemplo, $n=7$) y su distribución. (B) Para mantener la probabilidad de muestreo, las siete bolas muestreadas que se muestran en la caja hexagonal gris se pueden dibujar repetidamente con reemplazo. Para cada bucle, el número de repeticiones de bootstrap fue 7, igual al número de muestras originales. El número de réplicas de bootstrap podría llegar a 10.000. (C) Las nuevas muestras se produjeron utilizando el proceso de remuestreo antes mencionado y una estimación para la distribución de dicha cantidad se indica por la curva roja en la Fig. C. (Adaptada y modificada a partir de [12] con permiso de Elsevier)

En esta tesis, se emplea la técnica de Bootstrap en el análisis de nuestros datos obtenidos al medir la biometría del ojo entero, cristalino y retina. Para ello, el remuestreo bootstrap se realiza mediante la función de Matlab "*bootstrp.m*", con 100 réplicas. Normalmente este número de réplicas es suficiente para obtener intervalos de confianza adecuados [13]. Una vez realizado el remuestreo de nuestros datos originales, se representa la estimación de la distribución de la media, desviación estándar, skewness y curtosis. Posteriormente, se va a utilizar la prueba estadística *Kruskal-Wallis* para probar la hipótesis de que las distribuciones de probabilidad de la media, desviación estándar, skewness y curtosis son diferentes entre el grupo control y los grupos D2 y D8. El nivel de significación estadística elegido es $p < 0.05$.

Acto seguido para explorar más a fondo los cambios en estos parámetros (solo en el caso de la circularidad), se va a utilizar la distribución de los Valores Extremos Generalizada (GEV de sus siglas en inglés Generalized Extreme Value) a fin de ajustar los datos de cada grupo a una distribución de probabilidad. La distribución GEV es una familia de distribuciones de probabilidad continuas establecidas dentro de la teoría del Valor Extremo, que es una rama de la estadística que estudia las desviaciones de la media de las distribuciones de probabilidad. La distribución GEV combina tres familias de distribuciones: Gumbel, Fréchet

y Weibull en una única familia con función de distribución Eq.(2.10) para permitir un rango continuo de formas posibles. Estas tres familias de distribuciones se pueden establecer en una sola representación paramétrica. A menudo se usa como una aproximación para modelar el máximo de una larga secuencia de variables aleatorias [14-16]. En esta tesis, se recurre a esta distribución porque es aplicable a datos “anormales”, en nuestro caso alteraciones en la biometría ocular.

$$G(z) = \exp \left\{ - \left[1 + \xi \left(\frac{z - \mu}{\sigma} \right) \right]^{\frac{-1}{\xi}} \right\}, \quad (2.10)$$

donde μ es el parámetro de localización, σ de escala y ξ de forma. Este último determina el comportamiento de la cola de la distribución. Estos parámetros satisfacen, $-\infty < \mu < +\infty$, $\sigma > 0$ y $-\infty < \xi < +\infty$.

Se modelan los datos de la circularidad con la distribución GEV usando Matlab®. Este programa tiene funciones de biblioteca para ajustar los datos a una función de distribución de probabilidad GEV (*pdf GEV*) utilizando un proceso de estimación de máxima verosimilitud (mle). El resultado del ajuste es un vector de parámetros estimados $\hat{\theta} = (\xi, \sigma, \mu)^T$ y una matriz de covarianza $S_{\hat{\theta}}$ para estos parámetros.

Para probar el significado de la diferencia entre las *pdf*, se realizó el siguiente análisis (el proceso se explica en dos pasos para describirlo con claridad):

- i. La estimación por máxima verosimilitud es un método de optimización asintóticamente insesgado que sigue una distribución normal multivariante dada por la Eq.(2.11) definida como [10, 17]:

$$f(\theta) = \frac{1}{[(2\pi)^3 |S_{\hat{\theta}}|]^{1/2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\theta - \hat{\theta})^T S_{\hat{\theta}}^{-1} (\theta - \hat{\theta}) \right\}, \quad (2.11)$$

Esta ecuación describe una distribución de probabilidad de tres variables ya que el vector de los parámetros estimados $\hat{\theta} = (\xi, \sigma, \mu)^T$ tiene tres componentes. Es posible calcular el término dentro del exponencial, $(\theta - \hat{\theta})^T S_{\hat{\theta}}^{-1} (\theta - \hat{\theta}) = D^2$ en el caso en el que la matriz de covarianza $S_{\hat{\theta}}$ sea diagonal. Dada la normalidad de los datos, el resultado es la suma de tres variables normales independientes con varianza unidad. Por lo tanto, D^2 sigue un χ^2 *pdf* con N=3 grados de libertad [18]. Esta distancia, D , se puede considerar como una desviación

de los valores de θ desde $\hat{\theta}$, medida en unidades de la desviación estándar en la dirección de $(\theta - \hat{\theta})$.

- ii. El procedimiento de ajuste anterior se aplicó al grupo control. El resultado fue un vector de distribución de parámetros ajustados y una matriz de covarianza para esos parámetros: $\hat{\theta}_C = (\xi_C, \sigma_C, \mu_C)^T$, $S_{\hat{\theta}_C}$.

A continuación, se calculó el valor de la distancia para los grupos deficitarios D2 y D8 de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} D_{C,D2}^2 &= (\hat{\theta}_{D2} - \hat{\theta}_C)^T S_{\hat{\theta}_C}^{-1} (\hat{\theta}_{D2} - \hat{\theta}_C) \\ D_{C,D8}^2 &= (\hat{\theta}_{D8} - \hat{\theta}_C)^T S_{\hat{\theta}_C}^{-1} (\hat{\theta}_{D8} - \hat{\theta}_C)' \end{aligned} \quad (2.12)$$

y, al mismo tiempo, la probabilidad acumulada del valor D^2 , en ambas expresiones de la Eq.(2.12) sabiendo que sigue una distribución de $\chi^2 pdf$ con 3 grados de libertad. Esta probabilidad se puede interpretar como el grado de diferencia entre la *pdf GEV* de los grupos deficitarios con la *pdf GEV* del grupo control, en otras palabras, indica a qué distancia está la distribución de probabilidad de los grupos deficitarios con respecto al grupo control.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS BOOTSTRAP

3.1 Resultados del cálculo del área

Una vez seleccionadas las zonas, se realizaron los cálculos y el análisis estadístico de los resultados. Respecto al cálculo del área, los resultados están recogidos en las tablas II-9 y II-10; sus *pdfs* y la prueba estadística Kruskal-Wallis para la media se muestran en las figuras II-8, II-9 y II-10 para el cristalino, ojo y retina, respectivamente.

TABLA II- 9: Valores medios del área y circularidad (Circ.) para estimadores bootstrap de la media y desviación estándar del cristalino, ojo y retina de los tres grupos: C: grupo control, D2 y D8: grupos con déficit materno de AF. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control ($p < 0.05$).

Parámetros		Media y desviación estándar (píxeles)		
		C	D2	D8
Cristalino	Área	285653 ± 46811	271500 ± 52489	237862 ± 97979
	Circ.	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.02
Ojo	Área	1175368 ± 159071	1072368 ± 201419	1010537 ± 200348
	Circ.	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.02
Retina	Área	548126 ± 72675	512521 ± 115492	520332 ± 66423

TABLA II- 10: Valores medios del área y circularidad (Circ.) para estimadores bootstrap de la skewness y curtosis del cristalino, ojo y retina de los tres grupos: C: grupo control, D2 y D8: grupos con déficit materno de AF. El símbolo (*) marca las diferencias no significativas.

Parámetros		Skewness			Curtosis		
		C	D2	D8	C	D2	D8
Cristalino	Área	-1.11	0.64	1.03	0.92	-0.77	1.38*
	Circ.	-0.66	-2.23	-1.75	-0.62	4.31	3.06
Ojo	Área	-0.02	0.13	0.73	-1.11	-1.42	1.37
	Circ.	-0.59	-1.60	-0.98	-0.37	3.50	2.23
Retina	Área	1.45	-0.17	-0.13	3.50	-1.26	-0.68

Las tablas muestran los datos estadísticos correspondientes a los parámetros estudiados en el cristalino (área y circularidad), el ojo (área y circularidad) y la retina (área). La tabla II-9 muestra que el promedio del área estimado de estas estructuras, excepto la retina, se hace más pequeño a medida que aumenta el déficit de AF. Esto, incrementó la dispersión (desviación estándar) entre los individuos estando de acuerdo con las malformaciones observadas en los grupos D2 y D8, con mayor severidad en D8. Lo cierto es que incluso con dos semanas de déficit materno de AF la variabilidad entre los individuos aumentó para los parámetros del cristalino y ojo. No obstante, en el caso de la retina, el área no sufrió grandes cambios.

En cuanto a la circularidad, las diferencias en los valores medios entre los grupos no fueron muy altas, especialmente en el caso de la circularidad del cristalino, tabla II-9. Esta fue la razón por la cual se han calculado los estadísticos de orden superior, tabla II-10. El resultado del contraste de la prueba *Kruskal-Wallis* para los estimadores bootstrap de los parámetros aparece en las dos tablas. El asterisco indica los estimadores cuya distribución no es significativamente diferente del grupo control. Como se ha indicado anteriormente en el apartado de métodos, estos casos son aquellos en los que el p-valor es mayor que 0.05.

Para conocer la distribución de la muestra, el papel de la skewness (3º momento estadístico central) es describir la simetría alrededor de la media. Si es igual a cero, la *pdf* es simétrica, si es mayor que cero se dice que es asimétrica positiva o sesgada a la derecha, por el contrario, si es menor que cero se dice que es asimétrica negativa o sesgada a la izquierda. En lo que concierne a la curtosis (4º momento estadístico central), mide el grado de agudeza o achatamiento de la *pdf* con relación a una distribución gaussiana; en otras palabras mide cuán puntiaguda es una distribución [19]. Si existe una mayor concentración de datos en la zona central de la *pdf* (curtosis mayor que cero) la distribución se llama leptocúrtica (más puntiaguda). Si la curtosis es nula, la distribución es gaussiana y recibe el nombre de mesocúrtica. Por último, si la curtosis es negativa los datos están muy dispersos, la distribución se llama en este caso platicúrtica.

Dicho lo anterior, los datos del área del cristalino muestran que el valor de la skewness obtenido en el grupo control es negativo lo que indica que hay cierta asimetría negativa entre los individuos control. Por lo cual, la mayoría de los datos del grupo control están por debajo de la media aritmética. Sin embargo, los grupos D2 y D8 tienen un comportamiento diferente. El valor positivo de la skewness indica que los datos están sesgados a la derecha. La mayoría de estos datos se encuentran por encima del valor de la media. Por otra parte, el coeficiente de la curtosis indica que los grupos control y D8 tienen una distribución leptocúrtica. Sin embargo, D2 tiene una distribución platicúrtica (Fig. II-8).

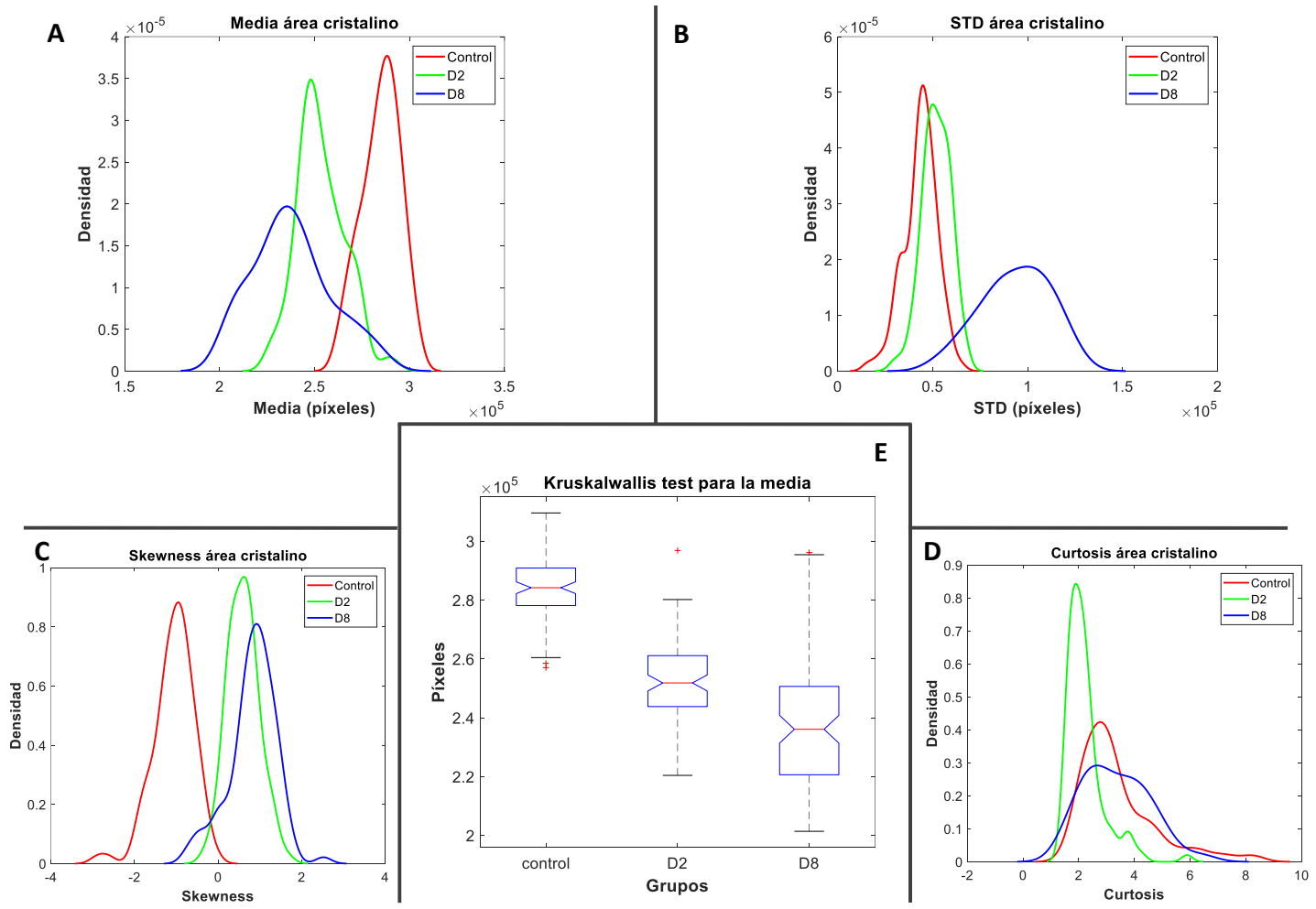


Figura II- 8: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo del área del cristalino para los distintos grupos: control, D2 y D8.

Respecto al área del ojo, como muestra la figura II-9 y a partir de los resultados de la tabla II-10, para el grupo control y D2 la pdf es simétrica; no obstante, la distribución para D8 presenta asimetría positiva.

El coeficiente de la curtosis es negativo en el control y D2 lo que indica una distribución platicúrtica. Por otra parte, D8 tiene una distribución leptocúrtica.

Finalmente, con respecto a la retina, a partir de los datos de la tabla II-10 y de la figura II-10 se observa que la distribución del control adopta distinta forma con respecto a los grupos D2 y D8. En el control presenta asimetría a la derecha, sin embargo, en D2 y D8 la presentan a la izquierda. Luego, la distribución del control presenta un coeficiente de curtosis positivo superior a la distribución gaussiana. En cambio, D2 y D8 presentan un coeficiente inferior al de la distribución normal.

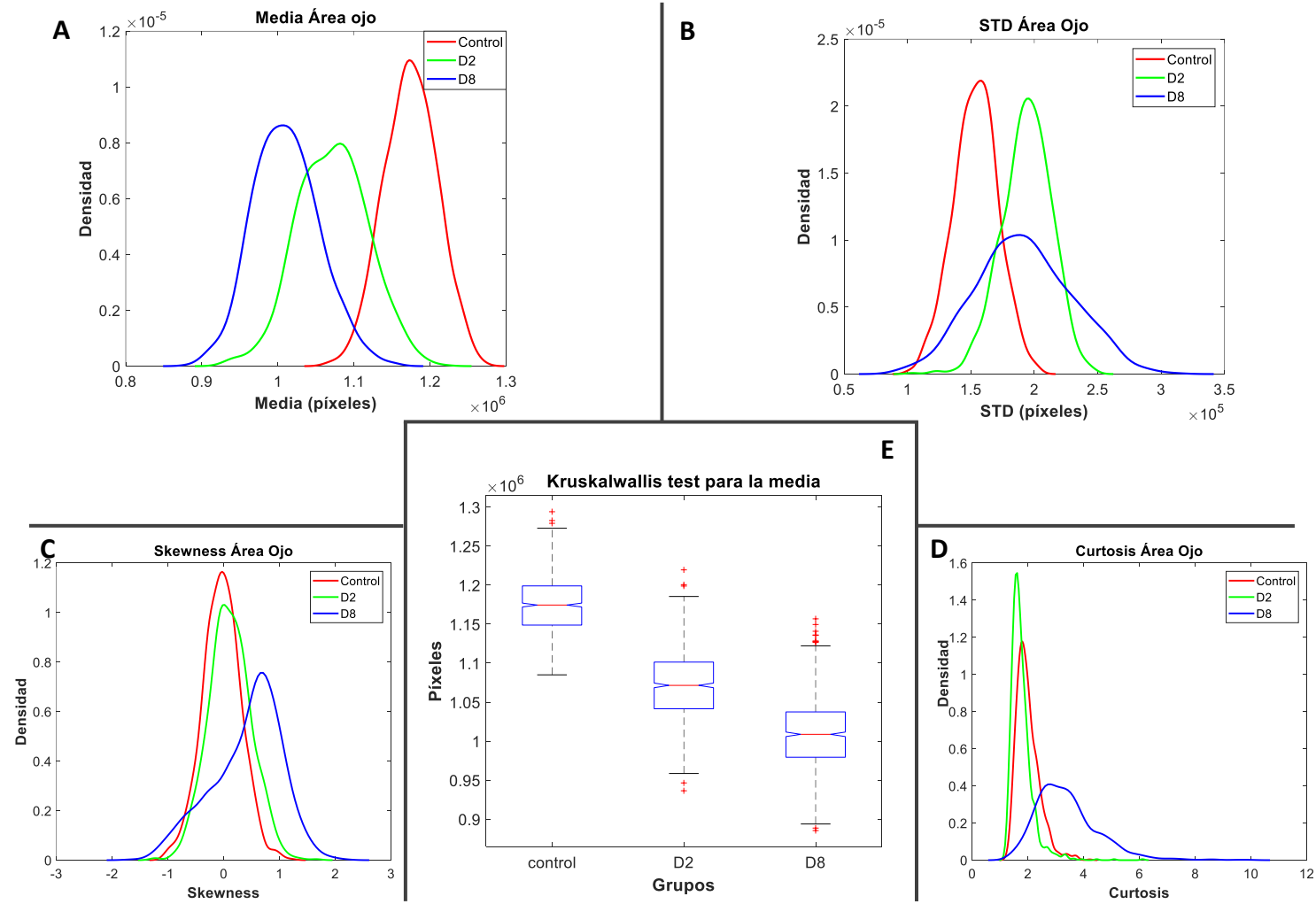


Figura II- 9: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo del área del ojo para los distintos grupos: control, D2 y D8.

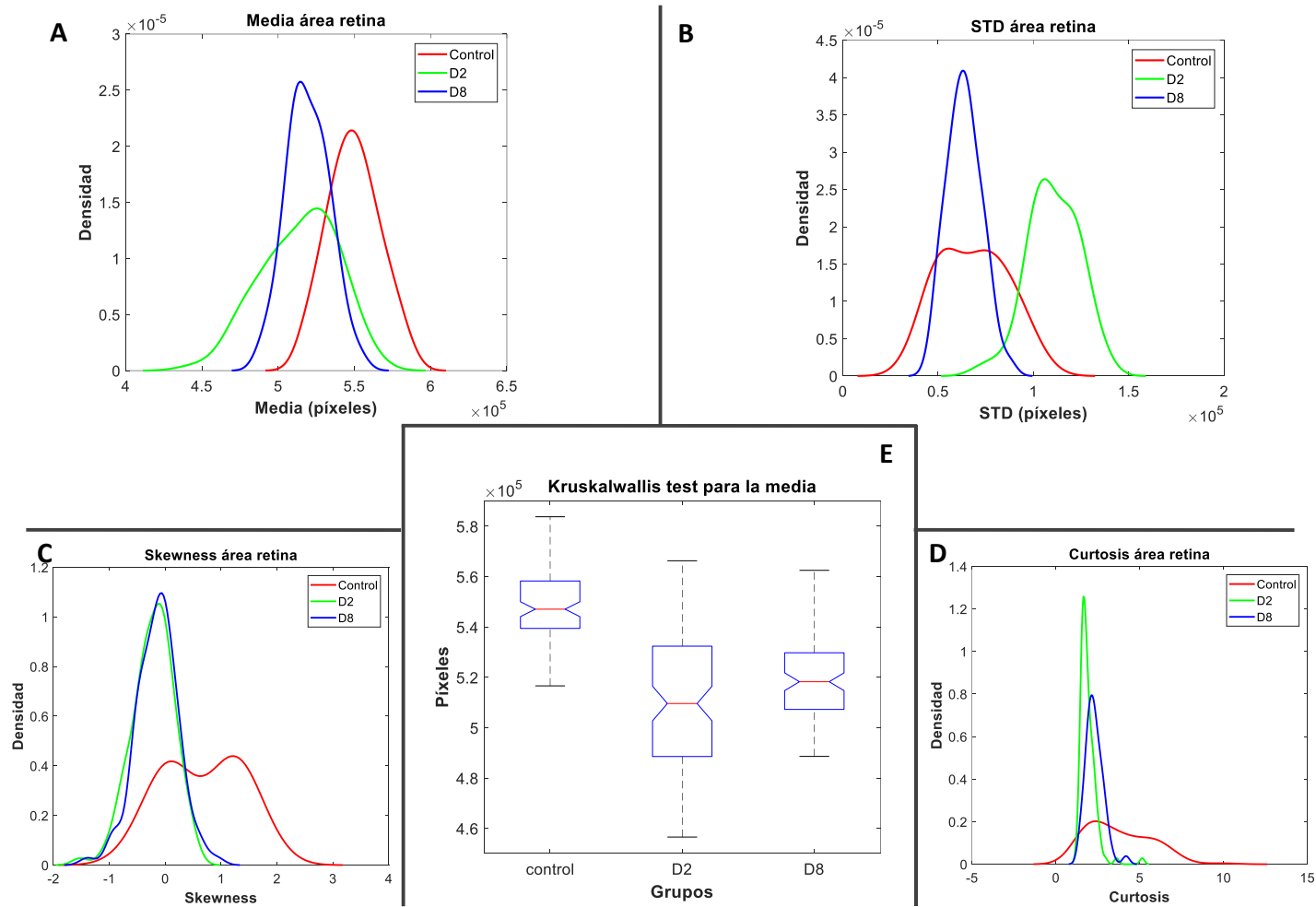


Figura II- 10: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo del área de la retina para los distintos grupos: control, D2 y D8.

Los resultados detallados anteriormente sugieren que los ojos desarrollados en condiciones de deficiencia de AF son más pequeños que los controles. Calculamos la disminución relativa (Δ) en comparación con el control con la siguiente formula (Eq. 2.13):

$$\Delta = \frac{(\text{ÁreaMedia}_{\text{GrupoControl}}) - (\text{ÁreaMedia}_{\text{GrupoDeficitario}})}{\left(\frac{(\text{ÁreaMedia}_{\text{GrupoControl}}) + (\text{ÁreaMedia}_{\text{GrupoDeficitario}})}{2} \right)} * 100, \quad (2.13)$$

El resultado se observa en la tabla II-11:

TABLA II- 11: Disminución del valor relativo en las estructuras con déficit de AF comparado con el control.

Estructura	D2 (%)	D8 (%)
Cristalino	5.08	18.26
Ojo	9.16	15.08
Retina	6.71	5.20

La tabla muestra que el déficit materno de AF provoca en los embriones una disminución en el tamaño del ojo, el cual se reduce un 9.16% en D2 y un 15.08% en D8. Esta reducción fue acompañada con bajada en el tamaño del cristalino, 5.08% en el caso de D2 y 18.26% en D8. No obstante, la retina no sufre una disminución acusada a medida que aumenta el déficit como las otras dos estructuras: D2 disminuye un 6.71% y D8 un 5.20%, ambos valores son comparables y dentro del margen de error del control.

Analizando la tabla II-11, se observa que con el aumento del déficit de AF tanto el ojo como el cristalino se vuelven más pequeños, sin embargo, no hay cambios relevantes en el área de la retina. Con el fin de encontrar respuesta se plantea la siguiente hipótesis: “la retina cambia de forma para adaptarse en un ojo pequeño”. Para comprobar esta hipótesis, se analiza estadísticamente la altura y anchura de la retina (véase Fig. II-11) de los tres grupos estudiados. Los resultados se muestran en la tabla II-12.

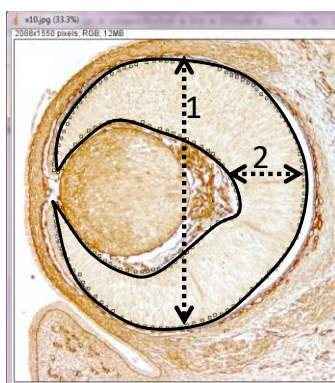


Figura II- 11: Sección frontal de la cabeza de un embrión de ratón E14.5 donde se muestra uno de los ojos, con aumento X10 marcado con anti-colágeno IV. Medición de la altura (flecha 1) y anchura (flecha 2) de la retina.

TABLA II- 12: Valores medios de la altura y anchura de la retina para estimadores bootstrap de la media, desviación estándar, skewness y curtosis de los tres grupos: Control, D2 y D8. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control ($p < 0.05$).

Parámetro	Altura de la retina (píxeles)			Anchura de la retina (píxeles)		
	Control	D2	D8	Control	D2	D8
Media	1150.6	1097.1	1041.5	321.3	301.6	337.0
Desviación estándar	98.3	139.6	136.7	20.5	35.4	36.0
Skewness	0.208	0.093	-0.053	0.775	-0.481	-0.107
Curtosis	-0.720	-1.213	0.082	0.403	-0.257	-0.436

De la tabla II-12 se deduce que a medida que aumenta el déficit materno de AF la altura de la retina decrece, sin embargo, la anchura aumenta en el grupo D8 en comparación con el control. Así mismo, se observa que la desviación estándar de ambas medidas es mayor en D2 y D8 que el control. Por otra parte, el grado de asimetría tiende a disminuir con respecto al grupo control. Por último, la anchura de la retina control tiene una curtosis positiva lo que indica mayor concentración de datos en la zona central de la *pdf* (distribución leptocúrtica). En cambio, D2 y D8 tienen curtosis platicúrtica (los datos están dispersos). Otra forma de evaluar los parámetros de la tabla II-12 es a partir de la distribución de la estimación bootstrap representada en las figuras II-12 y II-13, en ellas se representa también la prueba Kruskal-Wallis. En suma, la altura de la retina se hace más pequeña con el aumento del déficit materno de AF. Esto coincide con la disminución en el tamaño del ojo. Sin embargo, los resultados muestran un aumento significativo de la anchura de la retina invadiendo así el espacio vítreo. Con este análisis se confirma la veracidad de la hipótesis planteada anteriormente “la retina cambia de forma para adaptarse en un ojo pequeño”.

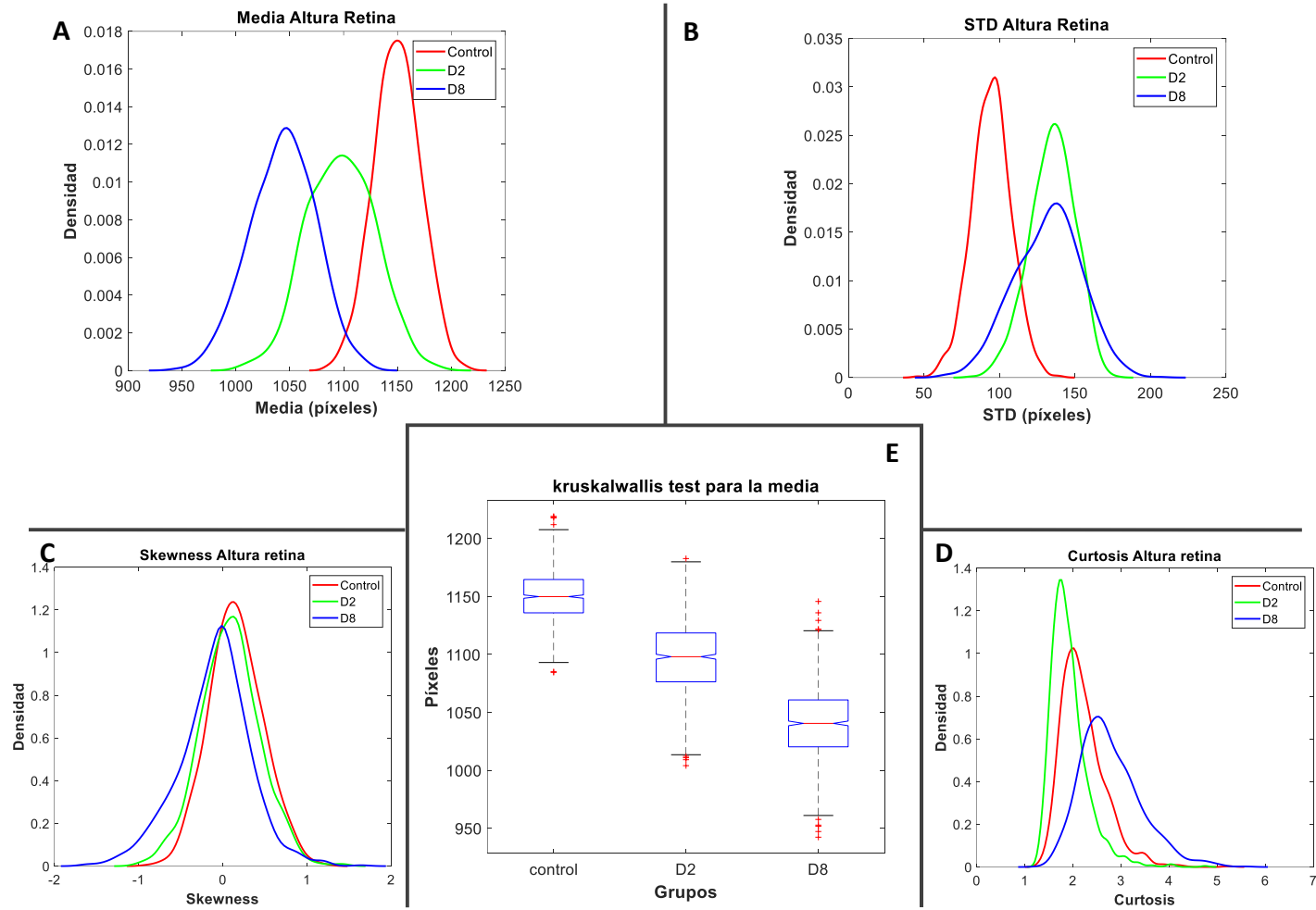


Figura II- 12: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo de la altura de la retina para los distintos grupos: control, D2 y D8.

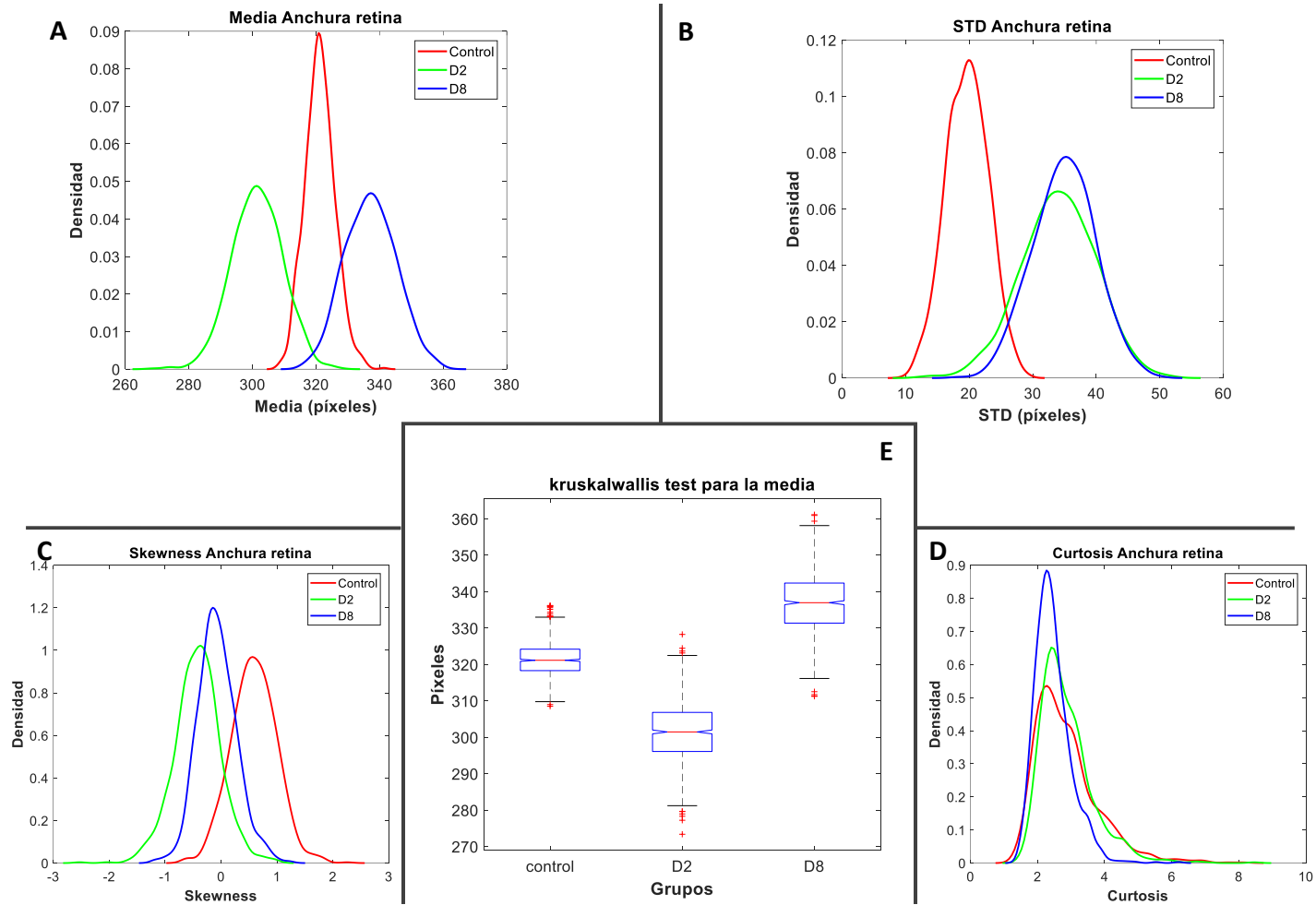


Figura II- 13: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo de la anchura de la retina para los distintos grupos: control, D2 y D8.

3.2 Resultados del cálculo de la circularidad

A. Circularidad del cristalino:

Respecto a la circularidad del cristalino, tal como muestran la tabla II-10 y la figura II-14, los tres grupos tienen una asimetría negativa, más acusada en los grupos D2 y D8. La curtosis, sin embargo, cambia de negativa (control) a positiva (D2 y D8). Esto indica colas extendidas de la distribución, en caso de D2 y D8 revelan la presencia de valores atípicos (aumento de la probabilidad de una gran desviación con respecto a la media y mediana de la distribución en comparación con el control, probablemente debido a las malformaciones).

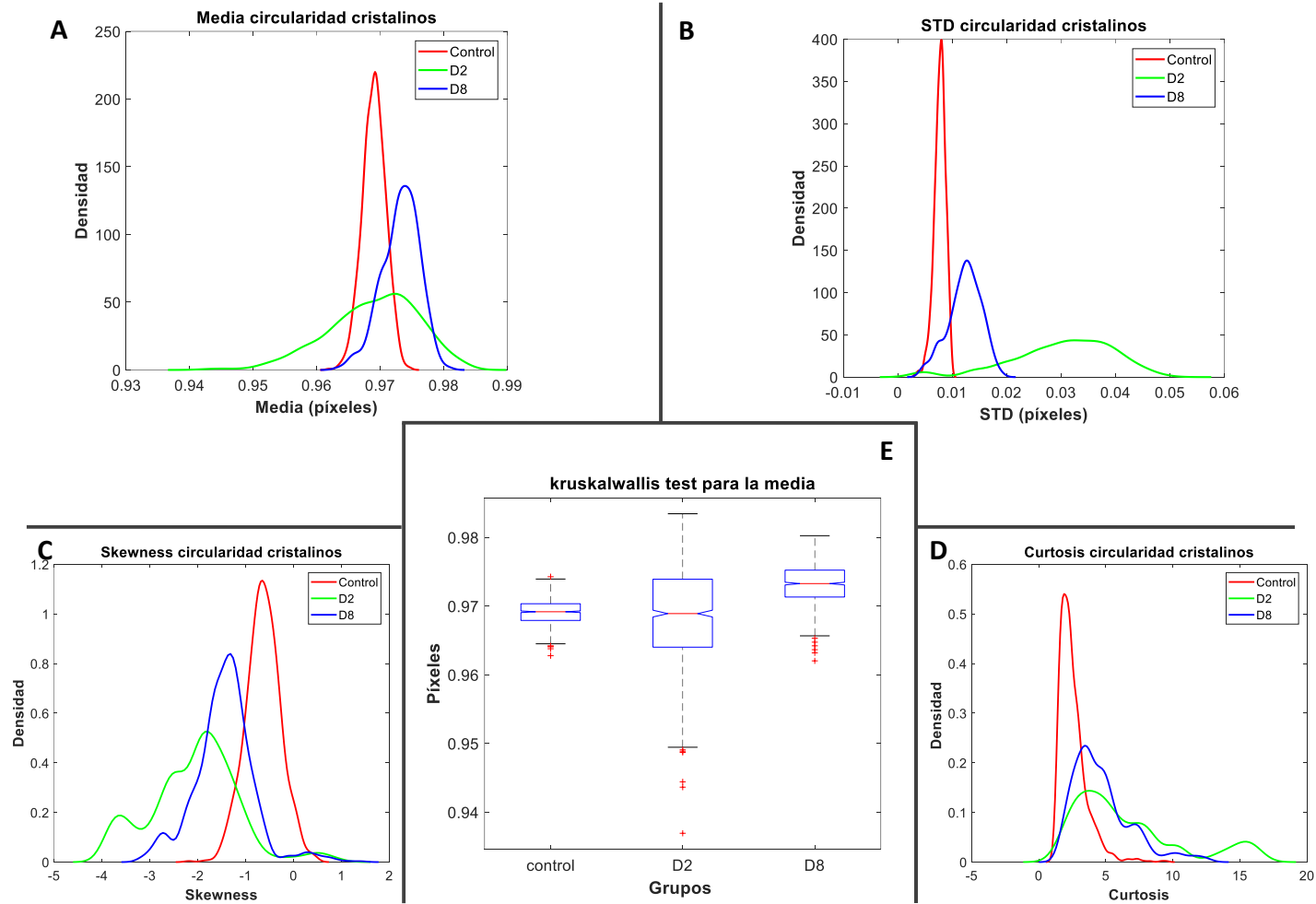


Figura II- 14: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo de la circularidad del cristalino para los distintos grupos: control, D2 y D8.

B. Circularidad del ojo:

En la figura II-15 se muestra la representación gráfica de la *pdf* de la circularidad del ojo, mientras que la tabla II-10 muestra los datos. Al igual que el cristalino, los tres grupos tienen una asimetría negativa más acusada en los grupos D2 y D8.

La curtosis, sin embargo, cambia de negativa (control) a positiva (D2 y D8), en la figura II-12D se observa que la *pdf* disminuye su apuntamiento en estos últimos grupos.

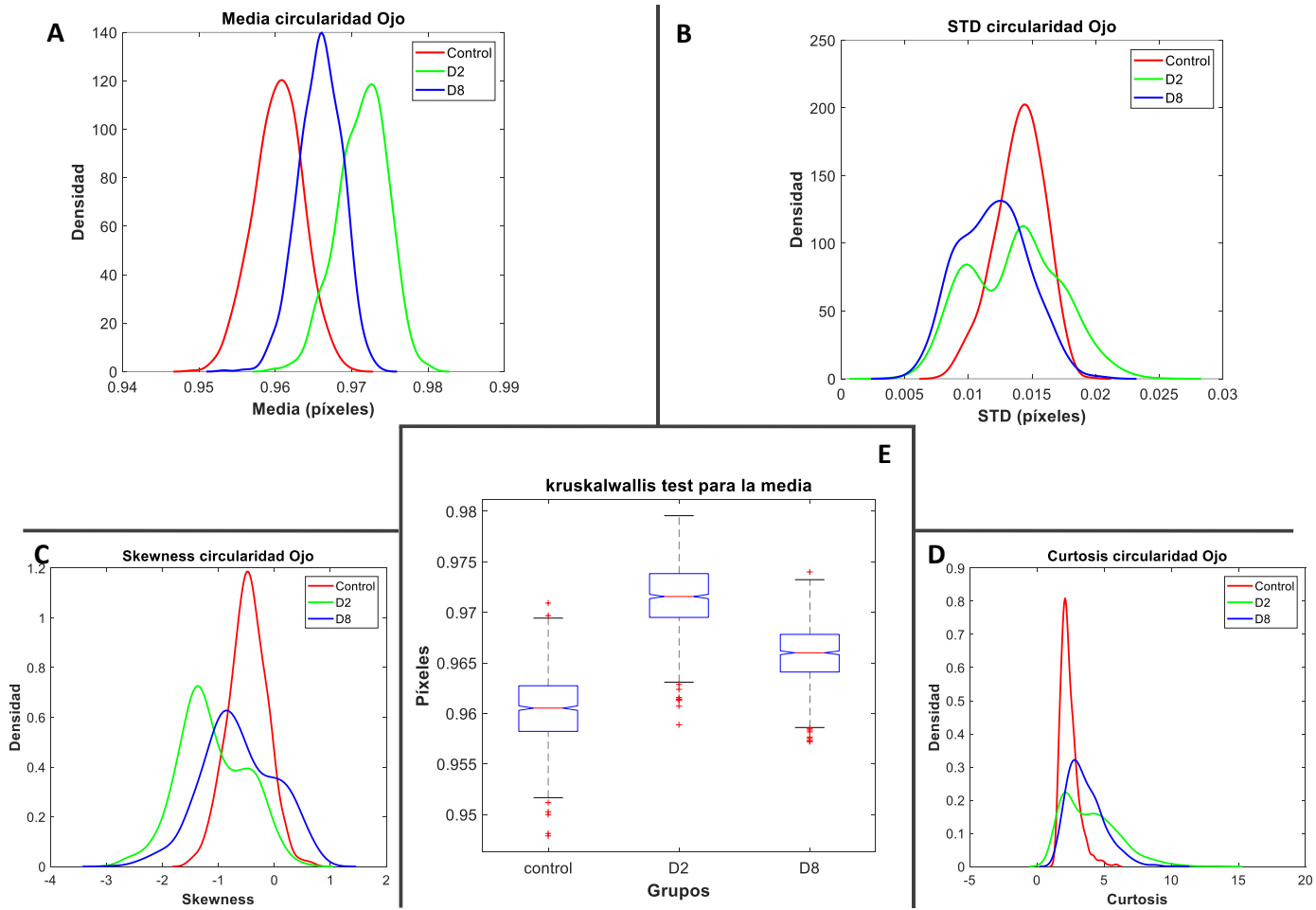


Figura II- 15: Resultados del proceso Bootstrap y del test estadístico *Kruskal-Wallis* para el cálculo de la circularidad del ojo para los distintos grupos: control, D2 y D8.

C. Resultados del ajuste GEV

Analizando los resultados del procedimiento de ajuste a la función GEV explicado anteriormente se observa que aporta mejores resultados (Fig. II-16).

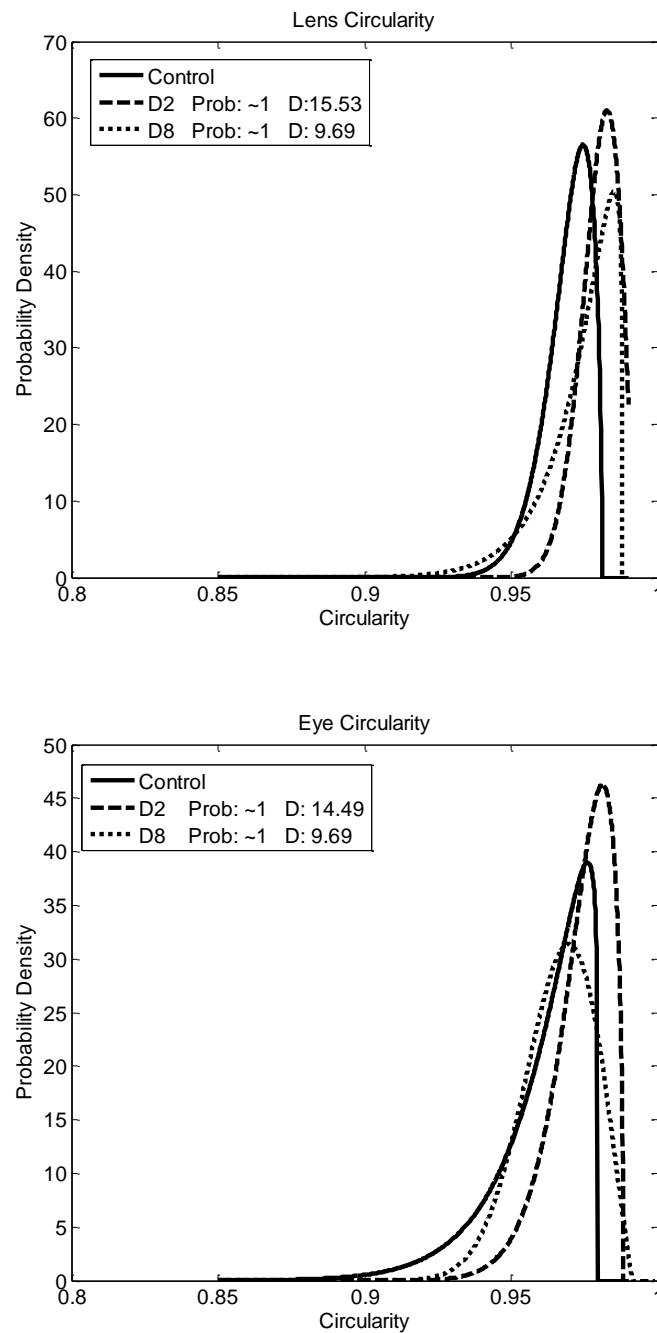


Figura II- 16: Distribución de probabilidad de la circularidad del cristalino y ojo para el control, D2 y D8.

En la figura se muestra que las *pdfs* de D2 y D8 son diferentes del control. Por un lado, la distancia D , entre los parámetros ajustados del control y los parámetros ajustados de D2 y D8, es bastante grande. Por otro, la probabilidad de que fueran diferentes distribuciones es muy alta (prácticamente 1). En general, los cristalino y ojo de los embriones con déficit materno de AF son más circulares de lo normal.

III. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II

Desde hace años se acepta que una dieta materna deficitaria en AF produce defectos en el tubo neural de la progeñe. En el presente capítulo, nuestro objetivo fue evaluar la posible relación entre la dieta materna deficitaria en AF, los defectos oculares congénitos y la presencia de alteraciones en el patrón de expresión de dos proteínas de la MEC, colágeno IV y laminina-1.

A día de hoy se ha investigado poco sobre las anomalías oculares congénitas debidas a la deficiencia de AF [20, 21] y parece que es necesaria una privación muy drástica de AF antes de la concepción para detectar alteraciones oculares [21]. Sin embargo, en esta tesis presentamos una evidencia estadística de que el ojo es muy sensible a la falta de AF, ya que solo con dos semanas gestacionales de déficit materno existen malformaciones estadísticamente significativas en los segmentos anterior y posterior y en los vasos coroideos. Nuestros resultados muestran que el riesgo de defectos oculares congénitos incrementa con el aumento de la deficiencia materna de AF.

Las alteraciones observadas en el segmento anterior, tanto en D2 como en D8, tales como el engrosamiento corneal, adherencias y reducción de la cámara anterior podrían estar relacionadas con los cambios en el patrón de expresión de colágeno IV y/o laminina-1. Varios estudios han sugerido que la alteración de una o ambas moléculas causa defectos similares a los observados en nuestro trabajo. El papel del colágeno IV y la laminina-1 en el desarrollo ocular es bien conocido [22, 23]. Por ejemplo, las mutaciones nulas de los genes de ratón *Col4 α 1* y *Col4 α 2* dan como resultado adherencia entre la córnea y el cristalino, córnea gruesa y cámara anterior reducida [24]. Por otra parte, se observó disgenesia del segmento anterior en ojos de pez cebra mutante para laminina- α 1 [25].

Además, las anomalías morfológicas del cristalino probablemente se originaron a partir de la alteración del colágeno IV y la laminina-1. El síndrome de Alport, por ejemplo, es el resultado de la mutación del colágeno IV. Se ha diagnosticado en pacientes con este síndrome la presencia de lenticono anterior, así como anomalías oculares que afectan al cristalino, córnea y retina [26].

Simbléfaron es un término usado en patología oftalmológica para indicar la adhesión entre las conjuntivas palpebral y bulbar. Nuestros resultados revelan que el déficit materno de AF podría ser una de las causas que producen esta anomalía congénita.

Respecto a la retina, observamos diversos desprendimientos de retina. Las mutaciones de colágeno IV y laminina-1 en ratones también se asocian con numerosas anomalías retinianas congénitas [27, 28].

Nuestros resultados muestran que diversos embriones presentan microftalmia y cámara vítrea reducida, varios estudios relacionaron estas anomalías con alteraciones en la MB [25].

El análisis de la vascularización coroidea revela que existen anormalidades claramente visibles en ambos grupos D2 y D8. El tamaño y la densidad de los vasos sanguíneos coroides y hialoides aumentan en numerosos embriones. El AF se requiere durante la embriogénesis para la vasculogénesis. La hiperhomocisteinemia severa se asoció con alteración de la vascularización retiniana, incluida la isquemia concomitante con neovascularización [29]. En condiciones de hipoxia, los astrocitos liberan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la migración, diferenciación y proliferación de las células endoteliales. Los niveles elevados de VEGF en la retina causan cambios fisiopatológicos en la coroides [30]. Se ha demostrado que, bajo condiciones de hipoxia durante la vasculogénesis, el diámetro de los vasos sanguíneos cerebrales (capilares) aumenta, lo que conduce a senos vasculares aberrantes grandes [31]. Nuestros resultados son consistentes con estos hallazgos. Parece que los altos niveles de VEGF desempeña un papel importante en la alteración del patrón vascular [32]. Además, se ha demostrado que VEGF induce proteínas de la MEC en la arteria umbilical, de modo que, el colágeno IV y la laminina-1 aumentan después del tratamiento con VEGF [33]. Por lo tanto, el aumento en la vasculogénesis podría estar relacionado con el aumento en la intensidad del marcaje en las MBs oculares del colágeno IV y la laminina-1 observado en nuestro estudio. La alteración en el patrón de expresión puede estar asociada con diversas anomalías oculares.

Por lo que se refiere al análisis de la biometría de algunas estructuras oculares, hemos observado disminución en el tamaño del ojo y cristalino incluso en el grupo D2 en el cual las madres solo fueron privadas de AF durante las dos primeras semanas de gestación. Se sabe que el AF es necesario para los procesos normales de proliferación de células embrionarias; su deficiencia interfiere en el desarrollo del embrión [34]. De hecho, se ha asociado la baja ingesta materna de AF con un riesgo aumentado de bajo peso al nacer [35]. Ciertamente, en los embriones de los grupos D2 y D8 el tamaño del ojo y el cristalino en la mayoría de los casos fue más pequeño que el grupo control, posiblemente debido a reducción de la proliferación celular. Algunos estudios han demostrado que la deficiencia de AF disminuye la proliferación celular [36, 37].

Curiosamente, al comparar la retina neural hemos observado que, a pesar del déficit de AF, el tamaño del área no cambió, ni siquiera en el grupo D8. Para comprobar esto, se ha medido la altura y la anchura de la retina de todos los grupos y se ha comparado con el control. Nuestros resultados revelaron que la retina neural vuelve más gruesa de lo normal en los embriones del grupo D8. El aumento en el tamaño de la retina neural también se ha visto en otros estudios por otras causas [38, 39]. Algunos estudios experimentales [40, 41] han revelado que la reducción de la apoptosis del sistema nervioso central resulta en múltiples hiperplasias, masas de células ectópicas, estructuras celulares desorganizadas y un número excesivo de neuronas en la corteza, el cerebelo y la retina. Se sabe desde hace mucho tiempo que la eliminación de células por muerte programada (apoptosis) es un mecanismo de desarrollo. El exceso de células se genera durante el desarrollo de varios sistemas como el sistema nervioso central [42] incluida la retina [43] por eso la apoptosis es fundamental en esta etapa. Se ha demostrado que los cambios tanto en la cantidad como en la composición de la MEC inducen modificaciones en la apoptosis/supervivencia celular [44, 45].

En cuanto a las medidas de circularidad, hemos observado que los embriones de los grupos D2 y D8 tienen ojos y cristalinos más circulares de lo normal.

La mayoría de los embarazos no son planificados. En promedio, la primera visita prenatal se realiza en la 9ª semana de embarazo [46]. Sin embargo, el ojo humano comienza a desarrollarse a partir de la 7ª semana de gestación. Por lo tanto, el embarazo puede empezar con un déficit materno de AF. Debido a la gran susceptibilidad del desarrollo ocular en ausencia de AF, como hemos demostrado con nuestros resultados, en los recién nacidos con alguna disfunción visual sin ninguna otra alteración aparente cabe sospechar que es debido a un pequeño déficit materno de AF al principio del embarazo.

No queremos cerrar este capítulo sin plasmar una última reflexión. La contribución del AF en la dieta no solo es esencial durante el desarrollo embrionario, para la correcta formación del sistema nervioso, sino que se requiere también para el crecimiento, maduración y el buen funcionamiento del sistema nervioso en niños y ancianos [47]. En personas de edad avanzada una dieta deficitaria en AF puede deberse no solo a la baja ingesta de AF sino también a otras circunstancias (mala absorción, alcoholismo, medicación, etc.). Se ha demostrado que la neuropatía óptica [48-50] y la degeneración macular [51, 52] están relacionadas con el déficit de AF.

IV. REFERENCIAS DEL 2º CAPÍTULO

1. Agresti A, Kateri M: **Categorical data analysis**. In: *International encyclopedia of statistical science*. edn.: Springer; 2011: 206-208.
2. Pearson K: **On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that in can reasonably be supposed to have arisen from random sampling**. *Philosoph Magazine* 1900, **50**:157-175.
3. Toolbox O: **MatLab, r2015b edition**. In.: September; 2015.
4. IBM_Corp R: **IBM SPSS statistics for windows**. *IBM Corp, Armonk, NY* 2010.
5. du Prel J-B, Hommel G, Röhrig B, Blettner M: **Confidence interval or p-value?: part 4 of a series on evaluation of scientific publications**. *Deutsches Ärzteblatt International* 2009, **106**(19):335.
6. Rasband W: **ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, h ttp. imagej nih gov/ij** 1997, **2012**.
7. Ferreira T, Rasband W: **ImageJ user guide**. *ImageJ/Fiji* 2012, **1**.
8. Bootstrap EB: **methods: Another look at the Jackknife [J]**. *Ann Statist* 1979, **7**(1):1-26.
9. Efron B, Tibshirani RJ: **An Introduction to the Bootstrap: Monographs on Statistics and Applied Probability, Vol. 57**. *New York and London: Chapman and Hall/CRC* 1993.
10. Peña D: **Fundamentos de estadística**: Alianza Editorial; 2014.
11. Cheng A, Yeager M: **Bootstrap resampling for voxel-wise variance analysis of three-dimensional density maps derived by image analysis of two-dimensional crystals**. *Journal of structural biology* 2007, **158**(1):19-32.
12. Cui M, Xu L, Wang H, Ju S, Xu S, Jing R: **Combining Nordtest method and bootstrap resampling for measurement uncertainty estimation of hematology analytes in a medical laboratory**. *Clinical biochemistry* 2017, **50**(18):1067-1072.
13. Goodhue DL, Lewis W, Thompson R: **Does PLS have advantages for small sample size or non-normal data?** *Mis Quarterly* 2012:981-1001.
14. Markose S, Alentorn A: **The generalized extreme value distribution, implied tail index, and option pricing**. *The Journal of Derivatives* 2011, **18**(3):35-60.
15. Bali TG: **The generalized extreme value distribution**. *Economics letters* 2003, **79**(3):423-427.
16. Conniffe D: **The generalised extreme value distribution as utility function**. *ECONOMIC AND SOCIAL REVIEW* 2007, **38**(3):275.
17. Edwards A: **Likelihood**. In., Expanded Edition edn: Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press; 1992.
18. El Adlouni S, Ouarda T, Zhang X, Roy R, Bobée B: **Generalized maximum likelihood estimators for the nonstationary generalized extreme value model**. *Water Resources Research* 2007, **43**(3).
19. MacGillivray H, Balanda K: **The relationships between skewness and kurtosis**. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* 1988, **30**(3):319-337.
20. Armstrong RC, Monie I: **Congenital eye defects in rats following maternal folic-acid deficiency during pregnancy**. *Development* 1966, **16**(3):531-542.
21. Maestro-de-las-Casas C, Pérez-Miguelsanz J, López-Gordillo Y, Maldonado E, Partearroyo T, Varela-Moreiras G, Martínez-Álvarez C: **Maternal folic acid-deficient diet causes congenital malformations in the mouse eye**. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2013, **97**(9):587-596.
22. Bai X, Dilworth DJ, Weng Y-C, Gould DB: **Developmental distribution of collagen IV isoforms and relevance to ocular diseases**. *Matrix Biology* 2009, **28**(4):194-201.

23. Byström B, Virtanen I, Rousselle P, Gullberg D, Pedrosa-Domellöf F: **Distribution of laminins in the developing human eye.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(3):777-785.
24. Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, Klempt M, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Schmahl W, Quintanilla-Fend L: **Type IV procollagen missense mutations associated with defects of the eye, vascular stability, the brain, kidney function and embryonic or postnatal viability in the mouse, Mus musculus: An extension of the Col4 alpha 1 allelic series and the identification of the first two Col4a2 mutant Alleles.** *Genetics* 2007, **175**(2):725-736.
25. Semina EV, Bosenko DV, Zinkevich NC, Soules KA, Hyde DR, Vihtelic TS, Willer GB, Gregg RG, Link BA: **Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish.** *Developmental biology* 2006, **299**(1):63-77.
26. Savige J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG, Colville D: **Ocular Features in Alport Syndrome: Pathogenesis and Clinical Significance.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2015, **10**(4):703-709.
27. Alavi MV, Mao M, Pawlikowski BT, Kvezereli M, Duncan JL, Libby RT, John SW, Gould DB: **Col4a1 mutations cause progressive retinal neovascular defects and retinopathy.** *Scientific reports* 2016, **6**.
28. Edwards MM, Mammadova-Bach E, Alpy F, Klein A, Hicks WL, Roux M, Simon-Assmann P, Smith RS, Orend G, Wu J: **Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation.** *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**(10):7697-7711.
29. Tawfik A, Al-Shabrawey M, Roon P, Sonne S, Covar JA, Matragoon S, Ganapathy PS, Atherton SS, El-Remessy A, Ganapathy V: **Alterations of retinal vasculature in cystathionine-Beta-synthase mutant mice, a model of hyperhomocysteinemia.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2013, **54**(2):939-949.
30. Tee L, Penrose M, O'Shea J, Lai C, Rakoczy E, Dunlop S: **VEGF-induced choroidal damage in a murine model of retinal neovascularisation.** *British Journal of Ophthalmology* 2008, **92**(6):832-838.
31. Drake CJ, Little CD: **Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995, **92**(17):7657-7661.
32. Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, Solli T, Madri JA, Ment LR: **Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain.** *Developmental brain research* 2000, **119**(1):139-153.
33. Infanger M, Grosse J, Westphal K, Leder A, Ulbrich C, Paul M, Grimm D: **Vascular endothelial growth factor induces extracellular matrix proteins and osteopontin in the umbilical artery.** *Annals of vascular surgery* 2008, **22**(2):273-284.
34. Status IoMSoN, Pregnancy WGd, Intake IoMSoD, Pregnancy NSd: **Nutrition during pregnancy: part I, weight gain: part II, nutrient supplements:** Natl Academy Pr; 1990.
35. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL: **Dietary and serum folate: Their influence on the outcome of pregnancy.** *American Journal of Clinical Nutrition* 1996, **63**(4):520-525.
36. Moussa C, Ross N, Jolette P, MacFarlane AJ: **Altered folate metabolism modifies cell proliferation and progesterone secretion in human placental choriocarcinoma JEG-3 cells.** *British Journal of Nutrition* 2015, **114**(6):844-852.
37. Maldonado E, Murillo J, Barrio C, del Rio A, Perez-Miguelsanz J, Lopez-Gordillo Y, Partearroyo T, Paradas I, Maestro C, Martinez-Sanz E *et al*: **Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of Tgf-beta(3) Expression and the Mechanisms Leading to Palatal Fusion in Mice following Dietary Folic-Acid Deficiency.** *Cells Tissues Organs* 2011, **194**(5):406-420.

38. Dunker N, Kriegelstein K: **Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgf beta 2(-/-)Tgf beta 3(-/-) double-deficient mice.** *Cell and Tissue Research* 2003, **313**(1):1-10.
39. Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P: **Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development.** *Cell* 1998, **94**(6):727-737.
40. Oppenheim RW: **CELL-DEATH DURING DEVELOPMENT OF THE NERVOUS-SYSTEM.** *Annual Review of Neuroscience* 1991, **14**:453-501.
41. Kuida K, Zheng TS, Na SQ, Kuan CY, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA: **Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice.** *Nature* 1996, **384**(6607):368-372.
42. Conradt B: **Genetic control of programmed cell death during animal development.** *Annual review of genetics* 2009, **43**:493-523.
43. Laemle LK, Puzkarczuk M, Feinberg RN: **Apoptosis in early ocular morphogenesis in the mouse.** *Developmental brain research* 1999, **112**(1):129-133.
44. Farrelly N, Lee Y-J, Oliver J, Dive C, Streuli CH: **Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling.** *The Journal of cell biology* 1999, **144**(6):1337-1348.
45. Frisch SM, Francis H: **Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.** *The Journal of cell biology* 1994, **124**(4):619-626.
46. Herrmann W, Obeid R: **The mandatory fortification of staple foods with folic acid: a current controversy in Germany.** *Deutsches Ärzteblatt International* 2011, **108**(15):249.
47. Reynolds E: **Vitamin B12, folic acid, and the nervous system.** *The lancet neurology* 2006, **5**(11):949-960.
48. De Silva P, Jayamanne G, Bolton R: **Folic acid deficiency optic neuropathy: a case report.** *Journal of medical case reports* 2008, **2**(1):299.
49. Golnik KC, Schaible ER: **Folate-responsive optic neuropathy.** *Journal of neuro-ophthalmology* 1994, **14**(3):163-169.
50. Hsu CT, Miller NR, Wray ML: **Optic neuropathy from folic acid deficiency without alcohol abuse.** *Ophthalmologica* 2002, **216**(1):65-67.
51. Huang P, Wang F, Sah BK, Jiang J, Ni Z, Wang J, Sun X: **Homocysteine and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.** *Scientific reports* 2015, **5**.
52. Pinna A, Zaccheddu F, Boscia F, Carru C, Solinas G: **Homocysteine and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.** *Acta ophthalmologica* 2018, **96**(3):e269-e276.

RESULTADOS

Capítulo III

I. ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICAS

1. MATERIAL Y MÉTODOS: ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES APLICADO A IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICAS

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística bien conocida, utilizada originalmente para tratar grandes volúmenes de datos. La finalidad del método es reducir la dimensionalidad de los datos tratando de encontrar los factores más relevantes de éstos que nos permiten descartar algunos de ellos como no relevantes y así reducir el volumen de datos a tratar [1]. De hecho, este método se ha aplicado al tratamiento de imágenes en diferentes contextos.

En relación con las imágenes de inmunohistoquímica ha habido varios tipos de uso:

1. En un tejido se puede expresar un gran número de proteínas o compuestos, pero no es posible marcarlos todos a la vez. Para ello, el método ACP se ha utilizado en varios estudios para determinar qué proteínas son las más representativas de toda la variabilidad de los datos. Más adelante solo se marca el tejido con estas proteínas y no con las demás. Esto reduce la cantidad de muestra utilizada y el tipo de marcaje [2-4]. En otros casos, las imágenes inmunohistoquímicas se utilizaron para ilustrar los patrones morfológicos característicos de la expresión de los marcadores moleculares [5].
2. Mejora del contraste de imágenes inmunohistoquímicas mediante el análisis de ACP en la imagen RGB tomada con cámara CCD, junto con algoritmos de clasificación automatizados [6-10].
3. El grado de marcaje de una imagen inmunohistoquímica generalmente se realiza a través de una puntuación subjetiva que asigna un valor numérico a cada imagen. El método ACP se utiliza normalmente en los datos de estos valores numéricos [11]. Éste suele ser el uso más común del ACP.

La técnica inmunohistoquímica es un método que se utiliza para evaluar la expresión de antígenos en los tejidos [12]. La interpretación de este tipo de marcajes se basa en la distribución microanatómica de la tinción, la proporción de células positivas y la intensidad de la inmunotinción [13]. No obstante, no es siempre fácil de interpretar. La mayoría de los estudios inmunohistoquímicos evalúan los cambios en la expresión de la proteína basándose en una estimación visual. Una tarea que requiere mucho tiempo. A juicio de

muchos estudios, este tipo de cuantificación de expresión proteica tiene un enfoque muy subjetivo caracterizado por una gran variabilidad intra e interobservador [14-16].

Para minimizar las limitaciones de esta técnica tales como el tiempo invertido y subjetividad en la interpretación de los resultados, hemos implementado un sistema automatizado basado en el procesamiento de imágenes inmunohistoquímicas a fin de ser una herramienta alternativa para cuantificar la expresión de las proteínas y su distribución en los tejidos. En esta tesis, con la aplicación de esta metodología se pretende medir el porcentaje de expresión del colágeno IV y la laminina-1 en algunas estructuras oculares, así como regionalizar el marcaje.

En segunda instancia, con este procedimiento se procura mejorar la variabilidad intra e interobservador y crear así un método objetivo capaz de reducir la variabilidad interobservadores en la evaluación de los tejidos.

El método que se va a emplear para llevar a cabo el análisis automatizado de imágenes se basa en la técnica estadística ACP. En esta sección, se va a evaluar el patrón de expresión del colágeno IV y la laminina-1 en distintas estructuras oculares: cristalino, córnea y retina. Se parte de un conjunto de imágenes de ojos marcados con anti-colágeno IV o anti-laminina-1 tomadas mediante microscopía óptica con aumentos de x10 (el procedimiento de marcaje de las dos proteínas y toma de imágenes están explicados en el capítulo I). Los ojos pertenecen a los tres grupos muestrales: Control, D2 y D8. La siguiente tabla (Tabla III-1) resume el número total de ojos analizados:

TABLA III- 1: Cantidad de muestra analizada para cada tipo de marcaje.

Muestra	Cantidad de observaciones (n)	
	Colágeno IV	Laminina-1
Control	9	9
D2	9	9
D8	9	9

El procedimiento comienza con la selección de las distintas ROI. Así, pues, con la ayuda de Matlab se convierten todas las imágenes RGB originales a escala de grises y se normalizan llevando a 0 el valor de gris más pequeño y a 255 el máximo valor. Finalmente, se seleccionan las siguientes zonas (para cada ojo):

1. Cristalino: la selección de todo el cristalino se realiza aplicando una máscara circular. Para ello, se crea una matriz con las mismas dimensiones rellena de ceros. Para que la máscara tenga una forma circular, se modifica esta matriz para que tenga unos en un círculo de radio 190 y como centro de la imagen los valores $(C_x, C_y) = (258, 289)$. Más adelante, se multiplica cada una de las imágenes por la máscara. El resultado final sería, convertir a negro todos los píxeles que están fuera del círculo y sólo quedarían visibles los píxeles que están dentro del cristalino. Dado que los cristalinos de los grupos deficitarios son más pequeños que los del control se aplica a las imágenes de los cristalinos de los grupos D2 y D8 la función de Matlab *imresize.m* que se utiliza para el redimensionamiento de imágenes. Esta función conserva la relación de aspecto de la nueva imagen. Para realizar esta transformación geométrica se utilizas el siguiente comando:

$$Imagen_{final} = imresize(Imagen_{original}, [nrows, ncols])$$

Donde $[nrows, ncols]$ indica las nuevas dimensiones deseadas en píxeles filas $nrows$ y columnas $ncols$. El tamaño final para cada imagen de cristalino es 601×665 píxeles (Fig. III-1A).

2. Córnea: para este caso se selecciona una zona rectangular que abarca toda la región central de la córnea (estroma corneal). No se ha seleccionado toda la córnea dada su curvatura. Todas las imágenes tienen un tamaño de 42×200 píxeles (Fig. III-1B).
3. Retina: se selecciona una zona local en la retina neural (parte posterior) del tamaño 160×187 píxeles (Fig. III-1C). En todo los ojos analizado, se selecciona siempre la misma zona.

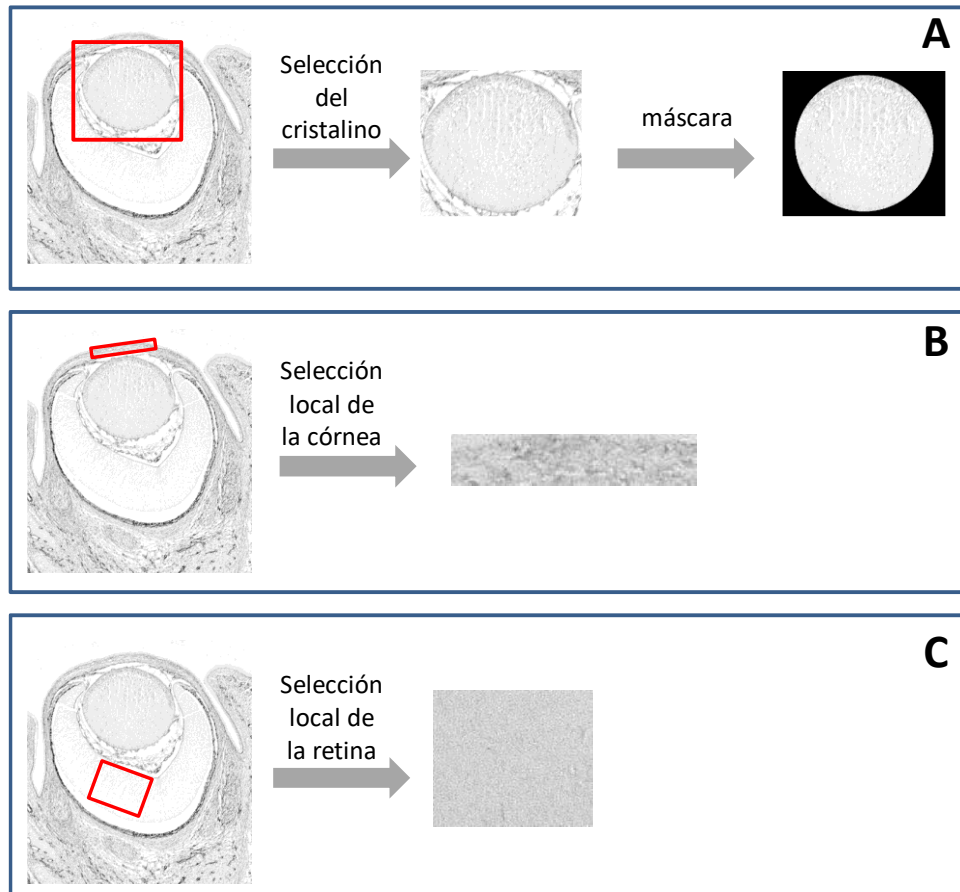


Figura III- 1: Esquema general del método de selección de las estructuras oculares a partir de una imagen de ojo control marcado con anti-colágeno IV. A, selección del cristalino, B, selección local de la córnea y C, selección local de la retina.

Una vez realizada la selección de las zonas anteriormente mencionadas, comienza el análisis del patrón de expresión de colágeno IV y laminina-1 dentro del cristalino, retina y córnea. Dicho procedimiento se detalla a continuación.

1.1 Evaluación del patrón de expresión mediante el ACP

Una imagen monocroma es una función bidimensional que se puede considerar como una matriz M de tamaño $R \times C$, donde R es el número de píxeles por fila y C lo es por columna creando un espacio N -dimensional teniendo que $N = RC$.

Sea X un conjunto de imágenes del tamaño $R \times C$. Consideramos el vector columna x compuesto por n píxeles y localizado en la misma posición de cada imagen (Fig. III-2):

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

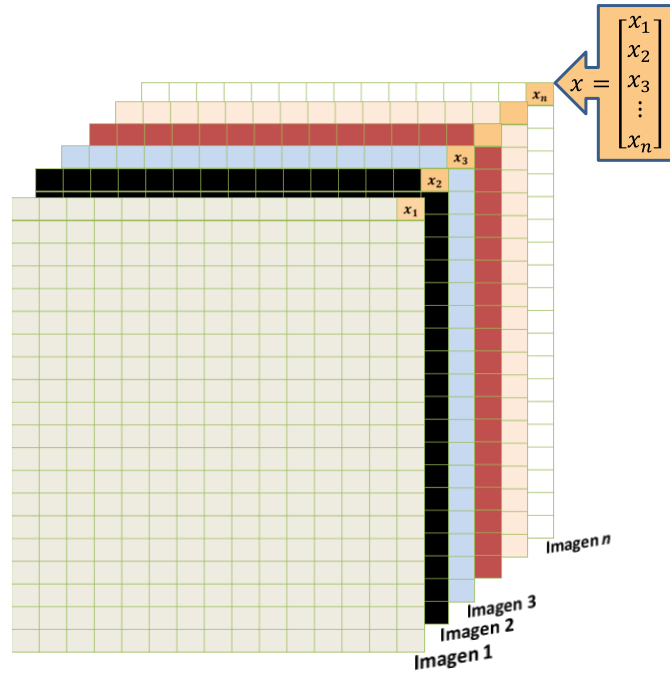


Figura III- 2: Representación de un vector x de píxeles formado a partir de n imágenes del mismo tamaño ordenadas en una matriz.

De la misma forma, se puede determinar una matriz X n -dimensional que comprende todos los píxeles en las n imágenes:

$$X = (X_1, X_2, \dots, X_j) = \begin{pmatrix} X_{11} & \dots & X_{1j} \\ \dots & \dots & \dots \\ X_{n1} & \dots & X_{nj} \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

Donde $X_j = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ y $j = 1, 2, 3, \dots, RC$.

Se puede determinar la media μ_x para la variable genérica x mediante:

$$\mu_x = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_j \quad (3.3)$$

Por otra parte, sea S_x la matriz de covarianzas de X de dimensión $n \times n$ y que viene determinada por:

$$S_x = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (X_j - \mu_x)(X_j - \mu_x)^T \quad (3.4)$$

Para ordenar las observaciones, el ACP se basa en la descomposición del autovalor de la matriz de covarianza, que toma la forma,

$$S_x = ADA^T \quad (3.5)$$

donde $D = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n)$ es la matriz diagonal compuesta por los autovalores de la matriz de covarianza. Por otra parte, A es la matriz ortonormal n-dimensional compuesta por los autovectores correspondientes a_k ($k = 1, 2, 3, \dots, n$) de S_x de la siguiente manera $A = (a_1, a_2, \dots, a_n)$.

La transformación lineal en componentes principales se define por:

$$Y = A(X - \mu_x) \quad (3.6)$$

Se pueden recuperar los datos originales X con una pequeña pérdida de la información realizando la transformación inversa:

$$X = A^T Y + \mu_x \quad (3.7)$$

Entonces, la transformación de los componentes principales es evidente cuando sólo se utiliza un conjunto q reducido de autovectores. En este caso, la matriz A se convierte a una matriz $q \times n$ y se denota como A_q . De este modo, la reconstrucción es una aproximación:

$$\hat{X} = A_q^T Y + \mu_x \quad (3.8)$$

El error cuadrático medio e_{ms} entre la reconstrucción exacta y la aproximada de los datos originales X está dada por la expresión:

$$e_{ms} = \sum_{j=1}^n \lambda_j - \sum_{j=1}^q \lambda_j \quad (3.9)$$

$$e_{ms} = \sum_{j=q+1}^n \lambda_j \quad (3.10)$$

si $q = n \xrightarrow{\text{Eq.(3.9)}} e_{ms} = 0$, esto ocurre cuando se utilizan todos los autovectores en la transformación inversa.

Como se puede observar, el error puede ser minimizado seleccionando para A_q los q autovectores asociados a los autovalores de mayor modulo [17].

En esta tesis, vamos a utilizar esta técnica para comparar entre las imágenes del grupo control con los deficitarios. El esquema general del procedimiento, en el caso del cristalino, se observa en la figura (Fig. III-3).

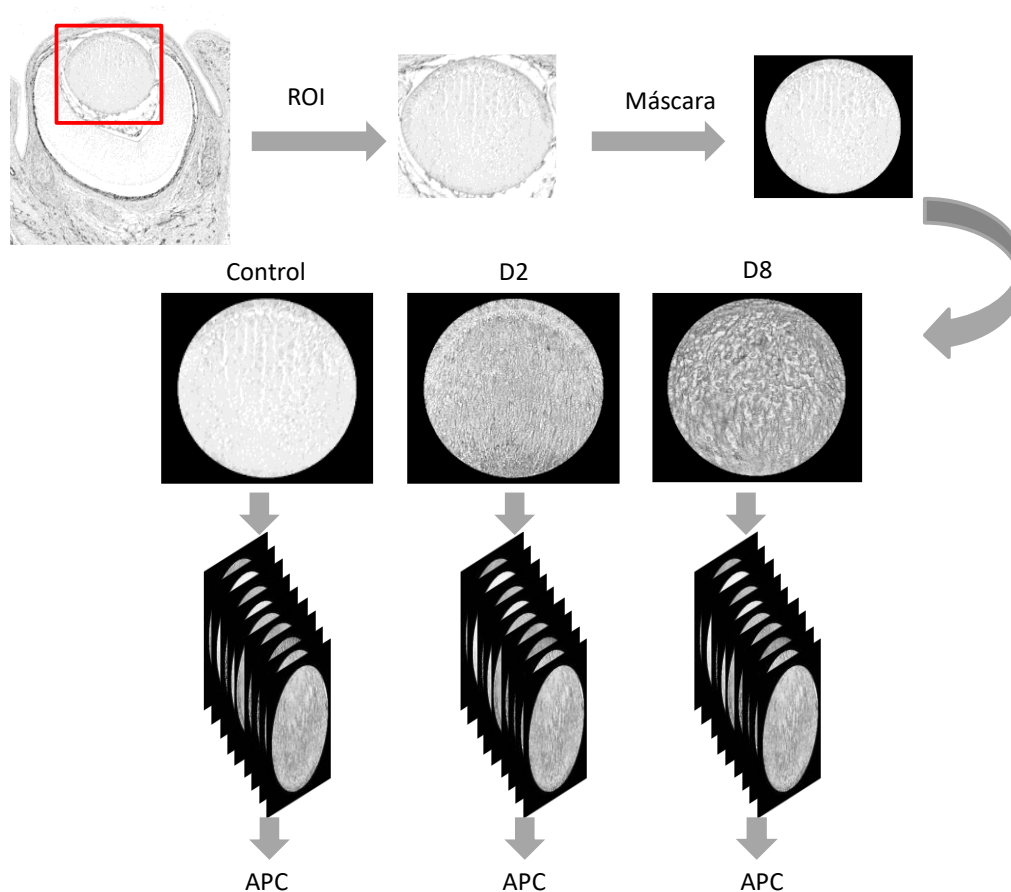


Figura III- 3: Representación esquemática de la selección de los cristalinios. Se ha aplicado una máscara circular sobre todos los ojos de todos los grupos muestrales: Control, D2 y D8. Más tarde, se realizan tres grupos de nueve imágenes de cristalinios para estudiarlas estadísticamente por medio del Análisis de Componentes Principales-ACP.

1.2 Representación de nuestras imágenes mediante el ACP

La técnica de ACP nos permite estudiar la varianza de un conjunto de imágenes a partir de la varianza del gráfico de dispersión de sus píxeles. La siguiente figura III-4 muestra, como un ejemplo, este diagrama de dispersión para el caso de tener solo tres imágenes. En este caso se restringe el ejemplo a tres imágenes o 'frames' porque es el número máximo que debe representarse con un gráfico tridimensional en el cual las tres direcciones ortogonales están asociadas a los frames. La señal dada para cada píxel se representa mediante un punto en un diagrama 3D cuyas coordenadas son los tres valores diferentes de ese píxel en las tres imágenes, después de restar el valor medio de cada imagen a cada coordenada de píxel. Cuando todos los píxeles se encuentran en este diagrama, se obtiene una nube de puntos; donde cada punto es un píxel. Para una descripción completa del método, véase [18].

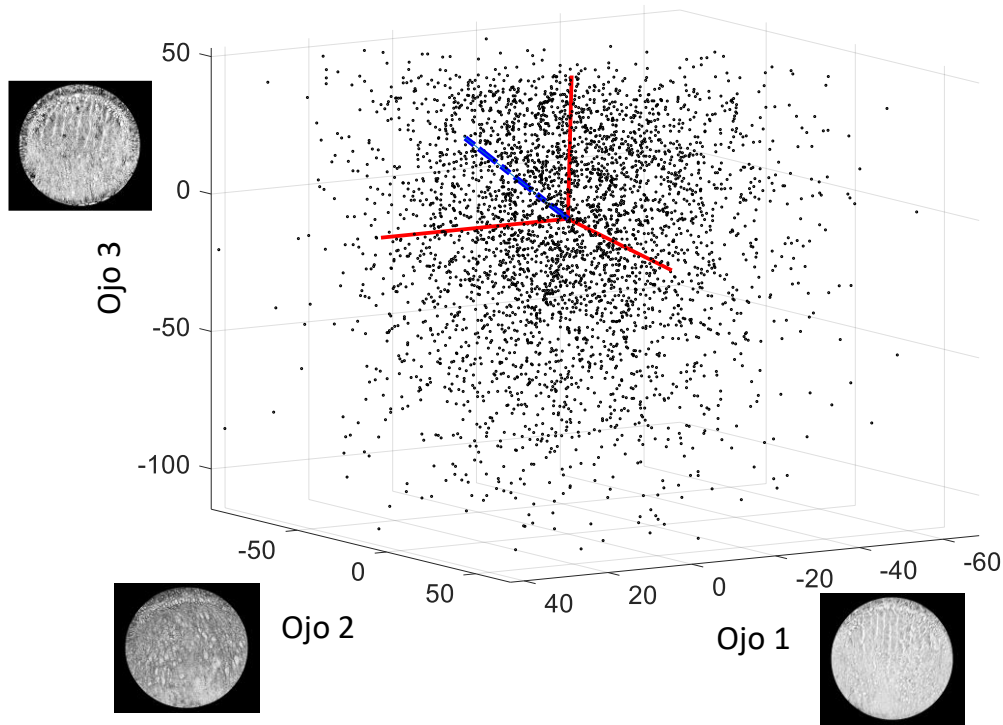


Figura III- 4: Diagrama de dispersión para un conjunto de tres imágenes del grupo control

El punto de partida del método de componentes principales es el cálculo de la matriz de covarianza \mathbf{S} , entre las imágenes. Una de las propiedades de esta matriz es que nos permite calcular cuál es la varianza V_u de los datos a lo largo de una dirección u en el diagrama de dispersión como [1]:

$$V_u = u^T \mathbf{S} u \quad (3.11)$$

Donde u es un vector columna de módulo unidad en la dirección considerada. Los autovectores (e_α) de la matriz \mathbf{S} son vectores normalizados en direcciones mutuamente ortogonales que maximizan la varianza V_u en esas direcciones. Estas varianzas maximizadas son los autovalores (λ_α) de \mathbf{S} . Como ejemplo, dichas direcciones se han representado en el caso particular de la figura III-4 (líneas rojas). Además, cada una de las direcciones del diagrama de dispersión se puede asociar con una imagen Y_u , combinación lineal de las imágenes iniciales con media cero I_k , mediante:

$$Y_u = \sum_{k=1}^N u(k) I_k \quad (3.12)$$

donde N es el número de imágenes. En el caso de tomar las direcciones de los autovalores e_α , esas imágenes Y_α son las imágenes correspondientes a los componentes principales (CPs). Debido a la ortogonalidad del ACP, la varianza total de las imágenes es la suma de la varianza asociada a cada dirección, es decir, la suma de los autovalores, de modo que, a cada uno de ellos se le puede asignar un peso relativo en la varianza total dado que:

$$\Omega_\alpha = \frac{\lambda_\alpha}{\sum_{\alpha=1}^N \lambda_\alpha} \quad (3.13)$$

Por otra parte, la imagen media está en la dirección $(\frac{1}{N}, \frac{1}{N}, \dots, \frac{1}{N})$ correspondiente a la dirección normalizada $u_m = 1/\sqrt{N}(1, 1, \dots, 1)$. Por lo tanto, podemos calcular la varianza de los datos en esa dirección como $V_m = u_m^T \mathbf{S} u_m$. El peso relativo en los datos de la imagen promedio se puede calcular mediante:

$$\Omega_m = \frac{V_m}{\sum_{\alpha=1}^N \lambda_\alpha} = \frac{V_m}{V_T} \quad (3.14)$$

siendo V_T la varianza total. Como ejemplo, esta dirección media se dibuja en la figura III-4 (línea azul).

Cabe señalar que se puede comparar la descomposición en ACP con sólo tomar la imagen promedio a través de tres consideraciones:

1. Dado que la extracción de los componentes principales es de mayor a menor representación en la varianza media, se pueden comparar Ω_1 con Ω_m . Por construcción, Ω_1 siempre será mayor que Ω_m ya que es el porcentaje de varianza en la dirección de máxima dispersión. Por lo tanto, si hay que elegir una imagen como representativa del todo debería ser la del primer componente principal. La diferencia entre Ω_1 y Ω_m proporcionará una idea del error que se cometería al tomar la imagen promedio como la más representativa.
2. Por lo tanto, para que la media de las imágenes sea la más representativa de todas, su dirección debería coincidir con la del primer autovector. De modo que, se puede calcular el ángulo entre estas dos direcciones θ como un segundo indicador.
3. Además, la diferencia entre Ω_1 y Ω_m nos puede proporcionar la idea de que podría tratarse de información en los datos que no está bien expresada por una sola imagen representativa.

A. Protocolo de análisis de componentes principales

Como se ha dicho anteriormente, la idea fundamental del ACP es formar nuevas variables (imágenes en nuestro caso) no correlacionadas entre ellas denominadas componentes principales, CPs, que son combinaciones lineales de las originales. Los coeficientes de la combinación lineal se eligen para maximizar la varianza de los CPs. Ordenados de modo que los primeros conservan la mayor parte de la variación presente en todas las variables iniciales [19, 20]. Esa es la razón por la cual se consideró el ACP como técnica de reducción de dimensionalidad. Ya que podría reducir las variables originales en un número menor de variables, CP, que conducen a una descripción más simple de los datos [21].

El punto de partida es la matriz de covarianza entre las imágenes, \mathbf{S} . Los coeficientes de las combinaciones lineales utilizadas para calcular los CPs son los autovectores de \mathbf{S} y sus autovalores (λ_α) son las varianzas de los CPs. El CP, Y_α se expresan como combinación lineal de las imágenes originales con media cero, I_k , mediante:

$$Y_\alpha = \sum_{k=1}^N e_\alpha(k) I_k \leftrightarrow I_k = \sum_{\alpha=1}^N e_\alpha(k) Y_\alpha \quad (3.15)$$

donde $e_\alpha(k)$ es K-componentes del autovector α y N es el número de imágenes analizadas (nueve en cada grupo muestral). Como se muestra en la Eq.(3.15) las imágenes iniciales se pueden expresar también como combinaciones lineales de los CPs. El porcentaje de la varianza de los datos (imágenes) explicados por α -CP viene dado por Ω_α definido en la Eq.(3.13).

Las ecuaciones 3.13 y 3.15 expresan la posibilidad de reconstruir las imágenes teniendo en cuenta solo los CPs relevantes o grupos de CPs considerados importantes por cualquier motivo. Este proceso normalmente se denomina rectificación. Los CPs más relevantes se pueden identificar por diferentes métodos, la mayoría de ellos seleccionan aquellos que representan una gran cantidad de varianza. En esta tesis, se ha desarrollado otro método para agrupar automáticamente diferentes CPs. El método se basa en el estudio de las incertidumbres en la varianza de las CPs, es decir, λ_α . La incertidumbre en λ_α depende de los estadísticos de orden superior de las imágenes (acumulantes de cuarto orden) [18]. En cualquier caso, este método permite reconstruir el conjunto de imágenes seleccionando cualquier CP o grupos de ellos considerados relevantes. Esto permite estudiar toda la varianza de las imágenes y la importancia de cada una de las estructuras espaciales reveladas por cada CP sobre ellas. El esquema general del procedimiento, en caso del cristalino, se observa en la figura III-3.

B. Distancia de Mahalanobis

Los componentes principales son combinaciones lineales de las imágenes iniciales que tienen cero covarianzas entre ellas. Las imágenes de cada grupo muestral provienen de la misma distribución de probabilidad subyacente, por lo que las imágenes de los CPs tienden a distribuirse juntas conforme a una distribución multinormal, de modo que:

$$f(\mathbf{Y}(p)) = \frac{1}{(2\pi)^{N/2} |\mathbf{S}_Y|^{1/2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \mathbf{Y}(p)^T \mathbf{S}_Y^{-1} \mathbf{Y}(p) \right\} \quad (3.16)$$

donde $\mathbf{Y}(p)$ es el vector formado por las coordenadas del píxel p en la base de los autovectores de \mathbf{S} (base de los CPs). La expresión anterior permite calcular una probabilidad para cada uno de los píxeles del grupo de imágenes. El exponente que aparece en la Eq.(3.16) se denomina *Distancia de Mahalanobis* y tiene propiedades estadísticas interesantes [1]. De hecho, se puede usar como tal para comparar probabilidades entre píxeles, ya que la dependencia de probabilidad en píxeles solo aparece en el exponencial de la Eq.(3.16) (*distancia de Mahalanobis*).

Por otro lado, en el diagrama de dispersión de los píxeles de las imágenes la transformación de los CPs se puede interpretar geoméricamente como una translación del origen al punto promedio de cada imagen seguida de una rotación rígida de ejes al nuevo sistema de coordenadas dado por los autovectores. Por lo tanto, la *distancia de Mahalanobis* se puede escribir también en la base de las imágenes originales como:

$$D^2 = (\mathbf{I}_k(\mathbf{p}) - \bar{\mathbf{I}}_k)^T \mathbf{S}^{-1} (\mathbf{I}_k(\mathbf{p}) - \bar{\mathbf{I}}_k) \quad (3.17)$$

donde $\mathbf{I}_k(\mathbf{p}) = [I_1(p), \dots, I_k(p)]^T$, siendo $I_{i=1..k}(p)$ el valor del píxel p en la imagen i para cada grupo, $\bar{\mathbf{I}}_k$ es el valor medio de la imagen correspondiente al ojo k en cada grupo y \mathbf{S}^{-1} es la inversa de la matriz de varianzas. Esta distancia se ha utilizado para detectar valores de píxeles defectuosos con el fin de clasificarlos como diferentes del resto. En algunos casos, se pueden clasificar como ‘píxeles anómalos’ [22] o como estructuras relevantes dentro del conjunto de datos [23]. En nuestro caso, se emplea la *distancia de Mahalanobis* para detectar aquellos píxeles relevantes de la imagen cuya distancia es mayor que un cierto umbral de probabilidad. Estos píxeles tienden a correlacionarse con estructuras significativas en el conjunto de datos [23]. En definitiva, los píxeles anómalos suelen aparecer más brillantes respecto a los demás.

C. Un ejemplo práctico

Tomamos como ejemplo las 9 imágenes de los cristalinos del grupo control marcados con anti-colágeno IV. Estas imágenes se guardan como una matriz de datos de 399665×9 (*pixeles x N.º de imágenes*).

El ACP se realiza utilizando la función *princomp* de Matlab. Este comando tiene la siguiente sintaxis:

$$[COEFF, Score, latent, tsquare] = princomp (datos)$$

Esta función devuelve:

- *COEFF*, es una matriz $p \times p$. Cada columna contiene coeficientes para un CP. Las columnas están en orden decreciente de varianza.
- *Score*, son los datos formados al transformar los datos originales en el espacio de los CPs.
- *Latent*, es un vector que contiene los autovalores de la matriz de covarianza de los datos.
- *Tsquare*, contiene el estadístico T2 de Hotelling.

Después de aplicar la función *princomp* a estas imágenes obtenemos los valores de los CPs. De modo que, la primera componente CP1 contiene el 94.1% de la variabilidad total, la segunda CP2 representa el 1.8%, la tercera CP3 representa 1.1%, y el resto de las componentes suman el 3%. La siguiente figura (Fig. III-5) muestra los CPs#1,2,7 en escala de grises ajustada para cada uno con el fin de mejorar su estructura espacial. Con este método, las diferentes estructuras espaciales de la imagen se muestran en orden decreciente de importancia.

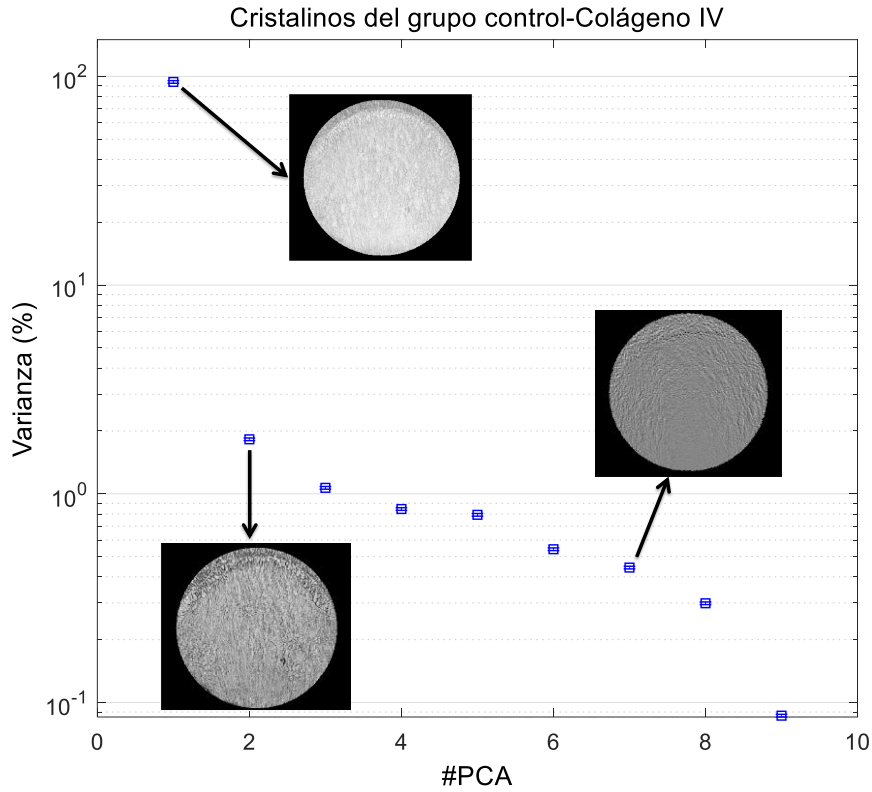


Figura III- 5: Estructura de los componentes principales para el grupo control con el anticuerpo anti-colágeno IV. Los CPs#1, 2, 7 se muestran al lado de sus autovalores.

Por otra parte, la función de densidad de probabilidad (pdf) mide las probabilidades con que una variable aleatoria continua toma diferentes valores [24]. En el caso de nuestras imágenes, la pdf normal multivariante se puede definir como:

$$f(x) = |2\pi\Sigma|^{-\frac{1}{2}} \exp\left\{-\frac{1}{2} (I_k(p) - \bar{I}_k)^T S^{-1} (I_k(p) - \bar{I}_k)\right\} \quad (3.18)$$

Lo que significa que es una función exponencial de la *distancia de Mahalanobis* del punto $I_k(p)$ al centro de la distribución \bar{I}_k .

La función de probabilidad acumulada (cdf) de una variable aleatoria X es la probabilidad $P(X \leq x_0)$ de que X sea menor o igual a un valor específico de x_0 [24]. La cdf es una función $F_x : \mathbb{R} \rightarrow [0,1]$, que adquiere valores en el intervalo [0,1] y se obtiene integrando la función pdf ($f(x)$) entre los límites $-\infty$ y x_0 :

$$F(x_0) = P(X \leq x_0) = \int_{-\infty}^{x_0} f(x) dx \quad (3.19)$$

Utilizaremos dos funciones de Matlab para generar ambas funciones pdf y cdf.

La *pdf* y la *cdf* de la *distancia de Mahalanobis* para el grupo control marcado con anti-colágeno IV se muestran en la figura III-6. Fijamos el umbral en el valor que representa distancias 10% más altas, es decir, *cdf* mayor que 0,9. En el caso de la figura III-6 el valor del umbral sería 27,07. Este umbral se ha seleccionado para poder visualizar más claramente la zona de alta distancia relevante. Un umbral muy alto selecciona puntos individuales en lugar de zonas, mientras que uno menor no difiere mucho del mapa de la distancia total de Mahalanobis. Por lo tanto, hemos elegido un nivel intermedio del 90% que parece ser el umbral más adecuado en este caso. El resultado se observa en la figura III-6, donde se representa el mapa de la distancia de Mahalanobis total junto a los píxeles cuya distancia es superior al 10%. En esta misma figura, se puede ver que los píxeles seleccionados representan principalmente la parte anterior del cristalino.

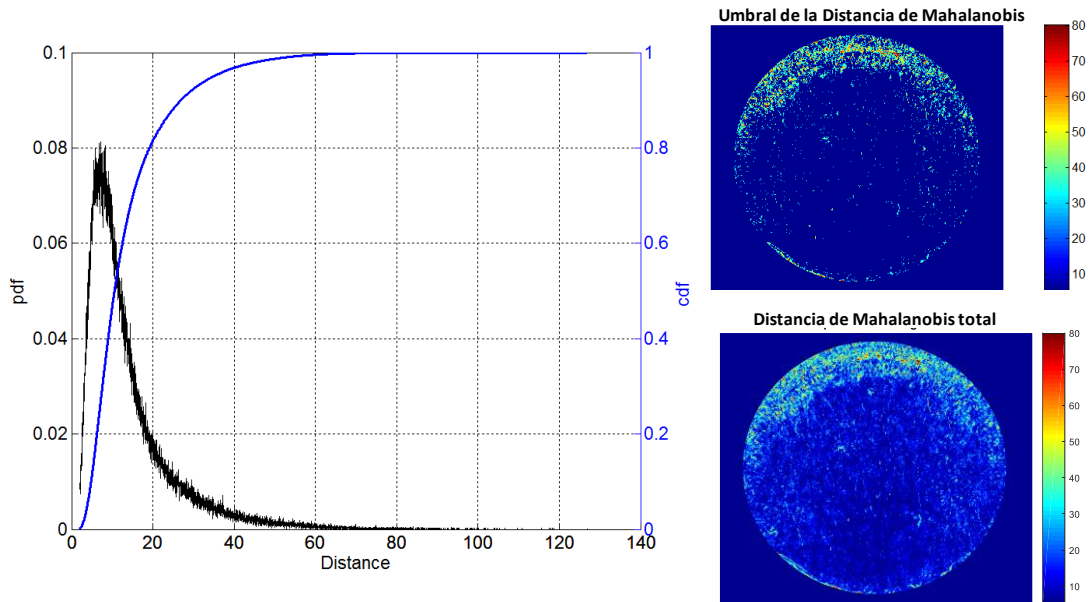


Figura III- 6: Función de distribución de probabilidad (*pdf*, eje izquierdo) y función de distribución acumulada (*cdf*, eje derecho) para las imágenes de cristalino del grupo control marcadas con anti-colágeno IV. La imagen de arriba muestra los píxeles con la distancia de Mahalanobis mayor que el umbral utilizado (27.07 para una *cdf* mayor que 0.9) mientras que la imagen de abajo muestra el mapa total de la distancia de Mahalanobis.

II. APLICACIÓN DEL MÉTODO Y RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN EL CRISTALINO

1.1 Resultados de la distancia de Mahalanobis

El método de la *distancia de Mahalanobis* se ha aplicado a las imágenes de los cristalinios de los tres grupos (Control, D2 y D8) marcados con anti-colágeno IV o anti-laminina-1. Los resultados se observan en la figura III-7.

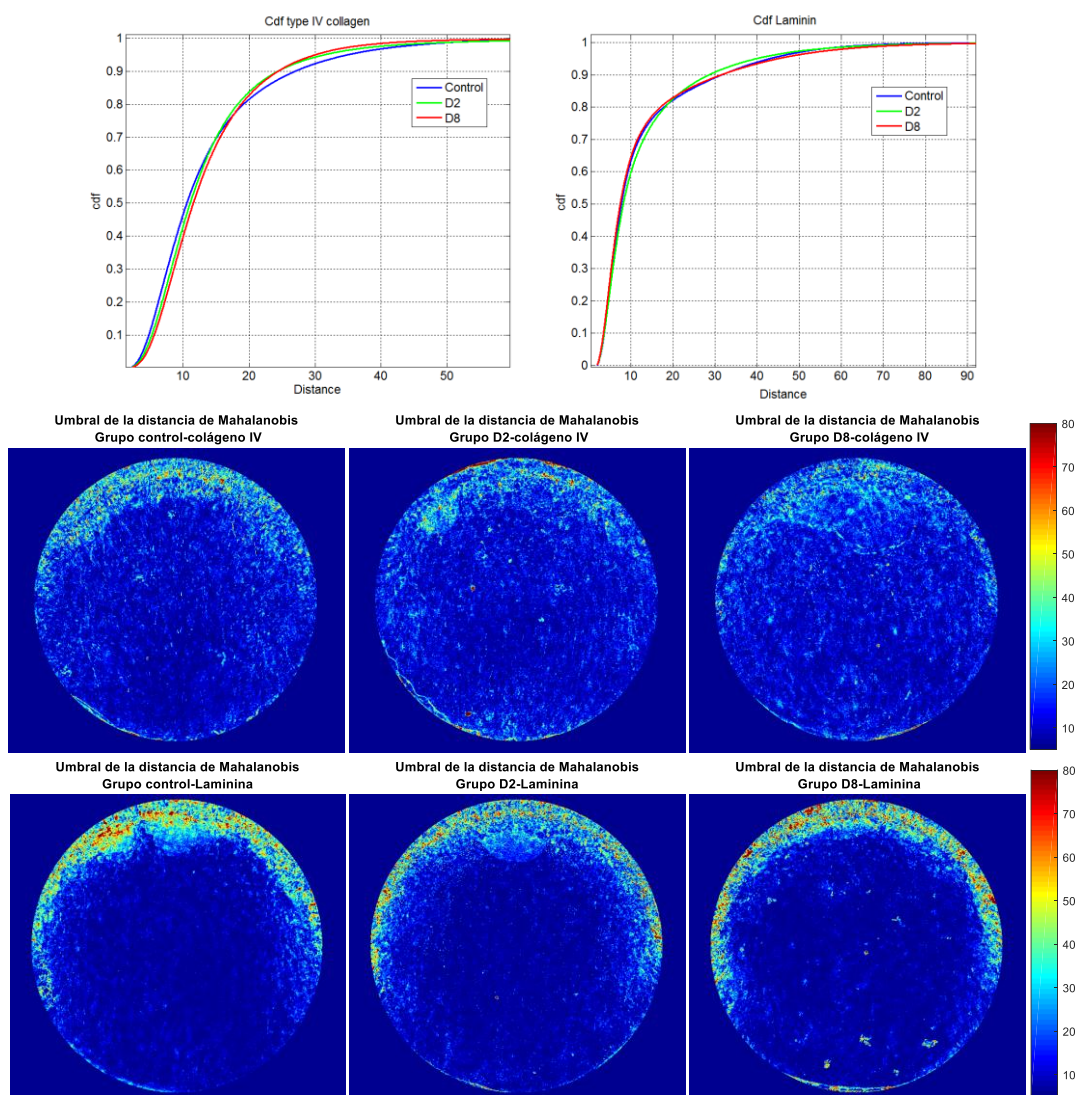


Figura III- 7: Función de distribución acumulada (cdf) para la distancia de Mahalanobis para los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV (izquierda) y anti-laminina-1 (derecha). Las imágenes muestran los píxeles con una distancia de Mahalanobis mayor que el umbral. El umbral de la distancia seleccionado es cuando la probabilidad acumulativa es superior a 0.9 para todos los grupos muestrales.

Las gráficas de la función *cdf* muestran, en el caso del colágeno IV, una ligera diferencia entre el grupo control y los deficitarios. No obstante, las *cdfs* de la laminina-1 son parecidas. Por otra parte, la comparación entre las imágenes del umbral de la distancia de Mahalanobis del colágeno IV y la laminina-1 muestra una cierta diferencia sobre todo en toda la zona de las células epiteliales. En el caso del colágeno IV, el número de píxeles seleccionados se extiende hacia el interior del cristalino en los grupos D2 y D8 comparados con el control. Sin embargo, en el caso de la laminina-1, en la región interna del cristalino la diferencia entre los grupos no es muy relevante, pero lo es en la zona epitelial.

Lo más destacado del análisis mediante la distancia de Mahalanobis es que la expresión espacial del colágeno IV y de la laminina-1 es distinta comparando el grupo control con los grupos D2 y D8. A continuación, estudiamos la cuantificación de la expresión de colágeno IV y laminina-1 y su regionalización en toda la estructura del cristalino.

1.2 Expresión espacial del colágeno IV y laminina-1 en el cristalino

Para valorar la expresión de ambas moléculas se aplica el ACP sobre los cristalinos de los grupos: control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV o anti-laminina-1. Los porcentajes de varianza de los datos para cada CP se muestran en la figura III-8. En los dos casos, colágeno IV y laminina-1, y para todos los grupos hay un primer CP que comprende la mayor cantidad de varianza (superior a 94%). Sin embargo, al fijarse en el gráfico de sedimentación correspondiente al colágeno IV observamos que el resto de CPs del grupo control, CP#2,3,4,5,6,7,8 representan varianzas mayores que las de D2 y D8. En cambio, observamos en el gráfico correspondiente a la laminina-1 que las CPs #2,3 del grupo D2 son similares a las del grupo control, mientras que el resto de los componentes #4,5,6,7,8 de los grupos D2 y D8 tienen varianzas más bajas que el control. Por esta razón, se agruparán los CPs en “*procesos*” de la siguiente manera:

- En el caso del colágeno IV, se va a denominar *proceso 1* (P1) al primer componente CP1 que representa la mayor variabilidad en los datos y se llamará *resto de procesos* (RP) a la agrupación de los CPs restantes, es decir del CP2 al CP9.
- En el caso de la laminina-1 hay 3 procesos, el primero P1 corresponde al componente CP1 que contiene la mayor variabilidad, el segundo P2 comprende los componentes CP2 y CP3 y finalmente el último proceso sería aquel que contiene la agrupación de los componentes restantes, desde CP4 hasta CP9.

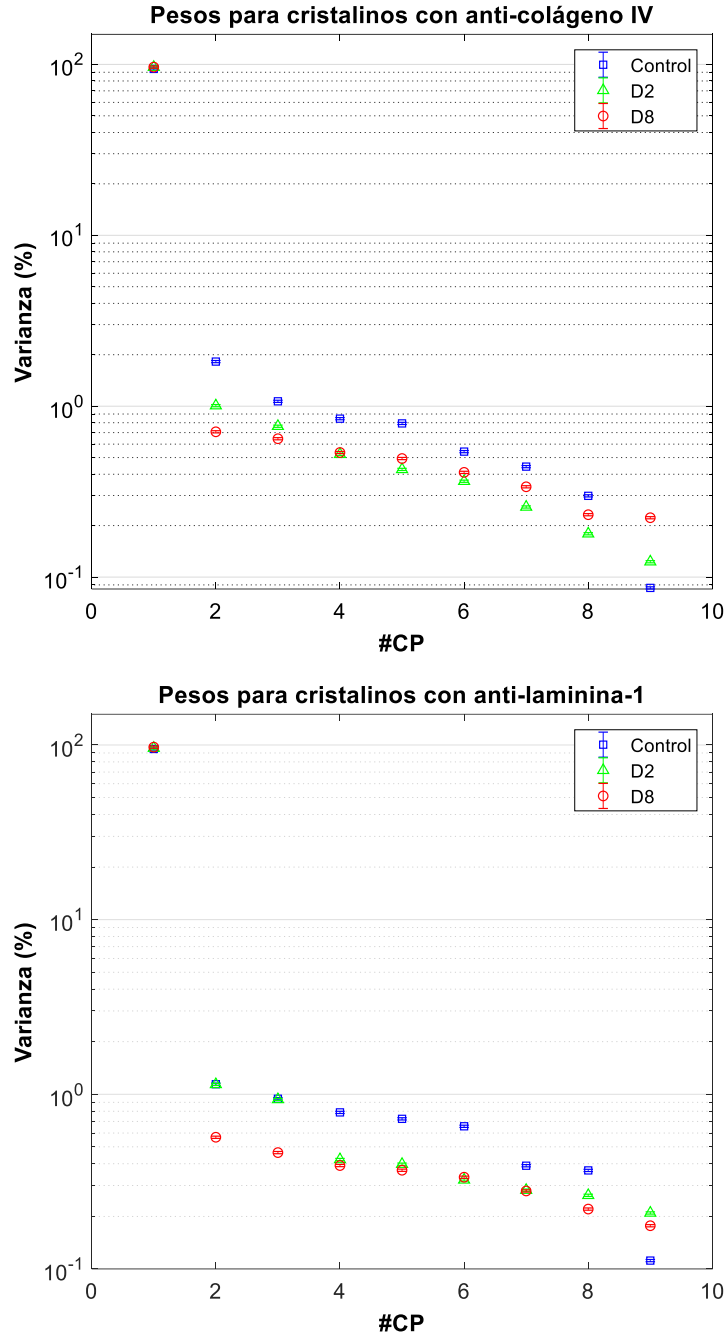


Figura III- 8: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza. Arriba, diagrama para cristalinicos marcados con anti-colágeno IV. Abajo, diagrama para cristalinicos marcados con anti-laminina-1.

El porcentaje de varianza representado por los diferentes procesos se da en la tabla III-2.

Este porcentaje está calculado mediante $\sum_{\alpha \in L} \Omega_{\alpha}$ donde $\Omega_{\alpha} = \frac{\lambda_{\alpha}}{\sum_{\alpha=1}^N \lambda_{\alpha}}$, y L es el conjunto de

CPs indexadas en los *procesos*.

TABLA III- 2: Porcentaje de varianza representado por la suma de los distintos autovalores en % para los cristalinos de los tres grupos muestrales: control, D2 y D8.

Colágeno IV						Laminina-1								
CPs del Control (%)		CPs del D2 (%)		CPs del D8 (%)		CPs del Control (%)			CPs del D2 (%)			CPs del D8 (%)		
1	2-9	1	2-9	1	2-9	1	2-3	4-9	1	2-3	4-9	1	2-3	4-9
94	6	96	4	96	4	95	2	3	96	2	2	97	1	2

Con el fin de determinar alteración en la expresión espacial de las dos moléculas colágeno IV y laminina-1 debido al déficit de AF, se ha definido un nuevo parámetro al que se ha denominado *Índice de Marcaje* $O_i^{P_i}$ ($l=\{\text{colágeno, laminina}\}$; $P_i=\{\text{CP1, CP2, and RP}\}$) tal que:

$$O_i^{P_i} = \frac{\overline{R(l_{Def}^{P_i})} - \overline{R(l_C^{P_i})}}{\overline{l_{I_C}}} \times 100, \quad (3.20)$$

donde $\overline{R(l_{Def}^{P_i})}$ es el valor medio de la rectificación respecto del proceso P_i de las imágenes de los grupos deficitarios (D2 o D8) marcadas con la molécula l , $\overline{R(l_C^{P_i})}$ representa lo mismo pero aplicada al grupo control, finalmente $\overline{l_{I_C}}$ es el valor medio del grupo control para la molécula l . Este índice indica la expresión espacial de la molécula analizada en porcentaje con respecto al grupo control. Además, analiza la expresión debida a cada P_i por separado (P1 y RP en el caso del colágeno IV y P1, P2 y RP en el caso de la laminina-1).

Como ejemplo, la figura III-9, representa el resultado para el proceso P2 del grupo D2 marcado con anti-laminina-1.

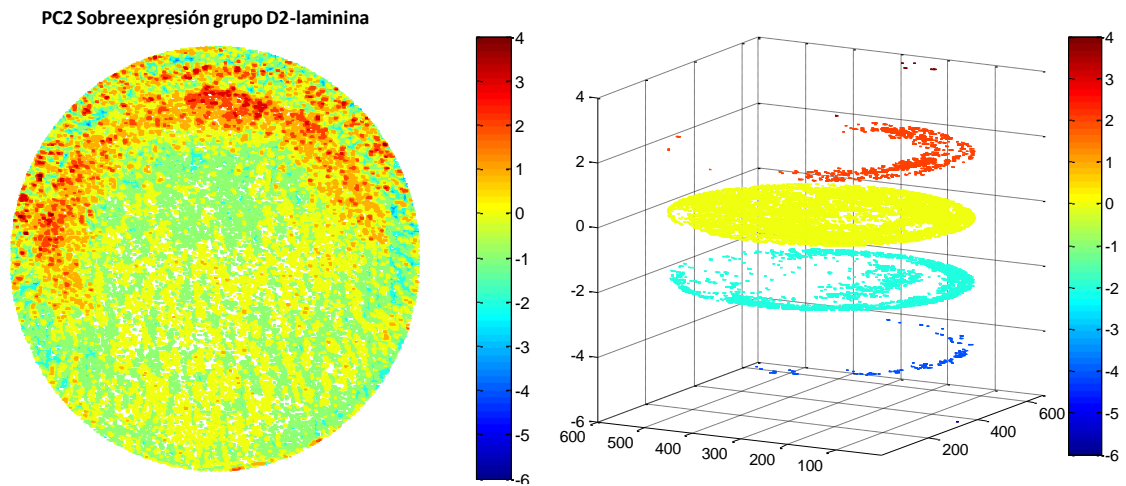


Figura III- 9: Índice de marcaje correspondiente al proceso P2 del grupo D2 marcado con anti-laminina-1 (rectificación con los CPs #2,3). Izquierda, visión frontal. Derecha, gráfico de nivel de contorno.

Los resultados del índice de marcaje para colágeno IV y laminina-1 se observan en las figuras III-10 y III-11.

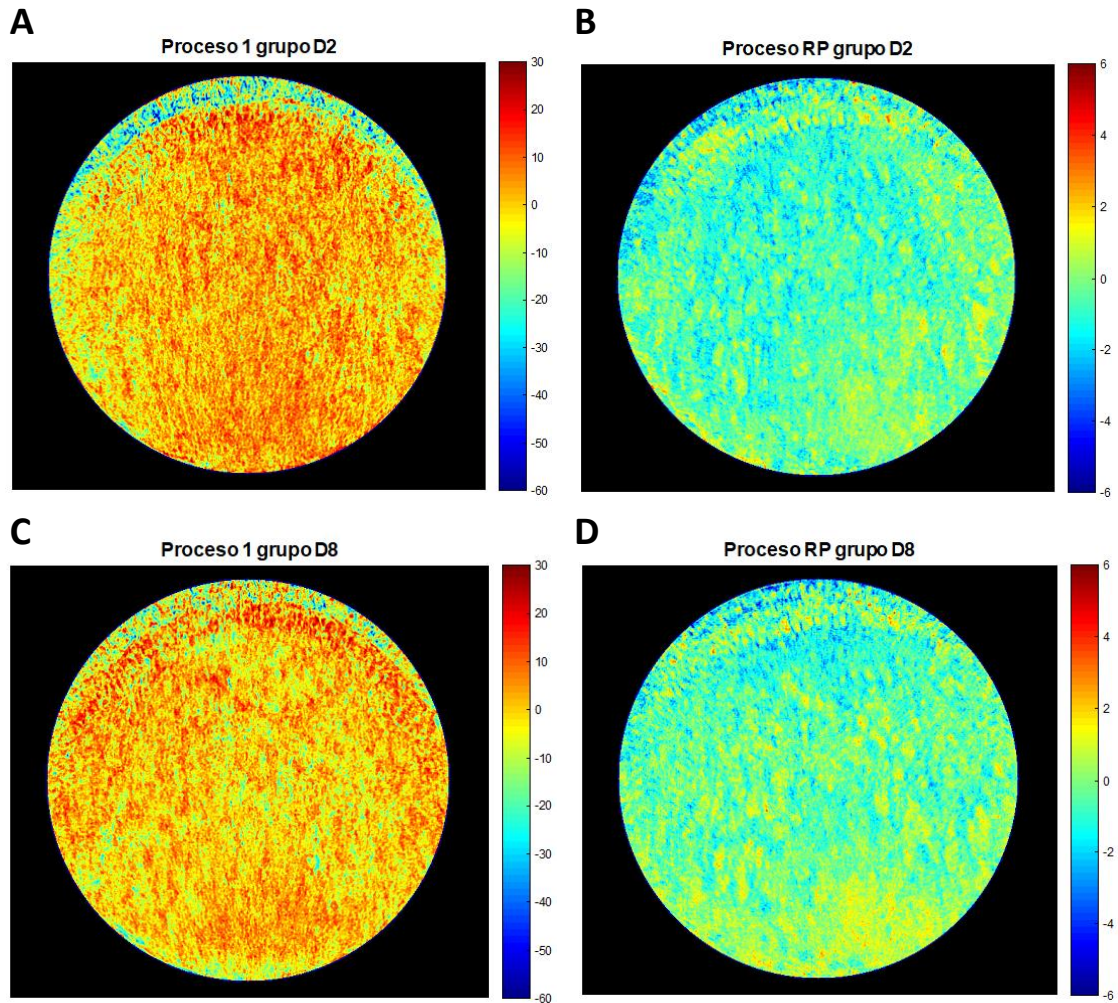


Figura III- 10: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 (A y B) y grupo D8 (C y D) marcados con anti-colágeno IV. La expresión del colágeno IV para las imágenes reconstruidas con el proceso P1 se observa en las figuras A y C (escala desde -60% hasta +30%), mientras que la reconstrucción para el resto de los procesos RP se observa en las figuras B y D (escala desde -6% hasta +6%)

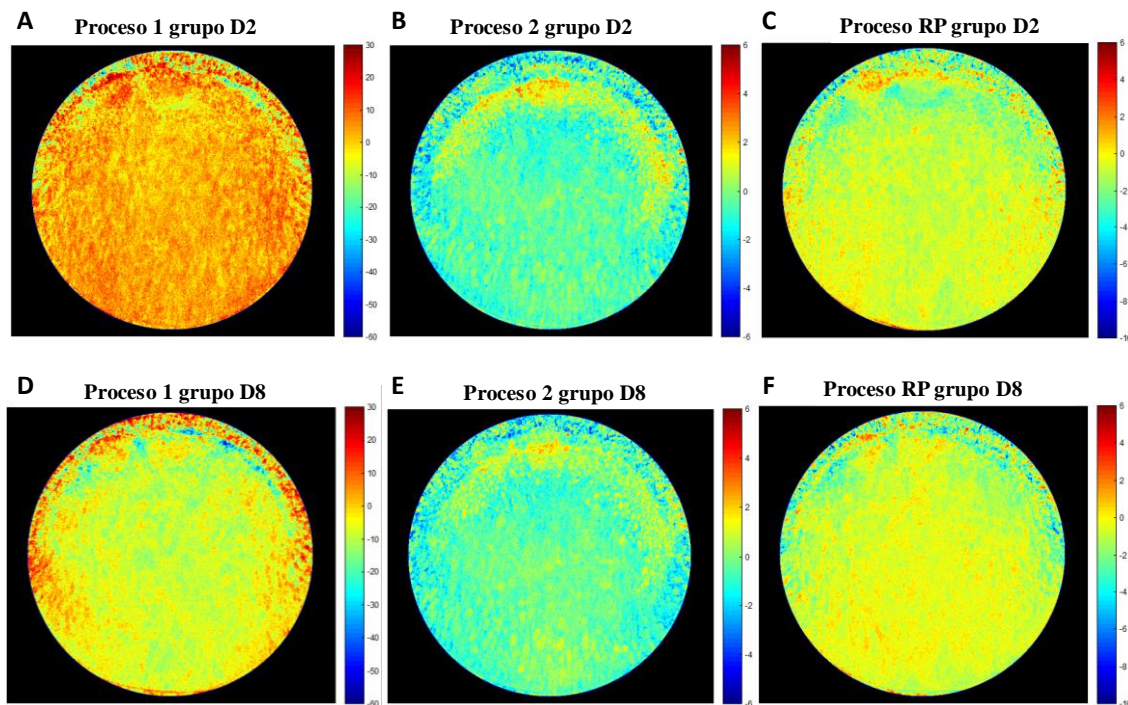


Figura III- 11: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 (A, B y C) y grupo D8 (D, E y F) marcados con anti-laminina-1. La expresión de la laminina-1 para las imágenes reconstruidas con el proceso P1 se observa en las figuras A y D (escala desde -60% hasta +30%), la reconstrucción para el segundo proceso P2 se observa en las figuras B y E (escala desde -6% hasta 6%), finalmente, la reconstrucción para el resto de los procesos RP se observa en las figuras C y F (escala desde -10% hasta +6%)

Según estos resultados, el déficit de AF afecta a la expresión de ambas proteínas, colágeno IV y laminina-1, en el cristalino. Para entender mejor los resultados, las imágenes se analizarán en las siguientes subsecciones. Las zonas donde se aprecian los cambios: las células epiteliales del cristalino (zona central y germinativa), zona de unión entre las fibras del cristalino y las células epiteliales, zona de transición, y finalmente en la zona de las fibras del cristalino. La siguiente figura (Fig. III-12) muestra un esquema explicativo en el que se muestran estas zonas.

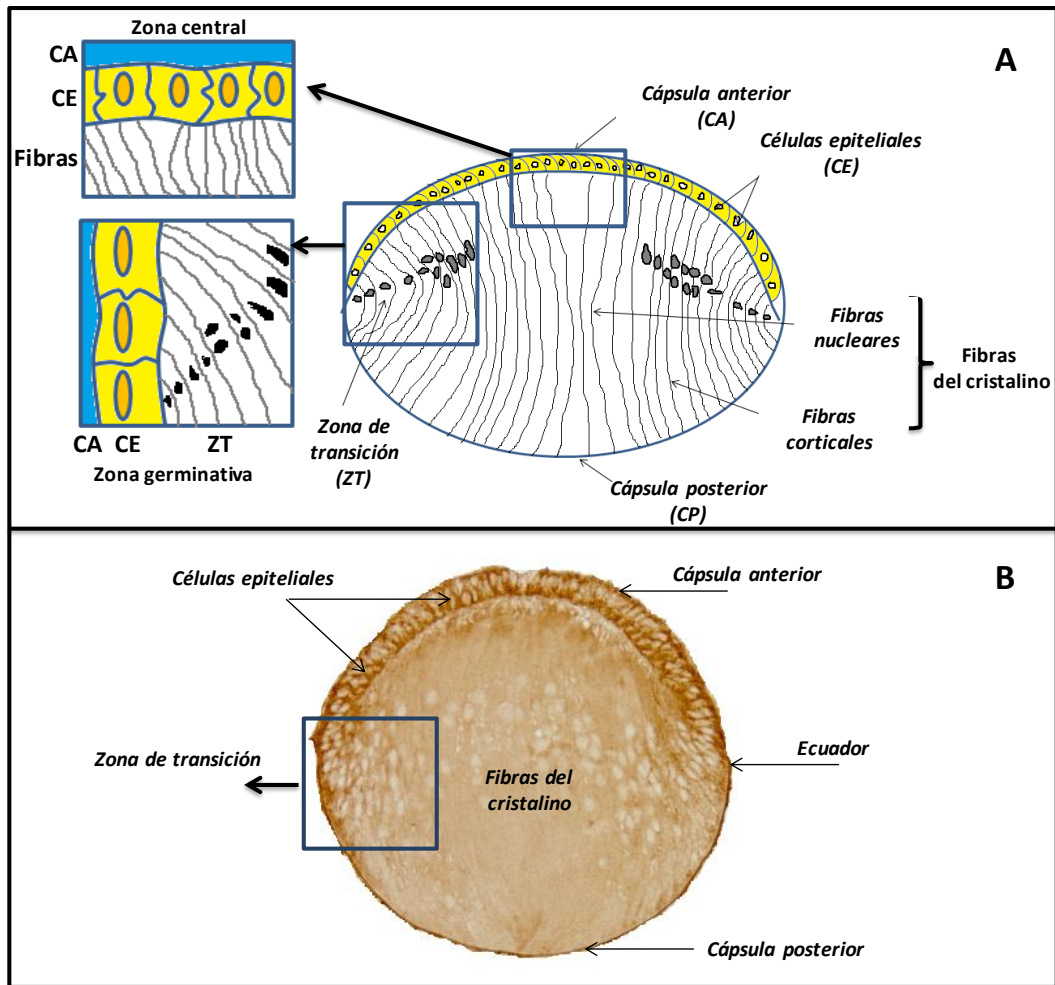


Figura III- 12: A, Dibujo esquemático del cristalino embrionario. B, cristalino embrionario de ratón control marcado con anti-colágeno IV. A, zona central (cuadrado superior), zona germinativa (cuadrado lateral) de la figura A.

Antes de proceder con el análisis de los resultados, hay que decir que la comparación cuando se toma solo la imagen media de cada grupo (Control, D2 y D8) no es una buena opción, ya que solo con la media se pierde mucha información. A continuación, se muestra una comparación usando los parámetros Ω_1 , Ω_m y θ definidas previamente. Los resultados de estos parámetros aparecen en la tabla III-3 para los grupos control, D2 y D8 marcados con colágeno IV o laminina-1.

TABLA III- 3: Valores de porcentaje de varianza representados por CP1 (Ω_1) y la imagen media (Ω_m). El ángulo (θ°) entre la dirección representativa de la media y el primer autovector para los distintos grupos muestrales marcados con colágeno IV o con laminina-1 aparece en la tercera fila de la tabla.

	Colágeno IV			Laminina-1		
	Control	D2	D8	Control	D2	D8
Ω_1 %	91.76	95.18	92.78	94.88	96.03	97.20
Ω_m %	91.03	94.95	91.77	91.51	94.99	96.07
θ°	5.15	2.81	6.03	10.91	5.98	6.20

Como se puede ver, ni la media ni el CP1 representan la estructura completa de los datos. En nuestro caso, existe una variación de entre el 5% y el 10% en las imágenes que no se explica por estos parámetros. Además, esta varianza inexplicada tiene una estructura espacial en la imagen ya que el ángulo entre la dirección de la media y el CP1 tampoco coincide. Particularmente en el caso de la laminina-1 es donde ocurre un cambio llamativo entre el grupo control y los grupos D2 y D8.

Dado que los CPs son una combinación lineal de las imágenes y por la ortogonalidad de los autovectores [18] podemos reconstruir las imágenes iniciales a partir de ellas usando la Eq.(3.15). De esta forma podemos reconstruir el resto de la varianza no representada por el CP1 manteniendo su estructura espacial para el estudio. Esta posibilidad no se da si solo tomamos la imagen media como representativa, porque, implícitamente, tomamos el resto de la varianza como ruido o algo que se debe ignorar. Esta es una de las grandes ventajas del método ACP. Es de destacar que el método muestra que hay una estructura en el 10% de los datos, lo cual es muy difícil de apreciar a ojo o mediante un método subjetivo, que es la forma habitual de evaluar este tipo de imágenes de microscopía.

Para comparar con la imagen media de cada grupo, se calcula un índice de marcaje similar al descrito anteriormente en la Eq. (3.20):

$$O_t^m = \frac{\overline{I_{Def}} - \overline{I_C}}{\overline{I_C}} \times 100 \quad (3.21)$$

donde $\overline{I_{Def}}$ es la media del grupo deficitario (D2 o D8), y $\overline{I_C}$ es la media del control.

Para los resultados de la tabla III-3, el resultado de este índice debe coincidir con el índice del CP1. La comparación de imágenes para los grupos D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV o anti-laminina-1 se muestran en las figuras III-13 y III-14:

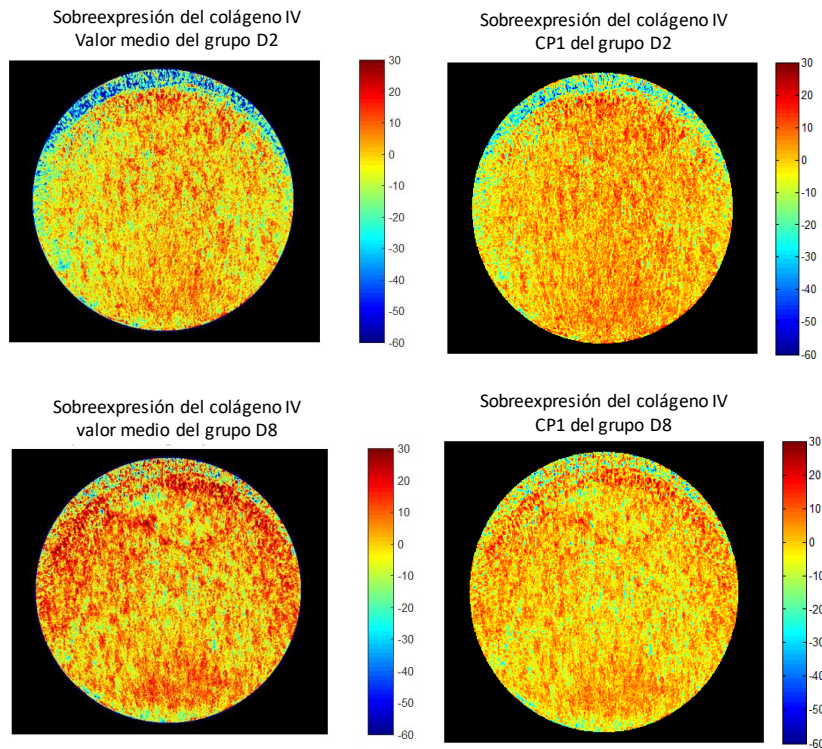


Figura III- 13: Índice de marcaje del colágeno IV para los grupos D2 (fila superior) y D8 (fila inferior). A la izquierda, se representan las imágenes medias para cada grupo en comparación con el grupo control. A la derecha, se representa el primer componente CP para cada grupo en comparación con el control.

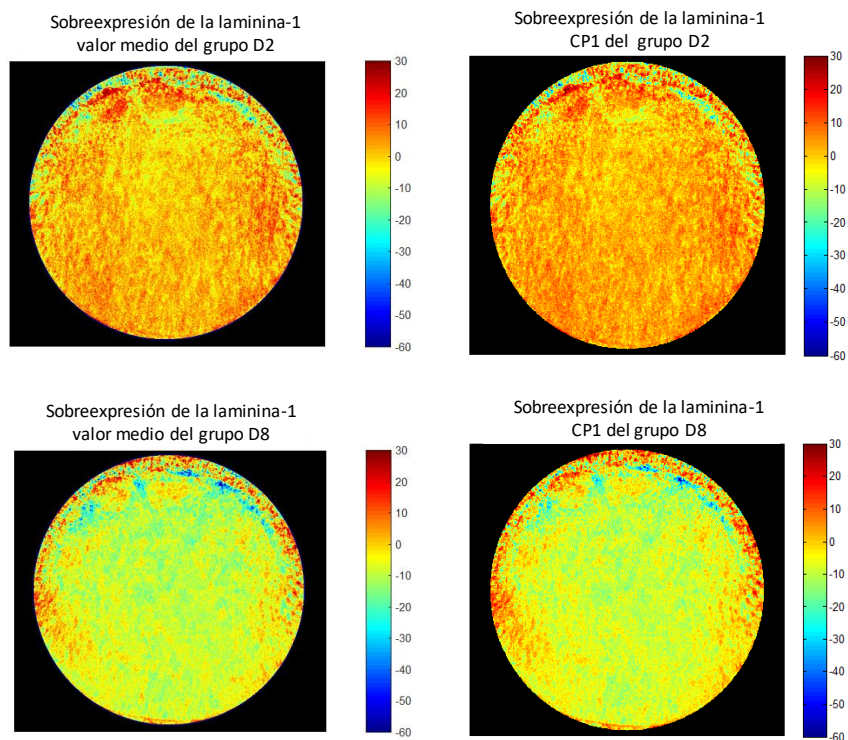


Figura III- 14: Índice de marcaje de la laminina-1 para los grupos D2 (fila superior) y D8 (fila inferior). A la izquierda, se representan las imágenes medias para cada grupo en comparación con el grupo control. A la derecha, se representa el primer componente CP para cada grupo en comparación con el control.

Como se esperaba de la tabla III-3, los resultados son distintos al comparar el índice utilizando el promedio de las imágenes con el índice usando la reconstrucción del CP1.

El verdadero poder del método de CPs se observa en las figuras III-11 y III-12. Donde la imagen del índice mencionado anteriormente se da por otros componentes principales distintos del CP1. Esto es especialmente interesante en el caso de laminina-1, donde se puede distinguir una alteración en el marcaje entre la zona de unión y zona epitelial con posible relevancia biológica y con una sobreexpresión de alrededor del 3% en comparación con el grupo control. Esto sería muy difícil de detectar mediante una evaluación microscópica de la imagen inmunohistoquímica, y eso es una de las grandes ventajas del método ACP. Asimismo, la técnica permite cuantificar y regionalizar el marcaje de las moléculas de forma automatizada, eliminando de forma sencilla la puntuación (scoring) subjetiva que suele tener lugar en estas imágenes. Finalmente, hay que recordar que el método ACP permite reconstruir todas las imágenes con los CPs requeridos. Es decir, para calcular el índice de la Eq. (3.20), las imágenes de cada grupo se reconstruyen con, por ejemplo, CP1. Obtenemos un total de 9 imágenes, cada una correspondiente a un cristalino diferente. En el índice tomamos el valor medio de la reconstrucción como representativo del grupo. De todos modos, es posible examinar cualquiera de estas nueve imágenes reconstruidas para ver la relevancia del CP1 en cada uno de los cristalinios individuales. Esto no se puede hacer si solo tomamos el valor promedio de las imágenes.

En las siguientes secciones se describen los cambios encontrados con respecto al grupo control para las dos proteínas (colágeno IV y laminina-1). Se analizan distinguiendo entre las diferentes partes del cristalino (véase Fig. III-12).

1.2.1 Expresión espacial del colágeno IV en el cristalino

Para el caso de las imágenes de colágeno IV, el método selecciona las imágenes reconstruidas con el proceso 1 (P1) y con el resto de los procesos (RP). En esta sección, se van a discutir los resultados observados para cada proceso junto con sus posibles causas biológicas. Es importante tener en cuenta que el método selecciona automáticamente las partes del cristalino y al mismo tiempo cuantifica la cantidad de sobre/infraexpresión de la proteína.

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

La reconstrucción de imágenes con P1 se observa en las figuras III-10A y III-10C. En estas imágenes se observa una sobreexpresión de colágeno IV del 1%-20%, aproximadamente, en la zona de las fibras. Se puede visualizar claramente esta sobreexpresión en la zona de las fibras en la figura III-15 (C y D), donde se ha aplicado a las imágenes una nueva máscara que marca solamente los puntos donde hay una sobreexpresión entre el 1%-10%. La sobreexpresión es más evidente en la zona de unión entre las fibras y las células epiteliales en el caso de D8 (figuras III-15H) que en D2 (figuras III-15D). Por lo contrario, hay una disminución de entre el 25% y el 10 % en la zona epitelial tanto en el grupo D2 como en el D8 (figuras III-15A y 15E) y (figuras III-10A y 10B). También se observa una disminución de entre el 1% y el 10% en otras zonas de las fibras, figuras III-15B y 15F.

En el día E14, durante el desarrollo normal del ratón, la superficie apical de las células epiteliales está en contacto con la mayor parte de la zona apical de las fibras del cristalino subyacentes, pero dicha unión aún no está completa. Firtina et al [25] relacionaron la sobreexpresión del colágeno IV en esta área con una pérdida de contacto entre las fibras y las células epiteliales, dando como resultado la formación de un espacio que separa las fibras de las células epiteliales. En nuestras secciones histológicas, esta pérdida de contacto en la zona de unión también se detecta y coincide con un aumento en el índice de marcaje en esta región (véase Fig. III-16).

Por otra parte, la sobreexpresión del colágeno IV observada en nuestro caso en las fibras del cristalino también ha sido observada por Firtina et al. que la atribuyen a la retención del colágeno IV dentro de las células de las fibras y al parecer induce cataratas [25].

Además, se ha observado una disminución de la expresión de colágeno IV en todas las células epiteliales. Se sabe que el déficit de AF produce disminución en la proliferación celular [26]. Dicha disminución podría dar como resultado una reducción en la síntesis de colágeno IV. Igualmente, una anomalía en la síntesis del colágeno puede reducir también la

proliferación de las células epiteliales del cristalino. De hecho, la alteración de la síntesis de colágeno en la piel se atribuye a la deficiencia de AF en la dieta [27]. Asimismo, se ha demostrado que la síntesis alterada de colágeno IV produce vacuolas en el cristalino y origina cápsula irregular [28, 29]. En nuestro caso, las vacuolas son visibles en varias secciones histológicas.

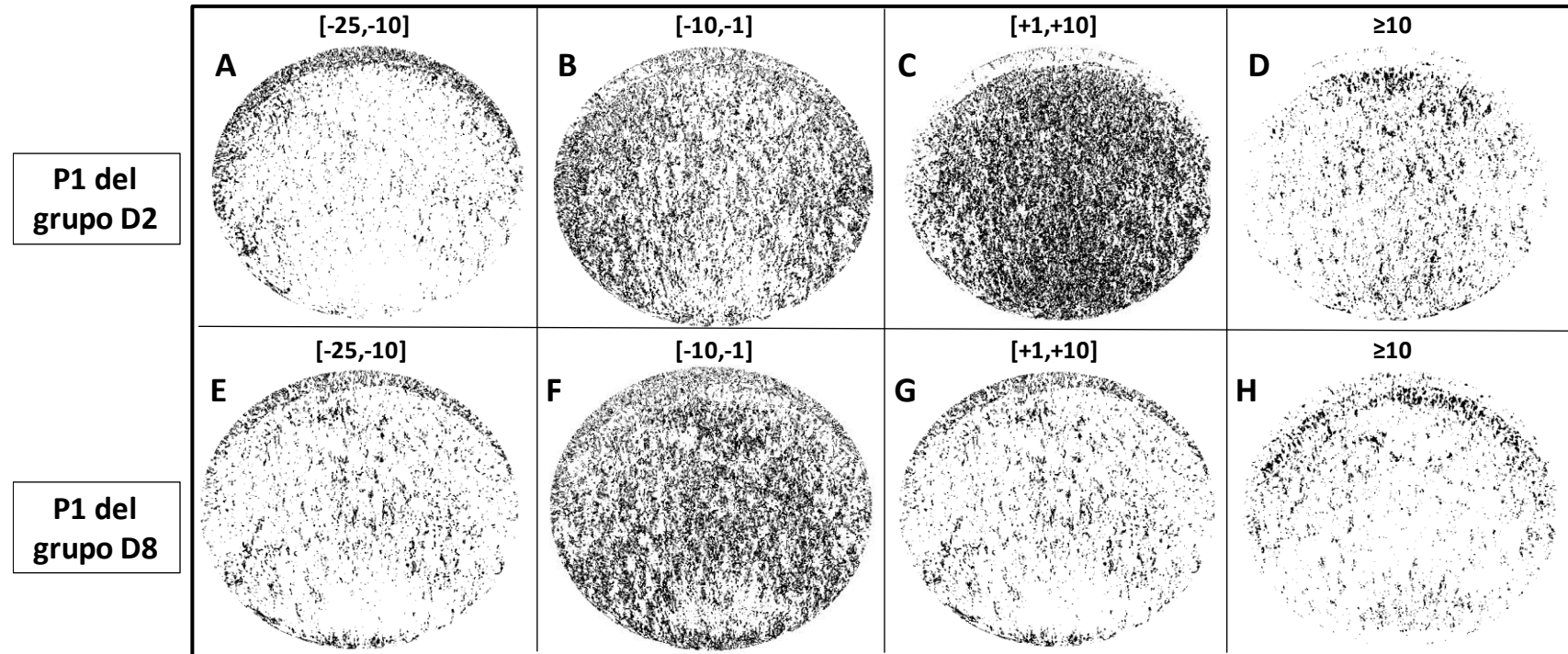


Figura III- 15: Regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en las distintas zonas del cristalino. Datos obtenidos del primer proceso P1.

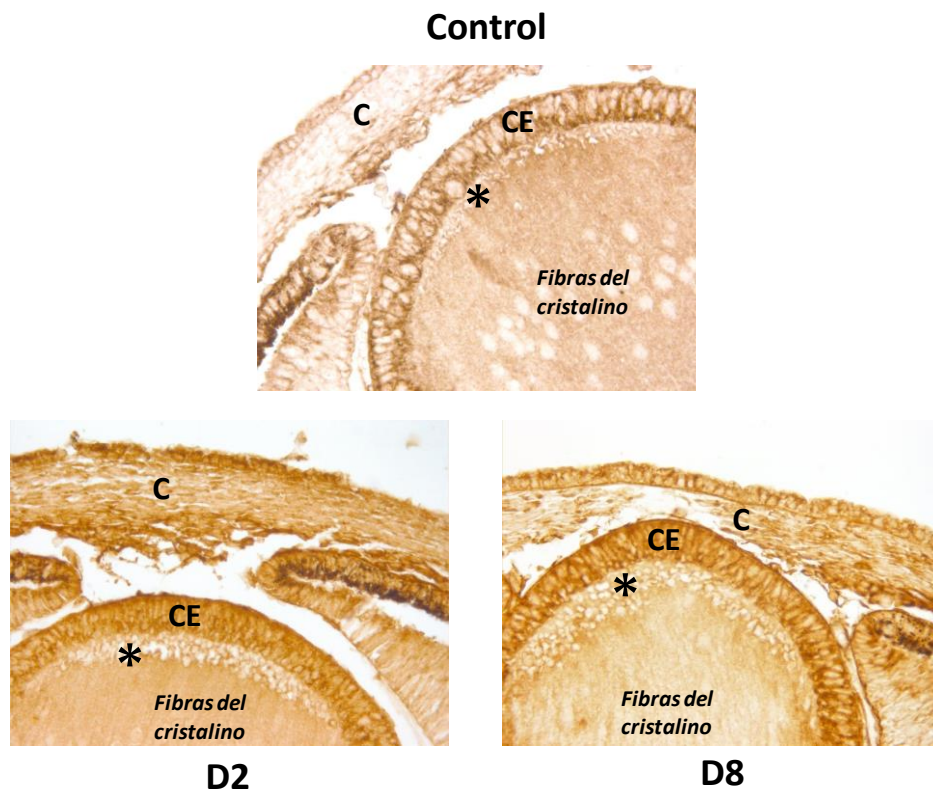


Figura III- 16: Zonas de unión entre las fibras y las células del epitelio del cristalino (*). Cristalino de un embrión control de E14,5 (arriba). Cristalino de un embrión D2 (abajo izquierda). Cristalino de un embrión D8 (abajo derecha). C: córnea. CE: células epiteliales del cristalino.

ii. Reconstrucción con el resto de los procesos (RP)

La reconstrucción con el último proceso, RP, muestra un ligero aumento de casi el 4% en la zona de unión entre las fibras y las células epiteliales, en ambos grupos D2 y D8 (véase Fig. III-10B y 10D). También se observa en el grupo D8 una sobreexpresión del 4% en el epitelio del cristalino (Fig. III-10D, III-17D). Y nuevamente, como en el caso del primer proceso P1, se observa una disminución de 4% en otras zonas de las células del epitelio (Fig. III-17A y 17B). Dada la ortogonalidad de los procesos dados por los CPs, estos cambios no ocurren exactamente en los mismos puntos que el proceso P1, lo que sugiere un mecanismo diferente de sobreexpresión o infraexpresión. Por lo tanto, el método puede usarse como una guía para el diseño de pruebas o experimentos que buscan encontrar estos mecanismos diferentes ya que, en sí mismo, solo proporciona información cuantitativa.

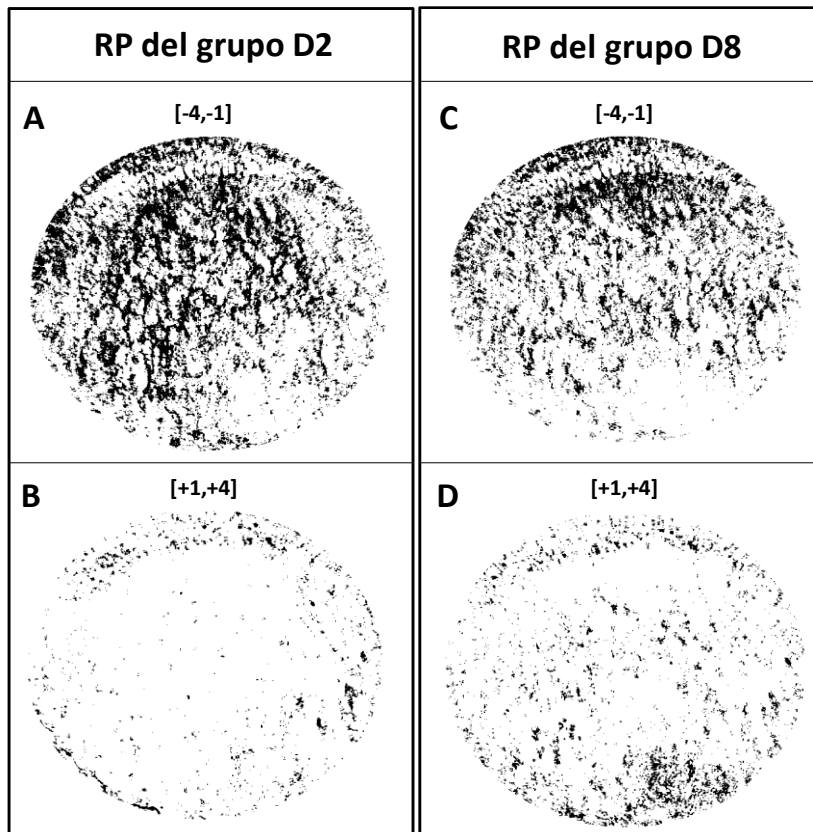


Figura III- 17: Regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en las distintas zonas del cristalino. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

1.2.2 Expresión espacial de la laminina-1 en el cristalino

Como se ha mencionado anteriormente, para el caso de laminina-1, los componentes CP#2-3 en el grupo D2 se comportan como en el grupo control. Para el grupo D8, el comportamiento es distinto mostrando una varianza menor que el grupo control (véase Fig. III-8). Para el resto de los componentes (RP), su peso es menor que en el grupo control, tanto para D2 como para D8. Por este motivo, se agruparán los CPs en procesos de la siguiente manera: un primer proceso (P1) que contiene la mayor variabilidad en los datos. Un segundo proceso (P2) que contiene los CPs 2 y 3 y, por último, un proceso final (RP) que contiene la reconstrucción de los datos con los CPs del #3 al #9.

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

En este caso, la sobreexpresión es mayor del 10 % en la zona de las células epiteliales, la zona de unión entre éstas y las fibras, y en la zona germinativa (Fig. III-11 A y D, III-18 D y H). Respecto al grupo D2, hay una sobreexpresión entre el 1% y el 10 % en la zona de las fibras (Fig. III-18C). Esta sobreexpresión es ausente en el grupo D8 (Fig. III-18D), sin embargo, en este grupo se aprecia una sobreexpresión más pronunciada entre el 1% y el 10% en varias zonas epiteliales, especialmente, en la zona germinativa y de transición. Se ha demostrado que la laminina promueve el crecimiento, la adhesión y la síntesis de proteínas en células epiteliales en vivo [30]. De hecho, se considera un potente regulador del comportamiento de las células epiteliales [31]. La laminina-1 es esencial para la formación de estructuras epiteliales, facilita que las células adquieran polaridad apicobasal y adopten un carácter epitelial [32]. Por lo tanto, la expresión de niveles más altos de laminina-1 en las células epiteliales en comparación con el grupo control puede tener un impacto notable en la función de las células epiteliales del cristalino. Yan et al. [33] han observado que la laminina-1 se expresó abundantemente en las células epiteliales del cristalino. En primer lugar, la consecuencia de este aumento en la expresión de laminina-1 interrumpió la señalización intracelular normal, así como la diferenciación celular, la polarización y la adhesión; todos son necesarios para el mantenimiento de la variabilidad e identidad de las células epiteliales y para la formación normal de las fibras del cristalino. Una deposición anormal de la laminina-1 puede causar desorganización de las proteínas de la MEC en la cápsula del cristalino, lo que puede influir en la homeostasis del epitelio del cristalino [34].

Por otro lado, el grupo D2 presenta una sobreexpresión entre el 1% y el 10 % en la zona de las fibras. No obstante, el grupo D8 presenta resultados opuestos: una infraexpresión de

hasta el 20 % en todas las fibras (Fig. III-18E y 18F). La disminución en la expresión de la laminina-1 en las fibras del cristalino podría conducir a una variedad de defectos y degeneración severa del cristalino. Estudios previos de embriones mutantes de laminina-1 han mostrado que las células del epitelio del cristalino y sus fibras no se diferencian adecuadamente [35].

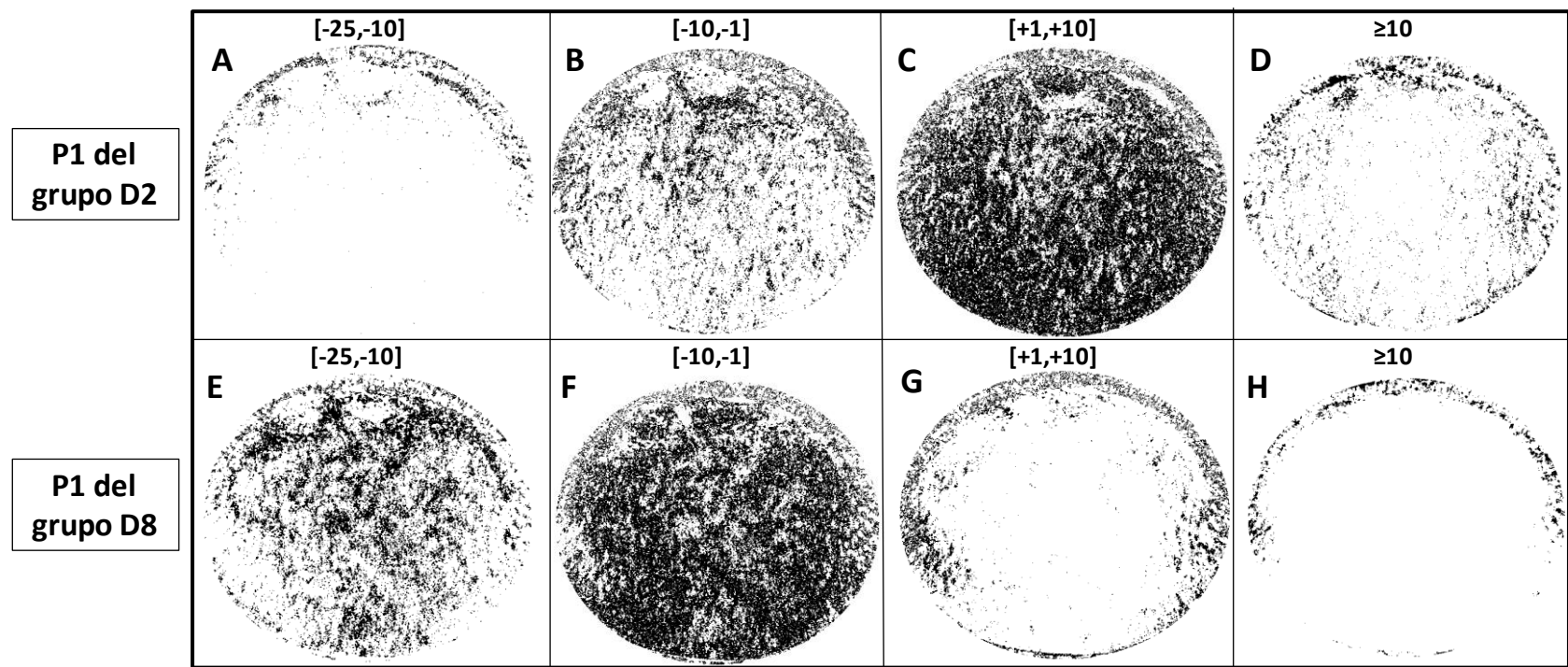


Figura III- 18: Regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en las distintas zonas del cristalino. Datos obtenidos del primer proceso P1.

ii. Reconstrucción con el segundo proceso P2

El segundo proceso, P2, sugiere un aumento de la expresión de la laminina-1 ~4% en la zona de unión (Fig. III-19 B y D). En cambio, se observa una disminución de 4% en algunas zonas del epitelio y las fibras (Fig. III-19 A y C). Esto podría ser un hecho relevante, tal vez porque la sobreexpresión es pequeña en comparación con el enmascaramiento producido en la imagen no tratada con el método ACP.

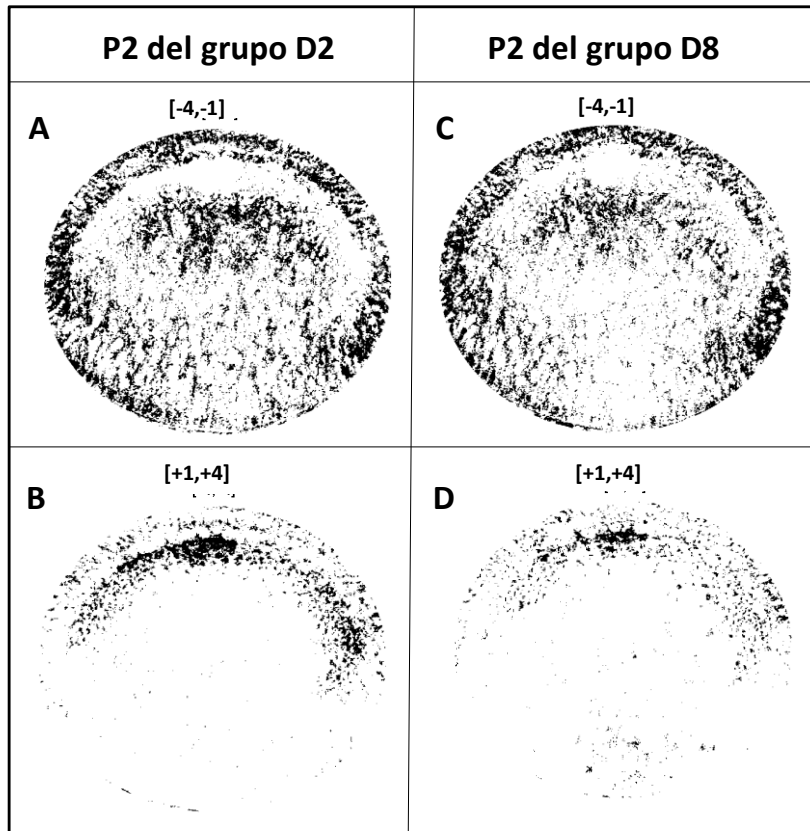


Figura III- 19: Regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en las distintas zonas del cristalino. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

iii. *Reconstrucción con el resto de los procesos RP*

Respecto al último proceso, RP, las imágenes obtenidas de sobreexpresión (Fig. III-20 B y D) revelan un aumento en la expresión del 6%, sobre todo, en toda la zona que rodea al cristalino, lo que se ve marcado puede que sea la cápsula del cristalino. Por otra parte, las figuras III-20A y III-20C, muestran una infraexpresión de la laminina-1 de hasta un 6% prácticamente en todas las zonas del cristalino.

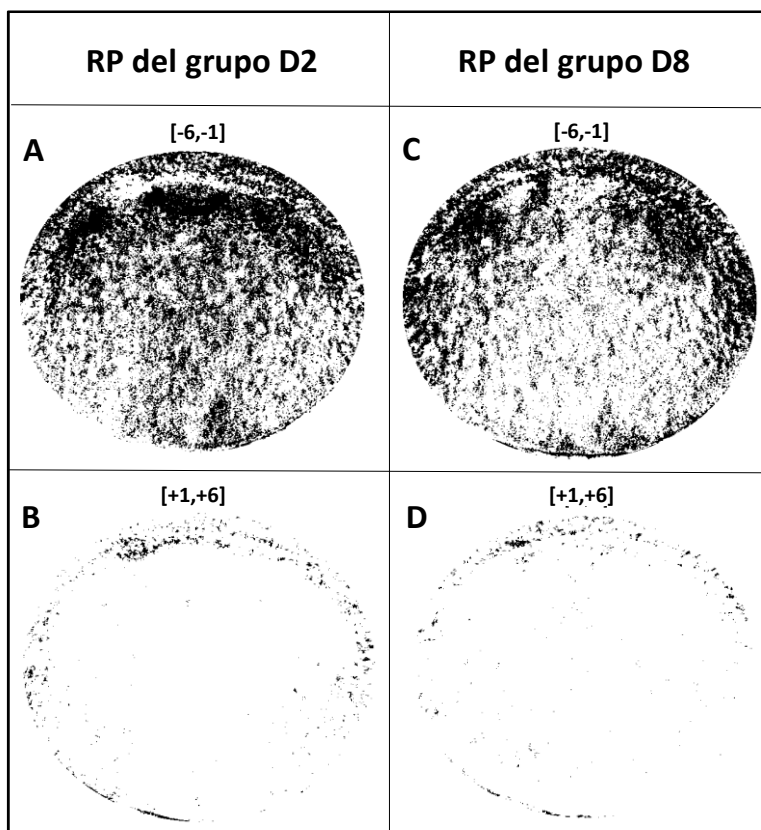


Figura III- 20: Regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en las distintas zonas del cristalino. Datos obtenidos del tercer proceso P3.

Es importante señalar el hecho de que el comportamiento general del colágeno IV es opuesto a la laminina-1. Debido al déficit de AF, el colágeno IV tiende a aumentar su expresión en la zona de las fibras mientas que disminuye en la zona de las células epiteliales. No obstante, la laminina-1 aumenta su expresión en todas las zonas de las células epiteliales: zona central, de transición y germinativa. Por otra parte, suele tener infraexpresión en la zona de las fibras.

2. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN LA CÓRNEA

Como se ha mencionado en el capítulo I, las macromoléculas como el colágeno IV y la laminina-1 que al principio se pensaba que estaban restringidas a las MBs también se expresan en los tejidos conectivos incluido el estroma corneal [36-38]. En este apartado se aplicarán los mismos pasos descritos en el apartado anterior para estudiar cambios en el patrón de expresión de dichas moléculas debido al déficit materno de AF.

Los porcentajes de varianza de los datos para cada CP se muestran en la figura III-21. Como se puede observar, el gráfico de sedimentación correspondiente al colágeno IV muestra que existe un primer CP que comprende la mayor cantidad de varianza, en ella el grupo control tiene una mayor varianza que D2 y D8. Luego, el grupo D2 en el segundo componente tiene mayor variabilidad que el control y D8. Los CPs #3-4 de D2 y D8 tienen varianza más baja que el control. Finalmente, los CPs #5,6,7,8,9 del grupo D8 tienen mayor varianza que el control y D2. En cambio, el gráfico de laminina-1 muestra que el primer componente del grupo D2 tiene mayor varianza que el control y D8. Luego, los CPs #2-3 del grupo control tienen varianza más alta que D2 y D8. Finalmente, el resto de los componentes del grupo D8, CPs # 4,5,6,7,8 supera los del control y D2. De modo que, al igual que en el cristalino, vamos a agrupar los CPs en “procesos” de la siguiente manera:

- En el caso del colágeno IV, el primer proceso P1 corresponde al CP1 que contiene la mayor variabilidad, el segundo P2 contiene al CP2, el tercero P3 se obtiene al agrupar los componentes CPs #3-4. Finalmente, el último proceso RP sería aquel que contiene la agrupación de los componentes restantes, desde CP5 hasta CP9.
- En el caso de la laminina-1, se llamará proceso 1 (P1) a ICP1. Después, llamaremos proceso 2 (P2) a la agrupación de CPs #2-3. Finalmente, el resto de los procesos (RP) será la agrupación de los CPs restantes, del CP2 al CP9.

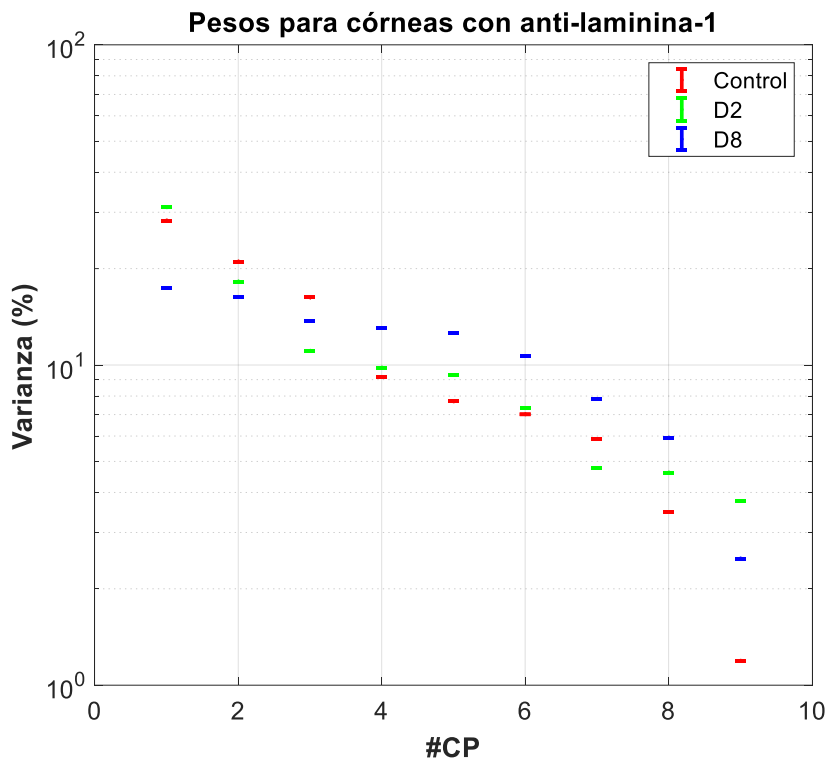
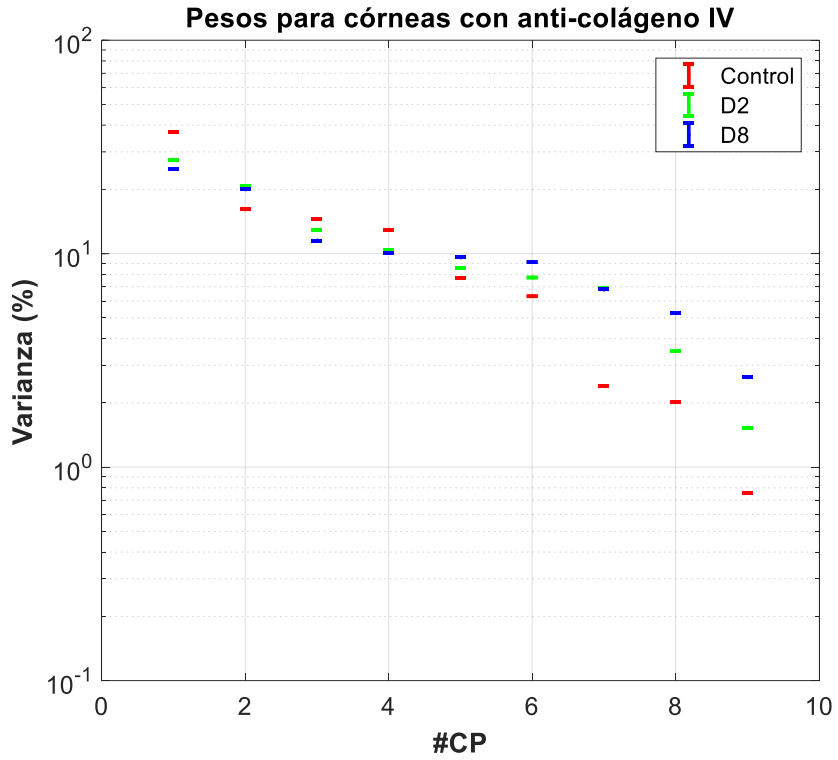


Figura III- 21: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza. Derecha, diagrama para córneas con anti-laminina-1. Izquierda, diagrama para córneas con anti-colágeno IV.

El porcentaje de varianza representado por los diferentes procesos se da en las tablas III-4 y III-5.

TABLA III- 4: Porcentaje de varianza representado por la suma de los distintos autovalores en % para las córneas marcadas con anti-colágeno IV de los tres grupos muestrales: control, D2 y D8.

Colágeno IV											
CPs del Control (%)				CPs del D2 (%)				CPs del D8 (%)			
1	2	3-4	5-9	1	2	3-4	5-9	1	2	3-4	5-9
37,2	16,1	27,5	19,2	27,6	20,8	23,3	28,3	25	20	21,6	33,4

TABLA III- 5: Porcentaje de varianza representado por la suma de los distintos autovalores en % para las córneas marcadas con anti-laminina-1 de los tres grupos muestrales: control, D2 y D8.

Laminina-1								
CPs del Control (%)			CPs del D2 (%)			CPs del D8 (%)		
1	2-3	4-9	1	2-3	4-9	1	2-3	4-9
28,3	37,3	34,4	31,1	29,3	39,6	17,4	30	52,6

2.1 Expresión espacial del colágeno IV en la córnea

Para el caso de las imágenes de colágeno IV, el método selecciona las imágenes reconstruidas con el proceso 1 (P1), el proceso 2 (P2), el proceso 3 (P3) y el resto de los procesos (RP). A continuación, se analiza cada uno de los procesos por separado.

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

Hay que recordar que la zona seleccionada de la córnea contiene solo el estroma corneal, tanto su porción anterior como posterior. La reconstrucción de P1 se muestra en la figura III-22 para el grupo D2 y en la figura III-23 para el D8. En estas mismas figuras, se representan también dos figuras donde se observa la cuantificación de la infra/sobreexpresión del colágeno IV después de aplicar a las imágenes una nueva máscara que marca en negro únicamente los puntos donde hay una infraexpresión entre -20% y -1% o sobreexpresión entre 1 % y el 15%.

En general, para el grupo D2, se observa una disminución en el marcaje del colágeno IV en la porción anterior del estroma acompañada por una sobreexpresión en su porción posterior.

Por otra parte, los resultados de P1 para el grupo D8 muestran un comportamiento distinto del colágeno IV. Existe una sobreexpresión del colágeno IV de hasta un 15% en gran parte del estroma corneal. El déficit de AF altera la síntesis de dicha molécula de forma más destacada en el grupo D8 que en el D2. En ambos casos podemos decir que la composición del estroma corneal se altera debido al déficit materno de AF.

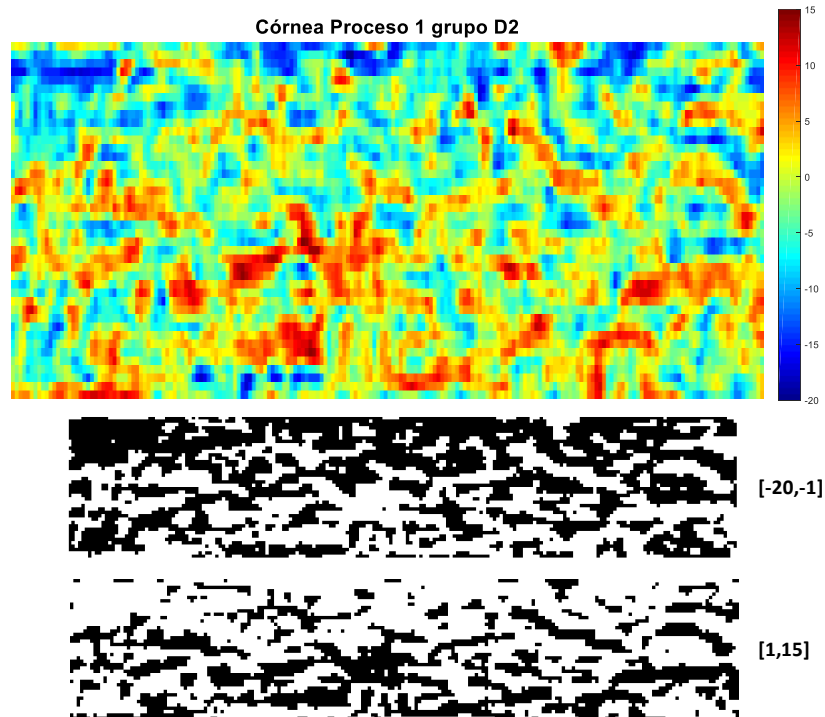


Figura III- 22: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del primer proceso P1.

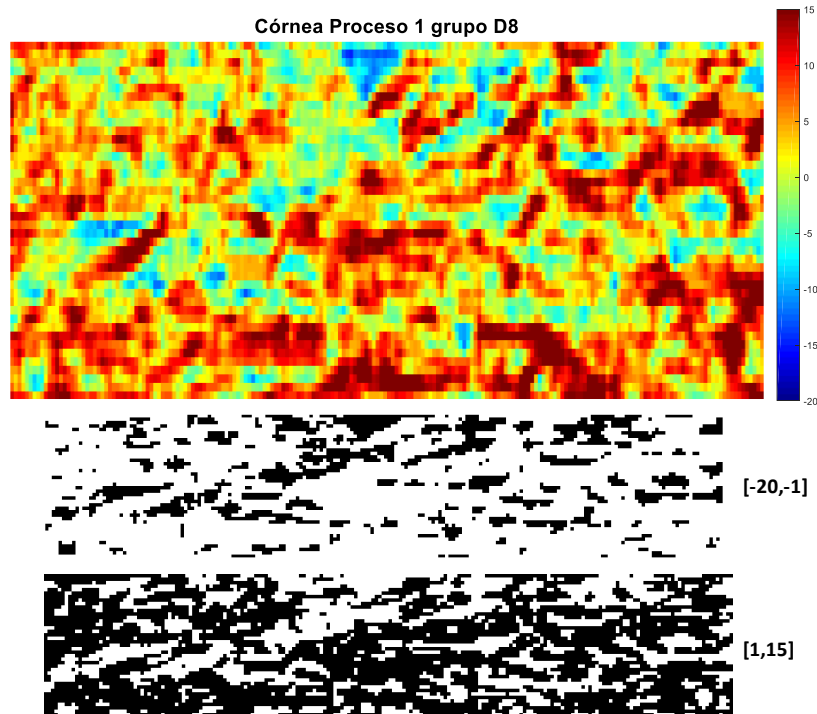


Figura III- 23: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del primer proceso P1.

ii. Reconstrucción con el segundo proceso P2

En esta reconstrucción, se observa una sobreexpresión de colágeno IV entre 1% y 6% (Fig. III-24 y III-25). Una córnea transparente requiere una expresión espacial y temporal coordinada de diversos genes durante el desarrollo embrionario. Por eso es necesario una organización única de la MEC en el estroma además de un apropiado estado de diferenciación de las células [40]. Los queratoblastos son las células principales que sintetizan los componentes moleculares del estroma corneal embrionario. Continúan proliferando y se diferencian en queratocitos. Éstos proliferan más lentamente y sintetizan altos niveles de colágenos y proteoglicanos [41-43]. Los queratocitos interactúan para coordinar los pasos de reguladores del estroma, las alteraciones en éstas moléculas resultan en alteración en la transparencia de la córnea lo que lleva a una biopatología del estroma corneal, como distrofias del estroma, cornea plana y queratocono [44].

Por otra parte, se observa un infraexpresión de colágeno IV de hasta un 6 %. Este resultado puede que signifique que los haces de colágeno o las laminillas están separados por múltiples espacios incluso más amplios que los observados en el grupo control. En esta reconstrucción podemos decir que la organización del estroma corneal se altera debido al déficit materno de AF.

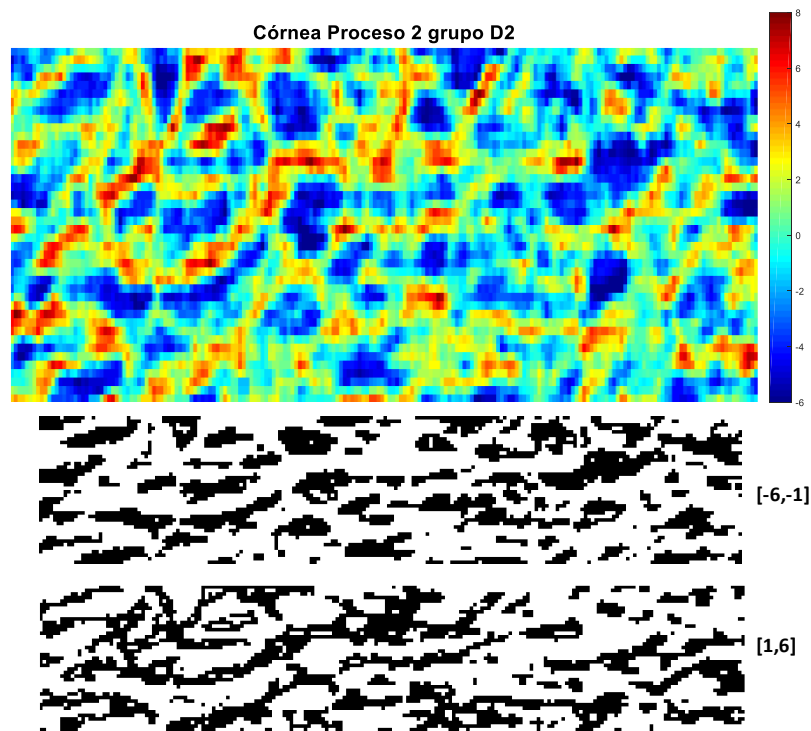


Figura III- 24: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

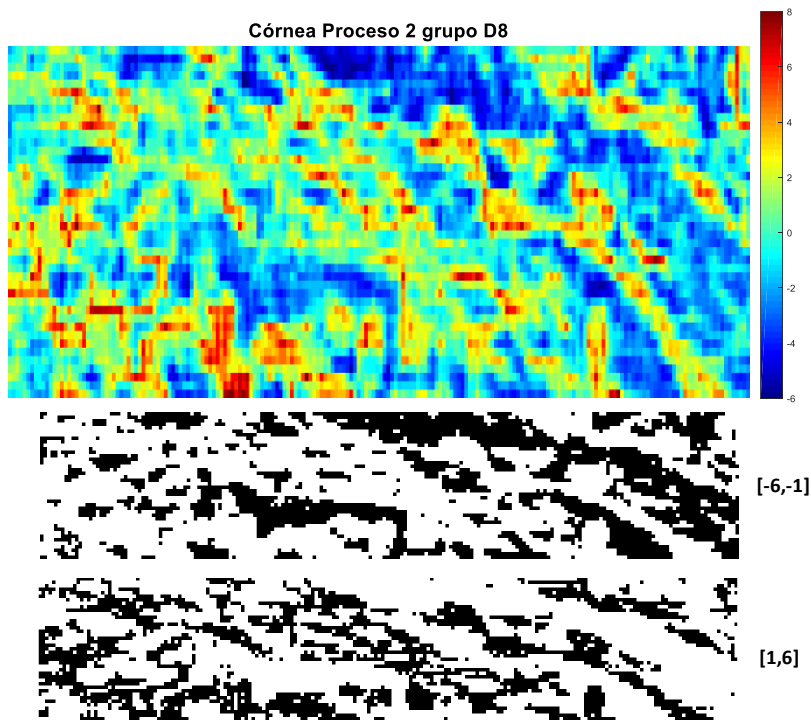


Figura III- 25: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

iii. Reconstrucción con el tercer proceso P3

La siguiente reconstrucción muestra, sobre todo, una sobreexpresión de hasta un 15% en diversas zonas del estroma corneal distintas de las zonas detalladas en las reconstrucciones anteriores. Como se ha dicho en el apartado del cristalino, dada la ortogonalidad de los procesos obtenidos por los componentes principales, los cambios no ocurren exactamente en las mismas zonas que los procesos anteriores.

Respecto a la infraexpresión observada, entre un 1% y un 15%, en este caso también al parecer indican el espaciado entre las laminillas (Fig. III-26 y III-27).

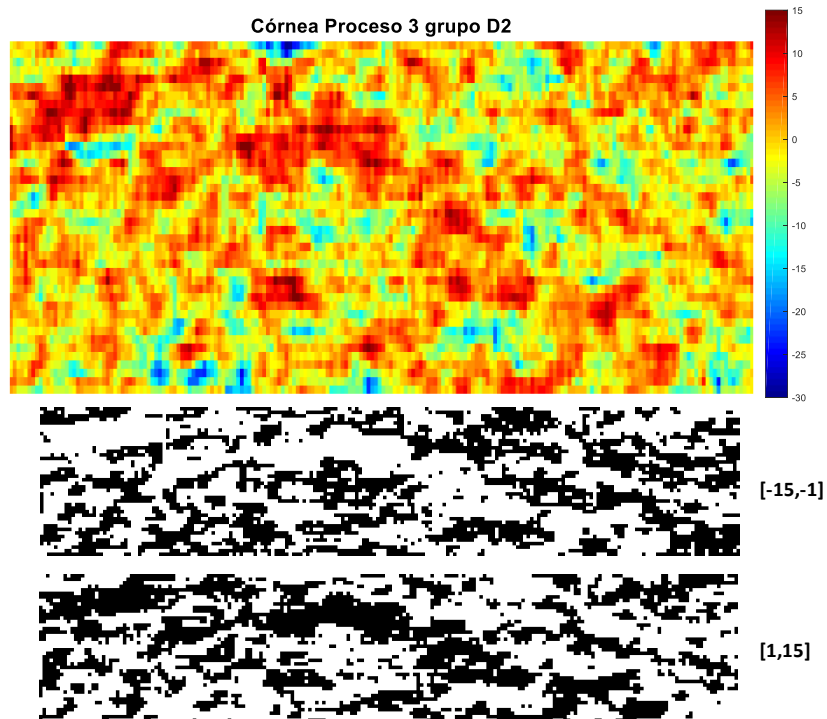


Figura III- 26: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del tercer proceso P3.

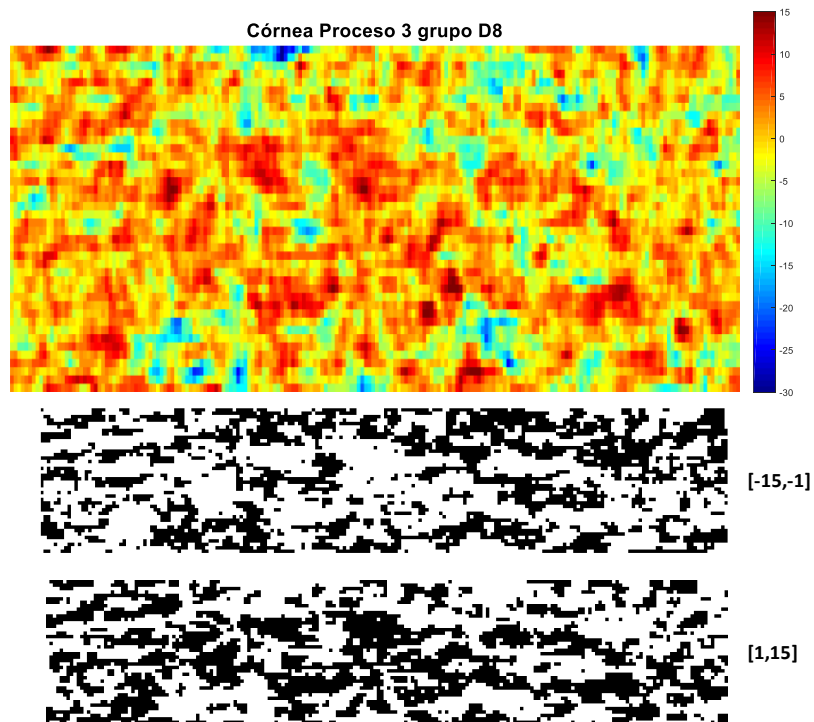


Figura III- 27: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del tercer proceso P3.

iv. Reconstrucción con el resto de los procesos RP

Las figuras III-28 y III-29, muestran el resultado de la reconstrucción con RP. La sobreexpresión está marcada mayoritariamente en la zona central y posterior del estroma. La sobreexpresión no es homogénea, sino irregular y fragmentada. En un estudio realizado por Fitch et al. se muestra que en la matriz estromal de la córnea aviar existen unas estructuras en forma de placas que contienen colágeno IV. Dichas placas tienen una forma irregular y son dispersas a lo largo del estroma [45]. Es probable que la sobreexpresión indicada en esta reconstrucción esté en estas placas.

La infraexpresión probablemente indica disminución del marcaje en estas zonas o bien marca zonas espaciadas o huecos.

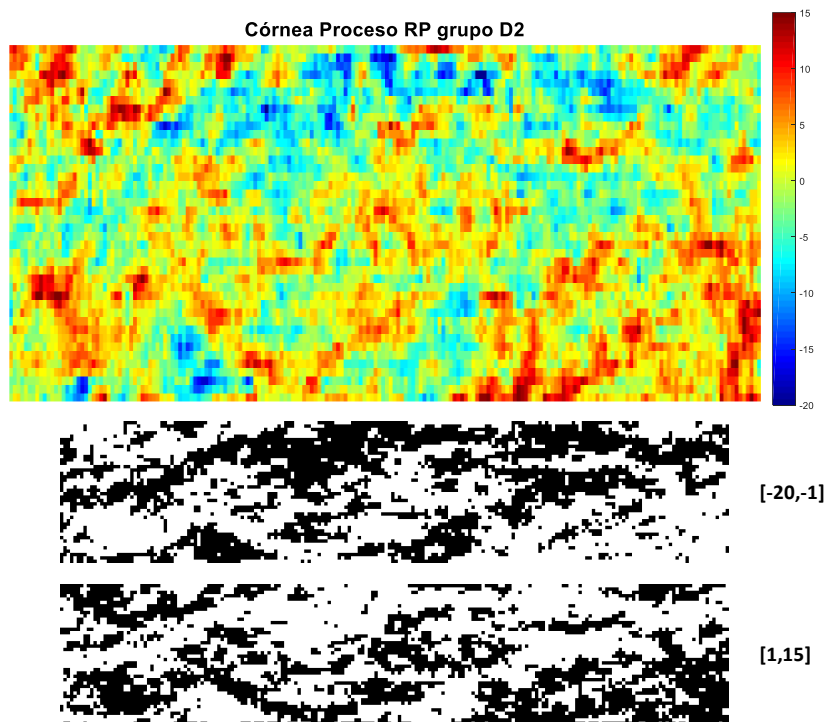


Figura III- 28: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del último proceso RP.

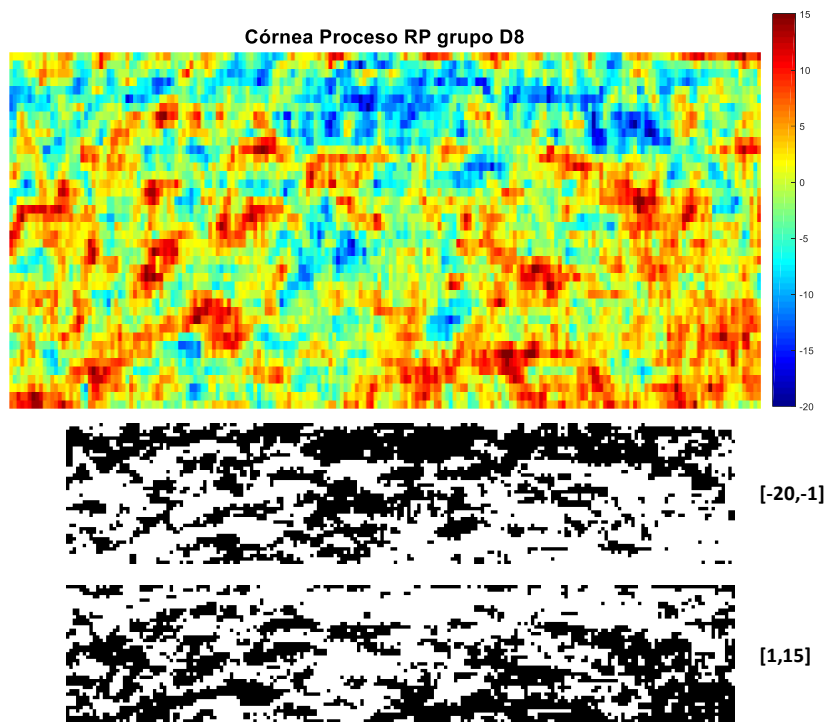


Figura III- 29: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la córnea. Datos obtenidos del último proceso RP.

2.2 Expresión espacial de la laminina-1 en la córnea

En la córnea del ratón, la laminina-1 se ha localizado en distintas áreas del estroma. En concreto, se ha detectado en estructuras o placas alargadas amorfas, que parecen morfológicamente similares a la lámina densa. Algunos de estos elementos alargados están en contacto con un lado de los queratocitos mientras que otros están localizados entre grandes fibras de colágeno cruzadas. A través de la inmunofluorescencia se ha observado que estas placas se distribuyen homogéneamente por todo el estroma corneal [46].

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

Contrariamente a lo observado en la reconstrucción con el primer proceso del colágeno IV, la laminina-1 en el estroma corneal sufre una infraexpresión de hasta un 15% (Fig. III-30 y III-31 para los grupos D2 y D8, respectivamente). Por otra parte, en el grupo D2, existe una sobreexpresión de hasta el 8% en una zona concreta del estroma posterior.

Las glicoproteínas, como las lamininas, juegan un papel cardinal en la córnea. Actúan como factores reguladores manteniendo en equilibrio la naturaleza biológica de la córnea [47]. Varios estudios han demostrado que la laminina a nivel corneal mejora la adhesión celular, apoya y protege las células con el fin de mantener la transparencia [48]. En la córnea, las células responsables en sintetizar la laminina-1 son las del epitelio corneal y los fibroblastos estromales [49]. Aunque en cultivo, se ha observado que los queratocitos corneales sintetizan laminina en cantidades mayores que las células epiteliales corneales [36]. La alta disminución en el índice de marcaje de la laminina-1 observada en la parte central del estroma puede que sea debida a una alteración en la síntesis, fundamentalmente en los fibroblastos.

Asimismo, es posible que la disminución en el estroma anterior sea debida a una alteración en una parte de las células epiteliales lo cual va a dañar a las propiedades adhesivas y migratorias de dichas células.

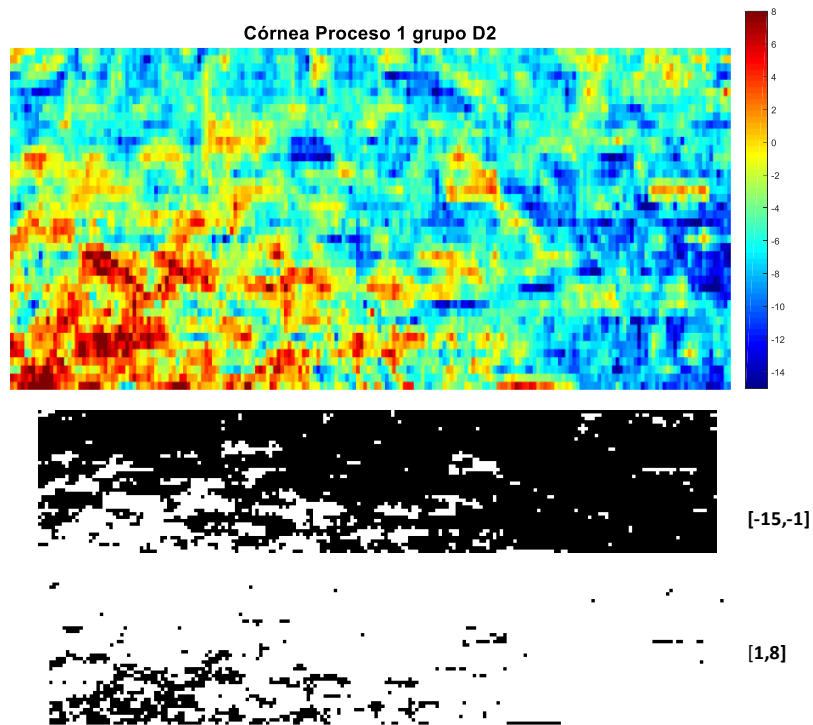


Figura III- 30: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del primer proceso P1.

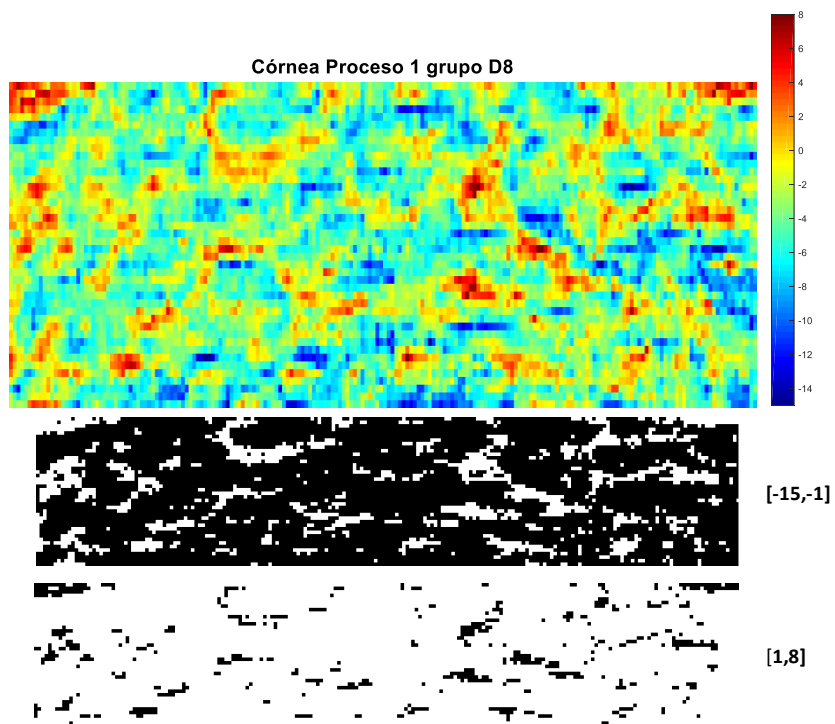


Figura III- 31: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del primer proceso P1.

ii. Reconstrucción con el segundo proceso P2

La reconstrucción con P2 observada en las figuras III-32 y III-33, muestra una mezcla entre sobreexpresión, aproximadamente de hasta 11%, y una infraexpresión, hasta un 15%, en todas las áreas del estroma corneal. Es probable que la infraexpresión aquí se refiere a los espacios en el estroma ya que no es tan acusada. Por otra parte, la sobreexpresión es debida a un aumento en la expresión de la laminina-1 en las zonas marcadas. Se sabe que los queratocitos estromales producen grandes cantidades de laminina-1 [50]. Posiblemente, estas células estromales que producen los componentes de la MEC, como el colágeno IV y la laminina-1, son los responsables de su acumulación anormal en las córneas de los grupos D2 y D8. Se ha observado que en la cicatriz hiper celular estromal la deposición de laminina era más elevada de lo normal [49]. Algo similar se ha observado también en las córneas humanas después de la cirugía refractiva [51].

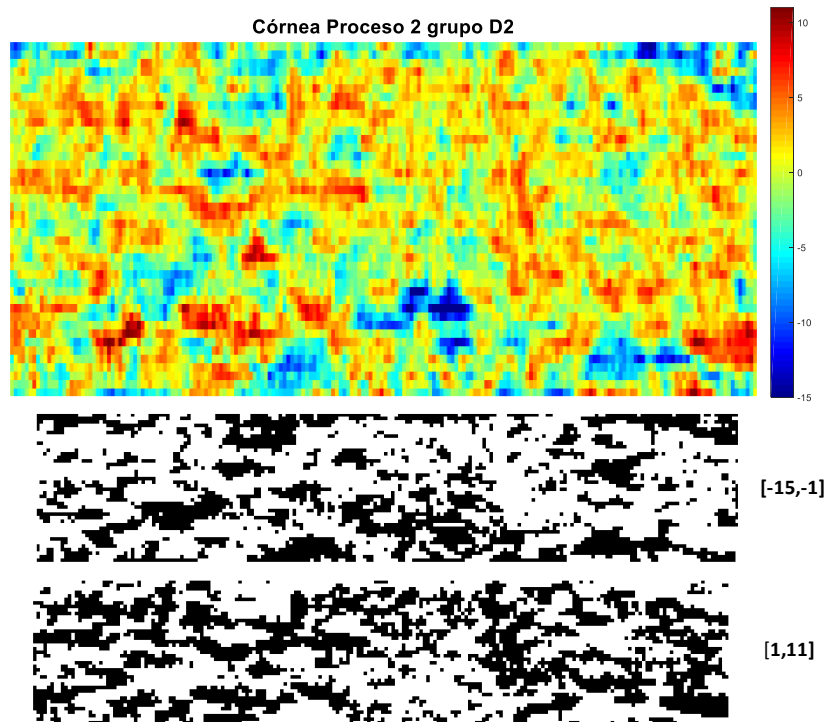


Figura III- 32: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

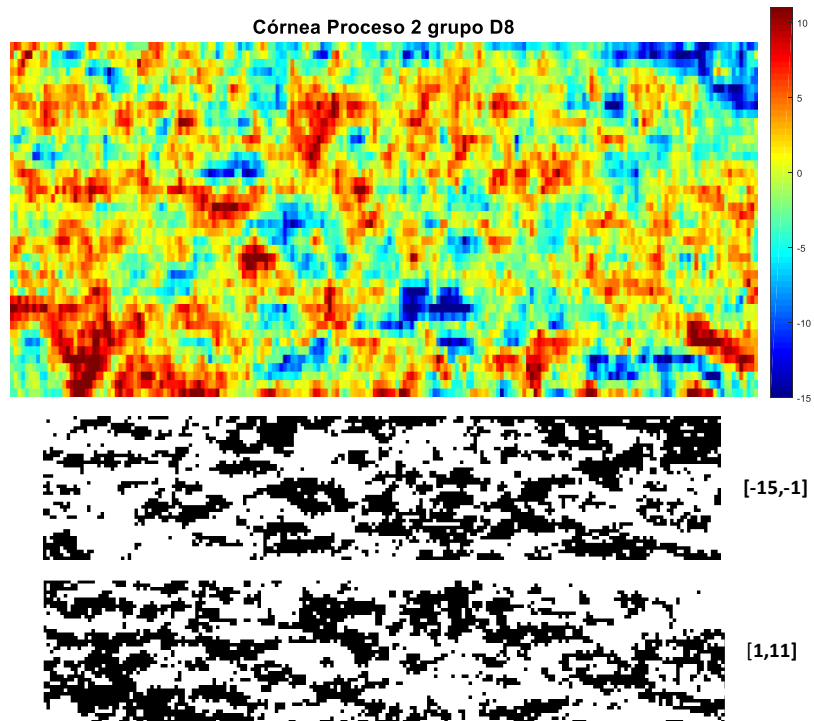


Figura III- 33: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

iii. Reconstrucción con el resto de los procesos RP

En la última reconstrucción, figuras III-34 y III-35, se observa el mismo comportamiento que el proceso anterior. Es decir, una infraexpresión de hasta un 15% y sobreexpresión hasta el 11%. La diferencia entre ambas reconstrucciones se halla en que los cambios no ocurren exactamente en las mismas zonas que el proceso anterior. Por lo tanto, es de suponer que la regulación de la síntesis de la laminina-1 se ve alterada en las células estromales.

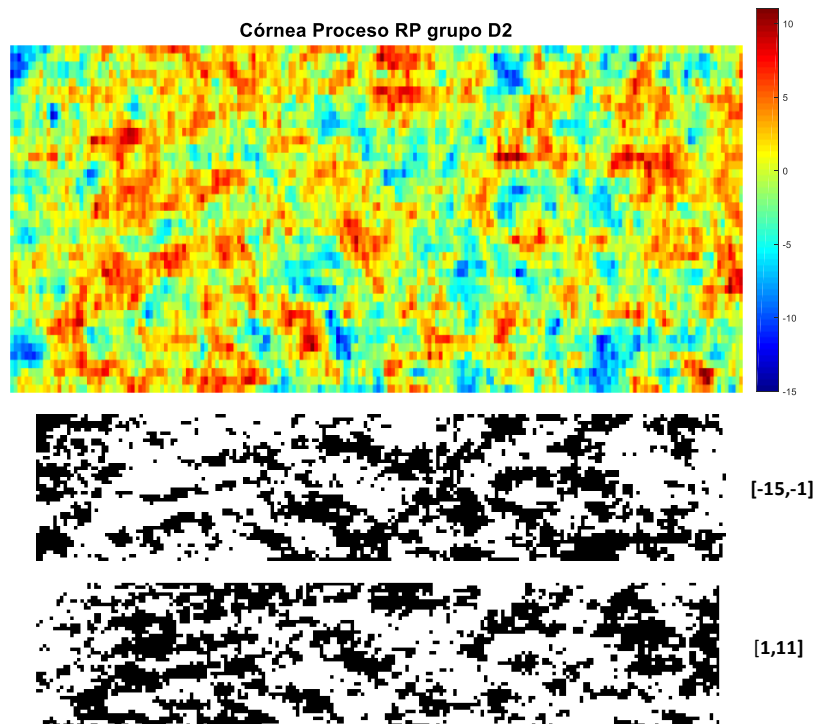


Figura III- 34: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del último proceso RP.

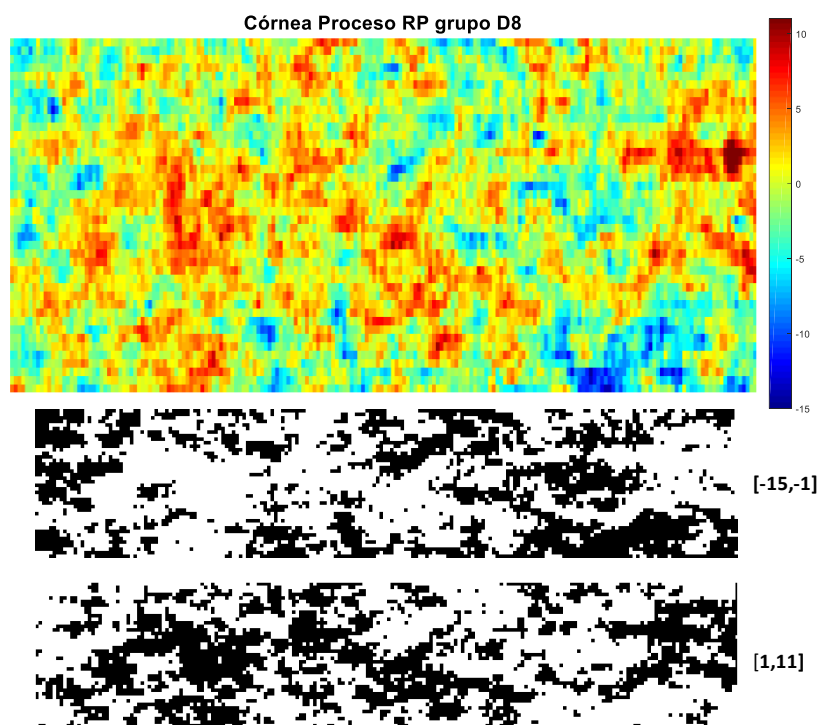


Figura III- 35: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la córnea. Datos obtenidos del último proceso RP.

Para concluir esta sección, hay que decir que, al igual que en el análisis del cristalino, el colágeno IV y la laminina-1 tienen un resultado opuesto en la córnea. Es decir que el déficit materno de AF altera inversamente a la expresión del colágeno IV y laminina-1. Pratt y Madri [39] observaron que ambas moléculas en el estroma corneal de ratón muestran un patrón formado por filamentos lineales intensamente fluorescentes. En este mismo estudio, la inmunolocalización a microscopía electrónica mostró una asociación de colágeno IV y laminina con los haces de microfibrillas del estroma corneal. Por otra parte, otro estudio [41] demuestra una estrecha relación entre las microfibrillas estromales y sus proteínas con los queratocitos en desarrollo. Todo esto nos lleva a pensar que es muy probable que el déficit materno de AF altere la síntesis de ambas proteínas por parte de los queratocitos.

3. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE COLÁGENO IV Y LAMININA-1 EN LA RETINA

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, la MEC proporciona una fuente de señales extrínsecas para guiar la migración de neuroblastos, el crecimiento del axón, la formación de sinapsis y dirigir la diferenciación celular hacia una vía particular. Se ha demostrado que la MEC a nivel de la retina, contactada por células precursoras neuroepiteliales, contiene una variedad de moléculas como el colágeno IV y la laminina-1 y es capaz de proporcionar señales extrínsecas que dirigen la diferenciación de una célula por una vía particular [52].

En esta sección, se va a estudiar los cambios producidos en ambas proteínas en una zona local de la retina neural.

Los porcentajes de varianza para cada CP se muestran en la figura III-36. El gráfico de sedimentación correspondiente al colágeno IV muestra que existe un primer CP que comprende la mayor cantidad de varianza, en ella el grupo control tiene una mayor varianza que D2 y D8. Después, el grupo D2 en el segundo componente tiene mayor variabilidad que el control y D8. En el tercer componente, el grupo control vuelve a estar por encima del D2 y D8. Finalmente, los CPs #4,5,6,8 y9 del grupo D8 tienen varianza más alta que el control y D2. Por otro lado, el gráfico de la laminina-1 muestra que el primer componente del control tiene mayor varianza que D2 y D8. Luego, el segundo componente del grupo D2 tiene varianza que supera el control y D8. Finalmente, casi todo el resto de los componentes del grupo D8, CPs # 3,4,5,6,7 supera los del control y D2. Por tanto, del mismo modo que las estructuras anteriores, agrupamos los CPs en “procesos” como sigue:

- En el caso del colágeno IV, el primer proceso P1 corresponde al CP1, el segundo P2 incluye al CP2, el tercero P3 contiene al CP3, finalmente el último proceso RP contiene la agrupación de los componentes restantes, desde CP4 hasta CP9.
- Para la laminina-1, el primer proceso P1 contiene al CP1. Luego, el segundo proceso P2 abarca al CP2. Por último, el resto de los procesos (RP) será la agrupación de los CPs restantes, del CP3 al CP9.

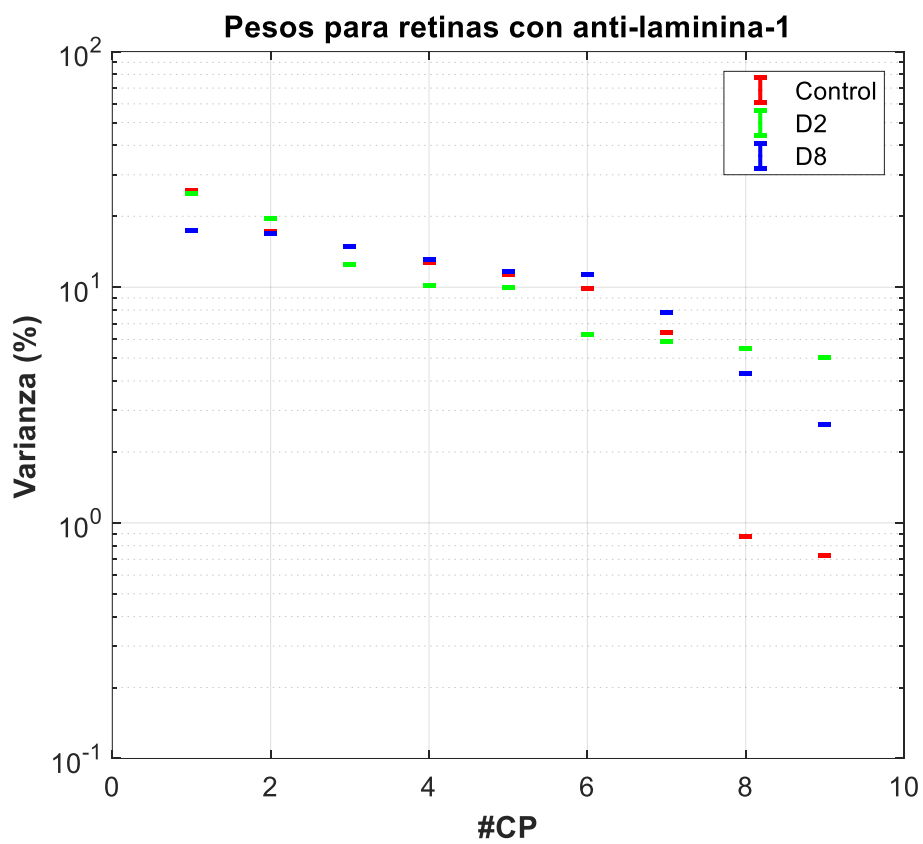
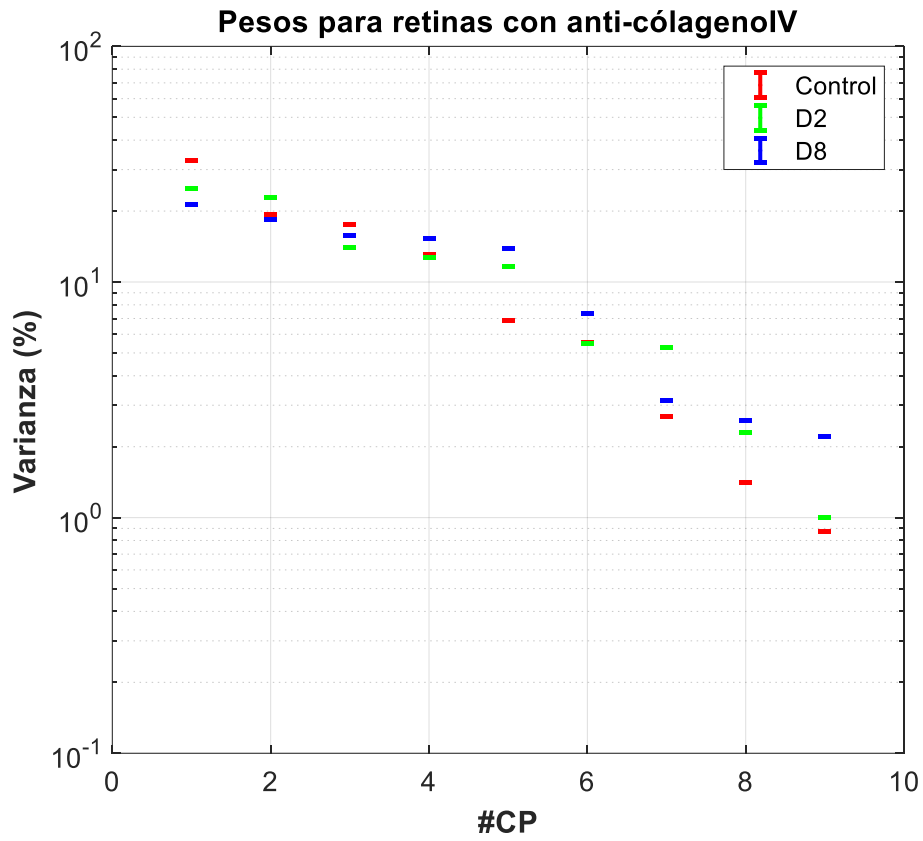


FIGURA III- 36: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza. Derecha, diagrama para retinas con anti-laminina-1. Izquierda, diagrama para retinas con anti-colágeno IV.

El porcentaje de varianza representado por los diferentes procesos se da en las tablas III-6 y III-7.

TABLA III- 6: Porcentaje de varianza representado por la suma de los distintos autovalores en % para las retinas marcadas con anti-colágeno IV de los tres grupos muestrales: control, D2 y D8.

Colágeno IV											
CPs del Control (%)				CPs del D2 (%)				CPs del D8 (%)			
1	2	3	4-9	1	2	3	4-9	1	2	3	4-9
32,6	19,3	17,6	30,5	24,8	22,8	14	38,4	21,3	18,5	15,7	44,5

TABLA III- 7: Porcentaje de varianza representado por la suma de los distintos autovalores en % para las retinas marcadas con anti-laminina-1 de los tres grupos muestrales: control, D2 y D8.

Laminina-1								
CPs del Control (%)			CPs del D2 (%)			CPs del D8 (%)		
1	2	3-9	1	2	3-9	1	2	3-9
25,8	17,2	57	25,1	19,7	55,2	17,5	16,8	65,7

3.1 Expresión espacial del colágeno IV en la retina

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

Las figuras III-37 y III-38 muestran el resultado de la reconstrucción. En cada una de estas figuras, la imagen de arriba representa el resultado del índice de marcaje, mientras que las dos imágenes de abajo corresponden a la cuantificación de sobre/infraexpresión del colágeno IV representada en distintos rangos.

Los resultados de las figuras revelan que en el grupo D2 la retina sufre una infraexpresión del colágeno IV de hasta un 10%, sin embargo, en el grupo D8 ocurre exactamente lo contrario, sobreexpresión del colágeno IV entre el 1% y el 4%, aproximadamente.

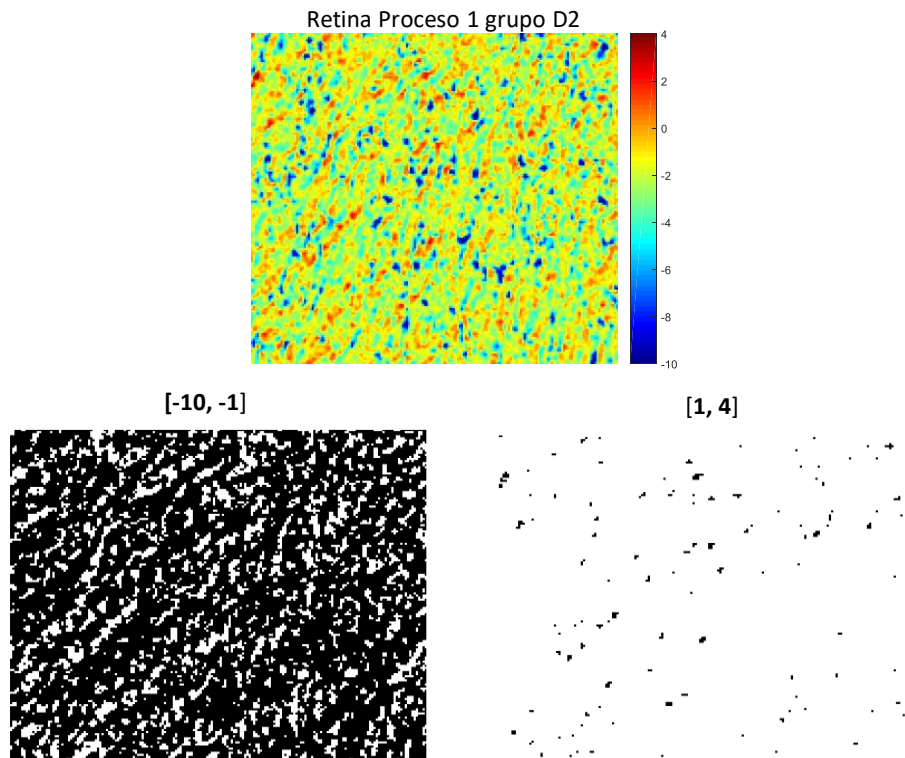


FIGURA III- 37: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del primer proceso P1.

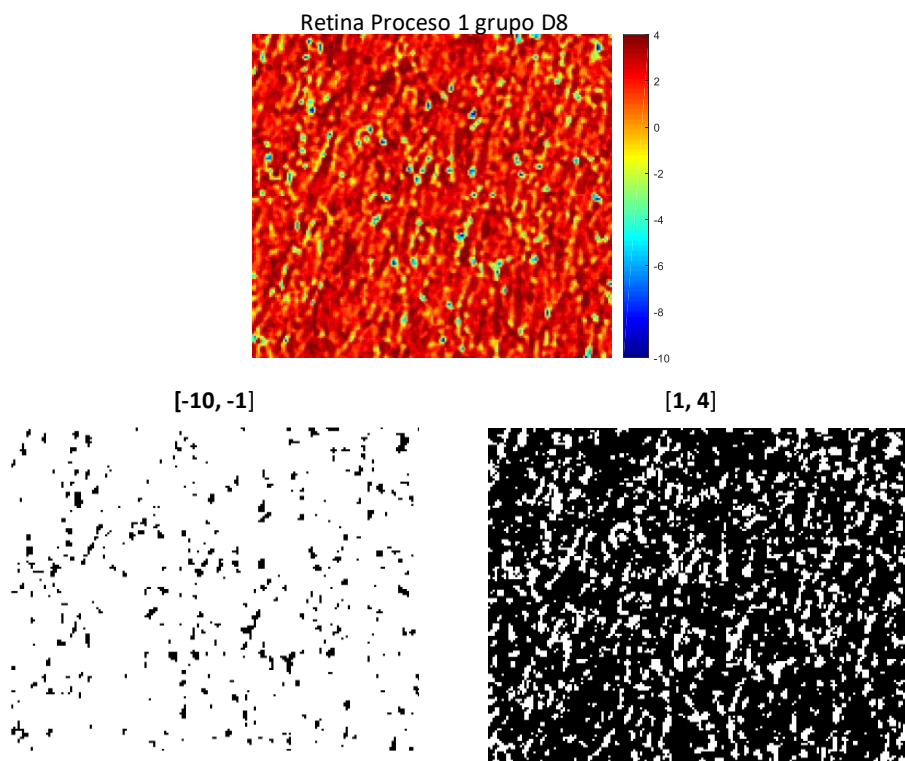


FIGURA III- 38: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del primer proceso P1.

ii. Reconstrucción con los procesos P2, P3 y RP

Los demás procesos, P2 (Fig. III-39 y III-40), P3 (Fig. III-41 y III-42) y RP (Fig. III-43 y III-44), muestran distintas zonas en la retina con sobre o infraexpresión. Como se puede observar en las imágenes, la alteración en la producción del colágeno IV no engloba las mismas zonas. Dada la complejidad de la estructura de la retina y los diferentes tipos celulares que están en fase de desarrollo no se puede valorar exactamente las zonas de los cambios observados, solo se puede indicar que el déficit materno de AF altera la síntesis de colágeno IV la cual afectará al desarrollo de la retina.

Según la revisión bibliográfica, una sobreexpresión de colágeno IV puede ser inducida por diabetes o glucosa alta [53]. Se ha observado en estudios realizados sobre la retinopatía diabética que la diabetes induce un aumento doble de la expresión del colágeno IV por parte de las células productoras de MBs en la retina humana [54]. Es verdad que esta tesis dispone de muy poca evidencia para sugerir que el déficit de AF conduce a la diabetes o retinopatía diabética en los embriones estudiados. Sin embargo, algunos estudios observaron deficiencia significativa de AF plasmático y de folato de los glóbulos rojos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 independientemente de la presencia o no de la retinopatía [55].

Respecto a la infraexpresión de colágeno IV en la retina neural, no se ha encontrado en la bibliografía ninguna referencia sobre patologías retinianas asociada con esta alteración.

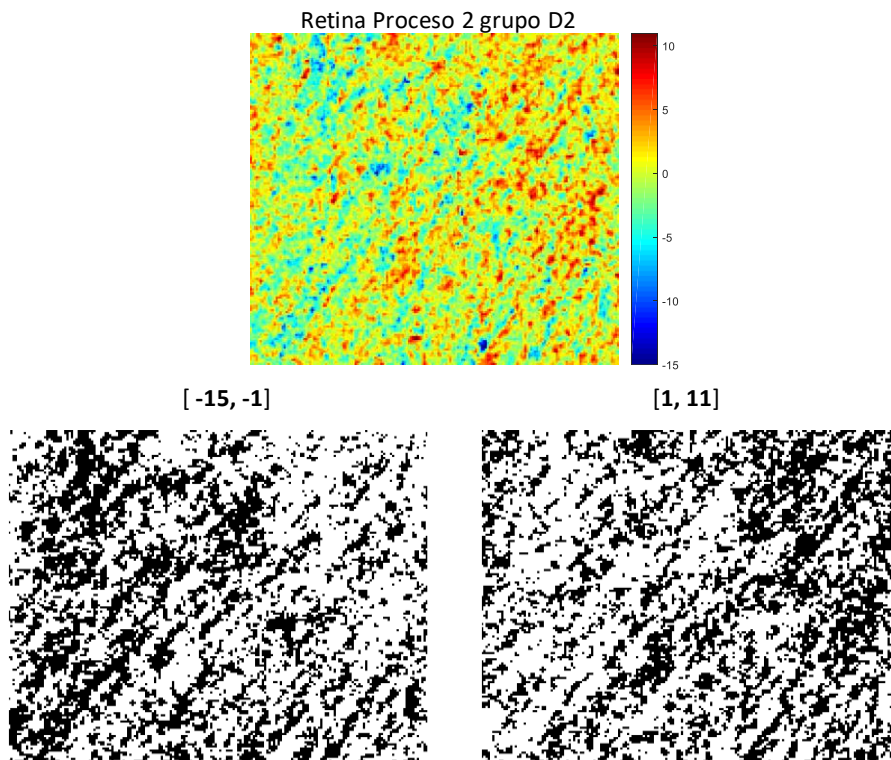


FIGURA III- 39: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

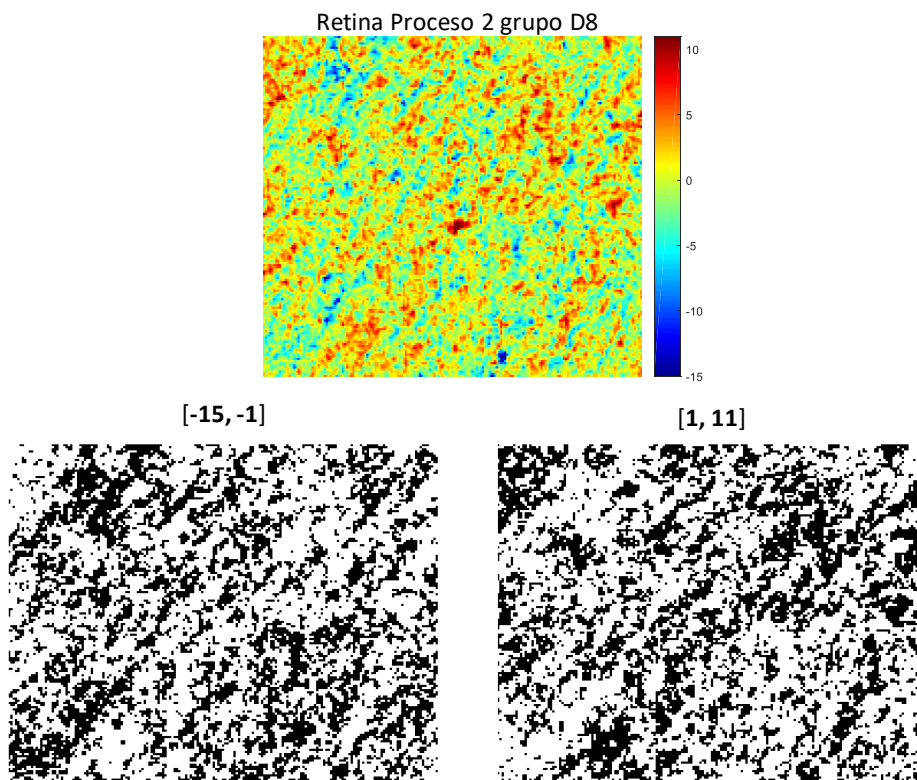


FIGURA III- 40: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

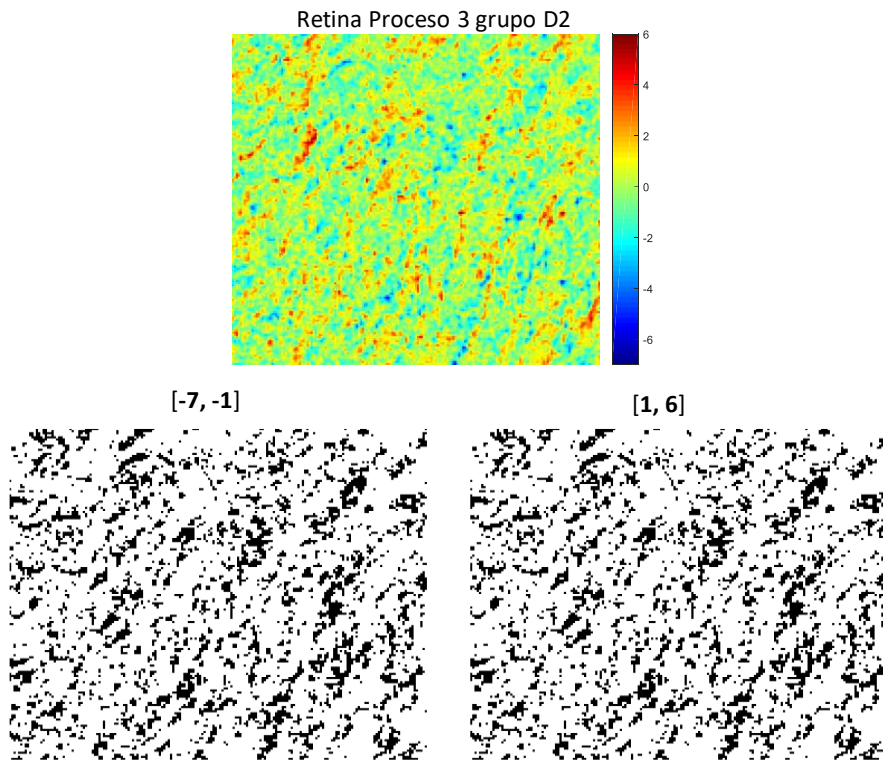


FIGURA III- 41: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del tercer proceso P3.

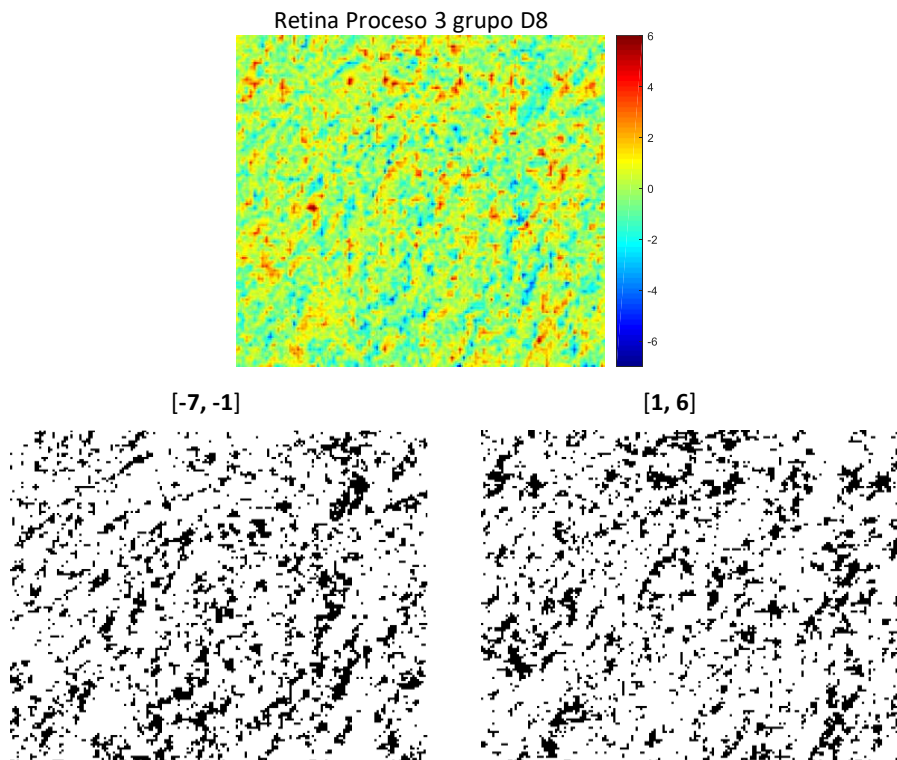


FIGURA III- 42: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del tercer proceso P3.

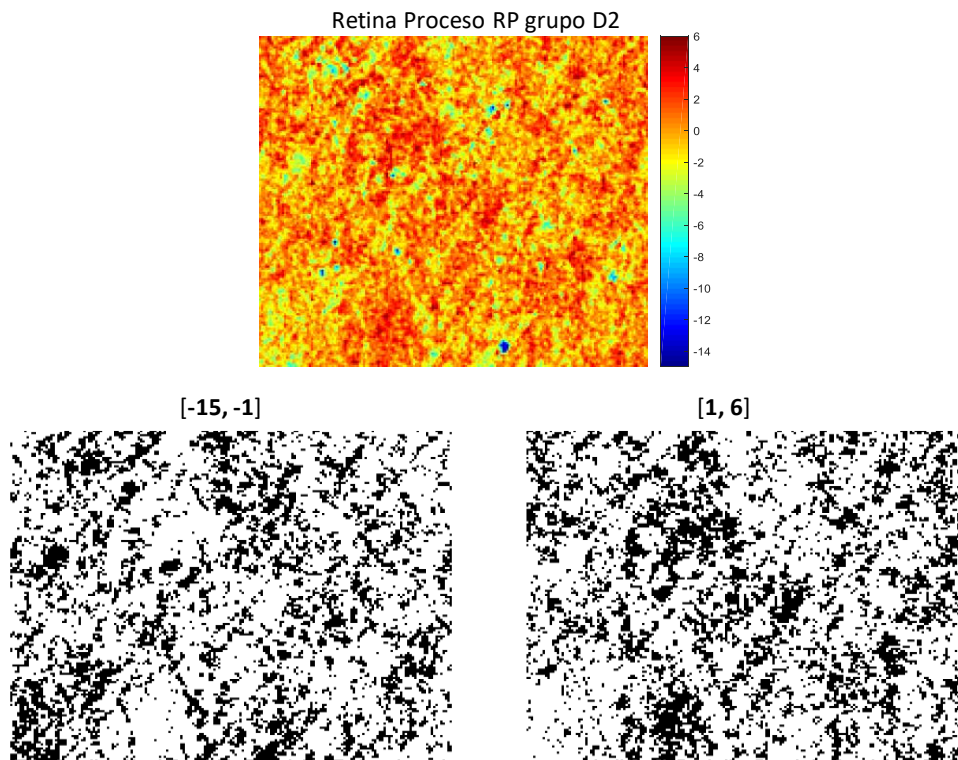


FIGURA III- 43: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del cuarto proceso RP.

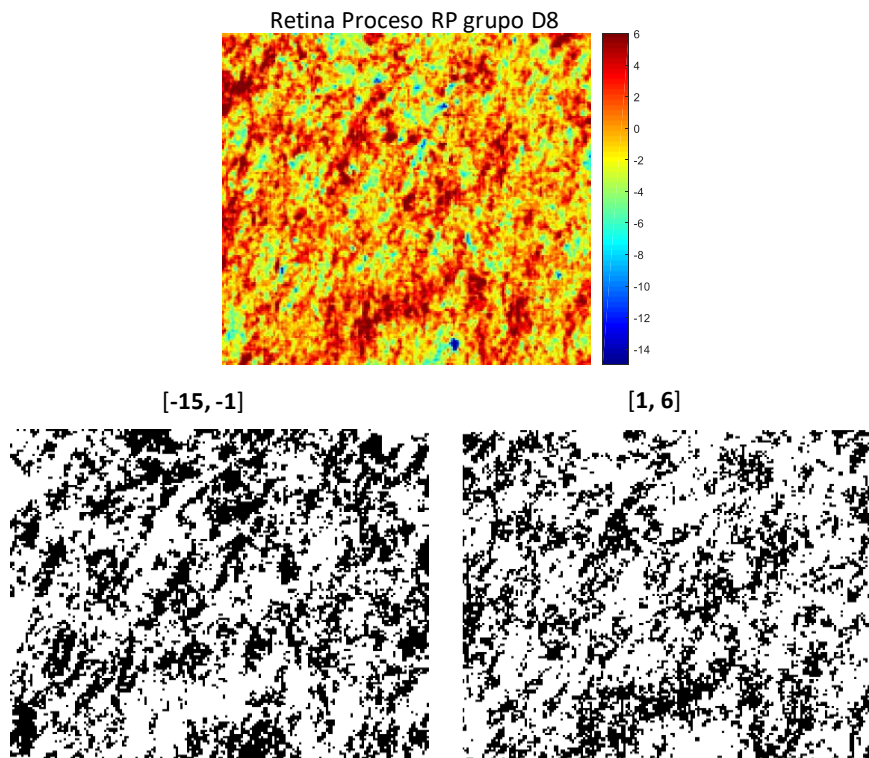


FIGURA III- 44: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión del colágeno IV en la retina. Datos obtenidos del cuarto proceso RP.

3.2 Expresión espacial de la laminina-1 en la retina

A diferencia del colágeno IV, el análisis de las imágenes marcadas con anti-laminina-1 muestra que las imágenes reconstruidas se forman en tres procesos: proceso 1 (P1), proceso 2 (P2) y el resto de los procesos (RP).

i. Reconstrucción con el primer proceso P1

Tanto en el grupo D2 como en el D8 lo que más predomina es la sobreexpresión de la laminina-1 entre el 1% y el 5% (Fig. III-45 y III-46). Dicha sobreexpresión es más acusada en el grupo D2. Aunque parece que la sobreexpresión aumenta primero con un nivel bajo de déficit (D2) como si fuera un mecanismo compensatorio luego comienza a disminuir a medida que aumenta el déficit (D8). Song et al. [56] han observado este mismo mecanismo compensatorio al estudiar el efecto de los niveles altos de glucosa en la expresión de la isoforma laminina- α 1 (LAMA1) en las células endoteliales de la retina. La expresión de LAMA1 aumentaba primero con glucosa alta a través de un mecanismo compensatorio y luego comenzó a disminuir.

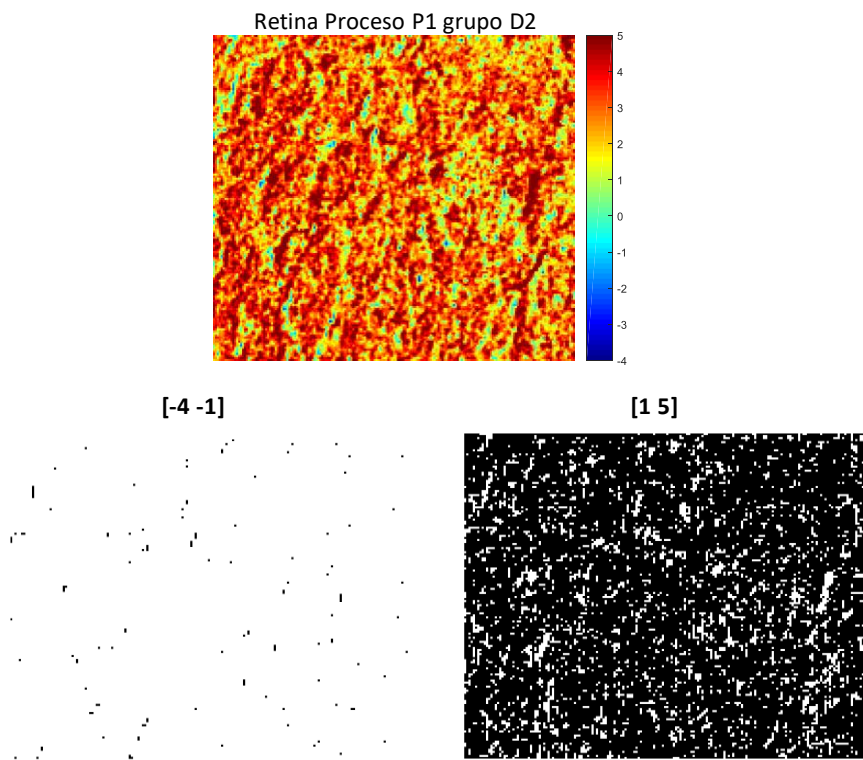


Figura III- 45: Resultados del índice de marcate para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del primer proceso P1.

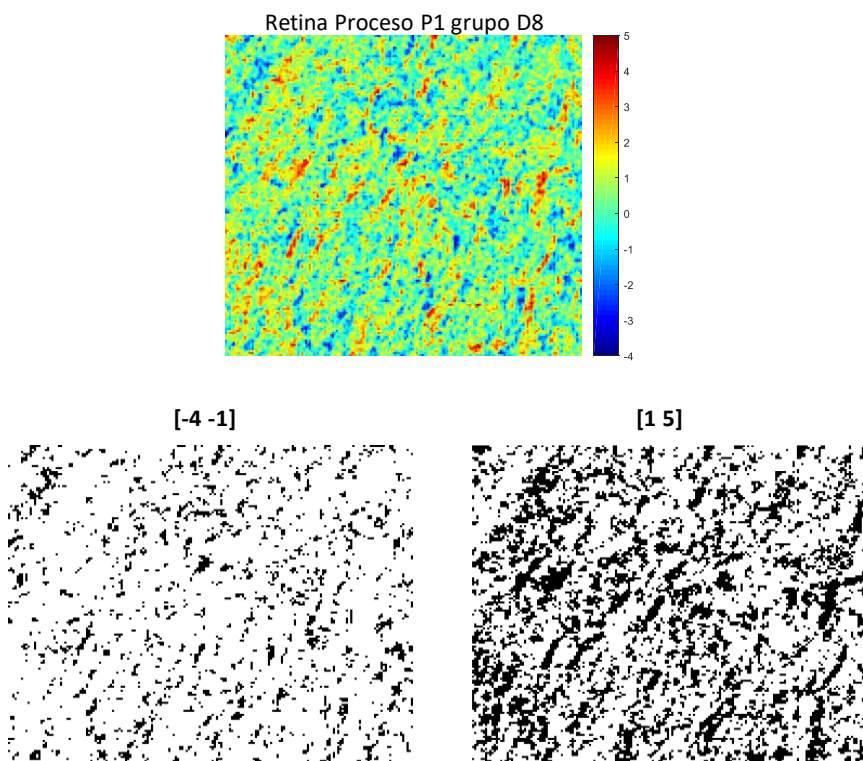


Figura III- 46: Resultados del índice de marcate para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del primer proceso P1.

ii. Reconstrucción con los procesos P2 y RP:

Respecto a la laminina-1, al igual que el colágeno IV, los procesos P2 (Fig. III-47 y III 48) y RP (Fig. III-49 y III-50), muestran distintas zonas en la retina con sobre o infraexpresión. Varios estudios han observado que la diabetes provoca en la retina un aumento en la expresión de laminina-1 [57] y del mismo modo ocasiona infraexpresión de esta molécula en las membranas basales vasculares de la retina [58].

Por otra parte, en un estudio sobre el glaucoma [59] se ha observado una disminución en la expresión de la laminina en la capa de las células ganglionares. En este estudio se ha demostrado que el aumento de la presión intraocular produce degradación de la laminina en la retina lo que causa apoptosis de las células ganglionares. A nivel cerebral se ha observado también que la muerte de las neuronas del cerebro está asociada con la pérdida de la laminina [60]. Además, algunos estudios relacionan el glaucoma pseudoexfoliativo con la disminución de AF en el suero [61, 62].

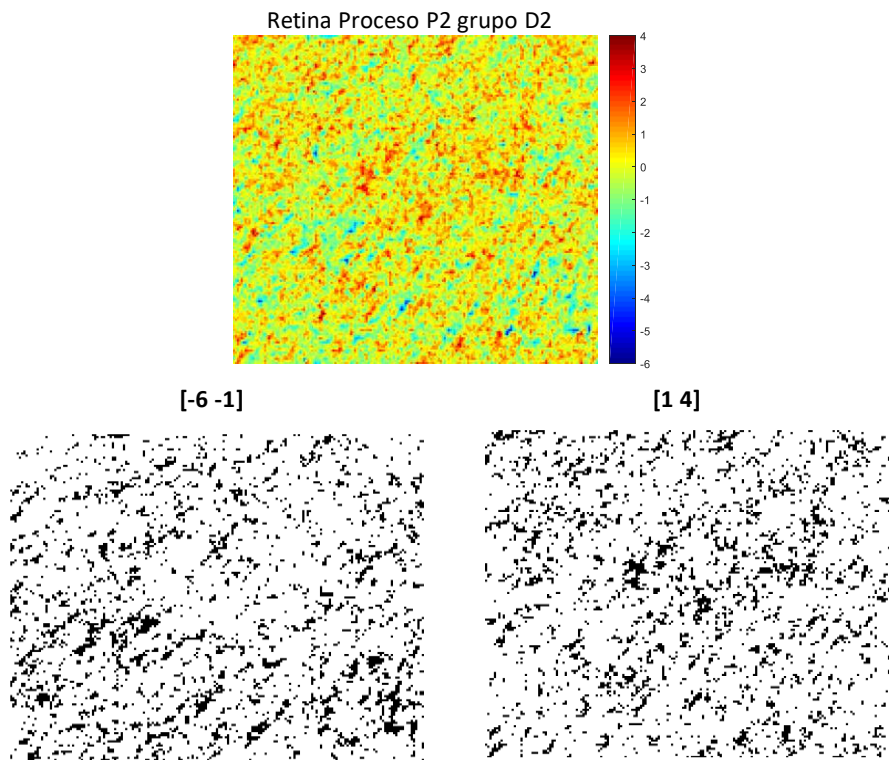


Figura III- 47: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

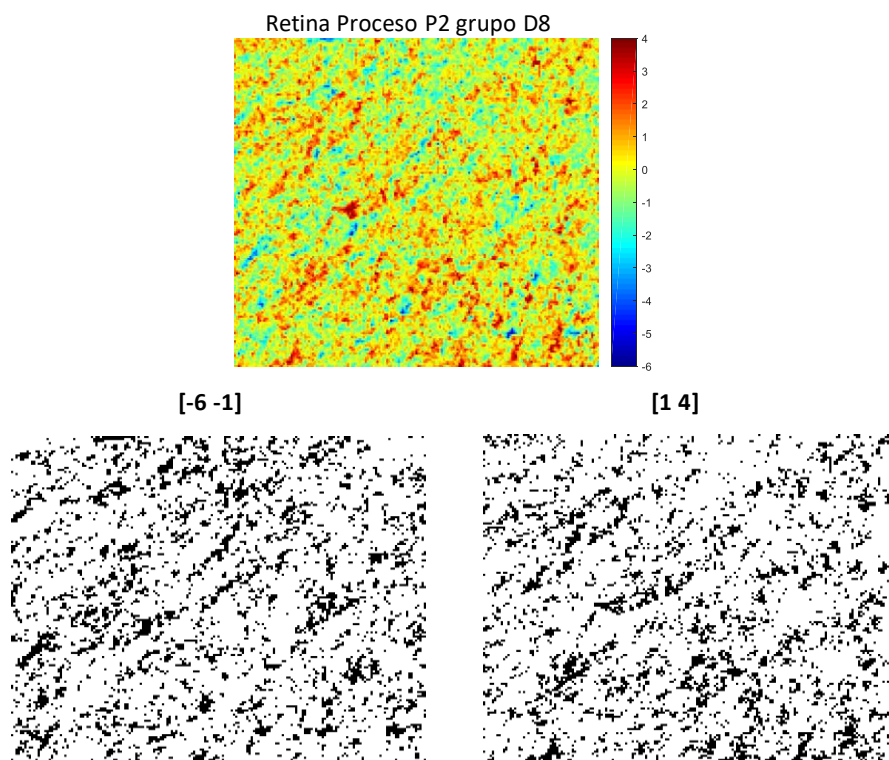


Figura III- 48: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso P2.

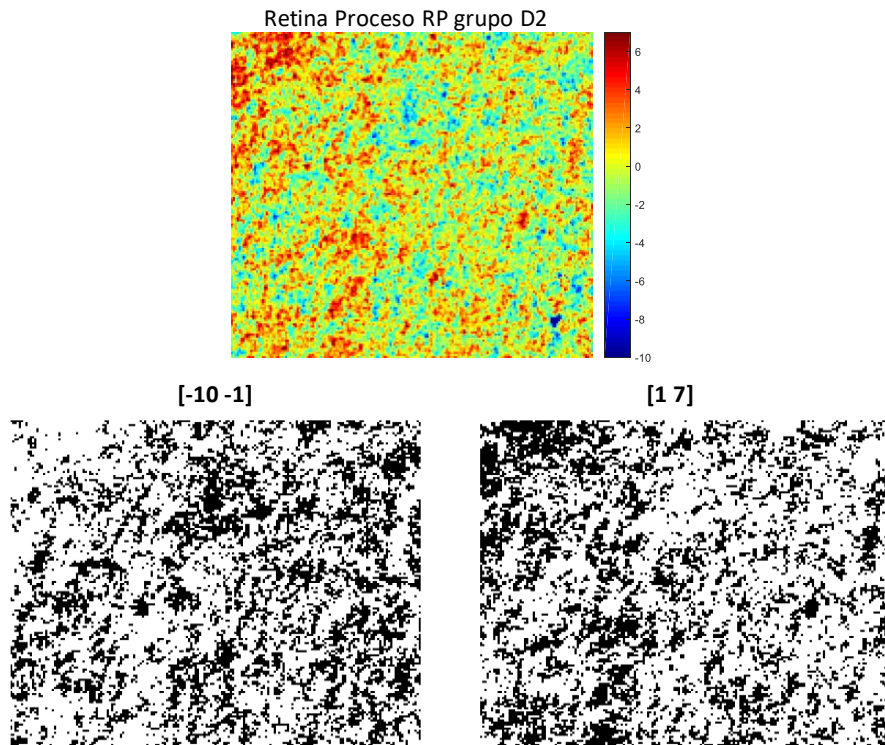


Figura III- 49: Resultados del índice de marcaje para el grupo D2 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso RP.

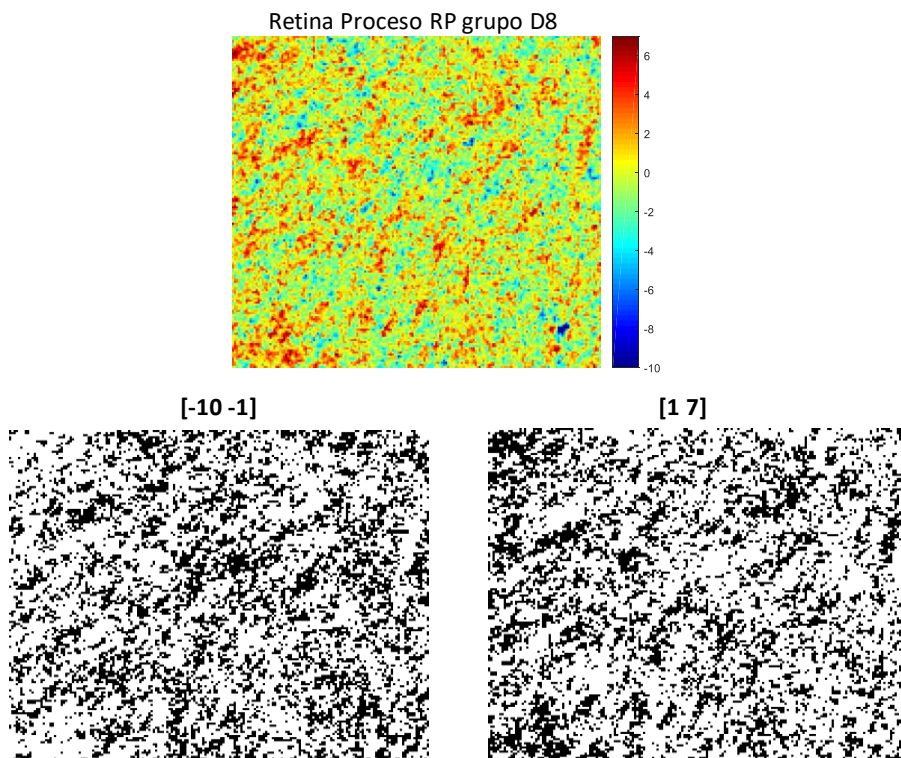


Figura III- 50: Resultados del índice de marcaje para el grupo D8 y de la regionalización y cuantificación de sobre/infra expresión de la laminina-1 en la retina. Datos obtenidos del segundo proceso RP.

III. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III

Para una correcta interpretación del marcaje inmunohistoquímico se requiere experiencia. Sin embargo, no siempre es fácil de interpretar. En este capítulo, hemos utilizado un nuevo método para cuantificar y regionalizar la expresión de dos componentes de la MEC, colágeno IV y laminina-1, en varias estructuras del ojo aplicando la técnica ACP. Por lo tanto, analizamos las imágenes desde un punto de vista estadístico utilizando el ACP y comparando el grupo control con los grupos D2 y D8. Esta técnica nos permite reconstruir las imágenes originales considerando diferentes estructuras espaciales (procesos) para analizar de forma independiente. Estos procesos podrían estar asociados a una organización espacial diferente de colágeno IV y laminina-1. Hoy en día, poco se sabe sobre cómo afecta el déficit materno de AF a las moléculas de la MEC del ojo. Creemos que la alteración de alguna de estas moléculas o de ambas puede tener un papel importante en el desarrollo de las enfermedades o anomalías oculares.

Nuestros resultados muestran que la deficiencia de AF altera el patrón de expresión de las dos proteínas. Nuestro método nos permitió detectar alteraciones en la expresión en distintas zonas de la misma estructura, es decir, en algunas regiones se observó infraexpresión mientras que en otras se detectó sobreexpresión.

El cristalino está formado principalmente por unas células polarizadas, las fibras y células epiteliales que están rodeadas por una MB especializada, la cápsula del cristalino. Se ha demostrado que la cápsula está compuesta mayoritariamente por colágeno IV y laminina-1, secretados por las células que la rodean [63]. La reducción en la ingesta materna de AF modificó el patrón de expresión de las dos moléculas en las estructuras oculares de la descendencia. Firtina et al. [25] observaron que los cristalinos con sobreexpresión de colágeno IV tienen fibras defectuosas. Al parecer, la acumulación intracelular de colágeno IV interfirió en el desarrollo y la diferenciación del cristalino. Asimismo, Semina et al [35] observaron, en embriones mutantes del gen LAMA-1, degeneración severa del cristalino debido a que las células del epitelio y las fibras no se diferenciaron normalmente. En este mismo estudio detectaron una infraexpresión de colágeno IV en la cápsula de cristalino, y sobreexpresión o acumulación de colágeno IV en las fibras del cristalino.

Las anomalías en la expresión observadas en nuestro estudio probablemente influyen en la adherencia de las células epiteliales y en la diferenciación de las fibras dando lugar a la formación de cataratas, cambios morfológicos del cristalino y a la disminución en el tamaño del ojo y cristalino. De hecho, Biehlmaier et al. han demostrado que la mutación de la laminina-1 es la causante de la formación de cristalinos más pequeños de los normal en ojos

del pez cebra [64], esto concuerda con nuestros resultados observados en el capítulo II. Por otro lado, dicha alteración en la expresión también podría ser responsable de las adherencias entre el cristalino-córnea y cristalino-retina observadas en el capítulo II.

Varios estudios proporcionaron pruebas de que el cristalino es crucial para el desarrollo normal del segmento anterior del cual forma parte la córnea [65, 66]. Otro estudio sugiere que el epitelio del cristalino es importante también para la diferenciación normal de la córnea del ratón [67]. Así mismo, otro indica que el cristalino es necesario para la diferenciación normal de las células del estroma corneal [68]. En el capítulo II, habíamos observado en los grupos D2 y D8 un engrosamiento corneal estadísticamente significativo. Mientras que en este capítulo hemos visto que ambos grupos tienen sobre e infraexpresión de colágeno IV y laminina-1 en el estroma corneal. Basándose en los resultados presentados anteriormente, parece probable que la alteración en la expresión de colágeno IV y laminina-1 en el cristalino resulta en defectos en la morfología del cristalino. Podría ser que la alteración del cristalino influya en la diferenciación corneal. Estas alteraciones son debidas a los cambios detectados en ambas moléculas en el estroma corneal. Lo que indica que la integridad estructural de la córnea se ve comprometida dando lugar a engrosamiento corneal y desorganización celular.

En cuanto a la retina, nuestro método muestra cambios en la expresión de colágeno IV y laminina-1 debido el déficit materno de AF.

Algunos estudios sobre individuos con diabetes o galactosemia han observado cambios en la expresión de colágeno IV y/o laminina-1 en la córnea [69], cristalino [70] y retina [54, 57]. Otros sugieren que la laminina-1 sufre cambios en su patrón de expresión inducidos por el aumento de la presión intraocular en individuos glaucomatosos causando la apoptosis de las células ganglionares de la retina [59]. Es sabido que el déficit de AF está relacionado con ambas enfermedades [61], diabetes y glaucoma, aunque no podemos dar por sentado que los cambios observados en nuestros embriones pueden generar estas patologías.

IV. REFERENCIAS DEL 3º CAPÍTULO

1. Donald M: **Multivariate statistical methods**. In.: McGraw Hill, New York; 1990.
2. Laas E, Ballester M, Cortez A, Graesslin O, Daraï E: **Unsupervised Clustering of Immunohistochemical Markers to Define High-Risk Endometrial Cancer**. *Pathology & Oncology Research* 2017;1-9.
3. Gry M, Oksvold P, Pontén F, Uhlén M: **Tissue-specific protein expression in human cells, tissues and organs**. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 2010, **3**(10):286-293.
4. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Van Nhieu JT, Furet JP: **Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients**. *PloS one* 2011, **6**(1):e16393.
5. Moro CF, Fernandez-Woodbridge A, D'souza MA, Zhang Q, Bozoky B, Kandaswamy SV, Catalano P, Heuchel R, Shtembari S, Del Chiaro M: **Immunohistochemical typing of adenocarcinomas of the pancreatobiliary system improves diagnosis and prognostic stratification**. *PloS one* 2016, **11**(11):e0166067.
6. Loukas CG, Wilson GD, Vojnovic B, Linney A: **An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections**. *Cytometry part A* 2003, **55**(1):30-42.
7. Khorshed RA: **A cell level automated approach for quantifying antibody staining in immunohistochemistry images. A structural approach for quantifying antibody staining in colonic cancer spheroid images by integrating image processing and machine learning towards the implementation of computer aided scoring of cancer markers**. University of Bradford; 2013.
8. Sarnecki JS, Burns KH, Wood LD, Waters KM, Hruban RH, Wirtz D, Wu P-H: **A robust nonlinear tissue-component discrimination method for computational pathology**. *Laboratory Investigation* 2016, **96**(4):450.
9. Komura D, Ishikawa S: **Machine learning methods for histopathological image analysis**. *arXiv preprint arXiv:170900786* 2017.
10. Van Eycke Y-R, Allard J, Salmon I, Debeir O, Decaestecker C: **Image processing in digital pathology: an opportunity to solve inter-batch variability of immunohistochemical staining**. *Scientific Reports* 2017, **7**:42964.
11. Ocak S, Friedman DB, Chen H, Ausborn JA, Hassanein M, Detry B, Weynand B, Aboubakar F, Pilette C, Sibille Y: **Discovery of new membrane-associated proteins overexpressed in small-cell lung cancer**. *Journal of Thoracic Oncology* 2014, **9**(3):324-336.
12. Taylor C, Levenson R: **Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II**. *Histopathology* 2006, **49**(4):411-424.
13. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H: **Interpretation and quantification of immunostains**. *The American journal of surgical pathology* 2001, **25**(9):1204-1207.
14. Becker RL: **Standardization and quality control of quantitative microscopy in pathology**. *Journal of Cellular Biochemistry* 1993, **53**(S17G):199-204.
15. Taylor CR: **An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry**. *Human pathology* 1994, **25**(1):2-11.
16. Rexhepaj E, Brennan DJ, Holloway P, Kay EW, McCann AH, Landberg G, Duffy MJ, Jirstrom K, Gallagher WM: **Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer**. *Breast Cancer Research* 2008, **10**(5):R89.
17. Gonzalez RCE, Woods SL, Gonzalez RERERC, Woods RE, Eddins SL: **Digital image processing using MATLAB**; 2004.

18. López-Alonso JM, Alda J, Bernabéu E: **Principal-component characterization of noise for infrared images.** *Applied optics* 2002, **41**(2):320-331.
19. Jolliffe I: **Principal component analysis:** Wiley Online Library; 2002.
20. Jackson JE: **A user's guide to principal components**, vol. 587: John Wiley & Sons; 2005.
21. Koch I: **Analysis of multivariate and high-dimensional data**, vol. 32: Cambridge University Press; 2013.
22. Alda J: **Bad pixel identification by means of principal components analysis.** *Optical engineering* 2002, **41**(9):2152-2157.
23. Alda J: **Characterization of artifacts in fully digital image-acquisition systems: Application to web cameras.** *Optical Engineering* 2004, **43**(1):257-265.
24. Marques de Cantú MJ: **Probabilidad y estadística: para ciencias químico-biológicas.** In.; 1991.
25. Firtina Z, Danysh BP, Bai X, Gould DB, Kobayashi T, Duncan MK: **Abnormal expression of collagen IV in lens activates unfolded protein response resulting in cataract.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(51):35872-35884.
26. Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH: **Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain.** *Journal of Nutrition* 2004, **134**(1):162-166.
27. Hautvast J, Barnes M: **Collagen metabolism in folic acid deficiency.** *British Journal of Nutrition* 1974, **32**(2):457-469.
28. Gould DB, Marchant JK, Savinova OV, Smith RS, John SW: **Col4a1 mutation causes endoplasmic reticulum stress and genetically modifiable ocular dysgenesis.** *Human molecular genetics* 2007, **16**(7):798-807.
29. Van Agtmael T, Schlötzer-Schrehardt U, McKie L, Brownstein DG, Lee AW, Cross SH, Sado Y, Mullins JJ, Pöschl E, Jackson IJ: **Dominant mutations of Col4a1 result in basement membrane defects which lead to anterior segment dysgenesis and glomerulopathy.** *Human molecular genetics* 2005, **14**(21):3161-3168.
30. Sugrue SP, Hay ED: **Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules.** *The Journal of Cell Biology* 1981, **91**(1):45-54.
31. De Arcangelis A, Lefebvre O, Méchine-Neuville A, Arnold C, Klein A, Rémy L, Kedinger M, Simon-Assmann P: **Overexpression of laminin α 1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth.** *International journal of cancer* 2001, **94**(1):44-53.
32. Ivanovitch K, Cavodeassi F, Wilson SW: **Precocious acquisition of neuroepithelial character in the eye field underlies the onset of eye morphogenesis.** *Developmental cell* 2013, **27**(3):293-305.
33. Yan Q, Perdue N, Blake D, Sage EH: **Absence of SPARC in murine lens epithelium leads to increased deposition of laminin-1 in lens capsule.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, **46**(12):4652-4660.
34. Weaver MS, Sage EH, Yan Q: **Absence of SPARC in lens epithelial cells results in altered adhesion and extracellular matrix production in vitro.** *Journal of cellular biochemistry* 2006, **97**(2):423-432.
35. Semina EV, Bosenko DV, Zinkevich NC, Soules KA, Hyde DR, Vihtelic TS, Willer GB, Gregg RG, Link BA: **Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish.** *Developmental biology* 2006, **299**(1):63-77.
36. Hassell JR, Schrecengost P, Rada JA, SundarRaj N, Sossi G, Thoft R: **Biosynthesis of stromal matrix proteoglycans and basement membrane components by human corneal fibroblasts.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1992, **33**(3):547-557.

37. Guerriero E, Chen J, Sado Y, Mohan RR, Wilson SE, Funderburgh JL, SundarRaj N: **Loss of alpha3 (IV) collagen expression associated with corneal keratocyte activation.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(2):627-635.
38. Sato N, Nakamura M, Chikama T-i, Nishida T: **Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats.** *Japanese journal of ophthalmology* 1999, **43**(5):343-347.
39. Pratt B, Madri J: **Immunolocalization of type IV collagen and laminin in nonbasement membrane structures of murine corneal stroma. A light and electron microscopic study.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1985, **52**(6):650-656.
40. Jester JV, Lee YG, Huang J, Houston J, Adams B, Cavanagh HD, Petroll WM: **Postnatal corneal transparency, keratocyte cell cycle exit and expression of ALDH1A1.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(9):4061-4069.
41. Cintron C, Covington H, Kublin CL: **Morphogenesis of rabbit corneal stroma.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1983, **24**(5):543-556.
42. Young RD, Gealy EC, Liles M, Caterson B, Ralphs JR, Quantock AJ: **Keratan sulfate glycosaminoglycan and the association with collagen fibrils in rudimentary lamellae in the developing avian cornea.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(7):3083-3088.
43. Funderburgh JL, Caterson B, Conrad GW: **Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea.** *Developmental biology* 1986, **116**(2):267-277.
44. Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE: **Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly.** *Experimental eye research* 2015, **133**:69-80.
45. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF: **Stromal assemblies containing collagen types IV and VI and fibronectin in the developing embryonic avian cornea.** *Developmental biology* 1991, **144**(2):379-391.
46. Schittny JC, Timpl R, Engel J: **High resolution immunoelectron microscopic localization of functional domains of laminin, nidogen, and heparan sulfate proteoglycan in epithelial basement membrane of mouse cornea reveals different topological orientations.** *The Journal of cell biology* 1988, **107**(4):1599-1610.
47. Xuan M, Wang S, Liu X, He Y, Li Y, Zhang Y: **Proteins of the corneal stroma: importance in visual function.** *Cell and tissue research* 2016, **364**(1):9-16.
48. Uzunalli G, Soran Z, Erkal T, Dagdas Y, Dinc E, Hondur A, Bilgihan K, Aydin B, Guler M, Tekinay A: **Bioactive self-assembled peptide nanofibers for corneal stroma regeneration.** *Acta biomaterialia* 2014, **10**(3):1156-1166.
49. SUNDARRAJ N, FITE D, BELAK R, SUNDARRAJ S, RADA J, OKAMOTO S, HASSELL J: **Proteoglycan distribution during healing of corneal stromal wounds in chick.** *Experimental eye research* 1998, **67**(4):433-442.
50. Benezra D, Foidart JM: **Collagens and non collagenous proteins in the human eye. I. Corneal stroma in vivo and keratocyte production in vitro.** *Current eye research* 1981, **1**(2):101-110.
51. Maguen E, Alba S, Burgeson R, Butkowski R, Michael A, Kenney M, Nesburn A, Ljubimov A: **Alterations of corneal extracellular matrix after multiple refractive procedures: a clinical and immunohistochemical study.** *Cornea* 1997, **16**(6):675-682.
52. Bradshaw AD, McNagny KM, Gervin DB, Cann GM, Graf T, Clegg DO: **Integrin alpha 2 beta 1 mediates interactions between developing embryonic retinal cells and collagen.** *Development* 1995, **121**(11):3593-3602.
53. Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M: **Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990, **87**(1):404-408.

54. Roy S, Maiello M, Lorenzi M: **Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy.** *The Journal of clinical investigation* 1994, **93**(1):438-442.
55. Malaguarnera G, Gagliano C, Salomone S, Giordano M, Bucolo C, Pappalardo A, Drago F, Caraci F, Avitabile T, Motta M: **Folate status in type 2 diabetic patients with and without retinopathy.** *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2015, **9**:1437.
56. Song G, Lin D, Bao L, Jiang Q, Zhang Y, Zheng H, Gao Q: **Effects of High Glucose on the Expression of LAMA1 and Biological Behavior of Choroid Retinal Endothelial Cells.** *Journal of Diabetes Research* 2018, **2018**.
57. Nishikawa T, Giardino I, Edelstein D, Brownlee M: **Changes in diabetic retinal matrix protein mRNA levels in a common transgenic mouse strain.** *Current eye research* 2000, **21**(1):581-587.
58. Halfter W, Moes S, Asgeirsson DO, Halfter K, Oertle P, Herraiz EM, Plodinec M, Jenoe P, Henrich PB: **Diabetes-related changes in the protein composition and the biomechanical properties of human retinal vascular basement membranes.** *PloS one* 2017, **12**(12):e0189857.
59. Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF: **Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, **46**(1):175-182.
60. Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S: **Neuronal cell death and tPA.** *Nature* 1996, **384**(6605):123.
61. Cumurcu T, Sahin S, Aydin E: **Serum homocysteine, vitamin B 12 and folic acid levels in different types of glaucoma.** *BMC ophthalmology* 2006, **6**(1):6.
62. Xu F, Zhang L, Li M: **Plasma homocysteine, serum folic acid, serum vitamin B12, serum vitamin B6, MTHFR and risk of pseudoexfoliation glaucoma: a meta-analysis.** *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2012, **250**(7):1067-1074.
63. Danysh BP, Duncan MK: **The lens capsule.** *Experimental eye research* 2009, **88**(2):151-164.
64. Biehlmaier O, Makhankov Y, Neuhaus SC: **Impaired retinal differentiation and maintenance in zebrafish laminin mutants.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(6):2887-2894.
65. Beebe DC, Coats JM: **The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye.** *Developmental biology* 2000, **220**(2):424-431.
66. Genis-Galvez J: **Role of the lens in the morphogenesis of the iris and cornea.** *Nature* 1966, **210**(5032):209.
67. Robinson ML, Ohtaka-Maruyama C, Chan C-C, Jamieson S, Dickson C, Overbeek PA, Chepelinsky AB: **Disregulation of ocular morphogenesis by lens-specific expression of FGF-3/int-2 in transgenic mice.** *Developmental biology* 1998, **198**(1):13-31.
68. Zak NB, Linsenmayer TF: **Analysis of corneal development with monoclonal antibodies: I. Differentiation in isolated corneas.** *Developmental biology* 1985, **108**(2):443-454.
69. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Zardi L, Ninomiya Y, Sado Y, Huang Z-S, Nesburn AB, Kenney MC: **Basement membrane abnormalities in human eyes with diabetic retinopathy.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1996, **44**(12):1469-1479.
70. Poulson R, Prockop D, Boot-Handford R: **Effects of long-term diabetes and galactosaemia upon lens and retinal mRNA levels in the rat.** *Experimental eye research* 1990, **51**(1):27-32.

RESULTADOS

Capítulo IV

I. ESTUDIO DE TEXTURA MEDIANTE EL ANÁLISIS FRACTAL

1. EL ANÁLISIS FRACTAL

1.1 Concepto

La mayoría de los objetos presentes en la naturaleza tienen una cierta complejidad en sus estructuras. Así, por ejemplo, si se observa a mayores aumentos el sistema de ramificación de los pulmones se verá que sus estructuras tienen detalles muy similares. En el cuerpo humano, además de las ramificaciones pulmonares existen otras a nivel neuronal y vascular que se comportan de igual manera [1].

Una estructura fractal es una construcción geométrica que tiene la peculiaridad de ser autosimilar. Esto significa que a distintas escalas de observación se ve en la propia estructura la repetición del mismo patrón.

La geometría fractal fue desarrollada por Benoît Mandelbrot en 1975 [2, 3], este matemático definió el conjunto fractal como aquel en el cual se debe cumplir que la dimensión de Hausdorff sea mayor que la dimensión topológica. La primera dimensión se refiere al número de variables requeridos para determinar el conjunto en un espacio euclidiano nulo, mientras que la segunda describe el número de variables dentro del espacio topológico [4].

Los objetos considerados autosimilares deben satisfacer la siguiente relación de ley de potencia,

$$L(r) = cr^\alpha, \quad (4.1)$$

donde $L(r)$ se puede considerar como cualquier medida física de la estructura: superficie, volumen, distancia..., r es la unidad de medida lineal, c una constante y α es el espacio que ocupa el conjunto alrededor de cada uno de sus puntos [5]. En términos topológicos, α se pondera mediante valores estrictamente enteros. En otras palabras, se puede mostrar si la superficie estudiada se comporta como una línea si $\alpha=1$, en este caso se estaría hablando de una longitud (medida unidimensional), si fuera un plano $\alpha=2$ (medida bidimensional) y por último si fuese un espacio o superficie $\alpha=3$ (medida tridimensional). En el campo de las matemáticas, a la geometría de los objetos cuyos valores dimensionales son enteros se le conoce como 'geometría euclídea'.

Ahora bien, en la naturaleza no todos los objetos tienen este tipo de geometría. Al contrario, la gran mayoría suelen tener valores dimensionales no enteros, ésta es la denominada 'geometría fractal', útil para describir aquellos objetos que no se pueden definir mediante la geometría euclidiana [2]. Es necesario recalcar que, para describir formas y figuras, la geometría euclidiana aplica modelos matemáticos; sin embargo, la geometría fractal recurre a algoritmos.

Falconer describió en su libro *"Techniques in fractal geometry"* [6] una definición exacta de los fractales. Según este matemático, se puede considerar que un conjunto S en el espacio euclidiano es un fractal si cumple todas o la mayoría de las siguientes características:

- I. S tiene una estructura fina, que es irregular en detalle a escalas arbitrariamente pequeñas.
- II. S es demasiado irregular para ser descrito por el cálculo o el lenguaje de la geometría tradicional, tanto local como globalmente.
- III. Frecuentemente S tiene algún tipo de autosimilitud o auto-afinidad, quizás en un sentido estadístico o aproximado.
- IV. Generalmente la 'dimensión fractal' de S es estrictamente mayor a su dimensión topológica.
- V. En muchos casos de interés, S tiene una definición muy simple, tal vez repetitiva o recursiva.
- VI. A menudo S tiene una apariencia 'natural'.

En nuestro entorno natural, existe un sinnúmero de objetos con geometría fractal. En particular, se podría destacar los copos de nieve, el romanesco, la ramificación de las ramas de los árboles, las nubes, la forma en la que se extienden los afluentes de ríos, etc. (Fig. IV-1). Los patrones fractales se pueden generar también matemáticamente a través de procesos de iteración; la iteración es la repetición de un proceso n veces. El conjunto de Julia, las curvas de Koch y el conjunto de Mandelbrot son solo algunos ejemplos (Fig. IV-2).

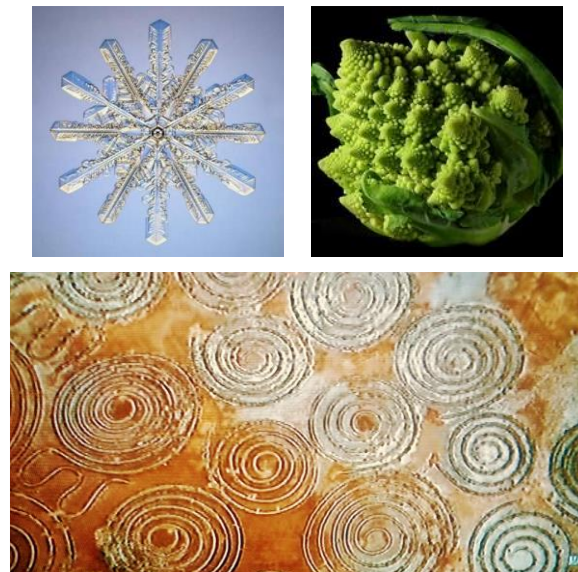


FIGURA IV- 1: Algunas estructuras fractales encontradas en la naturaleza. Arriba, copo de nieve y romanesco. Abajo, círculos en el desierto de Kalahari en Australia

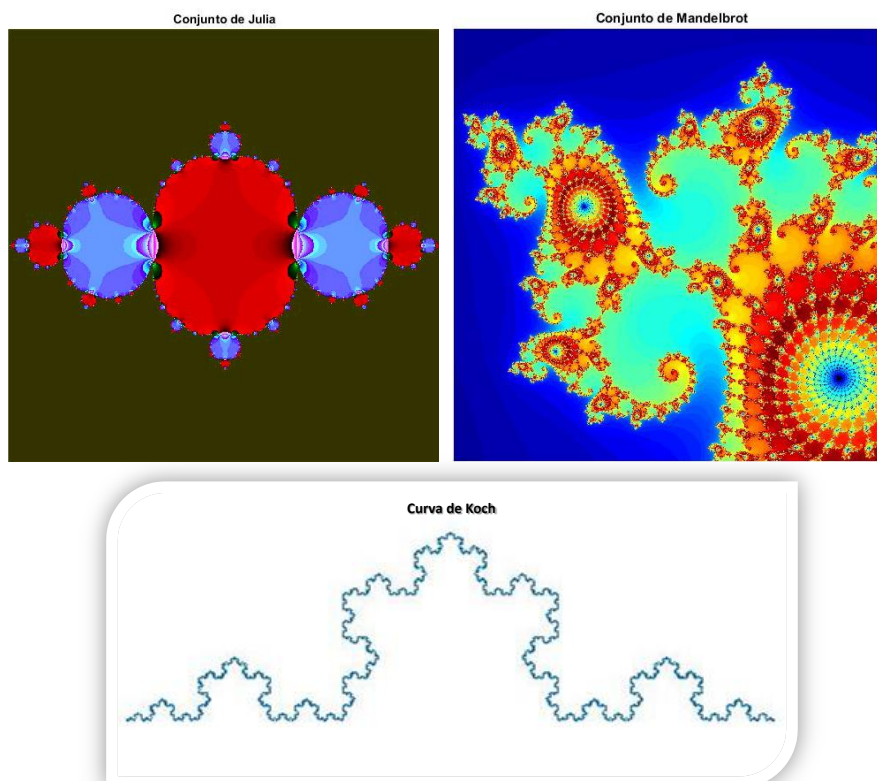


FIGURA IV- 2: Fractales matemáticos elaborados mediante scripts de Matlab.

Algunas aplicaciones del análisis fractal

Fractales en la física:

Los modelos fractales son de gran interés en muchas disciplinas tales como la caracterización de microestructuras desordenadas en medios porosos [7], el estudio de los fenómenos de mesoescala de los plasmas no lineales como las turbulencias electromagnéticas [8], la astronomía [9, 10], etc.

Fractales en la geología:

El análisis fractal es una herramienta muy útil a la hora de cuantificar el tamaño y la rugosidad de los suelos granulares [11], evaluar la ocurrencia y distribución de minerales [12], estudiar la distribución del epicentro, hipocentro y energía de los terremotos [13], etc.

Fractales en la biología:

El análisis fractal se utiliza en la caracterización de varios procesos biológicos, tales como la morfogénesis, la carcinogénesis, el sistema arterial, el sistema respiratorio [14] y muchos más. En el sistema arterial, por ejemplo, varios estudios mostraron que los vasos sanguíneos tienen propiedades fractales. Este método de análisis ha sido de gran ayuda para diagnosticar y clasificar patologías en la vascularización retiniana [15, 16]. Asimismo, como un sistema de diagnóstico no invasivo para detectar enfermedades respiratorias obstructivas [17]. De igual forma, el análisis de complejidad de los tejidos cancerígenos fue objetivo de muchos estudios. La aplicación de este método ayudó a los científicos a entender la arquitectura patológica del cáncer y su mecanismo de crecimiento [18].

El análisis fractal aplicado a imágenes médicas:

El análisis fractal tiene muchas aplicaciones en el estudio de imágenes biomédicas. Una investigación reciente aplicó dicha herramienta en la evaluación de imágenes PET/CT con melanoma metastásico con el fin de controlar la evolución de la enfermedad, así como su reacción ante el fármaco antes y después de administrarlo [19]. Otros, se enfocaron en el examen de imágenes mamográficas con el objetivo de detectar microcalcificaciones, un signo muy precoz de cáncer de mama [20, 21].

Las aplicaciones mencionadas anteriormente son en realidad una gota en un inmenso océano de ejemplos; la aplicación de este tipo de análisis se ha extendido prácticamente en todas las áreas.

En el capítulo anterior, se ha demostrado que el déficit materno de AF altera el patrón de expresión de las dos proteínas: colágeno IV y laminina-1, en el cristalino, córnea y retina. En el presente capítulo, se va a evaluar con más precisión mediante el análisis multifractal los cambios producidos en la textura de las estructuras mencionadas anteriormente junto con otra, el vítreo, para comprobar si las alteraciones son generalizadas en todo el ojo y en qué medida. Asimismo, cuantificar con más profundidad las alteraciones y distinguir entre las estructuras alteradas.

Como se ha dicho en el capítulo II, los experimentos inmunohistoquímicos suelen ser costosos, y el número de muestras que se puede obtener suele ser pequeño desde un punto de vista estadístico, aunque es normal en estudios histológicos y médicos. Por este motivo, se ha incorporado a la técnica multifractal un análisis estadístico utilizando la técnica de remuestreo Bootstrap, explicada en el capítulo II [22, 23] junto con una prueba de significación no paramétrica: test Kruskal-Wallis [24] que se detallará más adelante.

Por otra parte, cada uno de los grupos estudiados en esta tesis presenta también una variabilidad debido a los propios individuos. Por ello, el objetivo principal de este capítulo no es solo diferenciar entre individuos dentro de su propio grupo, sino distinguir entre individuos de todos los grupos para determinar si la estructura fractal de los tejidos cambia debido al déficit materno de AF o no. Por esta razón, es necesario caracterizar también la varianza y covarianza entre los resultados de los individuos del propio grupo. Para esto, se van a utilizar métricas de distancias estadísticas como la distancia de Mahalanobis [25, 26].

2. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO

2.1 Los principales parámetros del análisis fractal

2.1.1 Dimensión fractal

El análisis fractal facilita mucho la cuantificación de patrones difíciles de describir y la dimensión fractal (DF o D_F) se considera el concepto principal de dicho análisis. Este parámetro es una medida numérica que detalla el grado de irregularidad del contorno o la rugosidad de la superficie [27]. Esta medida es útil para describir cómo tan cerca está una geometría de ser un punto ($D_F=0$), una línea ($D_F=1$), un plano ($D_F=2$), o un volumen ($D_F=3$). Para cuantificar esta medida existen varias metodologías con sus propias bases teóricas [28]. La más popular, quizás, es el método de conteo de cajas o 'Box-Counting' que fue definido por Russell et al. 1980 [29]. Consiste en colocar una serie de rejillas o cajas de tamaño ε sobre una imagen binaria y registrar el número total de cajas $L(\varepsilon)$ necesario para cubrir toda la imagen (Fig. IV-3). La D_F es un índice de escala y la escala de medida en este caso sería ε .

La relación entre ε y $L(\varepsilon)$ cumple la ley de potencia mencionada anteriormente en la Eq.(4.1) y se puede escribir como,

$$L(\varepsilon) = \varepsilon^{-D_F} \quad (4.2)$$

Entonces, cuando $\varepsilon \rightarrow 0$, la dimensión de Box-Counting se puede estimar como:

$$D_F = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left(\frac{\log(L(\varepsilon))}{\log \varepsilon} \right) \quad (4.3)$$

Es importante considerar que las cajas de tamaño ε son conjuntos no vacíos para evitar así las complicaciones que pueden surgir con $\log(0)$ y $\log(\infty)$.

Lo cierto es que, este método es más fácil de aplicar en los programas de procesamiento de imágenes; eso es porque el propio programa es el que estima, para un tamaño ε , el número de cajas $L(\varepsilon)$ necesarias para rellenar toda la imagen. Por consiguiente, la D_F sería la pendiente del gráfico logarítmico donde se representa el tamaño de las cajas (eje x) frente al número de cajas necesarias para cubrir todo el objeto (eje y) [30]. La Figura IV-3 muestra la cantidad de cajas necesarias para cubrir completamente las imágenes de las distintas estructuras del ojo que vamos a estudiar en esta sección: retina neural, cuerpo vítreo, cristalino y córnea.

En resumidas cuentas, si el objeto analizado es un fractal puramente matemático este parámetro se calcula algebraicamente; en cambio, si es biológico la medida debe ser empírica porque el límite cero no puede aplicarse a objetos biológicos. En este caso, la D_F es, como se ha dicho antes, la pendiente de la gráfica logarítmica que relaciona ε con $L(\varepsilon)$ [31].

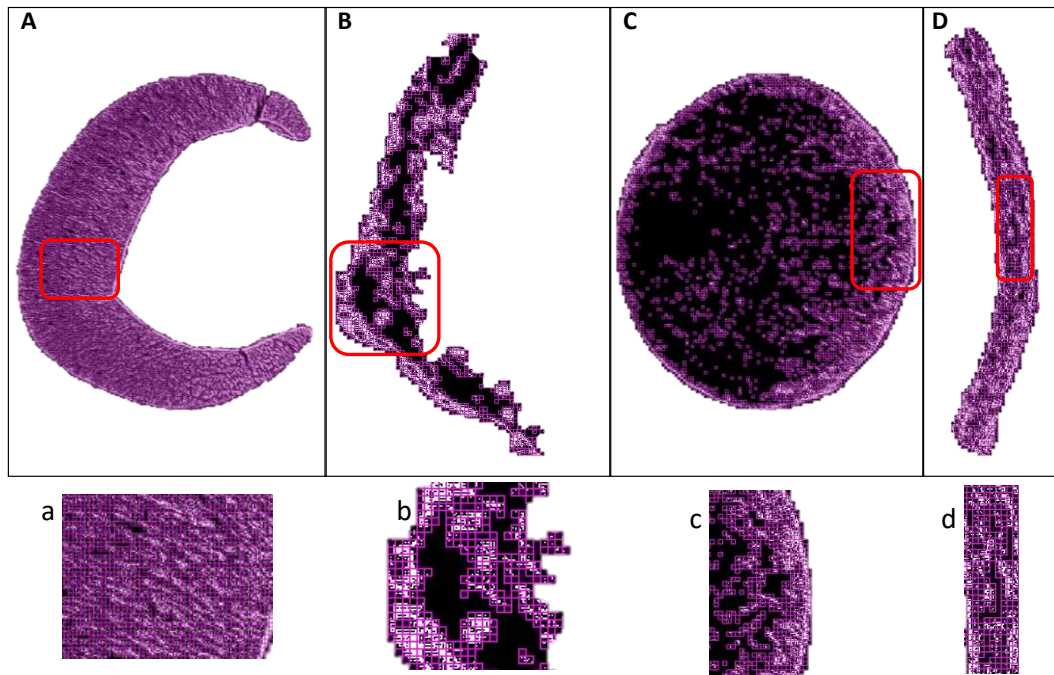


FIGURA IV- 3: Método de box-counting aplicado a imágenes de distintas estructuras de un ojo control con sus aumentos locales (retina(A,a), vítreo(B,b), cristalino(C,c) y córnea(D,d)).

2.1.2 Lacunaridad

La D_F no es un identificador completo de la textura del tejido, por eso se han propuesto otros conceptos para distinguir entre estructuras que tienen la misma D_F , pero parecen diferentes. Uno de estos conceptos es la Lacunaridad o Lagunaridad.

La lacunaridad (Λ), en términos generales, es una medida analítica multiescala que evalúa la heterogeneidad o la textura del tejido. Proporciona información sobre la estructura espacial dentro de la imagen a distintas escalas [32]. En particular, se refiere a la distribución de los huecos dentro de la estructura. Cuanto mayor es la lacunaridad, más espacios vacíos hay en la imagen [33].

Para determinar esta variable de manera totalmente segura, se analizan las fluctuaciones de la función de distribución de masa de los píxeles. Para ello, existe un algoritmo eficiente, denominado 'algoritmo de la caja deslizante o caja móvil', que analiza la desviación de una forma geométrica de la invariancia traslacional mediante un muestreo en caja deslizante

[34]. Es un algoritmo que está implementado en casi todos los programas de procesamiento y análisis de imágenes.

Este método sigue el siguiente procedimiento: coloca el conjunto en estudio (imagen) sobre una red enrejada. Luego, una caja o ventana de dimensiones $\varepsilon \times \varepsilon$ se sitúa en el píxel superior izquierdo de dicha imagen para obtener así la masa M que corresponde a esa ventana. A continuación, la caja se desliza sobre la red moviéndose hacia la siguiente columna de la primera fila y se vuelve a calcular la masa de la ventana para este sitio. El proceso se repite hasta cubrir todas las filas y columnas de la imagen (Fig. IV-4). En resumen, el software calcula en cada posición el número de huecos que hay. En nuestro caso, cada posición de píxel en la zona de interés será considerada vacía si el píxel es blanco, u ocupada si es negro.

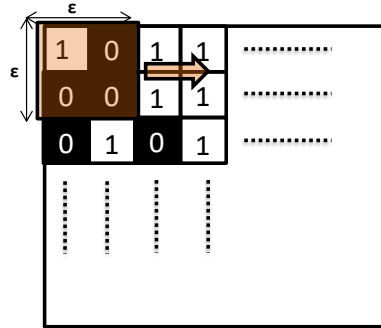


FIGURA IV- 4: Esquema explicativo del algoritmo de la caja deslizante usado para el análisis de la lacunaridad en una imagen binaria.

Si $n(M, \varepsilon)$ es el número de cajas deslizantes, la función de probabilidad $Q(M, \varepsilon)$ se obtiene dividiendo $n(M, \varepsilon)$ por el número total de cajas

$$Q(M, \varepsilon) = \frac{n(M, \varepsilon)}{L(\varepsilon)} \quad (4.4)$$

El primero y el segundo momento de la distribución se definen como $\sum_M MQ(M, \varepsilon)$ y $\sum_M M^2Q(M, \varepsilon)$, respectivamente. Ahora, se puede definir la lacunaridad para este tamaño de caja como [34]:

$$\Lambda(\varepsilon) = \frac{\sum_M M^2Q(M, \varepsilon)}{[\sum_M MQ(M, \varepsilon)]^2} = \frac{\sigma_\varepsilon^2}{\mu_\varepsilon^2} + 1 \quad (4.5)$$

Donde σ_ε^2 es la varianza de la distribución $Q(M, \varepsilon)$ y μ_ε^2 es el valor medio de dicha distribución. La lacunaridad depende de la escala ε . Para escalas grandes, el tejido tenderá

a aparecer homogéneo y la desviación estándar será pequeña. Sin embargo, para escalas pequeñas la desviación será mayor, creando huecos en el tejido y por ende aumentará la lacunaridad $\Delta(\varepsilon)$.

En general, la lacunaridad depende de la escala ε como $\Delta(\varepsilon) \sim \varepsilon^{-\beta}$, donde el exponente β se puede calcular por regresión lineal [35]. Hay que señalar que la lacunaridad es un parámetro sensible tanto a la densidad de la imagen como a su configuración espacial [36]. Por último, los índices de lacunaridad se representan como una gráfica log-log. Según Allain y Cloitre [34], la curva de la lacunaridad de un objeto monofractal autosimilar debe ser una línea recta con una pendiente igual a $(D - E)$, donde D y E son las dimensiones fractal y euclidiana, respectivamente. Si el conjunto es unidimensional dicha curva tendría distintas rupturas que corresponderían a distintas escalas dentro del conjunto. Sin embargo, si el conjunto es fractal, la recta es lineal [37].

El siguiente esquema (Fig. IV-5) resume los pasos realizados para el cálculo y la representación gráfica de la lacunaridad:

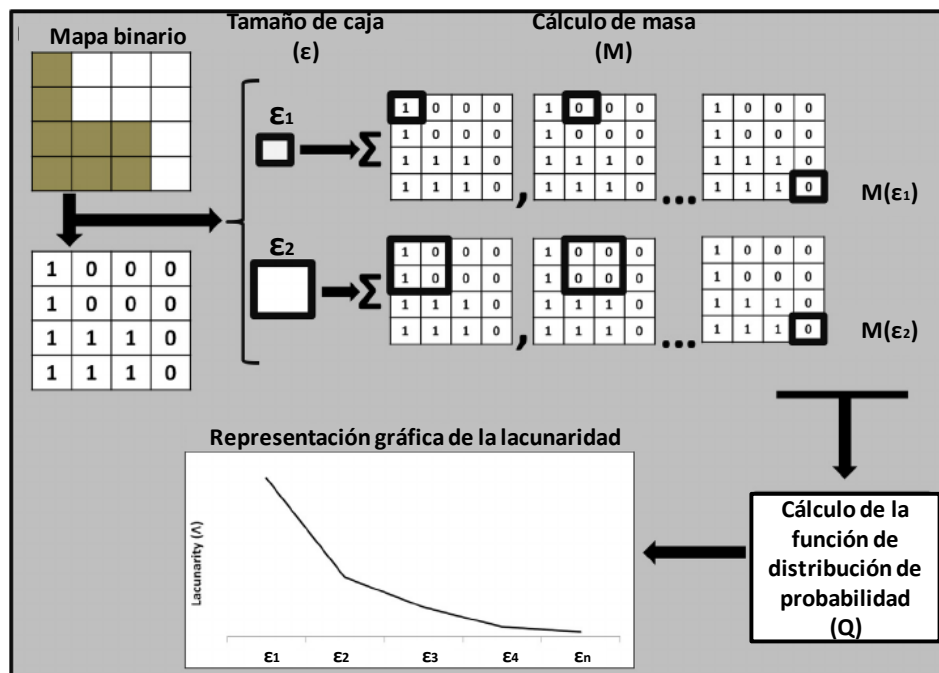


FIGURA IV- 5: Representación esquemática del cálculo de la lacunaridad para una imagen binaria, usando dos tamaños caja distintos ε_1 y ε_2 (imagen modificada a partir de la ilustración del artículo [38] con permiso de Elsevier).

2.1.3 El espectro multifractal o de singularidad

Los objetos multifractales son estructuras constituidas por la superposición de otras monofractales. Estos conjuntos ya no se definen únicamente por una sola DF sino por varias. Por lo tanto, cuando un conjunto estudiado presenta esta complejidad se analiza mediante el análisis multifractal. El objetivo de este tipo de análisis es evaluar estructuras que muestran fluctuaciones de D_F punto a punto. Ahora bien, este tipo de análisis no deja de ser una técnica del análisis fractal, útil para estudiar conjuntos autosimilares más complejos.

Lo cierto es que este tipo de análisis es el mejor indicado para estudiar las imágenes médicas y biológicas [39], como en este caso. Esta herramienta facilita a los científicos analizar, cuantificar, interpretar y detectar posibles anomalías. En particular, se utiliza para cuantificar la textura de los tejidos. Para ello, se han desarrollado varios algoritmos para facilitar la interpretación de este tipo de imágenes y cuantificar así la composición de la textura.

Los parámetros característicos de la multifractalidad son, además de la DF y lacunaridad, el espectro de singularidad $f(\alpha)$ [40]. Este espectro permite caracterizar una estructura como mono- o multifractal. Para medirlo, la imagen se cubre con una serie de cajas de tamaño ε , $L(\varepsilon)$. Entonces se puede definir la probabilidad $P_i(\varepsilon)$ para cada caja como:

$$P_i(\varepsilon) = \frac{N_i(\varepsilon)}{N_T} \quad (4.6)$$

Donde $N_i(\varepsilon)$ es el número de píxeles ocupados (píxeles negros) en la caja i , dividido por el número total de píxeles N_T . Esta medida nos da la probabilidad de que un píxel elegido al azar pertenezca a la caja i . En un tejido homogéneo, la probabilidad previa varía homogéneamente con el tamaño ε como $P \sim \varepsilon^D$, donde D es la dimensión fractal del tejido. Por otra parte, si el tejido es heterogéneo, la probabilidad se escala localmente en diferentes regiones k del tejido como $P(k, \varepsilon) \sim \varepsilon^{\alpha_k}$, siendo α_k el exponente de Lipschitz-Hölder o fuerza de singularidad [41]. Si medimos ahora el número de cajas $B(\alpha)$, cuyas singularidades están en el intervalo $[\alpha, \alpha + d\alpha]$, veremos que se escalan como $B(\alpha) \sim \varepsilon^{f(\alpha)}$; $f(\alpha)$ es la DF del conjunto de cajas con singularidad α [42].

Para calcular $f(\alpha)$, es habitual proceder de la siguiente manera. De la ecuación (4.6), una medida de probabilidad que depende de un parámetro q se define como [43]:

$$\mu_i(q, \varepsilon) = \frac{(P_i(\varepsilon))^q}{\sum_{j=1}^{L(\varepsilon)} (P_j(\varepsilon))^q} \quad (4.7)$$

El parámetro q actúa como una lupa. Los valores de $q > 1$ amplifican las regiones con alta probabilidad, mientras que los valores de $q < 1$ amplifican las de baja probabilidad. Para un cierto rango de valores de q $[(-10,10), (-20, 20), \text{etc.}]$, la $D_F f(\alpha(q))$ se calcula como la pendiente de la recta de regresión de $\sum_i \mu_i(q, \varepsilon) \log \mu_i(q, \varepsilon)$ frente a $\log(\varepsilon)$, mientras que la singularidad $\alpha(q)$ se calcula como la pendiente de la regresión $\sum_i \mu_i(q, \varepsilon) \log P_i(q, \varepsilon)$ frente a $\log(\varepsilon)$ [35]. Así, para cada valor de q tenemos un par $(\alpha(q), f(\alpha(q)))$ denominado espectro multifractal [44]. Dicho espectro indica información sobre la estructura y posee varias propiedades de las cuales se destaca:

- Si la estructura examinada es una distribución multifractal, el espectro presenta una forma parabólica y cóncava.
- A medida que aumenta la multifractalidad, la parábola es más ancha.
- Para $q = 0$, la parábola alcanza su valor máximo $f(\alpha_0)$ que corresponde al valor de la capacidad de la dimensión D_0 .
- Para $q = 1$, $f(\alpha) = \alpha$ y el valor corresponde a la dimensión de información D_1 .
- La parte izquierda del espectro, medida a partir de α_0 , corresponde a las grandes fluctuaciones ($q > 1$), mientras que la parte derecha corresponde a las pequeñas fluctuaciones ($q < 1$). Por lo tanto, una estructura multifractal tendrá una curva en la parte izquierda más abierta que la derecha debido a su heterogeneidad (Fig. IV-6).
- Si la estructura, por el contrario, es monofractal la gráfica colapsa en un solo punto (una sola singularidad).

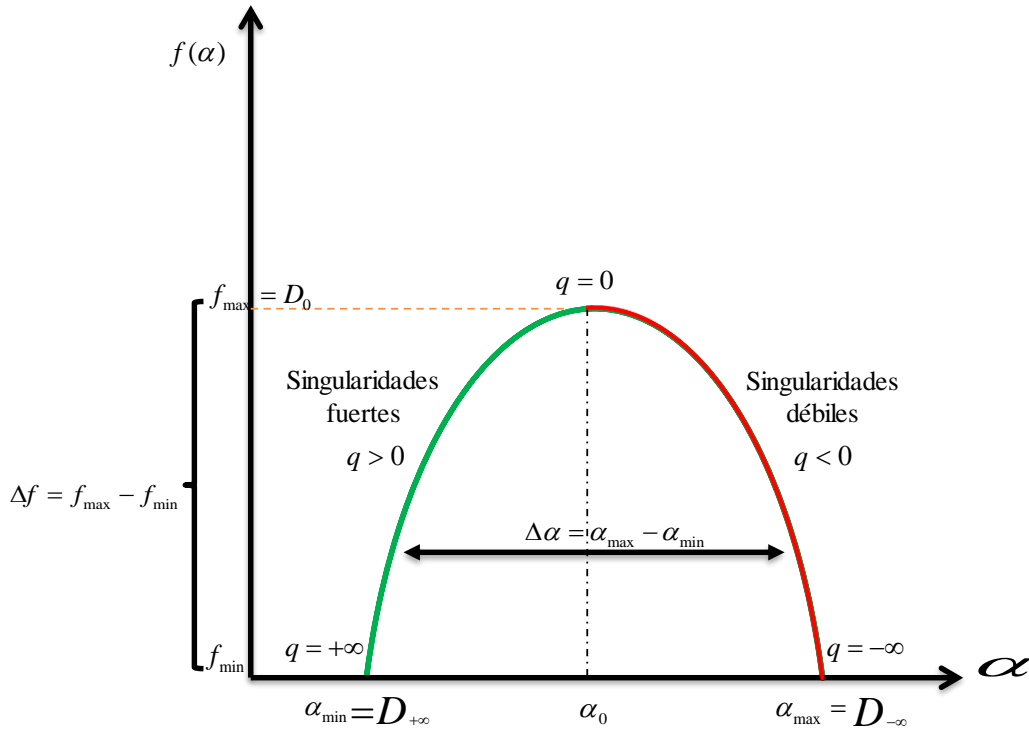


FIGURA IV- 6: Representación gráfica del espectro multifractal.

El algoritmo detallado anteriormente está implementado en el programa FraLac aplicado al ImageJ [45]. En este capítulo se han tomado las curvas proporcionadas por el software junto con una medida de multifractalidad llamada Divergencia ρ . Este parámetro se basa en los valores mínimo y máximo para los espectros multifractales $f(\alpha)$ versus α para los dos conjuntos de valores alrededor de cada lado de $q = 0$. Matemáticamente (ecuación 4.8), es la relación de las áreas definidas por los espectros dentro de esos dos espacios, $\times 100$, calculada en el espacio definido por las Q_{set} utilizadas para determinar los espectros multifractales (Karperien, A. Comunicación personal. 12 de Julio de 2016).

$$\rho = \frac{(\alpha_0 - \alpha_{\min}) \cdot (f(\alpha_0) - f(\alpha_{\min}))}{(\alpha_{\max} - \alpha_0) \cdot (f(\alpha_0) - f(\alpha_{\max}))} \times 100 \quad (4.8)$$

Para usarlo para comparar patrones, se deben utilizar las mismas Q_{set} para todas las imágenes. En nuestro caso, este rango va desde -30 a 30. Por ejemplo, en el caso de la figura IV-6, ρ es igual a 100 porque la parte multifractal con grandes fluctuaciones es igual a la

parte de pequeñas fluctuaciones. Como puede verse en la figura IV-6, el valor máximo del espectro multifractal corresponde a la singularidad dominante o D_0 .

En suma, el espectro multifractal nos va a aportar el grado de rugosidad, complejidad, anomalía y asimetría de los tejidos [43]. Mientras que, la curvatura y la simetría del espectro nos va a proporcionar información sobre la heterogeneidad del tejido [46]. A partir de las curvas de los espectros multifractales podemos obtener los valores α_{\max} y α_{\min} , que indican la probabilidad de fluctuación máxima y mínima de los píxeles, respectivamente [47]. A partir de estos parámetros, podemos calcular la anchura del espectro multifractal $\Delta\alpha = \alpha_{\max} - \alpha_{\min}$, un índice que proporciona información sobre la heterogeneidad de la textura, es decir, realiza una determinación cuantitativa del grado de multifractalidad. Además, hemos evaluado la asimetría de la forma del espectro mediante la siguiente fórmula [48, 49]:

$$A = \frac{\alpha_0 - \alpha_{\min}}{\alpha_{\max} - \alpha_0} \quad (4.9)$$

Donde α_0 es el valor de α cuando $f(\alpha)$ asume su máximo valor. El parámetro A es también un índice importante de multifractalidad.

2.2 Procedimiento matemático para comparar espectros multifractales

El apartado anterior describe el procedimiento para obtener el espectro multifractal de una estructura dada. En este apartado se quiere caracterizar las diferencias en el espectro multifractal de estructuras oculares de los tres grupos estudiados: control, D2 y D8. Cada uno de estos grupos comprende 18 ojos de embriones diferentes. Nueve de ellos están marcados con anti-colágeno IV y los otros 9 con anti-laminina-1. De cada ojo, se analizaron 4 estructuras (córnea, cristalino, vítreo y retina). En total, se analizaron 216 espectros multifractales. Para extraer información de todos ellos hemos considerado dos métricas de comparación. La razón por la que hemos utilizado varias métricas es para verificar la consistencia de los resultados:

La primera métrica consiste en lo siguiente: cada espectro multifractal obtenido se puede caracterizar por un vector $V_{g,i} = [\alpha_0, \Delta\alpha, f(\alpha_0), \Delta f, A]$, que describe los parámetros, definidos en la sección anterior, para el espectro multifractal de la estructura del ojo "i" que pertenece al grupo "g" (control-C-, D2, D8). El grupo control se puede caracterizar por un vector medio $V_C = (1/N) \sum_{i=1}^N V_{C,i}$, donde N es el número de ojos en este grupo. Una distancia ($d_{g,i}$) entre V_C y el espectro representado por $V_{g,i}$ se puede definir como:

$$d_{g,i} = \sqrt{(V_{g,i} - V_C) \cdot (V_{g,i} - V_C)^T} \quad (4.10)$$

Las estructuras del grupo control analizadas estarán a una distancia media de ese vector medio V_C dada por $\langle d_{C,i} \rangle_i$, donde el subíndice denota que el valor medio debe tomarse promediando sobre las estructuras estudiadas de cada ojo. Finalmente, se puede definir una distancia entre un grupo determinado "g" y el grupo control C como:

$$d(g, C) = \frac{\langle d_{g,i} \rangle_i}{\langle d_{C,i} \rangle_i} \quad (4.11)$$

Esta distancia mide la diferencia media de un grupo de estructuras de cada ojo con la media del control, normalizándola por la distancia media de las estructuras del grupo control a su media. De este modo, valores mayores que 1 nos indican cuantas veces las estructuras de ese ojo difieren de las del control.

Por otra parte, la **segunda métrica** consiste en lo siguiente: cada espectro multifractal está caracterizado por un vector $h_q(\alpha(q), f(\alpha(q)))$, según lo expuesto anteriormente. Para cada

“ q ” el vector anterior define una variable estadística bidimensional con una matriz de covarianzas \mathbf{S}_q teniendo en cuenta un grupo de espectros (Control, D2 y D8). Podemos definir el vector $h_q^C = (1/N) \sum_{i=1}^N (\alpha_i(q), f_i(\alpha(q)))$ como el vector medio que caracteriza al grupo control, siendo N , de nuevo, el número de ojos en el grupo control. En cada punto “ q ”, el grupo control tendrá una matriz de covarianzas \mathbf{S}_q^C . Para cada espectro de cada ojo “ i ” dentro de un grupo “ g ” y para cada punto “ q ” del espectro podemos definir una distancia como:

$$\Omega_q^{g,i} = \sqrt{(h_q^{g,i} - h_q^C)^T \cdot [\mathbf{S}_q^C]^{-1} \cdot (h_q^{g,i} - h_q^C)} \quad (4.12)$$

Esta distancia es la distancia de Mahalanobis [25, 26] entre un punto del espectro y la media para el grupo control, para un determinado “ q ”. Mide la distancia entre estos dos puntos, pero normalizándola por la desviación estándar de los datos en la dirección del punto $h_q^{g,i}$ considerado. Con la definición de la ecuación (4.12) podemos dar una distancia del espectro considerado al espectro control como un valor medio dado por $\Omega^{g,i} = \langle \Omega_q^{g,i} \rangle_q$, donde el subíndice “ q ” significa que debe tomarse la media en “ q ”. Finalmente, podemos definir la distancia de un grupo “ g ” al control, $\Omega(g, C)$ como:

$$\Omega(g, C) = \langle \Omega^{g,i} \rangle_i \quad (4.13)$$

Análogamente, también podemos estudiar el valor de estas distancias para cada punto “ q ” por medio de:

$$\Omega_g(q) = \langle \Omega_q^{g,i} \rangle_i \quad (4.14)$$

Esta última distancia $\Omega_g(q)$ nos da información sobre qué parte del espectro ($q < 1$ o $q > 1$) tiene mayores variaciones respecto al grupo control. Esto nos da un parámetro más para estudiar si la diferencia entre las estructuras se produce más en la parte monofractal o multifractal.

2.3 Test de significancia estadística

Como se ha mencionado anteriormente, hemos calculado también los valores de la DF, lacunaridad (Lac) (valor medio de $\sigma_\varepsilon^2 / \mu_\varepsilon^2$ definido en la ecuación (4.5)) [45] y de la Divergencia (Div), para todas las estructuras.

Para tamaños de muestras pequeñas, como en nuestro caso, se proporciona el método Bootstrap para estimar sus distribuciones. Este método es el más popular utilizado para estimar estadísticas sobre la muestra original al muestrear un conjunto de datos con reemplazamiento [23]. Al igual que en el capítulo II, vamos a usar este método para estimar la media, desviación estándar, skewness y curtosis. Aquí también vamos a utilizar un total de 100 réplicas, este número debería ser suficiente para darnos los niveles de confianza que necesitamos [50]. Posteriormente, utilizamos el test estadístico no paramétrica denominado Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos D2 y D8. La idea de este test se basa en comparar medianas entre k grupos (en nuestro caso $k=3$).

2.4 Procesamiento digital de imágenes

Para realizar el análisis multifractal, se cargan las imágenes en el programa ImageJ. Luego, para cada imagen se seleccionaron cuatro ROI: córnea, cristalino, vítreo y retina. En total, se analizaron 54 ojos. Previamente al uso del programa FracLac [45], cada ROI se procesó mediante la aplicación de las siguientes funciones: se ha utilizado la herramienta ‘Sharpen’ es un filtro espacial perfilado de bordes que acentúa el detalle en la imagen, es decir, trata de reemplazar cada pixel de la imagen por el promedio ponderado de la vecindad usando la siguiente máscara 3×3 [51]:

$$\begin{array}{ccc} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 12 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{array}$$

Asimismo, se ha realizado un aumento del contraste (30%) con el fin de mejorar la calidad de segmentación de la imagen, y se ha aplicado una reducción del ruido. Todas las imágenes están en formato RGB, sin embargo, para analizarlas con el FracLac hay que transformarlas en formato binario. Eso se debe a que el algoritmo solo compila este tipo de formato. Para ello, a través del programa, las imágenes se convirtieron de RGB a binario siguiendo la ruta: “*ImageJ>Process>Binary>Make binary*”. Los parámetros fractales se calculan examinando el píxel negro; en cambio, el píxel blanco se consideraría como fondo [52, 53]. La figura IV-7 presenta un ejemplo de cristalino antes y después de la binarización.

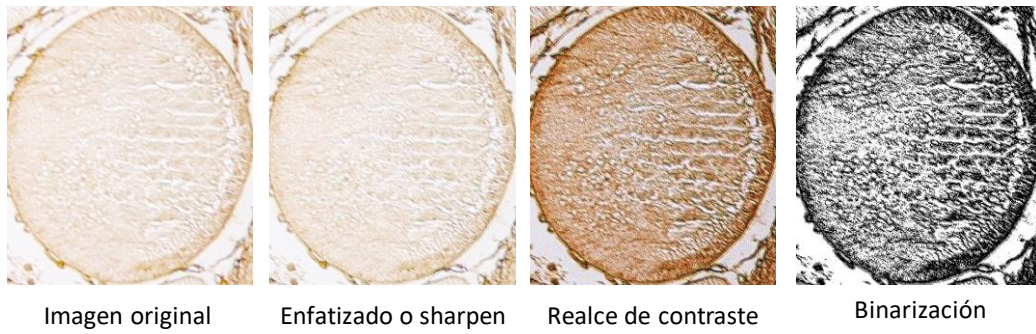


FIGURA IV- 7: Ejemplo de la binarización de un cristalino control mediante el programa de procesado de imagen ImageJ. La imagen original se enfatiza, se realza el contraste (30%), finalmente, se convierte a binaria.

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos con ImageJ se realizó mediante Matlab [54].

3. RESULTADOS

Los resultados para el espectro multifractal y la lacunaridad dependiendo de la estructura del ojo analizada (córnea, cristalino, vítreo o retina) se dan en las figuras IV-8, IV-9, IV-10 y IV-11, respectivamente.

Los valores de la lacunaridad dependen del tamaño de la caja y de la distribución de los huecos: una lacunaridad baja implica homogeneidad, ya que todos los tamaños de los huecos son iguales; mientras que, una lacunaridad mayor implica mayor heterogeneidad, lo que significa que la textura tiene huecos variables. En todos los casos, las figuras muestran que a medida que aumenta el tamaño de la caja, el valor de la lacunaridad disminuye. Por otro lado, en la mayoría de los casos, D2 y D8 son más lacunares (los tejidos tienen más huecos) que el control, excepto en córneas y retinas marcadas con anti-laminina-1.

El exponente $-\beta$ nos da información sobre cómo la homogeneidad del tejido cambia con la escala. Un valor nulo de β nos indica que el tejido es uniforme independientemente de la escala. De esta manera, podemos observar que, tanto en el cristalino como en el vítreo, la heterogeneidad con la escala tiende a aumentar. Por el contrario, en el caso de la retina y córnea, tiende a disminuir en ambos tipos de marcaje. Aunque parece que para el caso de las córneas marcadas con anti-laminina-1 este valor es casi el mismo que en el control.

En las figuras IV-8D, IV-9B, IV-9D, IV-11B y IV-11D se observa que el grupo D8 exhibe los tejidos más heterogéneos entre todas las muestras, lo que indica una disposición espacial más compleja.

Las figuras IV-8(A,C), IV-9(A,C), IV-10(A,C) y IV-11(A,C) muestran espectros multifractales correspondientes a las distintas estructuras marcadas con anti-colágeno IV o anti-laminina-1.

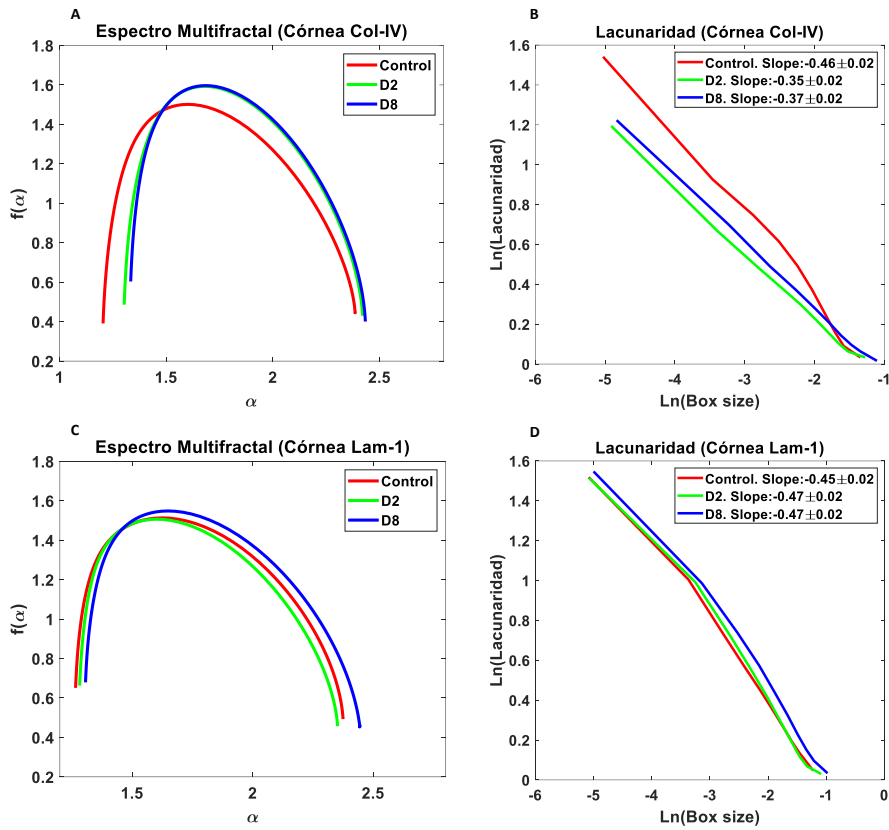


FIGURA IV- 8: Espectros multifractales y curvas de lacunaridad para córneas marcadas con anti-colágeno IV (A y B) o con anti-laminina-1 (C y D), para todos los grupos estudiados.

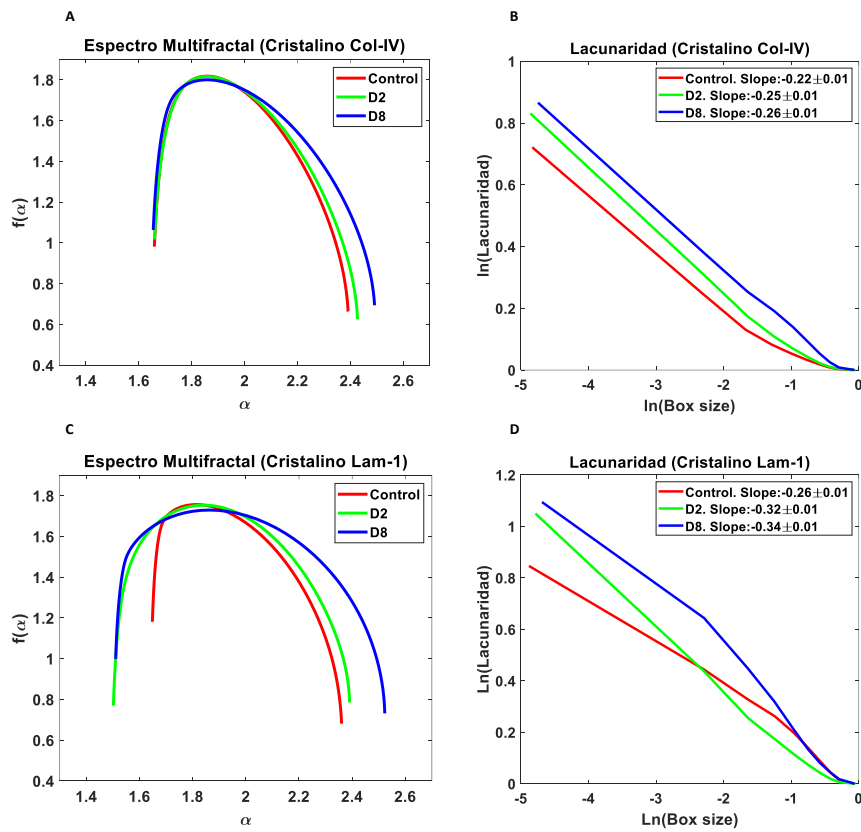


FIGURA IV- 9: Espectros multifractales y curvas de lacunaridad para cristalinos marcados con anti-colágeno IV (A y B) o con anti-laminina-1 (C y D), para todos los grupos estudiados.

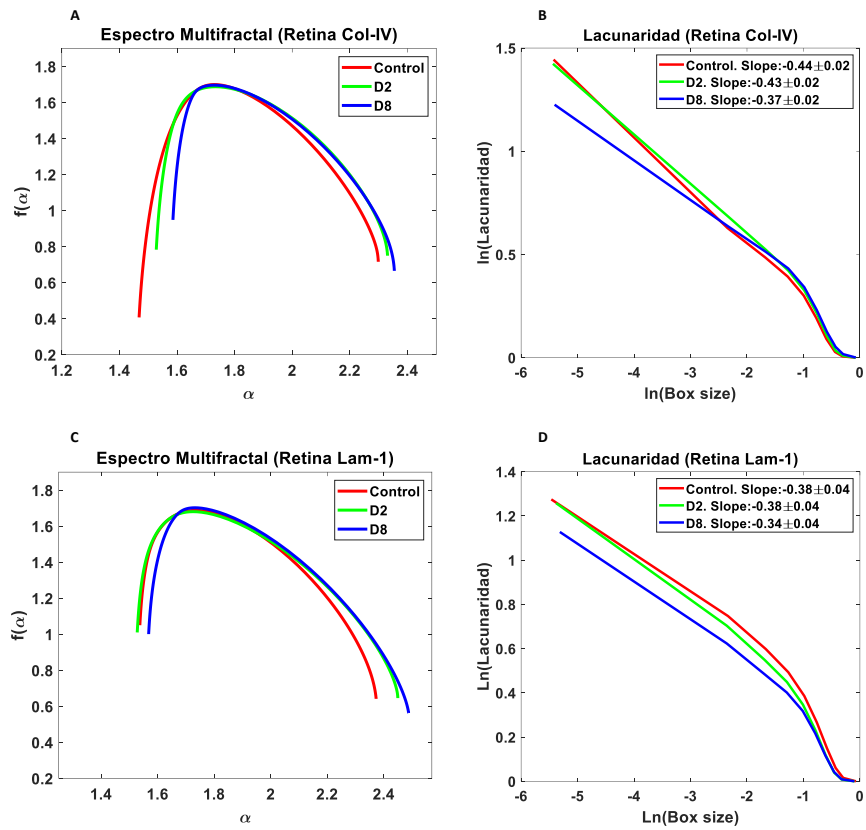


FIGURA IV- 10: Espectros multifractales y curvas de lacunaridad para retinas marcadas con anti-colágeno IV (A y B) o con anti-laminina-1 (C y D), para todos los grupos estudiados.

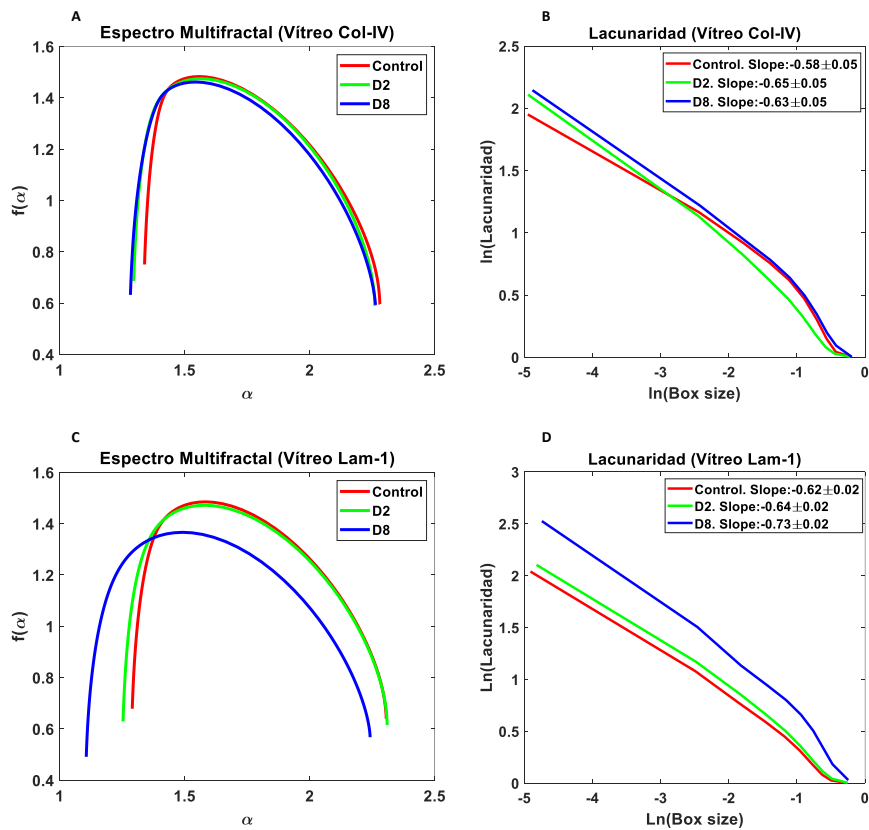


FIGURA IV- 11: Espectros multifractales y curvas de lacunaridad para vítreos marcados con anti-colágeno IV (A y B) o con anti-laminina-1 (C y D), para todos los grupos estudiados.

En la sección anterior, hemos definido ciertos parámetros para comparar los espectros multifractales entre el grupo control y los grupos D2 y D8. Los resultados se dan en las tablas IV-1 y IV-2.

Para D2 y D8, los valores del parámetro $\Delta\alpha$ muestran que los cristalinos, retinas y vítreos marcados con anti-laminina-1, así como los vítreos marcados con anti-colágeno IV tienen valores más altos que el control, lo que indica la presencia de un grado fuerte de multifractalidad en estas estructuras. Sin embargo, la córnea de ambos grupos mostró un grado de multifractalidad menor que el control, tanto para el colágeno IV como para la laminina-1.

Por otro lado, la asimetría puede presentar tres formas: asimetría sesgada hacia la derecha ($A > 1$), sesgada a la izquierda ($A < 1$) o simétrica ($A = 1$). Se observa que todas las muestras de los tres grupos tienen valores de $A < 1$, por lo que la curva del espectro multifractal está sesgada a la izquierda. Un espectro sesgado a la izquierda denota altos exponentes fractales y grandes fluctuaciones en los datos. Las tablas IV-1 y IV-2 también revelan que, para los grupos D2 y D8, las córneas, cristalinos y vítreos marcados con anti-colágeno IV, así como los cristalinos y vítreo con anti-laminina-1 tienen valores más altos de A que el control. En resumen, en la mayoría de los espectros multifractales, el espectro tiene una forma y simetría diferentes entre el control y los grupos D2 o D8.

Respecto a los resultados de $d(g, C)$ (véase Tablas IV-1 y IV-2), considerando que esta métrica está normalizada por la escala del grupo control (véase ecuación 4.11), los valores superiores a 1 muestran cambios relevantes con respecto al grupo control. Los resultados indican que la distancia con respecto al control es alta en el caso del marcaje con anti-laminina-1, especialmente en el cristalino y vítreo. Además, la variabilidad de esta distancia es muy grande en estos dos casos (véase la desviación estándar en las tablas IV-1 y IV-2). Por otro lado, las estructuras marcadas con anti-colágeno IV muestran una distancia ligeramente mayor que control (véase caso de la retina y córnea). Finalmente, la distancia con respecto al control no es significativa en algunas estructuras marcadas con anti-laminina-1 (córnea, retina y vítreo) y anti-colágeno IV (cristalino y vítreo).

TABLA IV- 1: Parámetros obtenidos del espectro multifractal de la córnea y el cristalino para todos los casos analizados. C: grupo control. D2 y D8: grupos deficitarios.

Estructura	Córnea						Cristalino					
Marcaje	Col-IV			Lam-1			Col-IV			Lam-1		
Grupo	C	D2	D8	C	D2	D8	C	D2	D8	C	D2	D8
α_0	1.59	1.68	1.70	1.62	1.64	1.69	1.83	1.82	1.91	1.86	1.93	1.92
$\Delta\alpha$	1.22	1.01	1.22	1.14	1.06	1.26	0.62	0.63	0.98	0.83	0.91	1.02
$f(\alpha_0)$	1.52	1.62	1.61	1.44	1.56	1.60	1.83	1.76	1.78	1.82	1.85	1.80
Δf	1.37	1.28	1.31	0.88	1.11	1.28	1.38	1.02	0.98	1.22	1.53	1.16
A	0.33	0.41	0.45	0.83	0.35	0.47	0.22	0.28	0.59	0.31	0.41	0.40
$d(g, C)$		1.3±0.4	1.5±0.5		1.2±0.4	1.0±0.4		1.0±0.6	1.1±0.4		2.2±1.1	2.2±1.4
$\Omega(g, C)$	1.2±0.5	1.7±0.4	1.8±0.3	1.2±0.3	1.6±0.4	1.4±0.5	1.2±0.3	1.5±0.6	1.9±0.6	1.3±0.2	3.1±1.2	2.7±1.3

TABLA IV- 2: Parámetros obtenidos del espectro multifractal de la retina y el vítreo para todos los casos analizados. C: grupo control. D2 y D8: grupos deficitarios.

Estructura	Retina						Vítreo					
Marcaje	Col-IV			Lam-1			Col-IV			Lam-1		
Grupo	C	D2	D8	C	D2	D8	C	D2	D8	C	D2	D8
α_0	1.65	1.73	1.73	1.71	1.69	1.72	1.57	1.56	1.38	1.51	1.61	1.34
$\Delta\alpha$	0.72	0.73	0.86	0.81	0.99	0.78	0.67	0.78	1.33	0.92	1.06	1.38
$f(\alpha_0)$	1.63	1.71	1.72	1.69	1.69	1.72	1.58	1.51	1.25	1.44	1.50	1.17
Δf	1.14	0.92	1.26	1.09	1.23	1.32	0.77	1.0	1.25	0.84	1.03	1.20
A	0.21	0.22	0.21	0.20	0.05	0.16	0.09	0.30	0.61	0.22	0.47	0.72
$d(g, C)$		1.5±0.4	1.5±0.3		1.0±0.5	1.0±0.3		0.8±0.6	1.2±0.9		1.1±0.6	1.8±1.1
$\Omega(g, C)$	1.2±0.4	1.7±0.6	1.8±0.2	1.2±0.4	1.7±0.7	2.1±0.5	1.2±0.4	0.9±0.5	1.5±0.9	1.2±0.3	1.4±0.7	3±2

Respecto a la segunda métrica $\Omega(g, C)$, la distancia con respecto al grupo control aumenta significativamente en las estructuras marcadas con anti-laminina-1 (cristalino, retina y vítreo) y con anti-colágeno IV (córnea, cristalino y retina). Por otro lado, la distancia es ligeramente mayor en las córneas marcadas con anti-laminina-1 y permanece prácticamente igual en el caso del vítreo marcado con anti-colágeno IV. Se puede observar que, la mayor diferencia con el grupo control se produce en el caso del cristalino y retina, ambos marcados con anti-laminina-1 o con anti-colágeno IV.

Esta segunda métrica también nos permite hacer una comparación para cada valor del parámetro "q" en los espectros multifractales (véase ecuación 14). En la figura IV-12 es posible ver, parámetro $\Omega_g(q) = \langle \Omega_q^{g,i} \rangle_i$ promediado para los ojos del mismo grupo, algunas estructuras con las mayores distancias respecto al control (Fig. IV-12 arriba) y otras con diferencias mínimas importantes (Fig. IV-12 abajo). Esta figura nos permite comparar en qué parte del espectro multifractal se produce la mayor diferencia (parte monofractal $q < 1$ o parte multifractal $q > 1$). Como se puede observar, en el caso de valores más grandes (Fig. IV-12 arriba), la diferencia con el grupo control se encuentra principalmente en la parte multifractal de los espectros. En el caso de las diferencias menos importantes (Fig. IV-12 abajo), los cambios afectan a la parte monofractal y multifractal por igual.

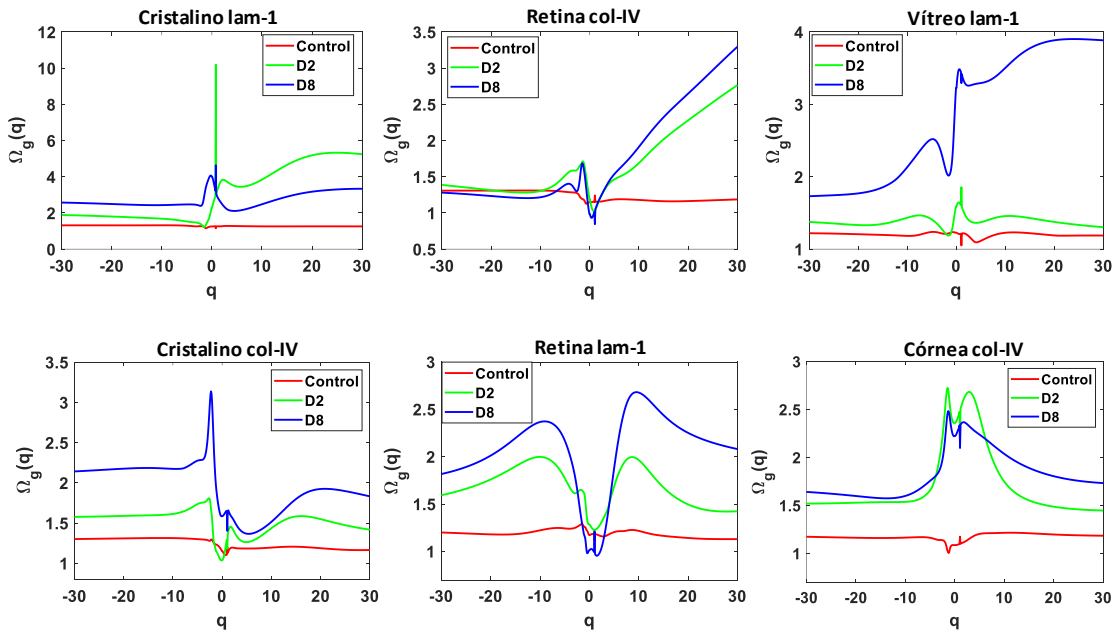


FIGURA IV- 12: Valores de la métrica definida por la ecuación 14, para los casos más relevantes (fila superior) y para las distancias ligeramente más altas que el grupo control (fila inferior). En el caso de distancias mayores, la mayor diferencia entre los espectros de los diferentes grupos ocurre en la parte multifractal $q > 1$.

En cuanto a los resultados de significación estadística, los resultados se resumen en las tablas IV-3 y IV-4. En las que aparecen los valores de la estimación de la media, desviación estándar, asimetría y curtosis de las distribuciones de probabilidad de las variables (DF, Lac, Div) para las diferentes estructuras estudiadas. Después de aplicar la prueba de significancia Kruskal-Wallis, si el p-valor es menor que 0.05, existen diferencias significativas entre los grupos. Por otro lado, si el p-valor es mayor que 0.05, un asterisco marca los parámetros cuya diferencia con respecto al control no es estadísticamente significativa. Como puede verse en las tablas, en casi todos los casos, todos los parámetros de las distribuciones de probabilidad tienen diferencias significativas. Lo que demuestra que los cambios en la estructura fractal del tejido ya se producen a partir de una dieta materna con déficit leve de AF (grupo D2). Para facilitar la comprensión de estas tablas, usamos una función elipsoidal de Matlab para ajustar las medidas (D_F, Lac y Div) a una superficie elipsoidal. Las figuras IV-13 y IV-14 muestran el valor del bootstrap para estimar los valores medios de la DF, lacunaridad y divergencia junto con sus intervalos de incertidumbre utilizando la forma de los elipsoides en el espacio [55], para las diferentes estructuras estudiadas. Las diferencias con el grupo control son evidentes prácticamente en todas las estructuras. La diferente orientación de los elipsoides también nos informa que la correlación entre estas tres variables (D_F, Lac, Div) cambia entre el grupo control y los grupos D2 y D8.

TABLA IV- 3: Valores estadísticos para la media μ , desviación estándar σ , Skewness y curtosis de todas las estructuras oculares para el grupo D2 en comparación con el control.

Estructura	Marcaje	Parámetros $\left[\begin{array}{cc} \mu & \sigma \\ \text{Skewness} & \text{Curtosis} \end{array} \right]$		
		DF	Lac	Div
Córnea	Collagen IV	1.55, 0.06 0.03, 1.62	0.23*, 0.04* 0.30*, 1.86	50.96, 19.32 0.35*, 1.78
	Laminina-1	1.49, 0.06 0.15, 2.40	0.29, 0.09 0.77*, 1.85	36.55, 20.71* 0.15, 1.56
Cristalino	Collagen IV	1.78, 0.02 -0.03, 1.69	0.33, 0.10 0.83*, 2.58	23.08, 15.95 1.11, 2.68
	Laminina-1	1.77, 0.07* -0.34, 1.89	0.37, 0.07 0.43*, 1.97*	79.79, 57.86 0.70, 2.25*
Retina	Collagen IV	1.64, 0.02 -0.12, 2.13	0.363, 0.04 1.08, 2.55	34.11, 14.87 0.36, 2.28
	Laminina-1	1.63, 0.02 0.15*, 1.85*	0.39, 0.06 1.06, 2.54	20.63*, 13.55 0.64, 2.18*
Vítreo	Collagen IV	1.48*, 0.04 -0.51, 1.74*	0.52, 0.06 -0.28, 2.12*	35.61, 18.62 1.01*, 2.48*
	Laminina-1	1.47, 0.06 -0.56, 2.31*	0.54, 0.14 0.21*, 1.67*	46.25, 24.11* 0.71, 2.19*

TABLA IV- 4: Valores estadísticos para la media μ , desviación estándar σ , Skewness y curtosis de todas las estructuras oculares para el grupo D8 en comparación con el control.

Estructura	Marcaje	Parámetros		
		DF	Lac	Div
Córnea	Collagen IV	1.59, 0.06 -0.49*, 2.18*	0.25, 0.03 0.09, 2.30	40.18, 21.61 0.75, 2.05
	Laminina-1	1.49, 0.06 -0.64, 2.56	0.30, 0.06* 0.32, 2.35*	34.88, 11.28 0.32, 2.11
Cristalino	Collagen IV	1.76, 0.03 0.29, 1.57	0.41, 0.17 0.38, 1.58	23.31, 12.7 0.29, 2.01
	Laminina-1	1.68, 0.09 -0.13, 1.52	0.50, 0.11* 1.23, 2.64	54.27, 56.89 0.90, 2.61
Retina	Collagen IV	1.66, 0.02 0.20, 2.12	0.38, 0.04 0.41*, 2.00*	17.94, 7.88 0.67, 2.28
	Laminina-1	1.65, 0.02 -0.23, 1.70*	0.37, 0.03 1.00, 2.67	13.52, 7.44 0.63, 2.55*
Vítreo	Collagen IV	1.44, 0.11 -1.06, 2.46	0.53, 0.12 -0.23, 1.73	38.10, 27.85 0.77, 2.10
	Laminina-1	1.36, 0.12 -0.48, 1.81	0.53, 0.21 0.89, 2.15	61.21, 42.60 0.55, 1.87

Como se muestra en las figuras IV-13 y IV-14, las córneas marcadas con anti-colágeno IV o con anti-laminina-1, para D2 y D8, tienen valores más altos de DF y lacunaridad que el control, mientras que ambos grupos tienen menor valor de divergencia. Por otro lado, para D2 y D8, los cristalinos marcados con anti-colágeno IV tienen valores de DF y divergencia más pequeños que el control, así como mayor lacunaridad. Respecto a las retinas marcadas con anti-colágeno IV o con anti-laminina-1, D2 y D8 tienen los valores más bajos de DF y divergencia mientras que el control experimenta los valores más altos. Las retinas marcadas con anti-colágeno IV tienen el mayor valor de lacunaridad para D2 y D8 que el control, mientras que las retinas marcadas con anti-laminina-1 tienen el menor valor de lacunaridad para D2 y D8 que el control. Finalmente, el vítreo marcado con anti-colágeno IV o anti-laminina-1 exhibe valores más altos de DF y divergencia que el control; sin embargo, ambos casos presentan un valor más bajo de lacunaridad con respecto a los controles.

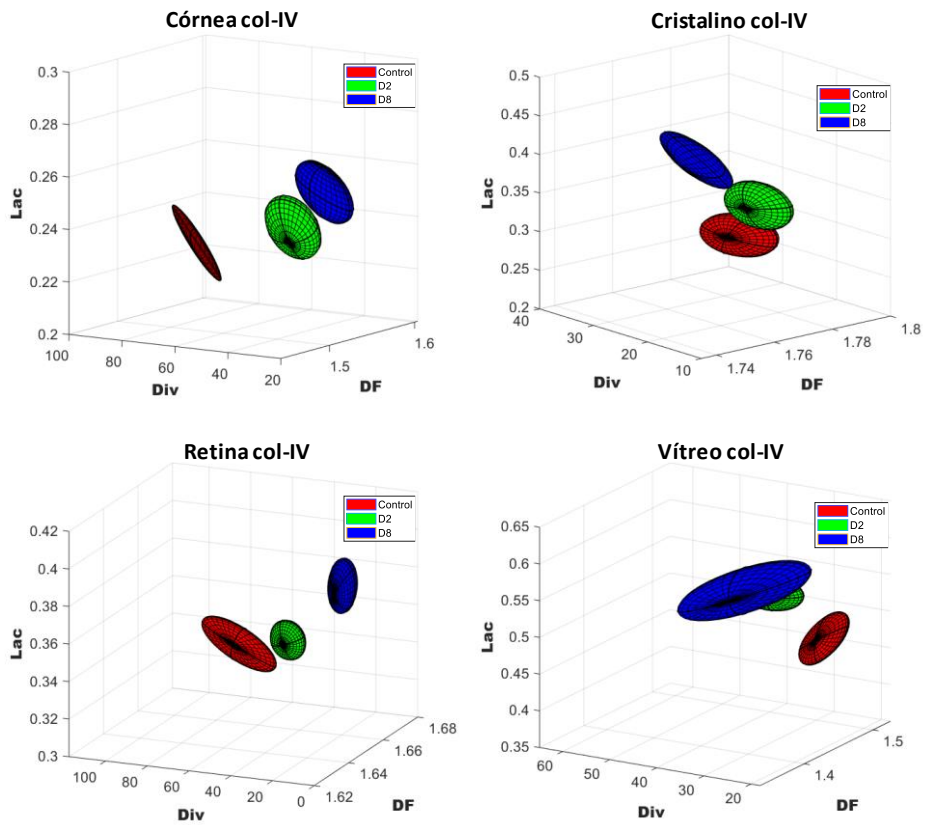


FIGURA IV- 13: Representación gráfica en forma de elipsoides para los datos de la distribución de la media, para todas las estructuras marcados con anti-colágeno IV.

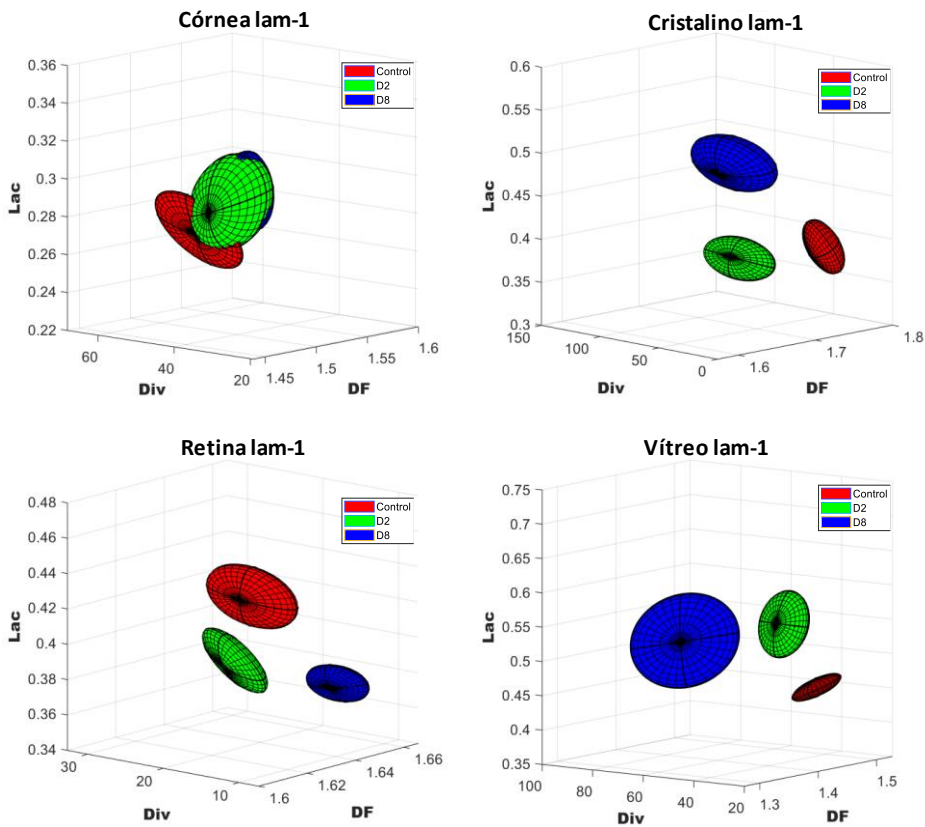


FIGURA IV- 14: Representación gráfica en forma de elipsoides para los datos de la distribución de la media, para todas las estructuras marcados con anti-laminina-1.

II. ESTUDIO DE TEXTURA: DIMENSIÓN FRACTAL LOCAL CONECTADA

Todos los parámetros estudiados hasta hora en este capítulo nos facilitaron el entendimiento de cómo cambia la textura dentro de las estructuras estudiadas. Por otra parte, en el capítulo III, hemos demostrado que el déficit materno de AF altera el patrón de expresión de colágeno IV y laminina-1 en la córnea, cristalino y retina. En este sentido, es interesante investigar la relación entre la sobre- o infraexpresión de estas moléculas y la organización espacial de ellas en el tejido, caracterizada por sus características fractales. Para hacer eso, es necesario tener parámetros fractales locales que permiten esta comparación. Por ello en la siguiente sección, vamos a comparar localmente las alteraciones de la fractalidad del cristalino con datos de sobre/infraexpresión de ambas moléculas en esta misma estructura (capítulo III). La razón por la que se va a estudiar solo el cristalino se debe a su forma circular, su estudio se adapta muy bien al análisis de los componentes principales, ya que las principales diferencias entre las imágenes no estarán en su forma, sino en el contenido local de su DF.

Un "conjunto fractal puro" es invariante con la escala. Por el contrario, los objetos biológicos son solo "estadísticamente fractales". Es decir, sus propiedades de invariancia con la escala de observación solo se mantienen en un cierto rango de escalas. Además, debido a la forma en que crecen los fractales, están sujetos a variaciones locales condicionadas por su desarrollo, por lo que sus características fractales cambian de un punto a otro [56]. Algunos estudios han desarrollado y probado medidas locales de fractalidad en varios tipos de tejidos biológicos como comparación entre tejidos sanos y patológicos [56-58].

1. MÉTODO Y PROCEDIMIENTO

1.1 Dimensión fractal conectada local

En la literatura podemos encontrar varios parámetros asociados a una DF local. La mayoría están relacionados con la distribución de masa sobre la imagen. Por distribución de masa se refiere al número de píxeles que forman la imagen después de ser binarizada (píxeles en blanco y negro). En esta sección, adoptaremos la DF "local" que se calcula utilizando la aplicación FracLac de ImageJ, cuyos algoritmos se basan en el trabajo de Landini y sus colegas [57, 59]. Este mismo algoritmo ha sido utilizado ampliamente en la literatura [56, 60, 61].

La figura IV-15 muestra una representación esquemática del procedimiento de cálculo. En primer lugar, se localizan en la imagen binarizada los píxeles marcados en negro. Se estudian las propiedades de la escala fractal para cada uno de ellos mediante la estimación del número de píxeles $N(\varepsilon)$ que los rodean, contenidos en una caja variable de dimensión ε centrada en un píxel P . El número de píxeles cambia con la escala como $N(\varepsilon) \approx F \varepsilon^{D_L}$, donde F es un parámetro conocido como prefactor y D_L es un número análogo a una D_F local, aunque con propiedades ligeramente diferentes, que se pueden obtener como la pendiente de la línea $\log N(\varepsilon)$ frente a $\log \varepsilon$ [57]. Generalmente, los valores de ε se eligen entre un valor mínimo y máximo, normalmente en píxeles, según la imagen [56]. Una variante de la medida anterior es la Dimensión Fractal Conectada Local (DFCL) [57, 58]. En este caso, solo se tiene en cuenta el número de píxeles $N_C(\varepsilon)$ (véase conjunto de puntos en negrita en la Fig. IV-15) que están conectados al píxel P . Este número cambia con ε como $N_C(\varepsilon) \approx F_C \cdot \varepsilon^{D_C}$, donde D_C es la DFCL.

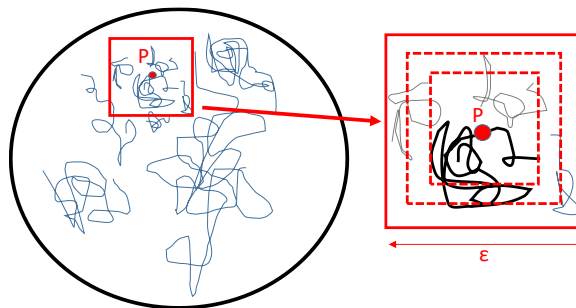


FIGURA IV- 15: Diagrama para el cálculo de las dimensiones fractales locales. Se toman las cajas de tamaño ε alrededor de un píxel P . Para cada caja de tamaño ε , se cuenta el número de píxeles que contiene, ya sea total, $N(\varepsilon)$, o conectado a P , $N_C(\varepsilon)$ (conjunto de píxeles en negrita en la imagen de la derecha). La dimensión local se calcula como la pendiente de $\log(N_C(\varepsilon))$ frente a $\log \varepsilon$.

1.2 Procesado de imágenes

Para cada imagen de ojo, se seleccionó el área del cristalino. Estas imágenes se procesaron y analizaron utilizando el software ImageJ [62]. Las imágenes se pre-procesaron de la siguiente forma: mejora del contraste (30%), sharpen, eliminación del ruido y binarización. El número final de imágenes estudiadas es 54, nueve en cada grupo (control, D2 y D8) y marcaje, colágeno IV y laminina-1. El algoritmo implementado en FracLac para obtener la dimensión fractal local (DFL) y DFCL se aplicó a todas ellas. Finalmente, todas las imágenes de los cristalinos fueron estandarizadas con un radio de 375 píxeles (tamaño de cada imagen final 750x750 píxeles) para poder estudiar estadísticamente el comportamiento de las diferentes zonas de los cristalinos. Los métodos utilizados para el análisis estadístico son: los CPs y la distancia de Mahalanobis. Ambas técnicas han sido explicadas detalladamente en el Capítulo III, por lo que a continuación, solo se centrará en visualizar y comentar los resultados.

2. RESULTADOS

Los mapas de la DFL y DFCL son muy similares para todas las imágenes analizadas (véase Fig. IV-16). Tal como se esperaba, los mapas de la DFL se extienden sobre un área más grande, ya que los conjuntos de puntos conectados en los que se basa la DFCL son más pequeños. Esta última parece estar mejor adaptada al tipo de imágenes procesadas. Dado que las moléculas utilizadas para este tipo de marcajes (colágeno IV y laminina-1) están articuladas en forma de redes [63].

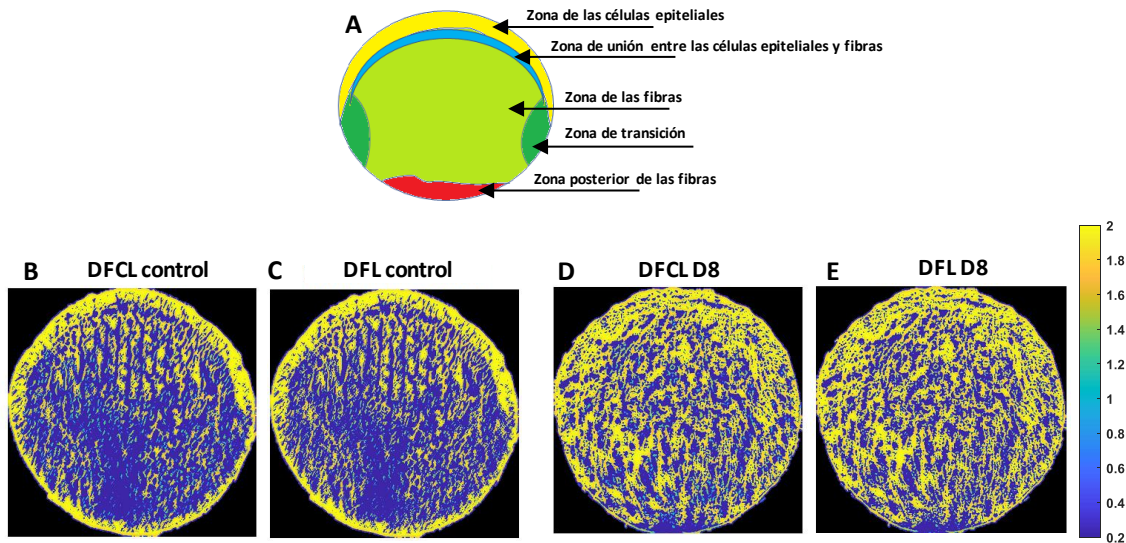


FIGURA IV- 16: Distribución de la Dimensión Fractal Local (DFL) y Dimensión Fractal Conectada Local (DFCL) para cristalinicos marcados con anti-colágeno.

Los resultados para la distancia de Mahalanobis se muestran en la figura IV-17. En general, las distancias son menores para los grupos marcados con anti-colágeno IV que para aquellos con anti-laminina-1, lo que indica una distribución de la DFCL más homogénea para el colágeno IV que para la laminina-1. En el caso del colágeno IV, el grupo control presenta variaciones principalmente en el epitelio, zona de transición y en la parte posterior de las fibras del cristalino. Sin embargo, para los grupos D2 y D8, la diferencia aumenta en comparación con el control, especialmente en el epitelio, zona central de las fibras y zona de transición. En el caso de la laminina-1, a medida que aumenta el déficit materno de AF, hay una mayor diferencia en la DFCL en la zona de unión entre el epitelio y las fibras y en la zona de transición. La diferencia en la DFCL es mayor en laminina-1 que en colágeno IV.

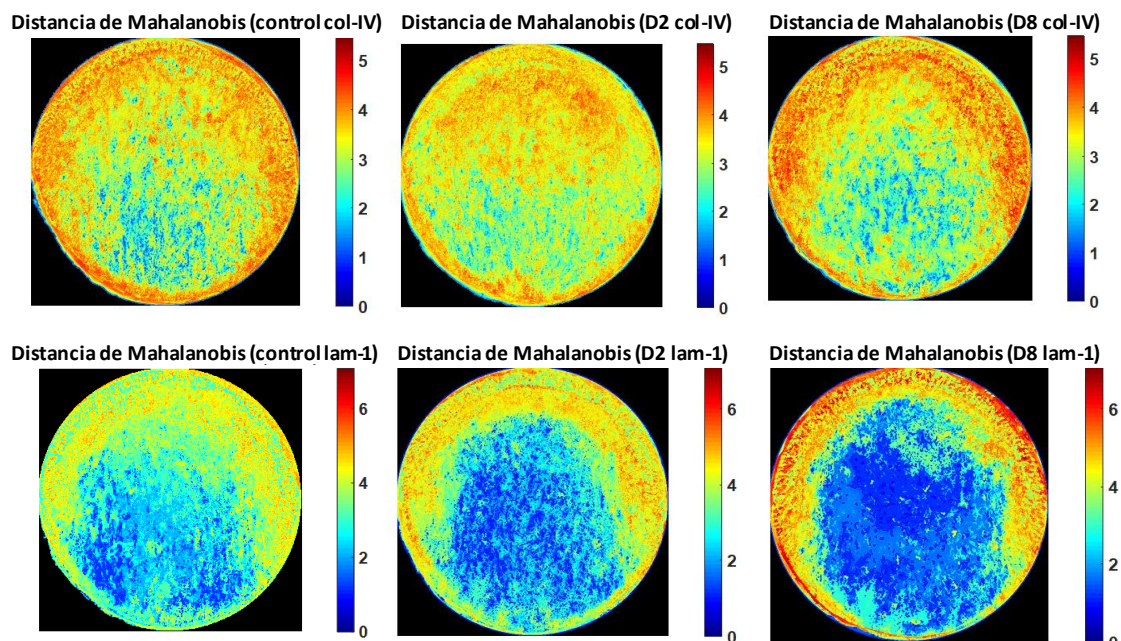


FIGURA IV- 17: Distancia de Mahalanobis para los mapas de la DFCL para los grupos estudiados. Los valores altos marcan píxeles con una distancia creciente respecto al comportamiento medio de píxeles.

Por otro lado, con respecto a los resultados del ACP, el porcentaje de varianza por cada componente aparece en la Tabla IV-5. Según estos datos, se pueden establecer dos grupos de componentes para rectificar las imágenes. De los datos, podemos distinguir un primer grupo o Proceso (P1) que comprende los dos primeros CPs y un segundo Proceso que comprende el resto de los componentes (RP). Como puede verse en la Tabla IV-5, los dos primeros componentes están por encima del 10% en todos los grupos. En el caso del grupo D2, hay un tercer componente justo en ese límite. Por lo tanto, se decide tomar como CPs los primeros dos para todos los grupos.

TABLA IV- 5: Valores del porcentaje de varianza por cada componente principal (CP). En la mayoría de ellos, los dos primeros están por encima del 10%, por lo que estos dos se toman para la reconstrucción de las imágenes.

	Colágeno IV			Laminina-1		
	Control	D2	D8	Control	D2	D8
CP1	37.10	29.26	37.76	44.33	43.35	46.77
CP2	11.32	13.73	10.32	12.08	11.25	15.77
CP3	9.03	11.01	9.75	8.99	10.03	8.96
CP4	8.23	8.71	9.06	7.00	8.16	6.91
CP5	7.72	8.27	8.64	6.90	7.25	5.67
CP6	7.51	7.53	7.92	5.86	6.45	4.98
CP7	6.65	7.40	6.62	5.60	5.02	4.38
CP8	6.51	7.30	5.58	5.00	4.48	3.61
CP9	5.93	6.79	4.35	4.24	4.01	2.95

Las imágenes rectificadas se restan al grupo original para dar un conjunto de imágenes como "Resto". Por tanto, para un grupo de 9 imágenes originales, tenemos 9 imágenes rectificadas y otras 9 en el grupo llamado "Resto". Para cada uno de estos dos subgrupos, podemos calcular el valor medio de cada píxel (imagen media) y su desviación estándar. De esta forma, podemos resumir esta información proporcionando dos imágenes para cada subgrupo, la de la imagen media y una imagen de la señal-ruido de cada punto (imagen media dividida por la imagen de la desviación estándar). Una señal de ruido alta nos informa de que el valor medio del píxel es representativo de todos los individuos en el mismo grupo. Una señal de ruido baja (<1) nos dice que el valor promedio de ese píxel varía mucho entre individuos. Expresa, por tanto, la variabilidad dentro del grupo y no significa representativo de todo el grupo. El resultado de este procedimiento para los grupos control (colágeno IV y laminina-1) se muestra en la figura IV-18. Como puede verse, la variabilidad entre los individuos de este grupo no tiene una marcada distribución espacial.

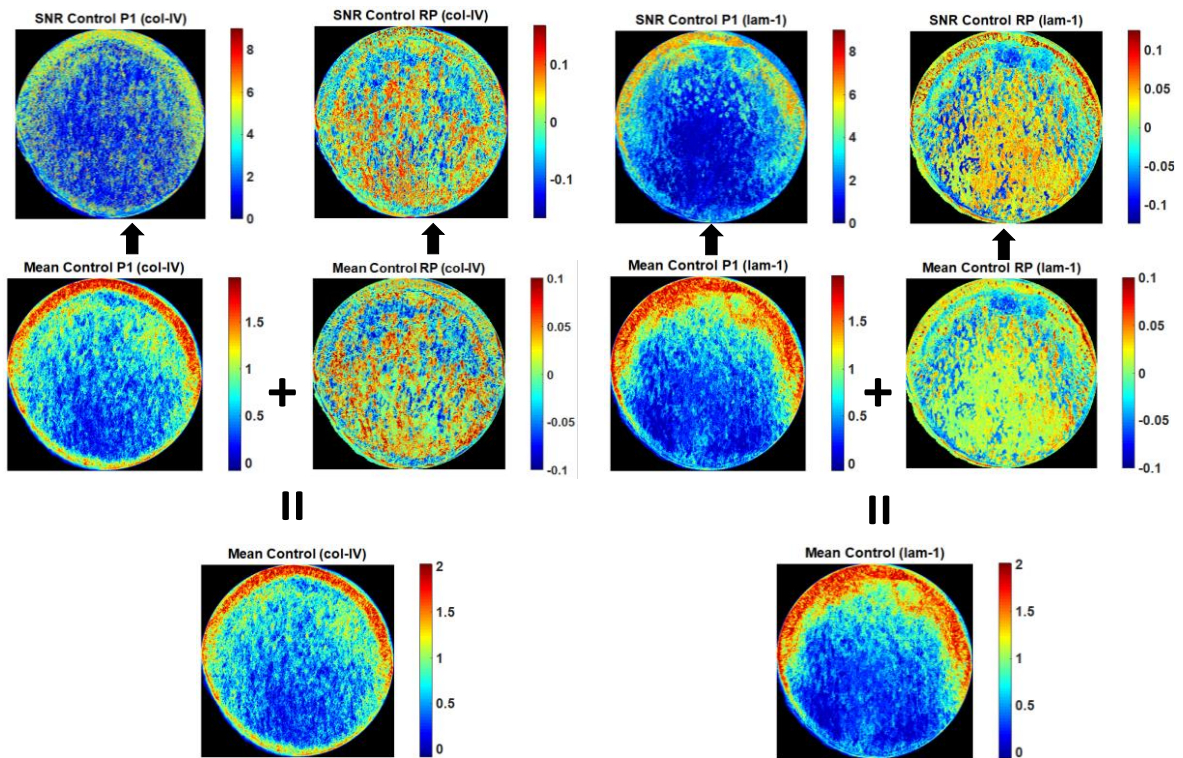


FIGURA IV- 18: Descomposición de las imágenes del grupo control para el marcaje con anti-colágeno IV (izquierda) o anti-laminina-1(derecha). El grupo de imágenes está representado por una sola imagen. El promedio de las imágenes reconstruidas con el proceso P1 (primer y segundo componente principal). La media de las imágenes reconstruidas con el resto del proceso aparece como Mean RP.

El método de CPs nos permite dividir los datos en una parte representativa del grupo y otra que nos da la variabilidad de éste, además de poder estimar el porcentaje entre ambas, a través del tanto por ciento de la varianza explicada por los componentes que utilizamos para estimar la “señal” del grupo frente al “ruido”. Por tanto, la “señal” es la media para cada pixel de la reconstrucción de las imágenes del grupo con los dos primeros CPs. El valor del incremento de la DFCL para cada grupo se calcula como la diferencia de esta “señal” (reconstrucción con P1) para cada grupo menos la “señal” dada por el control. Los resultados pueden verse en la figura IV-19 (grupo D2 colágeno IV), figura IV-20 (grupo D8 colágeno IV), figura IV-21 (grupo D2 laminina-1), figura IV-22 (grupos D8 laminina-1).

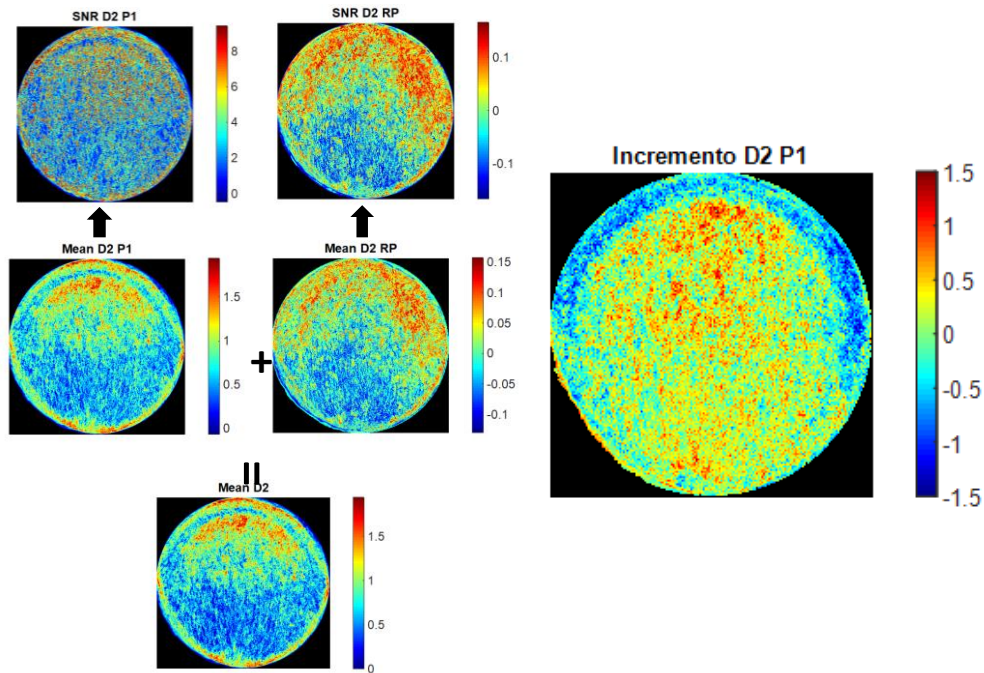


FIGURA IV- 19: En la parte izquierda puede verse el seccionamiento del valor medio de las imágenes para el grupo D2 marcado con anti-colágeno IV (Mean D2), en una parte representativa del grupo (mean D2 P1) más un resto (Mean D2 RP). Para el caso del "Mean D2 P1" su señal ruido es alta, mientras que la "Mean D2 RP" presenta una señal ruido menor que 1 en todos los píxeles (ruido o variación entre individuos). Sin embargo, la variación entre individuos no es aleatoria, muestra una clara distribución espacial. La figura de la derecha representa el incremento de DFCL respecto al proceso P1 del grupo control.

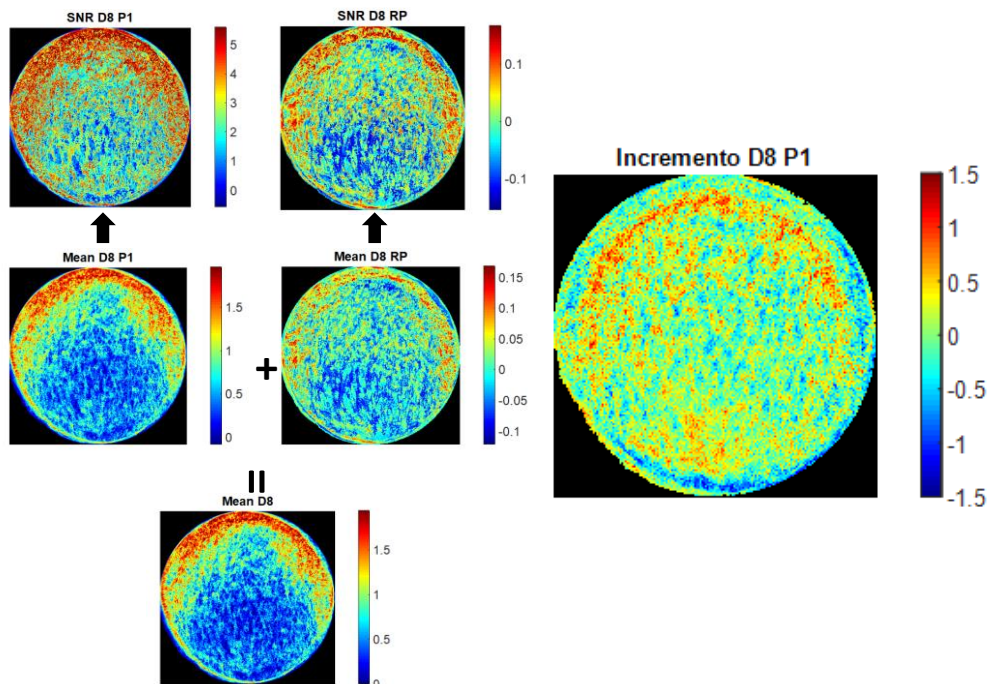


FIGURA IV- 20: En la parte izquierda puede verse el seccionamiento del valor medio de las imágenes para el grupo D8 marcado con anti-colágeno IV (Mean D8), en una parte representativa del grupo (mean D8 P1) más un resto (Mean D8 RP). Para el caso del "Mean D8 P1" su señal ruido es alta, mientras que la "Mean D8 RP" presenta una señal ruido menor que 1 en todos los píxeles (ruido o variación entre individuos). Sin embargo, la variación entre individuos no es aleatoria, muestra una clara distribución espacial. La figura de la derecha representa el incremento de DFCL respecto al proceso P1 del grupo control.

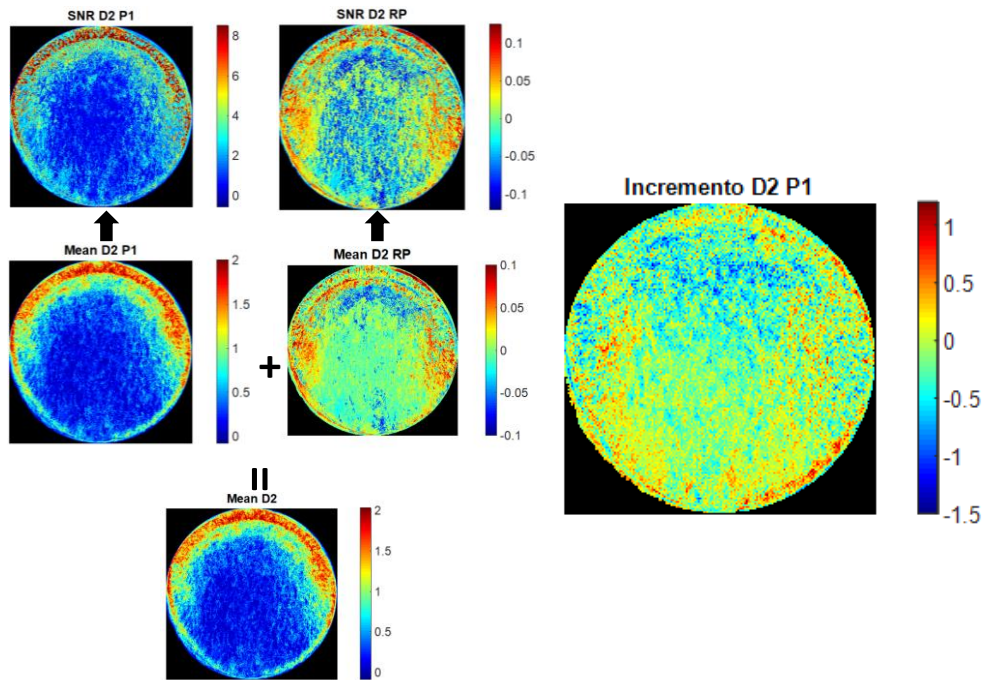


FIGURA IV- 21: En la parte izquierda puede verse el seccionamiento del valor medio de las imágenes para el grupo D2 marcado con anti-laminina-1 (Mean D2), en una parte representativa del grupo (mean D2 P1) más un resto (Mean D2 RP). Para el caso del "Mean D2 P1" su señal ruido es alta, mientras que la "Mean D2 RP" presenta una señal ruido menor que 1 en todos los píxeles (ruido o variación entre individuos). Sin embargo, la variación entre individuos no es aleatoria, muestra una clara distribución espacial. La figura de la derecha representa el incremento de DFCL respecto al proceso P1 del grupo control.

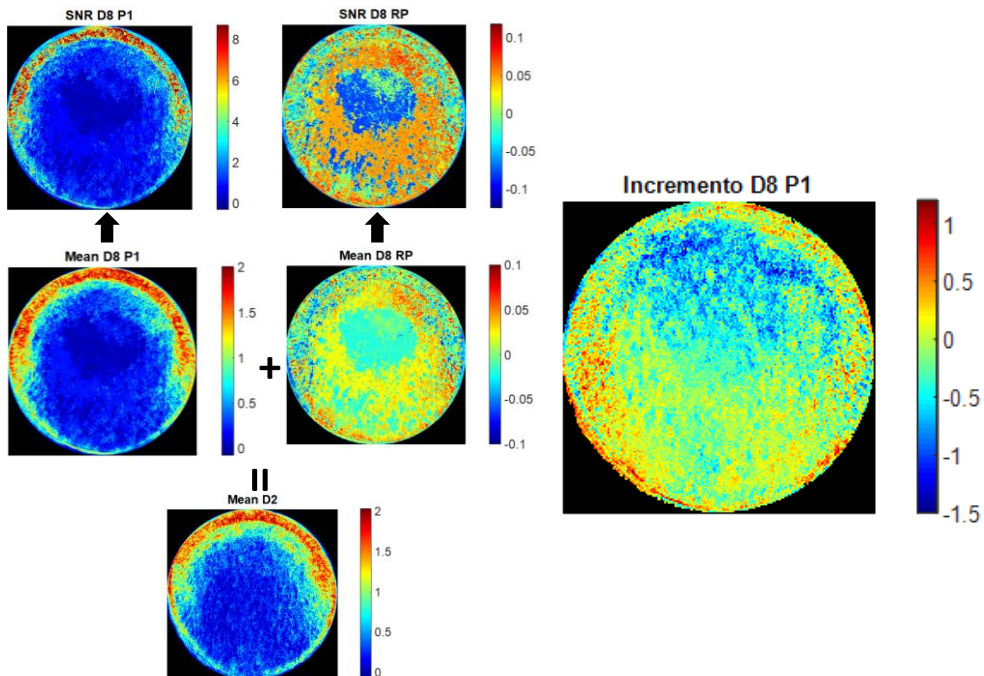


FIGURA IV- 22: En la parte izquierda puede verse el seccionamiento del valor medio de las imágenes para el grupo D8 marcado con anti-laminina-1 (Mean D8), en una parte representativa del grupo (mean D8 P1) más un resto (Mean D8 RP). Para el caso del "Mean D8 P1" su señal ruido es alta, mientras que la "Mean D8 RP" presenta una señal ruido menor que 1 en todos los píxeles (ruido o variación entre individuos). Sin embargo, la variación entre individuos no es aleatoria, muestra una clara distribución espacial. La figura de la derecha representa el incremento de DFCL respecto al proceso P1 del grupo control.

En dichas figuras puede verse como la imagen media para cada grupo puede descomponerse en la imagen media de la reconstrucción con el proceso P1 (Mean P1), que tiene una SNR (señal/ruido) elevada, más pequeñas variaciones locales medias con una SNR baja (Mean RP). Ambas imágenes tienen una estructura espacial definida. La primera de ellas (Mean P1) nos informa sobre las zonas que son representativas de todo el grupo junto con su nivel de representación (suma de los porcentajes de varianza por los CPs #1 y 2). Para todos los grupos este nivel de representación es del $50\% \pm 7\%$. Por tanto, la variación entre los individuos dentro de cada grupo es casi del 50% del total de la variabilidad de los datos. La distancia de Mahalanobis ya nos da información sobre qué zona está relacionada con esta variación entre individuos (véase Fig. IV-17). Para profundizar, en este estudio se ha representado la desviación estándar de cada pixel para las imágenes del proceso RP para los grupos control, D2 y D8 (Fig. IV-23). Comparando entre moléculas, la dispersión entre individuos es más uniforme para el colágeno IV que para la laminina-1. En este último caso la diferencia entre la parte de las fibras del cristalino y la zona anterior del cristalino va aumentando con el déficit de AF, concentrándose la variabilidad entre individuos en la zona de transición y la zona de unión entre las fibras y el epitelio. En el caso del colágeno IV, el aumento de la variabilidad entre individuos del mismo grupo aumenta también en la zona central de las fibras.

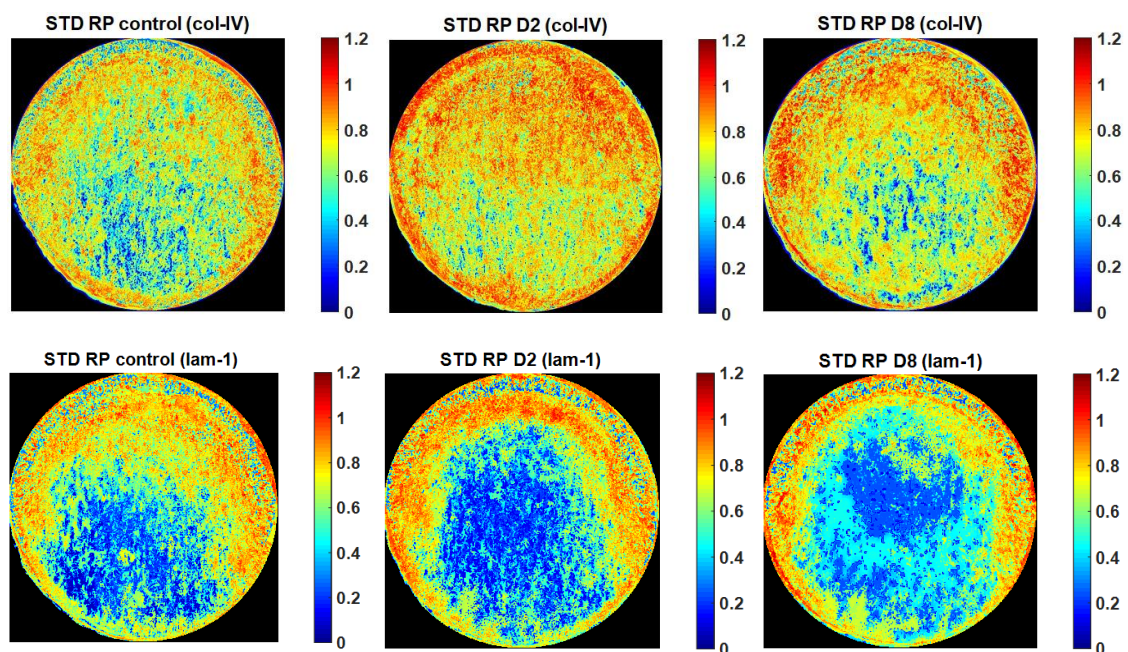


FIGURA IV- 23: Imágenes de la desviación estándar para cada pixel de las imágenes correspondientes a la reconstrucción con el proceso RP para cada grupo (control, D2, D8) y molécula de marcaje (anti-colágeno IV, anti-laminina-1)

Tal como se comentó al principio de esta sección, es de gran interés comparar los mapas de la DFCL del cristalino con medidas similares realizadas para la sobre o infraexpresión de las moléculas colágeno IV y laminina-1 (capítulo III). A diferencia del caso de la DFCL, con el primer CP se consigue un nivel de representación en torno al $97\% \pm 1\%$ (ver resultados del capítulo III). En las figuras IV-24 y IV-25 aparece la comparación entre los mapas de infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 y la distribución de la DFCL. Para ello, se calcula el coeficiente de correlación de Pearson entre los píxeles de las imágenes del incremento de la DFCL (D2 y D8) respecto al grupo control (imágenes a la derecha, Fig. IV-19 a IV-22) y los mapas de la infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 mostrados en el capítulo III (Fig. III-10 (A y C) y Fig. III-11 (A y D)). Los resultados se muestran en la Tabla IV-6 junto con una estimación de su incertidumbre realizada mediante técnicas de remuestreo Bootstrap implementadas en Matlab. Todos los valores que aparecen en la tabla son significativos ($p < 0.05$). Además, todos los valores de la correlación son positivos, aunque pequeños, indicando que un aumento o disminución de la expresión de colágeno IV o laminina-1 conlleva un aumento o disminución de la DFCL, respectivamente.

TABLA IV- 6: Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre los píxeles de las imágenes de infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 y las de la DFCL, junto con su incertidumbre. Todos los valores son significativos ($p < 0.05$).

	Coeficiente de correlación de Pearson
Cristalinos del grupo D2 marcados con anti-colágeno IV	0.261±0.003
Cristalinos del grupo D2 marcados con anti-laminina-1	0.111±0.003
Cristalinos del grupo D8 marcados con anti-colágeno IV	0.127±0.003
Cristalinos del grupo D8 marcados con anti-laminina-1	0.216±0.003

Las figuras IV-24 y IV-25 muestran un análisis más detallado de las correlaciones de la Tabla IV-6 para los casos más altos: grupo D2 marcado con anti-colágeno IV (Fig. IV-24) y grupo D8 marcado con anti-laminina-1 (Fig. IV-25). Dichas figuras muestran que el grado de correlación no es uniforme sobre toda la imagen (diagramas de puntos no son perfectamente elípticos). En las imágenes de la derecha de dichas figuras aparecen marcados en negro los puntos donde se produce sobreexpresión (datos del capítulo III). Puede verse como, en el caso del colágeno IV, la correlación se da principalmente en la zona de las fibras, mientras que para la laminina-1 en la zona epitelial y de transición.

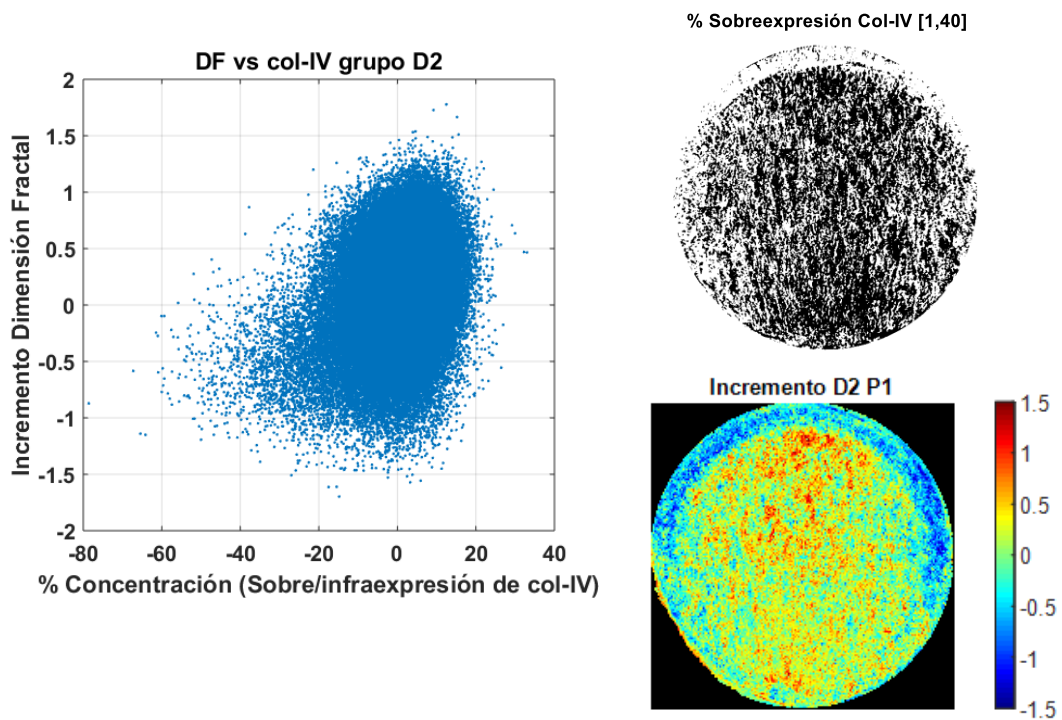


FIGURA IV- 24: Estructura de la correlación entre la sobreexpresión de colágeno IV y su DFCL para el caso del grupo D2.

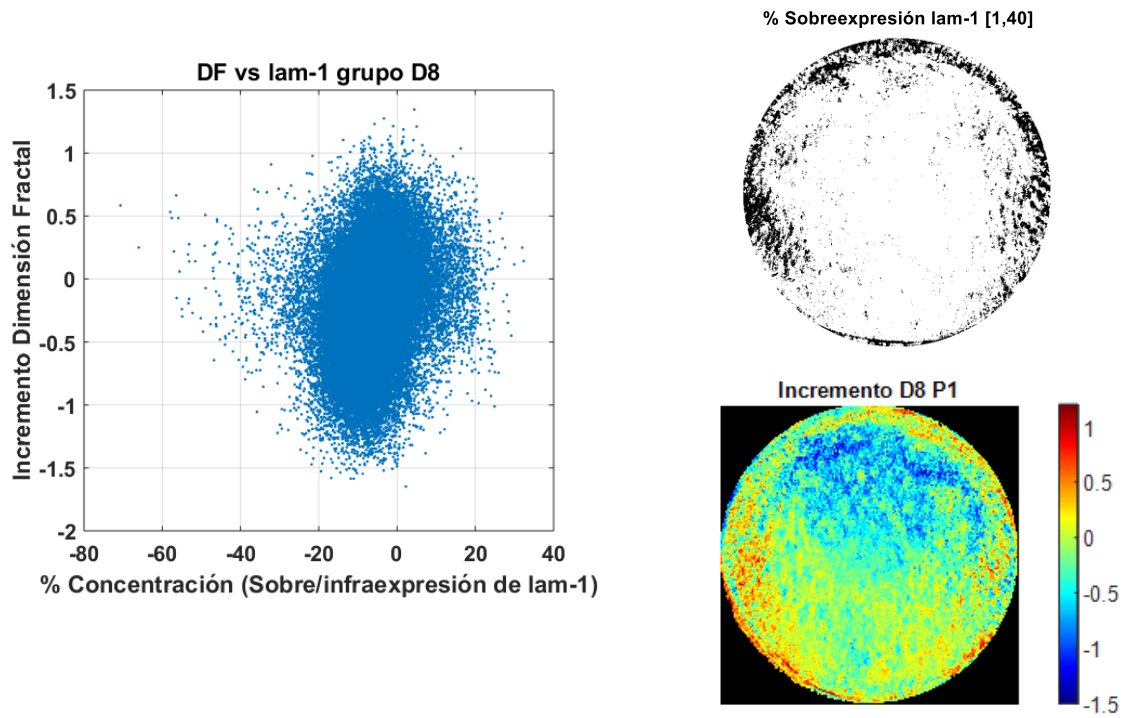


FIGURA IV- 25: Estructura de la correlación entre la sobreexpresión de laminina-1 y su DFCL para el caso del grupo D8.

III. ESTUDIO DE TEXTURA MEDIANTE EL PARÁMETRO “TAMAÑO DEL GRANO” Y LA TRANSFORMADA DE FOURIER

En el capítulo III, el principal objetivo a resolver era cuantificar la variación de la expresión de colágeno IV y laminina-1, en diferentes estructuras oculares de los grupos D2 y D8 con respecto al grupo control. La expresión de estas proteínas se estudió a través de imágenes inmunohistoquímicas, donde la escala de grises de la imagen es proporcional al nivel de expresión de las proteínas marcada. Una cuestión diferente es la forma en que esta infra/sobreexpresión se manifiesta en la textura del tejido. Por ejemplo, ¿están las fibras/células orientadas uniformemente? ¿Están agrupadas en distintas zonas de diferente manera? Para responder a estas preguntas, se debe hacer el siguiente análisis morfológico de textura en la imagen. En esta sección, se han implementado dos medidas de textura.

En primer lugar, se mide el parámetro *tamaño del grano* y se evalúan sus dimensiones horizontal y vertical. El *tamaño del grano* es un parámetro importante, generalmente se usa en imágenes de Speckle para caracterizar la rugosidad y la suavidad de la superficie. Se determina a partir de la autocorrelación de la imagen y se define como el ancho de dicha autocorrelación [64]. En nuestro caso, utilizamos este parámetro para determinar si hay cambios significativos en la textura de las estructuras: cristalino, córnea y retina. Dichos cambios, normalmente son difíciles de detectar en las imágenes microscópicas.

En segundo lugar, se estudia la orientación de las células/fibras. Para ello, la Transformada de Fourier permite obtener información sobre la orientación, ya que los puntos del espacio de Fourier simbolizan direcciones. Si la imagen consistiera en un conjunto de líneas horizontales, se vería una variación en su intensidad al moverse verticalmente. Esta imagen aparecería codificada como un par de puntos en el eje vertical central. La distancia de estos puntos al punto (0,0) del espacio de Fourier nos da la frecuencia espacial de las líneas de la imagen. En la siguiente figura IV-26, se muestra una de las imágenes inmunohistoquímicas. Especialmente, es de un ojo control marcado con anti-colágeno IV. Se ha introducido en Matlab, se ha normalizado y luego se ha cambiado artificialmente la intensidad del marcaje (véase Fig. IV-26, imagen oscurecida artificialmente). La única distinción entre estas dos imágenes es de intensidad. Es decir, "simula" una sobreexpresión de colágeno IV (sube el marcaje de colágeno IV). A continuación, hemos tomado el área marcada en rojo en ambas imágenes y se realizó una detección de bordes. Los resultados se muestran en la parte inferior de la figura IV-26. Como puede verse, se produce el mismo resultado. Lo que se pretende con estas medidas es saber si, además de cambiar la cantidad de colágeno IV o

laminina-1 en una zona, esta variación también implica una modificación en la textura, debido a variación en la organización del colágeno IV o laminina-1, o simplemente hay más o menos colágeno IV o laminina-1.

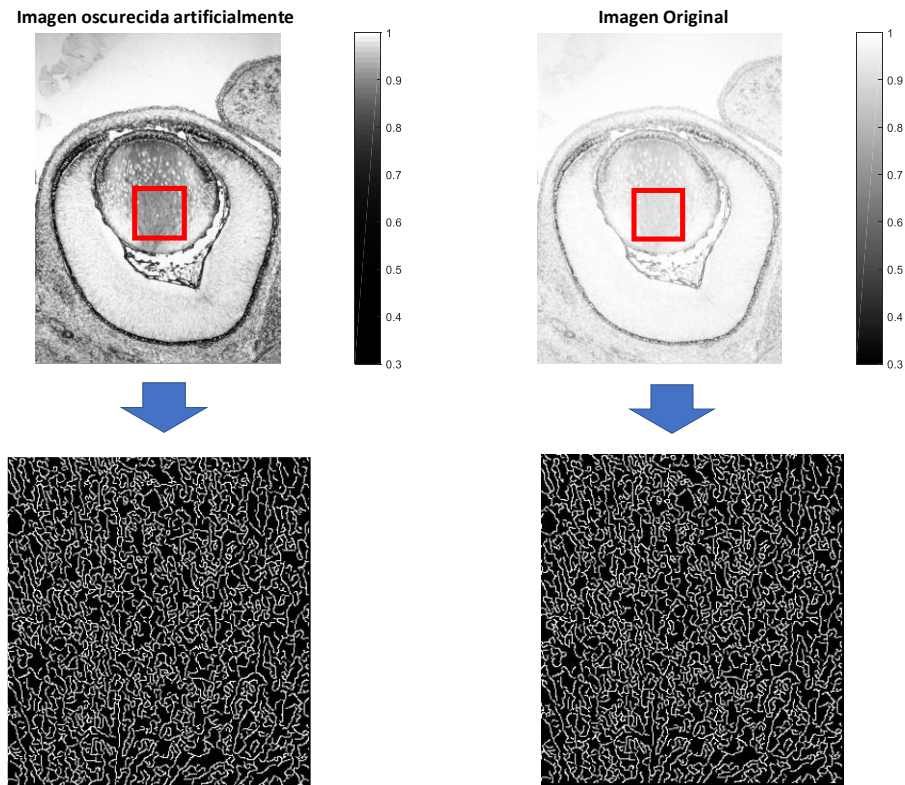


FIGURA IV- 26: Comparación entre los resultados del detector de bordes Canny entre dos imágenes con la misma morfología, pero con diferentes niveles de marcaje. Para hacer esto, se toma una imagen original y se alteran sus valores de gris usando Matlab (imagen oscura artificialmente). Dado que la morfología es la misma, el resultado es el mismo (fila inferior).

1. MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Como se indicó en la sección anterior, se usaron 9 cortes de ojos de cada muestra (control, D2, D8) y marcaje. Todas las imágenes utilizadas se normalizaron en escala de grises (véase Fig. IV-27B) para tener el mismo rango de señal. La figura IV-27A representa las ROI que se pretenden estudiar en cada ojo.

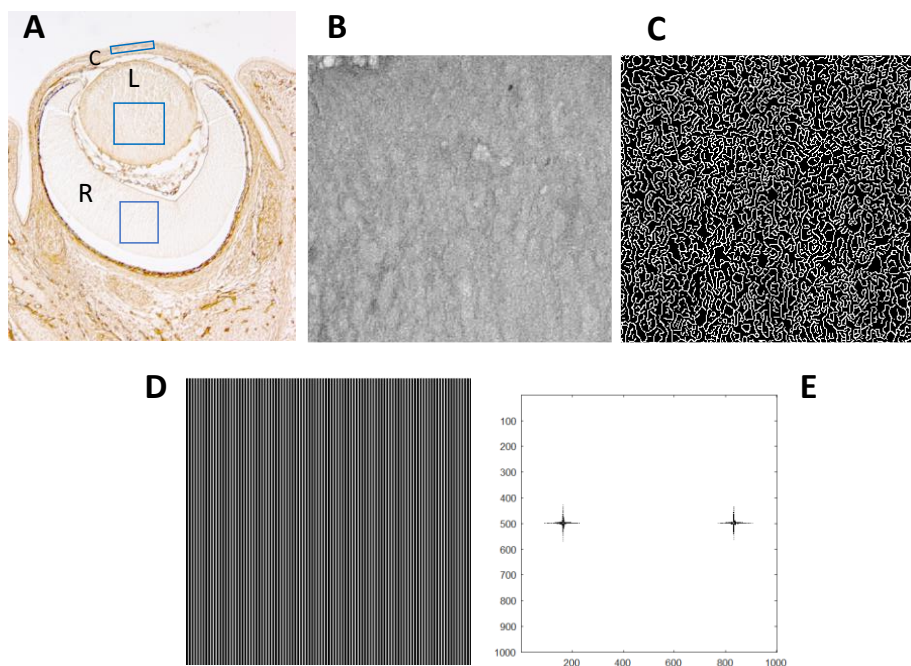


FIGURA IV- 27: A, corte de cabeza de un embrión control marcado con anti-colágeno IV. Las áreas seleccionadas son las zonas analizadas (C: córnea, L: cristalino, R: retina). B, región local del cristalino en escala de grises. C, región local del cristalino con detector de borde Canny. D, imagen de líneas verticales espaciadas 3 píxeles y (E) es su imagen de la Transformada de Fourier.

Todos los cristalinios marcados con anti-colágeno IV tienen un tamaño de 293x308 píxeles, mientras que los marcados con anti-laminina-1 miden 176x245 píxeles. Por otro lado, la dimensión de las imágenes de la córnea es la misma para los dos marcajes 42x200 píxeles. Por último, el tamaño de las imágenes de retina para ambos marcajes es de 160x187 píxeles. La figura IV-27B representa una de estas áreas seleccionadas (cristalino) y la figura IV-27C muestra el resultado al aplicar el detector de bordes Canny en la zona seleccionada. El detector de bordes Canny es una herramienta de procesamiento de imágenes que se usa para encontrar el borde de una imagen. Así, se simplifica el análisis de dicha imagen al reducir la cantidad de datos a procesar. La segmentación basada en la detección de los bordes es un método caracterizado por su rapidez y no requiere una gran potencia computacional [65, 66].

El procedimiento seguido para la determinación del *tamaño del grano* se detalla a continuación: para cada grupo estudiado (control, D2 y D8), se realizó la autocorrelación de cada imagen individualmente tras la sustracción de su valor medio. La correlación coge todos los puntos en todas las direcciones que se encuentran a una distancia determinada de un cierto punto y realiza un promedio. Esto lo repite con todos los puntos que forman la imagen, por lo que se obtiene finalmente es una imagen con la forma aproximada de la molécula y su tamaño. De esta forma se obtiene un valor medio del tamaño de la molécula en unidades de píxeles.

Es posible medir el tamaño medio del grano como el ancho de la función de correlación. En nuestro caso, tomamos el ancho de media altura en las direcciones horizontal y vertical. El valor final del tamaño de grano fue tomado como el valor medio geométrico de ambas direcciones. Finalmente, se considera el valor medio del ancho de la función de autocorrelación como una correlación representativa de todo el grupo. Así, la correlación entre los píxeles de la imagen proporciona información sobre la forma y el tamaño del grano promedio en la imagen digital. Como resultado final, la correlación proporciona una imagen con el tamaño del marcaje: colágeno IV o laminina-1.

Por otro lado, el segundo método utilizado en esta sección para el análisis de textura es la Transformada de Fourier (TF). Es una herramienta importante en el procesado de imágenes, utilizada a menudo para obtener información sobre la estructura geométrica de la imagen en el dominio de frecuencias. De hecho, la TF se ha vuelto indispensable en muchas áreas científicas como la biomedicina [67]. Para este análisis, utilizamos las mismas imágenes del análisis de autocorrelación anterior, pero ahora con un tratamiento previo mediante el Canny (véase Fig. IV-27C) con el fin de encontrar contornos presentes en las imágenes.

Para cada grupo, realizamos la TF para cada imagen individualmente. Para ello, usando Matlab, aplicamos las funciones, `fft2` (para devolver la TF bidimensional de la imagen) y `fftshift` (cambia el componente de frecuencia cero al centro del espectro). Para aumentar la precisión, el `fft2` se calcula con 1000×1000 puntos, por lo que cada imagen original se rellena con ceros. De esta manera, el punto (0,0) en el plano de frecuencia de Fourier se ubica en el punto 500×500 . Como ejemplo, la imagen de líneas verticales espaciadas 3 píxeles mostrada en la figura IV-27D. Su TF se muestra en la figura IV-27E, consta de dos puntos de frecuencia en el eje horizontal que indican que la imagen contiene líneas verticales de alta frecuencia (los puntos están lejos de (0,0)). Luego, se puede estudiar el espaciado y la orientación de las líneas de la imagen tratada con Canny mediante la imagen de su TF.

Posteriormente, se promedió el conjunto de 9 imágenes con TF para cada grupo y la imagen final se tomó como representante de todo el grupo. De esta forma, la TF nos permite analizar la distribución del marcaje para colágeno IV y laminina-1, y al mismo tiempo detectar la orientación de las fibras/células.

Por último, para estimar la distribución y los intervalos de confianza de la media, desviación estándar, skewness y curtosis del *tamaño del grano* se utiliza el método de remuestreo Bootstrap, explicado previamente en el capítulo II. Como se ha dicho anteriormente, este método extrae repetidas muestras que tienen el mismo tamaño de una estimación poblacional reiteradas veces. Para ello, utilizamos un total de 100 réplicas bootstrap para calcular los parámetros anteriores. Este tamaño de muestra suele ser suficiente para dar intervalos de confianza adecuados [50]. Luego aplicamos la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para probar cuándo las distribuciones (media, desviación estándar, skewness y curtosis) son diferentes entre el grupo control y los grupos D2 y D8, para un nivel de significancia $p < 0.05$.

2. RESULTADOS

2.1 Cristalino: tamaño del grano

Los resultados se muestran en la figura IV-28 ((A,a), (B,b) y (C,c)) en el caso del colágeno IV, y en la figura IV-28 ((D,d), (E,e) y (F,f)) para la laminina-1. Al analizar las imágenes marcadas con anti-colágeno IV encontramos que el *tamaño del grano* vuelve más grande a medida que aumenta el déficit materno de AF. Especialmente en D8, donde se ve claramente que el tamaño del grano es mucho más grande tanto en altura como en anchura. Sin embargo, la situación para las imágenes marcadas con anti-laminina-1 es totalmente opuesta. Es decir, el *tamaño del grano* se hace más pequeño a medida que aumenta el déficit materno de AF. El *tamaño del grano* comienza a reducirse en D2 y es mucho más pequeño en D8 en comparación con el grupo control.

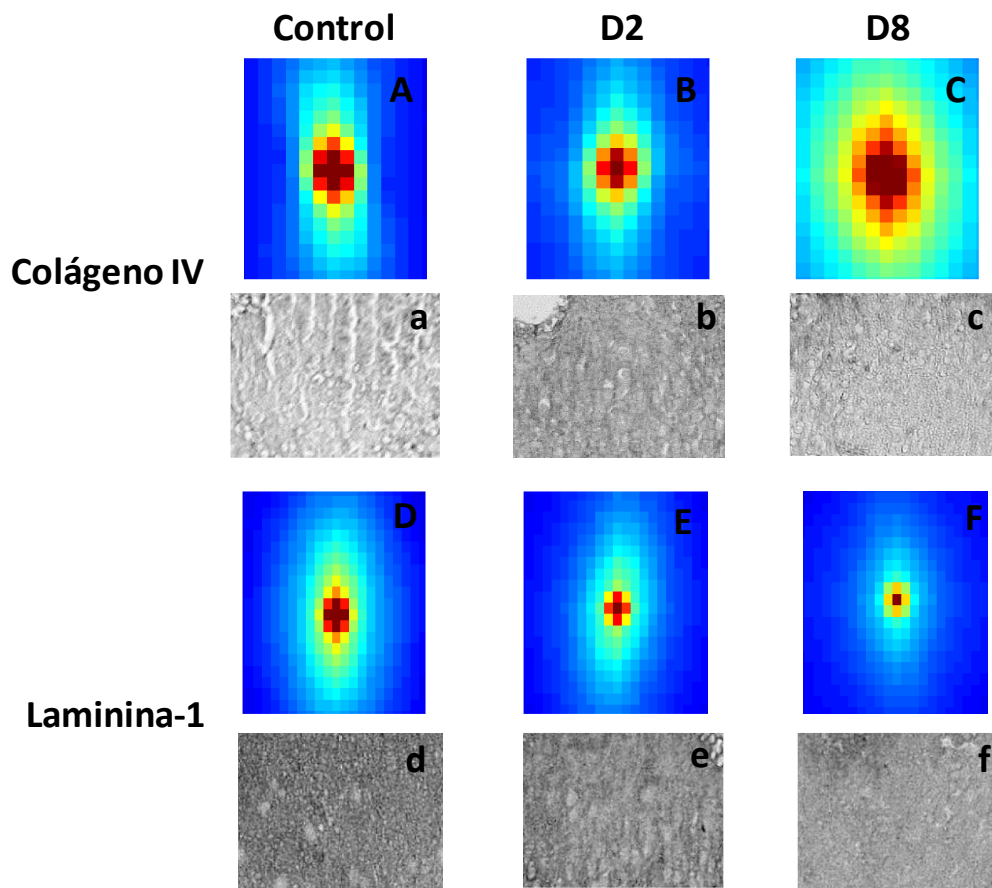


FIGURA IV- 28: Resultados del tamaño del grano obtenidos a partir del análisis de imágenes de cristalino. Las figuras A, B y C representan a los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-colágeno IV. Las figuras D, E y F representan los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden cristalinicos de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a cristalinicos de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-laminina-1.

Las figuras IV-29 y IV-30 muestran el resultado del análisis estadístico realizado con los datos del *tamaño del grano* de los cristalinicos marcados con anti-colágeno IV o anti-laminina-1, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, se han simulado muestras de 100 datos con el método bootstrap. Hemos probado con muestras de diferentes tamaños y el número 100 dio resultados estables, sin tener que aumentar demasiado el número de muestra bootstrap respecto al original [50]. Con este método, se obtuvieron 100 muestras de los valores de la media, desviación estándar, skewness y curtosis a partir de los nueve valores de *tamaño del grano* para los grupos control, D2 y D8. Después de esto, se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para resumir gráficamente la distribución de frecuencias de los parámetros anteriores.

Los resultados se muestran en forma de diagrama de caja y bigotes, que fue descrito por John Tukey en 1977. Este gráfico consiste en una caja rectangular, atravesada por una línea vertical que indica donde se posiciona la mediana y los extremos representan los valores mínimo y máximo de la variable. Por otra parte, las líneas que sobresalen de la caja representan los bigotes superior e inferior, los casos por encima de este límite se consideran atípicos [68]. La figura IV-29 muestra los resultados para los cristalinicos marcados con anti-colágeno IV y la figura IV-30 para cristalinicos marcadas con anti-laminina-1. Cada figura contiene tres diagramas de caja que representan la distribución espacial de los grupos control, D2 y D8. En el caso de colágeno IV, las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control-D2 y el control-D8 en todos los parámetros (media, desviación estándar, skewness y curtosis). En el caso de la laminina-1, todos los parámetros son diferentes y con significancia estadística entre control-D2 y control-D8, excepto la curtosis. Ambos resultados muestran que la distribución de probabilidad del *tamaño de grano* es diferente entre el grupo control y los grupos D2 y D8. En promedio, a medida que aumenta el déficit materno de AF, el tamaño del grano crece en los cristalinicos marcados con anti-colágeno IV y disminuye en el caso de laminina-1.

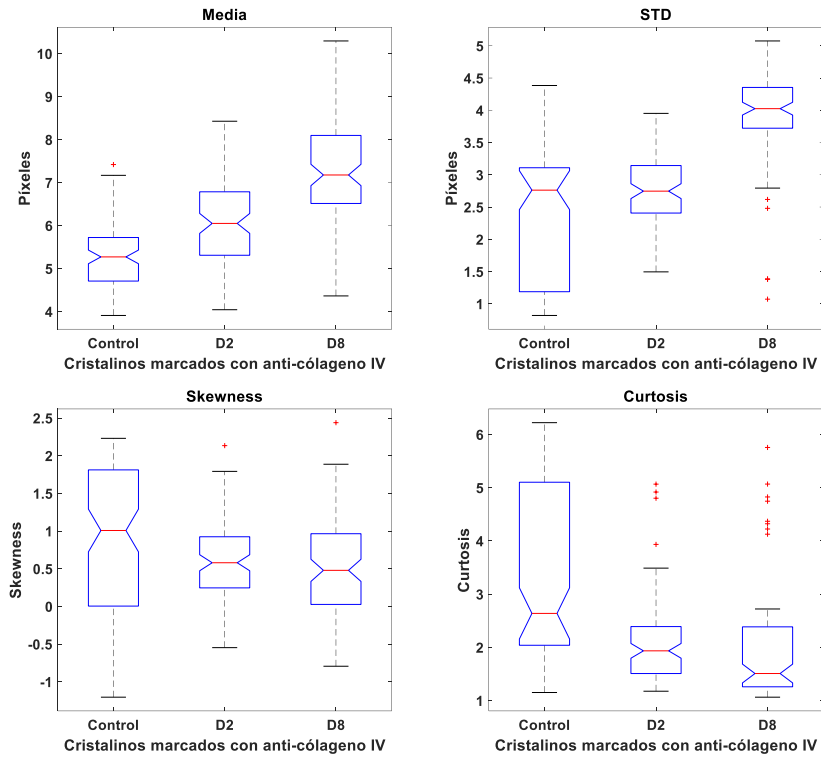


FIGURA IV- 29: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, Skewness y curtosis del tamaño del grano de los cristalinios marcados con anti-colágeno IV. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

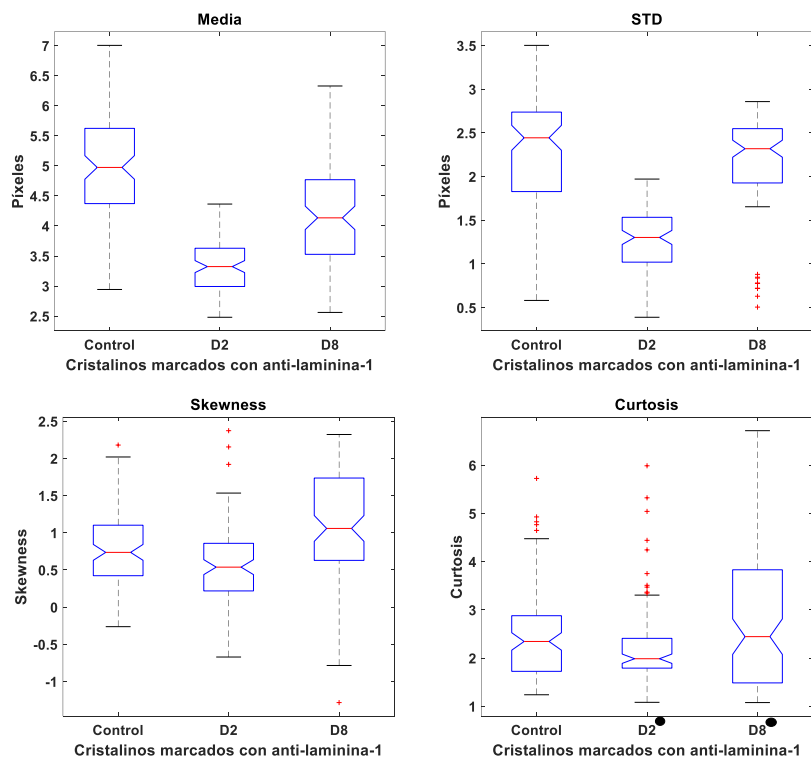


FIGURA IV- 30: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, Skewness y curtosis del tamaño de grano de los cristalinios marcados con anti-laminina-1. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) excepto para la curtosis (marcados con 'puntos negros' en la figura).

2.2 Cristalino: Transformada de Fourier

La figura IV-31 muestra los resultados para el análisis de orientación de las fibras del cristalino utilizando la TF. En cada una de las imágenes, se puede observar que el espectro tiene sus valores principales en una forma circular lo que indica que las moléculas cambian principalmente sus orientaciones y no la distancia entre ellas. Las imágenes de colágeno IV (véase Fig. IV-31 ((A, a), (B, b) y (C, c))) muestran que la dispersión es menor en D2 y D8, pero con mayor cambio en la orientación de las moléculas en ambos grupos comparados con el control. No obstante, las imágenes marcadas con anti-laminina-1 (véase Fig. IV-31 ((D, d), (E, e) y (F, f))) muestran lo contrario: la dispersión es mayor en D2 y D8 con cambio en la orientación de las fibras.

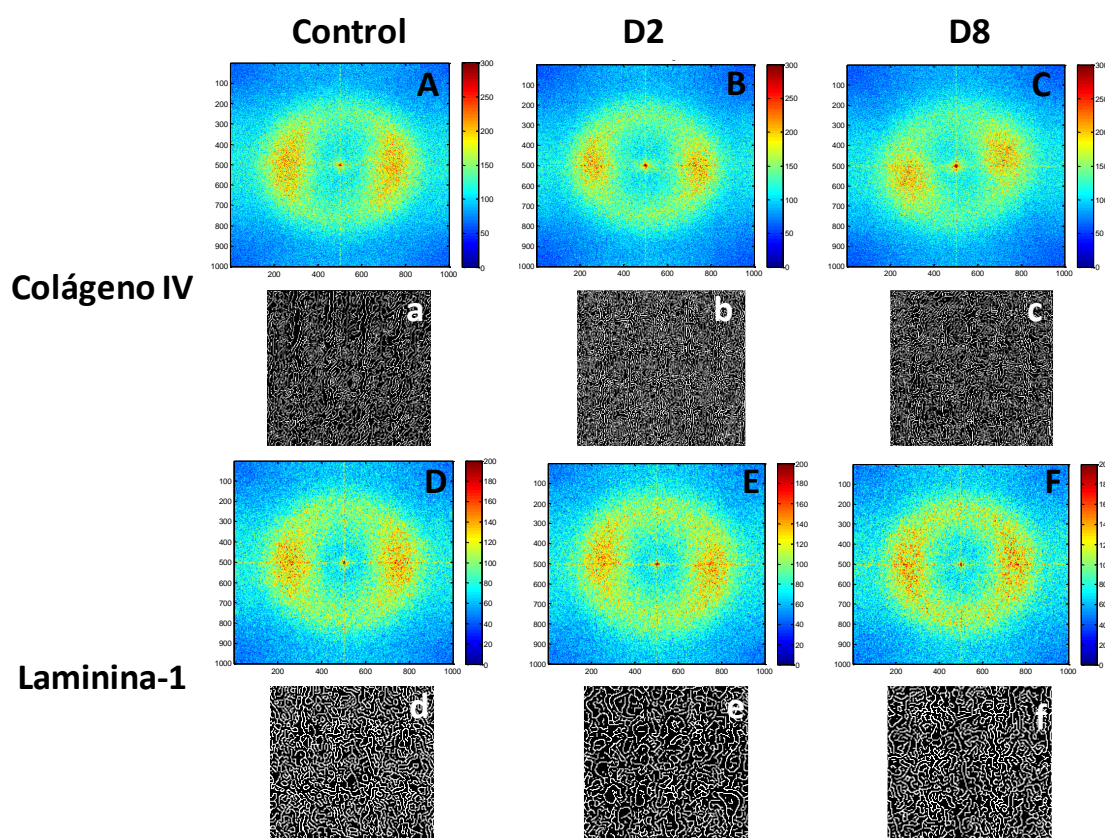


FIGURA IV- 31: Análisis de transformada de Fourier del cristalino. Las figuras A, B y C representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras D, E y F representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden a la detección de borde mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a la detección de bordes mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1.

2.3 Córnea: tamaño del grano

La figura IV-32 muestra los resultados para *el tamaño del grano*. En el caso de colágeno IV (véase Fig. IV-32 (A, a), (B, b) y (C, c)), encontramos que el *tamaño del grano* se hace más grande al aumentar el déficit materno de AF. En ambos grupos, D2 y D8, se observa que el *tamaño de grano* es mayor en altura y anchura. Al comparar las imágenes de las corneales marcadas con anti-colágeno IV (véase Fig. IV-32 (a, b y c)), se observa que las córneas de los grupos D2 y D8 tienen una textura más granulada y rugosa. Sin embargo, el grupo control presenta una textura lisa y uniforme.

Por otra parte, la situación con las imágenes de laminina-1 es completamente diferente (véase Fig. IV-32 (D, d), (E, e) y (F, f)). Encontramos que el *tamaño del grano* se hace más pequeño con el aumento del déficit materno en comparación con el grupo control. Asimismo, en las imágenes de las corneales marcadas con anti-laminina-1 (véase Fig. IV-32 (d, e y f)), se observa que la textura de las córneas control es rugosa y granulada, pero se vuelve uniforme, homogénea y suave en ambos grupos D2 y D8.

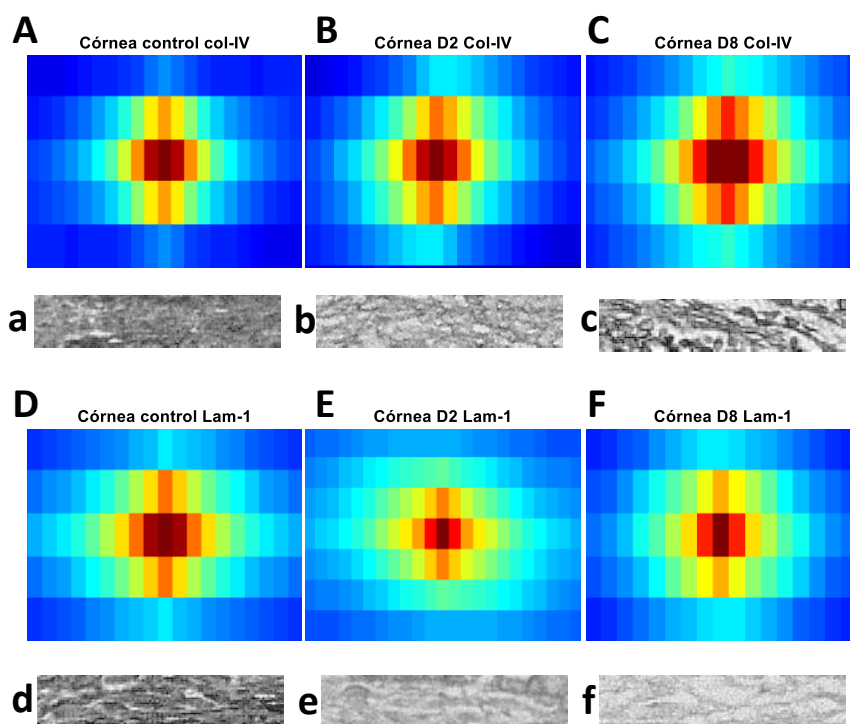


FIGURA IV- 32: Correlación del tamaño del grano obtenida a partir del análisis de imágenes corneales. Las figuras A, B y C representan al control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-colágeno IV. D, E y F representan los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden a imágenes corneales de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcado con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a imágenes corneales de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcado con anti-laminina-1.

Tal como se observa en las figuras IV-33 y IV-34, correspondientes al colágeno IV y laminina-1, respectivamente, las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre control-D2 y control-D8 en todos los parámetros (media, desviación estándar, skewness y curtosis).

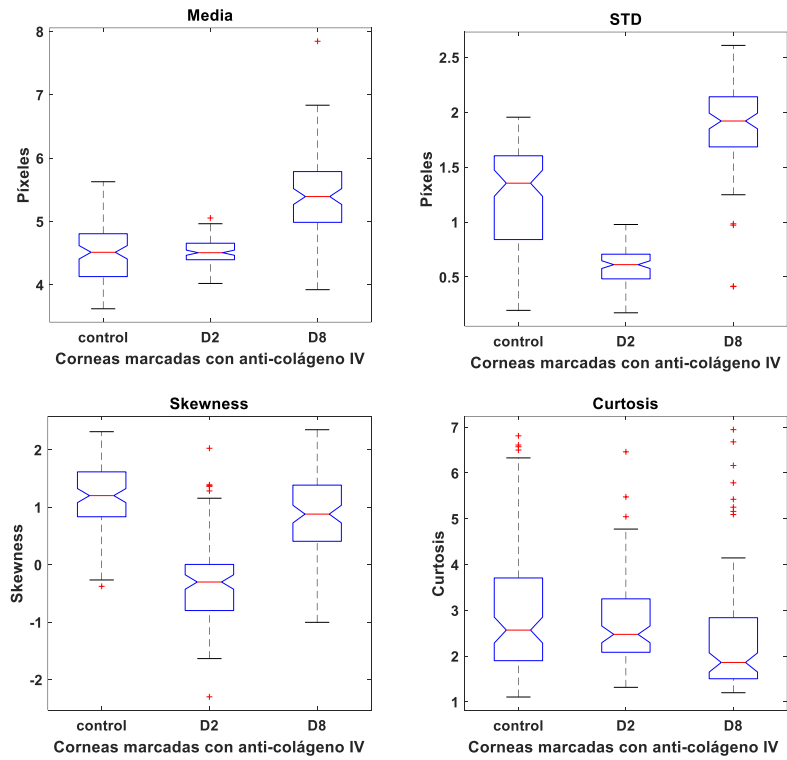


FIGURA IV- 33: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, skewness y curtosis del tamaño del grano de las córneas marcadas con anti-colágeno IV. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

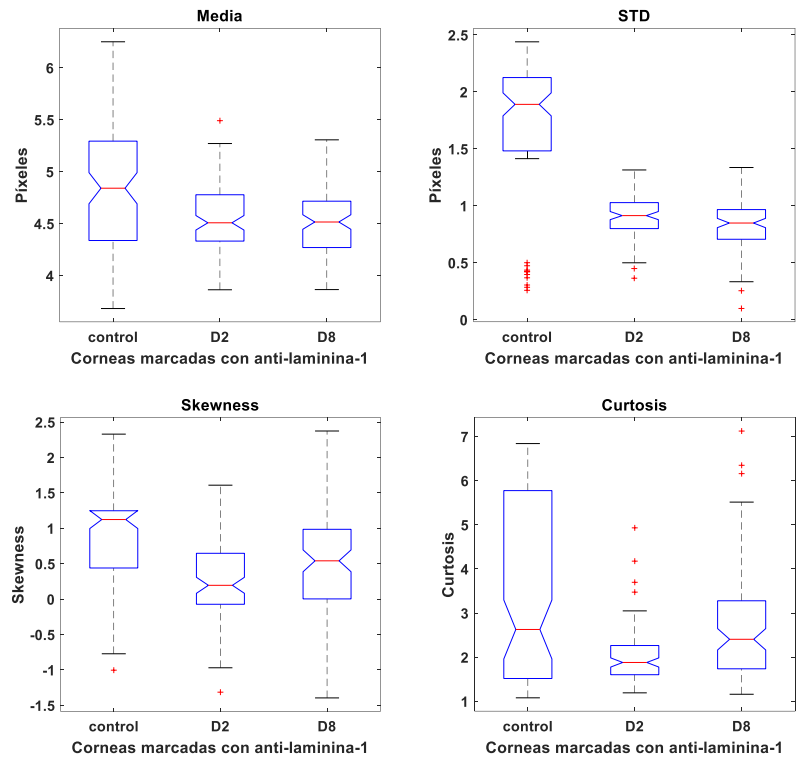


FIGURA IV- 34: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, Skewness y curtosis del tamaño del grano de las córneas marcadas con anti-laminina-1. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

2.4 Córnea: Transformada de Fourier

Los resultados de la TF para ambos marcajes se observan en la figura IV-35. Tanto las imágenes de colágeno IV (véase Fig. IV-35 (A, a), (B, b) y (C, c)) como las marcadas con anti-laminina-1 (véase Fig. IV-35 (D, d), (E, e) y (F, f)) muestran un ligero cambio en la orientación de las células en los grupos D2 y D8. Por otra parte, la dispersión de la orientación aumenta ligeramente en los grupos D2 y D8 marcados con anti-laminina-1. Como puede verse en la figura, la TF consta de puntos de frecuencia en el eje vertical lo que indica que la imagen contiene células dispuestas en líneas horizontales. Se puede observar también que existe una ligera inclinación de los puntos, esto indica que las células están ligeramente inclinadas respecto a un plano horizontal.

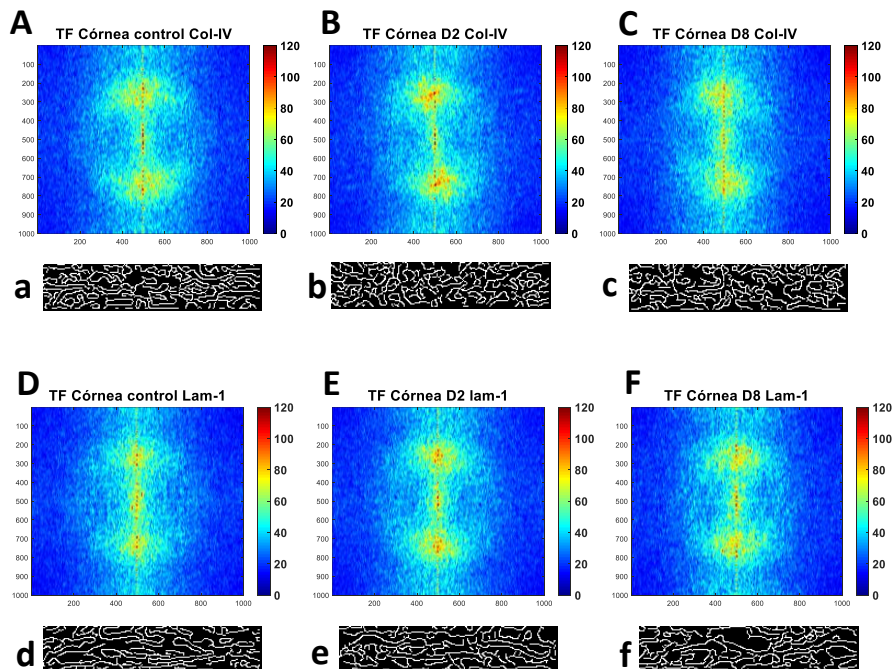


FIGURA IV- 35: Análisis de transformada de Fourier de la córnea. Las figuras A, B y C representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras D, E y F representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden a la detección de borde mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a la detección de bordes mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1.

2.5 Retina: tamaño del grano

Respecto al análisis de textura de la retina, las imágenes marcadas con anti-colágeno IV muestran un aumento en el *tamaño del grano* especialmente en el grupo D8 (Fig. IV-36 (A, B y C)). Asimismo, en las retinas control marcadas con anti-colágeno IV el tejido es uniforme y homogéneo; pero se cambia a rugoso y granulado en D2 y D8 (Fig. IV-36 (a, b y c)).

Por otra parte, el marcaje con anti-laminina-1 muestra mayor *tamaño del grano* en ambos grupos D2 y D8 (Fig. IV-36 (D, E y F)). La textura de la retina en los individuos control es muy homogénea y uniforme. Sin embargo, cambia en los grupos D2 y D8 y vuelve granulada y rugosa (Fig. IV-36 (d, e y f)).

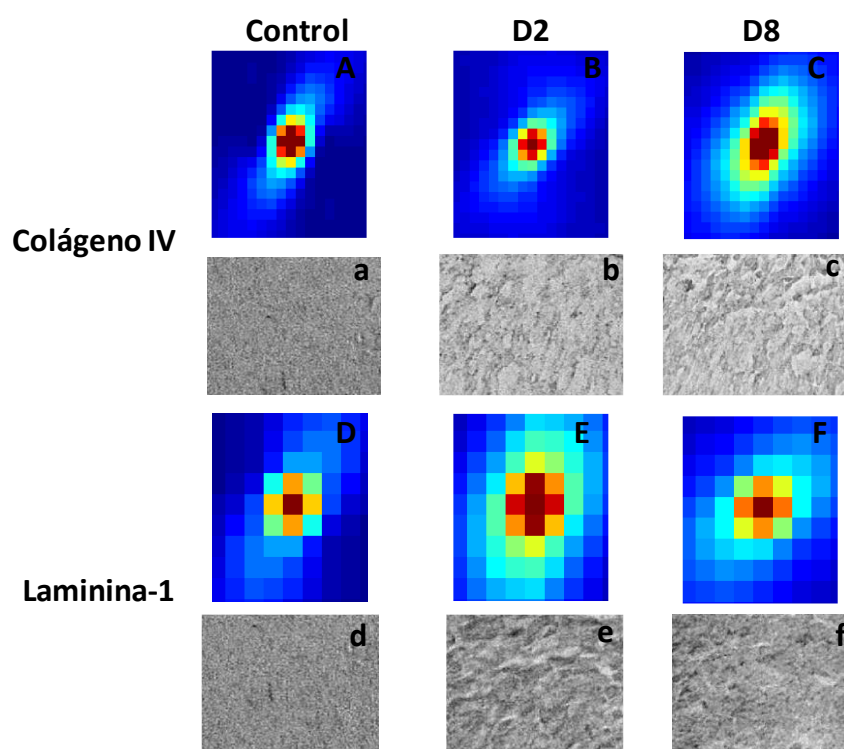


FIGURA IV- 36: Correlación del tamaño del grano obtenida a partir del análisis de imágenes retinianas. Las figuras A, B y C representan al control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-colágeno IV. D, E y F representan los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden a imágenes de tejidos retinianos de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcado con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a imágenes de tejidos retinianos de los grupos control, D2 y D8, respectivamente, marcado con anti-laminina-1.

Los resultados del análisis estadístico en forma de diagrama de cajas y bigotes se muestran en las figuras IV-37 y IV-38 para los dos marcajes colágeno IV y laminina-1, respectivamente. Como puede verse, todas las diferencias entre el grupo control-D2 y control-D8 son significativas ($p < 0.05$) excepto en el caso de la curtosis del *tamaño de grano* de retinas marcadas con anti-colágeno IV.

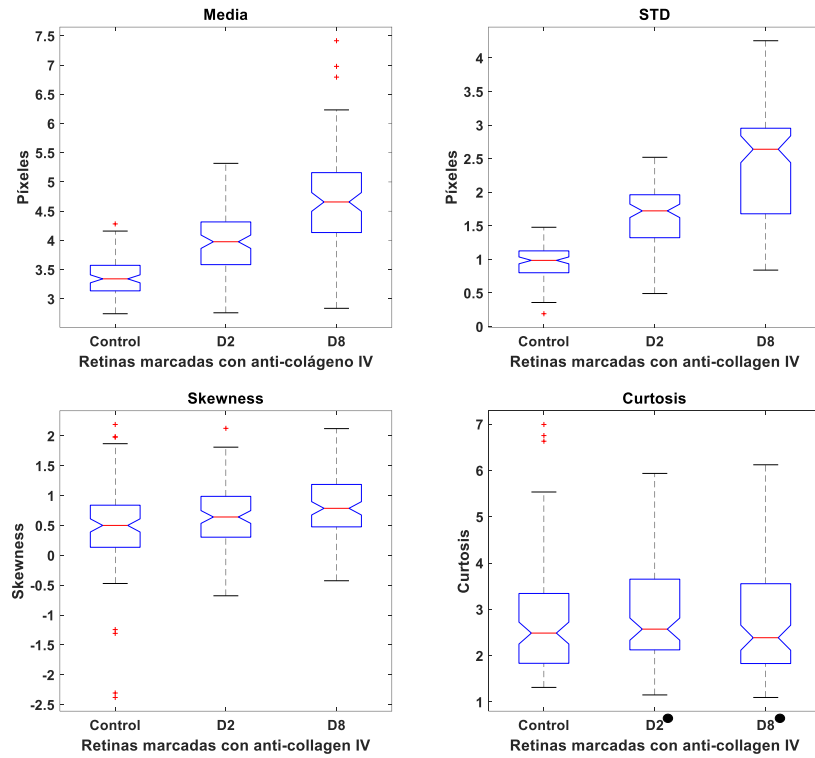


FIGURA IV- 37: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, Skewness y curtosis del tamaño del grano de las retinas marcadas con anti-collágeno IV. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) excepto para la curtosis (marcados con 'puntos negros' en la figura).

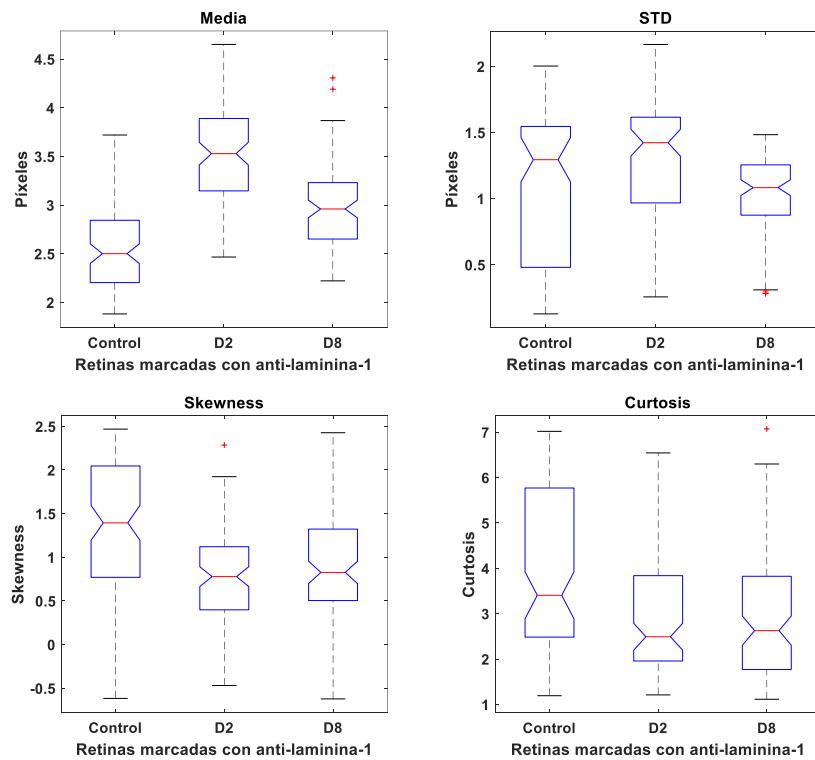


FIGURA IV- 38: Diagramas de caja para las distribuciones: media, desviación estándar, Skewness y curtosis del tamaño del grano de las retinas marcadas con anti-laminina-1. Todos los grupos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

2.6 Retina: Transformada de Fourier

Los resultados de la TF para las imágenes retinianas marcadas con anti-colágeno IV muestran que la orientación es la misma en todos los grupos, pero hay mayor dispersión en los grupos D2 y D8 (Fig. IV-39 (A, B, C)). Del mismo modo, analizamos las retinas marcadas con anti-laminina-1, con respecto a la orientación se observa cambio en la orientación en D8, además de mayor dispersión en D2 y D8.

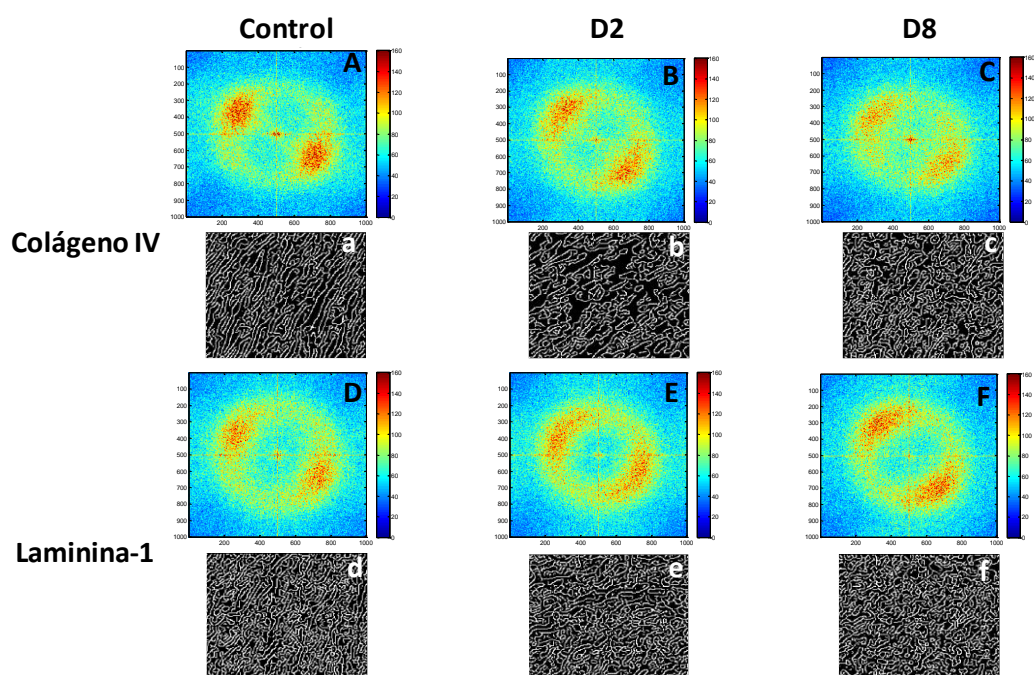


FIGURA IV- 39: Análisis de transformada de Fourier de la retina. Las figuras A, B y C representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras D, E y F representan los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1. Las figuras a, b y c corresponden a la detección de borde mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV. Las figuras d, e y f corresponden a la detección de bordes mediante el filtro Canny en los grupos control, D2 y D8 marcados con anti-laminina-1.

IV. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO IV

En este capítulo, hemos examinado los cambios de la textura de algunas estructuras oculares utilizando nuevos métodos de procesamiento y análisis de imágenes basados en teorías matemáticas. Estas herramientas nos han facilitado extraer información útil de las imágenes. Por ello, pueden ser los primeros pasos hacia el desarrollo de algún algoritmo que se puede utilizar como método de diagnóstico inicial para diferenciar estructuras alteradas, como se hace en las biopsias que discriminan tejidos sanos de patológicos.

La primera herramienta introducida en este capítulo es el análisis multifractal. Más precisamente, proponemos el uso de algunos parámetros fractales que son: DF, lacunaridad, divergencia y espectro multifractal para evaluar la complejidad estructural e irregularidad de las estructuras.

Utilizamos la lacunaridad en la medición de la textura en la imagen esencialmente por su capacidad para estimar la falta de homogeneidad en un objeto [69]. Mide la distribución de huecos en el tejido, esos huecos nos pueden proporcionar información sobre la homogeneidad de la distribución celular o molecular [70]. Por regla general, las estructuras con baja lacunaridad son homogéneas debido a que todos los tamaños de los huecos son iguales, no obstante estructuras con alta lacunaridad son heterogéneas.

Según nuestros resultados, en promedio la lacunaridad tiende a aumentar en los grupos D2 y D8 con respecto al control en todas las estructuras estudiadas, excepto en retinas y córneas marcadas con anti-laminina-1 (véase Fig. IV-13 y IV-14). Esto significa que casi todas estructuras de los grupos D2 y D8 se vuelven más heterogéneas.

Por otra parte, los resultados del espectro multifractal indican que los cambios más grandes en los espectros multifractales se dan, en orden decreciente, en el cristalino, retina, vítreo y córnea. En el caso del cristalino y el vítreo, el cambio tiende a hacer que los tejidos sean más multifractales para el marcaje con anti-laminina-1, mientras que en el caso del colágeno IV, los cambios se producen principalmente en la parte monofractal. En el caso de la retina, se producen cambios en la parte multifractal del espectro (marcadas con anti-colágeno IV) y en ambas partes del espectro para el caso de la laminina-1. Finalmente, para la córnea, los cambios se producen igualmente en ambas partes del espectro para ambos tipos de marcaje. El uso de la segunda métrica nos ha permitido hacer una comparación para cada valor del parámetro " q " en los espectros multifractales (véase ecuación 4.14). Así, hemos podido comparar en qué parte del espectro multifractal se produce la mayor diferencia entre el control y los grupos D2 y D8 (parte monofractal $q < 1$ o multifractal $q > 1$). Al parecer, en

el caso de valores más grandes, la diferencia con el grupo control se encuentra principalmente en la parte multifractal de los espectros. Sin embargo, en el caso de las diferencias menos importantes, los cambios afectan a la parte monofractal y multifractal por igual. En resumen, los hallazgos de la primera sección sugieren que, para casi todos los casos analizados, existen muchos huecos grandes e irregulares y las estructuras tienden a ser más heterogéneos de lo normal para ambos marcajes.

Por otra parte, comparando los resultados obtenidos mediante el análisis multifractal y los conseguidos mediante el parámetro *tamaño del grano* hemos encontrado evidencias de que una dieta materna carente de AF altera la textura de las estructuras, en el interior del cristalino, córnea y retina, lo que produce cambios en el grado de rugosidad e irregularidad de los tejidos: los tejidos de los grupos D2 y D8 marcados con anti-colágeno IV se vuelven más rugosos e irregulares, sin embargo los marcados con anti-laminina-1 vuelven más lisos. Estos cambios en la textura de los tejidos hacen que las estructuras se vuelvan más heterogéneos de lo normal y con más irregularidad espacial. El empleo conjunto de ambos métodos, análisis multifractal y *tamaño del grano*, podría ser ventajoso para evaluar la textura de tejidos biológicos. Primero, porque ambas técnicas no son destructivas ya que no hacen sufrir ningún daño visible a la muestra. Segundo, aprovechar las técnicas de tinción, como en nuestro caso la inmunohistoquímica, podría ayudar a identificar cambios específicos en las moléculas dentro de las estructuras. Gracias a este tipo de tinciones, se pueden revelar texturas con una disposición espacial mucho más fina, eso se debe a que la tinción resalta complejos moleculares muy pequeños, como proteínas, lípidos, etc. [71]. Por lo tanto, cualquier disposición no aleatoria de las células va a generar distintas texturas de tejido con distinta coloración en la imagen [72]. Así que, aprovechando tales imágenes realizando un análisis automatizado de la textura ayudaría en el diagnóstico diferencial de una serie de enfermedades o para identificar tejidos específicos, útil para varios propósitos clínicos.

Por último, el segundo método utilizado en este capítulo, el análisis de la dimensión fractal conectada local (DFCL), también podría resultar útil para evaluar posibles variaciones locales en estructuras. La DFCL muestra una mayor variabilidad en la estructura espacial de los cristalinos entre individuos, esto no era posible observarlo en el capítulo anterior cuando estudiamos los cambios en la expresión de colágeno IV y laminina-1. Debemos hacer notar que en el caso de la infra/sobreexpresión de estas moléculas, el primer CP representaba en promedio casi el 97% de los datos para todos los grupos (control, D2 y D8), sin embargo, para la DFCL este porcentaje se calcula solamente entre 30% y 47%. Cabe añadir que, en el capítulo anterior, hemos definido una métrica que proporciona el ángulo

entre el autovector asociado al primer CP y el que se asociaría con la toma del valor medio de las imágenes. En el caso de la DFCL este ángulo es de 10° , mucho más alto que el obtenido en el estudio de la infra/sobreexpresión. Esto muestra que la variación entre individuos no se distribuye de forma aleatoria, sino con una estructura espacial marcada. Como puede verse en la figura IV-23, las células epiteliales del cristalino y la región de transición son las zonas donde la variabilidad es mayor. En el caso del colágeno IV, para D2, también existe una variación en la zona de las fibras del cristalino, que coincide con la sobreexpresión observada en esta región en el capítulo anterior.

A pesar de que las zonas de sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 en el cristalino se correlacionan positivamente con un aumento de la DFCL con respecto al grupo de control, la correlación no es muy alta. En este sentido, es útil recordar que la correlación se estableció con las imágenes reconstruidas para la DFCL solo con el primer proceso P1, el más representativo para todos los grupos, con un porcentaje de la varianza total en torno al 50%.

La alteración en la organización espacial de las moléculas estudiadas en el cristalino descrita anteriormente sugiere que puede causar cambios en sus características ópticas. Algunos estudios relacionan el espectro fractal de los tejidos con sus parámetros de esparcimiento (scattering) [73, 74] que podrían estar también relacionados con patologías como la catarata en sus etapas iniciales [75]. Para averiguar los posibles cambios en las propiedades de scattering de los cristalinos, vamos a estudiar en el próximo capítulo las variaciones en el grado de polarización de la luz después de su interacción con estas estructuras.

V. REFERENCIAS DEL 4º CAPÍTULO

1. Goldberger AL, Amaral LAN, Hausdorff JM, Ivanov PC, Peng CK, Stanley HE: **Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**:2466-2472.
2. Engel P: **The fractal geometry of nature - mandelbrot**, BB. *Sciences-New York* 1983, **23**(5):63-68.
3. Mandelbrot BB: **Stochastic models for the Earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastlines, and the number-area rule for islands**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975, **72**(10):3825-3828.
4. Balka R, Buczolic Z, Elekes M: **A new fractal dimension: The topological Hausdorff dimension**. *Advances in Mathematics* 2015, **274**:881-927.
5. Thamrin C, Stern G, Frey U: **Fractals for physicians**. *Paediatric Respiratory Reviews* 2010, **11**(2):123-131.
6. Falconer KJ, Falconer K: **Techniques in fractal geometry**, vol. 3: Wiley Chichester (W. Sx.); 1997.
7. Xu P: **A discussion on fractal models for transport physics of porous media**. *Fractals-Complex Geometry Patterns and Scaling in Nature and Society* 2015, **23**(3):11.
8. Viana RL, da Silva EC, Kroetz T, Caldas IL, Roberto M, Sanjuan MAF: **Fractal structures in nonlinear plasma physics**. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 2011, **369**(1935):371-395.
9. Elmegreen BG, Kim S, Staveley-Smith L: **A fractal analysis of the HI emission from the Large Magellanic Cloud**. *Astrophysical Journal* 2001, **548**(2):749-769.
10. Andre H, Perdang JM: **Applying fractals in astronomy**, vol. 3: Springer Science & Business Media; 1991.
11. Hyslip JP, Vallejo LE: **Fractal analysis of the roughness and size distribution of granular materials**. *Engineering Geology* 1997, **48**(3-4):231-244.
12. Ford A, Blenkinsop TG: **Combining fractal analysis of mineral deposit clustering with weights of evidence to evaluate patterns of mineralization: application to copper deposits of the Mount Isa Inlier, NW Queensland, Australia**. *Ore Geology Reviews* 2008, **33**(3):435-450.
13. Hirabayashi T, Ito K, Yoshii T: **Multifractal analysis of earthquakes**. *pure and applied geophysics* 1992, **138**(4):591-610.
14. Havlin S, Buldyrev SV, Goldberger AL, Mantegna RN, Ossadnik SM, Peng CK, Simon M, Stanley HE: **Fractals in biology and medicine**. *Chaos Solitons & Fractals* 1995, **6**:171-201.
15. Kunicki ACB, Araujo LS, Sa FB, Stosic B, Barbosa CTF, Nogueira RA: **Fractal analysis of retinal vessel patterns in ophthalmically normal dogs**. *Veterinary Ophthalmology* 2008, **11**(1):2-6.
16. Avakian A, Kalina RE, Sage EH, Rambhia AH, Elliott KE, Chuang EL, Clark JI, Hwang JN, Parsons-Wingerter P: **Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina**. *Current Eye Research* 2002, **24**(4):274-280.
17. Xi JX, Zhao WZ, Yuan JE, Kim J, Si XH, Xu XW: **Detecting Lung Diseases from Exhaled Aerosols: Non-Invasive Lung Diagnosis Using Fractal Analysis and SVM Classification**. *Plos One* 2015, **10**(9):19.
18. Bizzarri M, Giuliani A, Cucina A, D'Anselmi F, Soto AM, Sonnenschein C: **Fractal analysis in a systems biology approach to cancer**. *Seminars in Cancer Biology* 2011, **21**(3):175-182.

19. Breki CM, Dimitrakopoulou-Strauss A, Hassel J, Theoharis T, Sachpekidis C, Pan LY, Provata A: **Fractal and multifractal analysis of PET/CT images of metastatic melanoma before and after treatment with ipilimumab.** *Ejnm Research* 2016, **6**:16.
20. Cardona HDV, Orozco Á, Álvarez MA: **Automatic Recognition of Microcalcifications in Mammography Images through Fractal Texture Analysis.** In: *International Symposium on Visual Computing: 2014*: Springer; 2014: 841-850.
21. Li H, Giger ML, Olopacle OI, Lan L: **Fractal analysis of mammographic parenchymal patterns in breast cancer risk assessment.** *Academic Radiology* 2007, **14**(5):513-521.
22. Chernick MR: **Bootstrap methods: A guide for practitioners and researchers.** **Hoboken.** In.: Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons. Inc. ; 2008.
23. Efron B, Tibshirani RJ: **An Introduction to the Bootstrap: Monographs on Statistics and Applied Probability, Vol. 57.** *New York and London: Chapman and Hall/CRC* 1993.
24. Siegel S: **Nonparametric statistics for the behavioral sciences:** McGraw-hill, New York; 1956.
25. Mahalanobis P: **Mahalanobis distance.** In: *Proceedings National Institute of Science of India: 1936*; 1936: 234-256.
26. De Maesschalck R, Jouan-Rimbaud D, Massart DL: **The mahalanobis distance.** *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 2000, **50**(1):1-18.
27. Dougherty G, Henebry GM: **Fractal signature and lacunarity in the measurement of the texture of trabecular bone in clinical CT images.** *Medical Engineering & Physics* 2001, **23**(6):369-380.
28. Lopes R, Betrouni N: **Fractal and multifractal analysis: A review.** *Medical Image Analysis* 2009, **13**(4):634-649.
29. Russell DA, Hanson JD, Ott E: **Dimension of strange attractors.** *Physical Review Letters* 1980, **45**(14):1175.
30. Landini G: **Fractals in microscopy.** *Journal of Microscopy* 2011, **241**(1):1-8.
31. Cross SS: **Fractals in pathology.** *Journal of Pathology* 1997, **182**(1):1-8.
32. Dong PL: **Lacunarity analysis of raster datasets and 1D, 2D, and 3D point patterns.** *Computers & Geosciences* 2009, **35**(10):2100-2110.
33. Mandelbrot BB, Pignoni R: **The fractal geometry of nature.** 1983.
34. Allain C, Cloitre M: **Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractal sets.** *Physical Review A* 1991, **44**(6):3552-3558.
35. Santos DS, Santos LCB, Carvalho AAT, Leao JC, Delrieux C, Stosic T, Stosic B: **Multifractal spectrum and lacunarity as measures of complexity of osseointegration.** *Clinical Oral Investigations* 2016, **6**(20):1271-1278.
36. Henebry GM, Kux HJH: **Lacunarity as a texture measure for sar imagery.** *International Journal of Remote Sensing* 1995, **16**(3):565-571.
37. Plotnick RE, Gardner RH, Oneill RV: **Lacunarity indexes as measures of landscape texture.** *Landscape Ecology* 1993, **8**(3):201-211.
38. Roces-Díaz JV, Díaz-Varela ER, Álvarez-Álvarez P: **Analysis of spatial scales for ecosystem services: application of the lacunarity concept at landscape level in Galicia (NW Spain).** *Ecological Indicators* 2014, **36**:495-507.
39. YUM MK, Kim JS: **Increased intermittency and decreased nonstationarity of heart rates during the daytime in patients with neurocardiogenic syncope.** *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2002, **13**(8):788-793.
40. Țălu Ș, Giovanzana S: **Fractal and multifractal analysis of human retinal vascular network: a review.** *Human & Veterinary Medicine* 2011, **3**(3).
41. Feder J: **Fractals plenum;** 1988.
42. Salat H, Murcio R, Arcaute E: **Multifractal methodology.** *Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications* 2017, **473**:467-487.

43. Chhabra A, Jensen RV: **Direct determination of the $f(\alpha)$ singularity spectrum.** *Physical Review Letters* 1989, **62**(12):1327-1330.
44. Halsey TC, Jensen MH, Kadanoff LP, Procaccia I, Shraiman BI: **Fractal measures and their singularities: the characterization of strange sets.** *Physical Review A* 1986, **33**(2):1141.
45. Karperien A: **FraCLac for ImageJ.** *Charles Sturt University* 2013.
46. Posadas AN, Giménez D, Quiroz R, Protz R: **Multifractal characterization of soil pore systems.** *Soil Science Society of America Journal* 2003, **67**(5):1361-1369.
47. Costa EVL, Nogueira RA: **Fractal, multifractal and lacunarity analysis applied in retinal regions of diabetic patients with and without nonproliferative diabetic retinopathy.** *Fractal Geom Nonlinear Anal Med Biol* 2015, **1**(3):112-119.
48. Hu M-G, Wang J-F, Ge Y: **Super-Resolution Reconstruction of Remote Sensing Images Using Multifractal Analysis.** *Sensors* 2009, **9**(11):8669.
49. Szczepaniak A, Macek W: **Asymmetric multifractal model for solar wind intermittent turbulence.** *Nonlinear Processes in Geophysics* 2008, **15**(4):615-620.
50. Goodhue DL, Lewis W, Thompson R: **Does PLS have advantages for small sample size or non-normal data?** *Mis Quarterly* 2012:981-1001.
51. Ferreira T, Rasband W: **ImageJ user guide.** *ImageJ/Fiji* 2012, **1**.
52. Abràmoff M, Magalhães P, Ram S: **Image processing with imageJ.** *Biophoton Int* **11**: 36-41. In.; 2004.
53. Stankovic M, Pantic I, De Luka SR, Puskas N, Zaletel I, Milutinovic-Smiljanic S, Pantic S, Trbovich AM: **Quantification of structural changes in acute inflammation by fractal dimension, angular second moment and correlation.** *Journal of Microscopy* 2016, **261**(3):277-284.
54. Toolbox O: **MatLab, r2015b edition.** In.: September; 2015.
55. Legland D: **Geom3d.** [On-line] Available on: <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24484-geom3d> [Retrieved March 19, 2019] 2019.
56. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar Jr RM, Luckie A: **Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice.** *Clinical ophthalmology* 2008, **2**(1):109-122.
57. Landini G, Murray PI, Misson GP: **Local connected fractal dimensions and lacunarity analyses of 60 degrees fluorescein angiograms.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1995, **36**(13):2749-2755.
58. Landini G, Rippin J: **How important is tumour shape? Quantification of the epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis.** *The Journal of pathology* 1996, **179**(2):210-217.
59. Voss RF, Wyatt JC: **Multifractals and the local connected fractal dimension.** In: *Applications of fractals and chaos.* edn.: Springer; 1993: 171-192.
60. Eid RA, Landini G: **Quantification of the global and local complexity of the epithelial-connective tissue interface of normal, dysplastic, and neoplastic oral mucosae using digital imaging.** *Pathology, research and practice* 2003, **199**(7):475.
61. Jelinek HF, Cornforth D, Roberts AJ, Landini G, Bourke P, Iorio A: **Image processing of finite size rat retinal ganglion cells using multifractal and local connected fractal analysis.** In: *Australasian Joint Conference on Artificial Intelligence: 2004:* Springer; 2004: 961-966.
62. Rasband W: **ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, h ttp. imagej.nih.gov/ij** 1997, **2012**.
63. Harvey L, Arnold B, Kaiser Chris A, Monty K: **Molecular cell biology:** New York : W.H. Freeman; 2008.
64. Nassif R, Pellen F, Magne C, Le Jeune B, Le Brun G, Abboud M: **Laser speckle dynamic for monitoring fruits maturation.** In: *Speckle 2012: V International*

- Conference on Speckle Metrology: 2012*: International Society for Optics and Photonics; 2012: 84131G.
65. Canny J: **A computational approach to edge detection**. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* 1986(6):679-698.
 66. Gonzalez RCE, Woods SL, Gonzalez RERERC, Woods RE, Eddins SL: **Digital image processing using MATLAB**; 2004.
 67. Li Y, Chen WR, Zhang Y, Qian W, Liu H: **Comparison of analog and digital Fourier transforms in medical image analysis**. *Journal of biomedical optics* 2002, 7(2):255-261.
 68. Tukey JW: **Exploratory data analysis**, vol. 2: Reading, Mass.; 1977.
 69. Smith Jr T, Lange G, Marks W: **Fractal methods and results in cellular morphology—dimensions, lacunarity and multifractals**. *Journal of neuroscience methods* 1996, 69(2):123-136.
 70. de Melo RH, Vieira EdA, Conci A: **Characterizing the lacunarity of objects and image sets and its use as a technique for the analysis of textural patterns**. In: *International Conference on Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems: 2006*: Springer; 2006: 208-219.
 71. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, Metzger GJ, Schmechel SC: **Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring**. *Diagnostic pathology* 2012, 7(1):42.
 72. Di Cataldo S, Ficarra E: **Mining textural knowledge in biological images: Applications, methods and trends**. *Computational and structural biotechnology journal* 2017, 15:56-67.
 73. Sheppard CJ: **Fractal model of light scattering in biological tissue and cells**. *Optics letters* 2007, 32(2):142-144.
 74. Xu M, Alfano RR: **Fractal mechanisms of light scattering in biological tissue and cells**. *Optics letters* 2005, 30(22):3051-3053.
 75. Michael R, Bron A: **The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2011, 366(1568):1278-1292.

Capítulo V

I. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS TEJIDOS: LUZ POLARIZADA

Las imágenes polarizadas son una nueva modalidad utilizada en muchas ramas de la ciencia, especialmente en biología [1]. Hoy en día, existe un gran interés en las técnicas de imagen óptica basadas en luz polarizada, debido a sus potenciales aplicaciones como método de diagnóstico óptico no invasivo. Este método permite un análisis detallado de los cambios en la textura de tejidos, midiendo propiedades físicas que no son detectables utilizando imágenes convencionales. Estas propiedades tratan de extraer nueva información sobre el tamaño, la forma y concentración de partículas dispersas, así como extraer la mayor cantidad de información posible sobre procesos de scattering y el grado de despolarización de la luz [2]. Se sabe que muchos tejidos biológicos exhiben birrefringencia debido fundamentalmente a su contenido celular y estructural [3]. Por este motivo, el uso de las propiedades de polarización de los tejidos se ha establecido como un mecanismo de contraste en la imagen biomédica [4].

En el presente capítulo, a diferencia de los capítulos anteriores, se van a evaluar estructuras oculares incluidas en parafina procedentes de cabezas de embriones de los grupos control, D2 y D8. Pretendemos desarrollar una nueva técnica para evaluar los cambios en las estructuras respecto al grupo control sin tener que realizar ninguna tinción ni marcaje biológico. Esto significa que la nueva técnica puede utilizarse como un indicador para proporcionar información sobre la anisotropía espacial de los tejidos. El método no reemplaza la estimación histológica, pero ayudaría a evaluar el daño estructural antes del marcaje. En general, los tejidos biológicos que forman parte de las estructuras corporales abarcan una amplia variedad de distintos tipos de moléculas con una composición bioquímica variada.

1. LUZ POLARIZADA: MODELO MATEMÁTICO

1.1 Parámetros de Stokes

1.1.1 Polarización lineal

Un polarizador es un material que transmite de forma selectiva el campo eléctrico haciendo que este vibre en un determinado plano. Existen varios tipos de polarizadores, pero en esta tesis utilizaremos polarizadores lineales que solo dejan pasar la componente del campo eléctrica que vibra paralela a su eje.

Consideramos un rayo incidente de luz polarizada formado por dos componentes ortogonales E_x y E_y , que tienen diferentes amplitudes y fases. Ambas son las componentes del campo eléctrico en las direcciones x e y , y que viajan en la dirección z . Las dos ondas incidentes se pueden expresar como[5]:

$$\mathbf{E}_x(z, t) = \hat{\mathbf{i}}E_{0x} \cos(kz - \omega t) \quad (5.1)$$

$$\mathbf{E}_y(z, t) = \hat{\mathbf{j}}E_{0y} \cos(kz - \omega t + \Delta\varepsilon) \quad (5.2)$$

donde E_{0x} y E_{0y} son las amplitudes, $(kz - \omega t)$ es la fase, $(\Delta\varepsilon)$ es la diferencia de fase relativa entre las dos ondas. La adición de $\Delta\varepsilon$ positivo significa que E_y queda detrás de E_x en $\Delta\varepsilon > 0$. No obstante, si es negativo E_y precede a E_x en $\Delta\varepsilon < 0$. Finalmente, si $\Delta\varepsilon = 0$ o múltiplo entero de $\pm 2\pi$, ambas ondas están en fase y la onda resultante es:

$$\mathbf{E} = (\hat{\mathbf{i}}E_{0x} + \hat{\mathbf{j}}E_{0y}) \cos(kz - \omega t) \quad (5.3)$$

Esta onda resultante, por tanto, tendrá una amplitud fija igual a $(\hat{\mathbf{i}}E_{0x} + \hat{\mathbf{j}}E_{0y})$ que es a su vez linealmente polarizada (Fig. V-1).

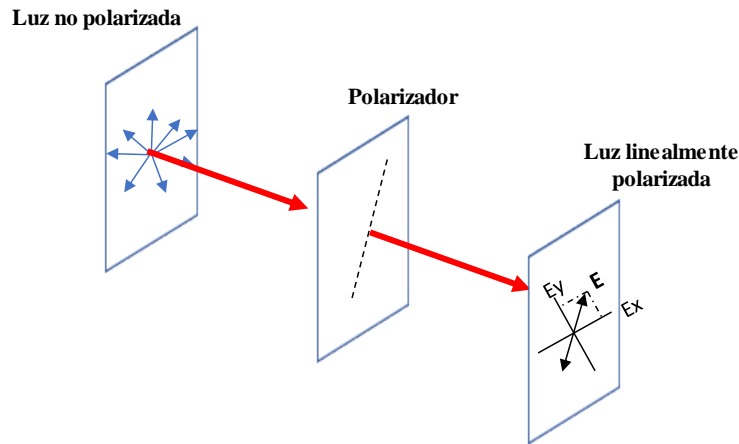


FIGURA V- 1: Obtención de luz linealmente polarizada a partir de una emisión de luz no polarizada.

A partir de las componentes paralela y perpendicular del campo incidente se pueden definir los parámetros de Stokes. Stokes [6] mostró que un haz de luz se puede caracterizar por cuatro elementos del vector de Stokes conocidos como Parámetros de Stokes (I, M, C, V), que especifican la intensidad incidente (I) y el estado de polarización del haz de luz (M,C,V). Los elementos del vector de Stokes se definen de la siguiente manera [5]: I, es la intensidad total de la luz medida sin ningún analizador delante del detector. M, representa la tendencia de la polarización a asemejarse a una polarización horizontal ($M > 0$) o vertical ($M < 0$). C, representa la tendencia de la luz a asemejarse a una polarización lineal en la dirección $+45^\circ$ (cuando ($C > 0$)) o en la dirección -45° (cuando ($C < 0$)). Finalmente, V, representa la tendencia del haz a tener sentido a derechas ($V > 0$), izquierdas ($V < 0$) o ninguno de los dos ($V = 0$).

De esta forma, para una luz cuasimonocromática [5]:

$$\mathbf{E}_x(t) = \hat{\mathbf{i}}E_{0x}(t) \cos((\bar{k}z - \bar{\omega}t) + \varepsilon_x(t)) \quad (5.4)$$

$$\mathbf{E}_y(t) = \hat{\mathbf{i}}E_{0y}(t) \cos((\bar{k}z - \bar{\omega}t) + \varepsilon_y(t)) \quad (5.5)$$

donde $E(t) = E_x(t) + E_y(t)$. Utilizando estos parámetros, el Vector Stokes se puede definir como:

$$S = \begin{bmatrix} I \\ M \\ C \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \langle E_{0x}^2 \rangle_T + \langle E_{0y}^2 \rangle_T \\ \langle E_{0x}^2 \rangle_T - \langle E_{0y}^2 \rangle_T \\ \langle 2E_{0x}E_{0y} \cos \varepsilon \rangle_T \\ \langle 2E_{0x}E_{0y} \sin \varepsilon \rangle_T \end{bmatrix} \quad (5.6)$$

donde $\varepsilon = \varepsilon_y - \varepsilon_x$ y $\langle \rangle_T$ significa promedio temporal. Por otra parte, para luz perfectamente monocromática los parámetros de Stokes serían:

$$S = \begin{bmatrix} I \\ M \\ C \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \\ E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \\ 2E_{0x}E_{0y} \cos \varepsilon \\ 2E_{0x}E_{0y} \sin \varepsilon \end{bmatrix} \quad (5.7)$$

A partir de los parámetros de Stokes se pueden definir el grado de polarización (DOP), grado de polarización lineal (DOLP), y el grado de polarización circular (DOCP) de la siguiente forma [2, 7, 8]:

$$DOP = \frac{\sqrt{M^2 + C^2 + V^2}}{I} \quad (5.8)$$

$$DOLP = \frac{\sqrt{M^2 + C^2}}{I} \quad (5.9)$$

$$DOCP = \frac{V}{I} \quad (5.10)$$

Los parámetros de Stokes también permiten calcular el retardo, $\Delta\varepsilon$, entre las dos componentes perpendiculares del campo eléctrico, dado por $\Delta\varepsilon = a \tan\left(V/\sqrt{M^2 + C^2}\right)$ [9].

El valor del DOP es un número entre 0 y 1. Entonces, para luz completamente polarizada, $DOP = 1$ y para luz no polarizada $DOP = 0$ (para este tipo de luz el plano de polarización cambia de manera aleatoria en la propagación). Por lo tanto, la luz parcialmente polarizada que está representada por $0 < DOP < 1$, se puede considerar como una superposición de un vector de Stokes completamente polarizado \mathbf{S}_p y un vector de Stokes no polarizado \mathbf{S}_U . De esta forma, el vector de Stokes par luz parcialmente polarizada se puede definir como:

$$S = \begin{bmatrix} I \\ M \\ C \\ V \end{bmatrix} = S_U + S_P = (1 - DOP) \begin{bmatrix} I \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} + DOP \begin{bmatrix} I \\ M \\ C \\ V \end{bmatrix} \quad (5.11)$$

Análisis de la elipse de polarización: También puede darse el caso de que el campo eléctrico “gire” a la vez que se propaga. En estas situaciones, el extremo del campo eléctrico genera, en un plano perpendicular al eje z de propagación, una elipse denominada *elipse de polarización*, caracterizada por una serie de parámetros. Se pueden definir los parámetros de la elipse de polarización, A (semieje mayor), B (semieje menor) y ángulo de polarización Θ denominado también *azimut* (comprendido entre el semieje mayor de la elipse y el eje x del plano contra el cual se está analizando), mostrados en la figura V-2, como sigue [9]:

Definimos la intensidad de una polarización total, I_p , tal que:

$$I_p^2 = M^2 + C^2 + V^2 \quad (5.12)$$

Del mismo modo, definimos la intensidad compleja de polarización lineal como $L \equiv M + iC$.

Ya que $M = \text{Re}(L)$ y $C = \text{Im}(L)$, podemos definir L como

$$|L| = \sqrt{M^2 + C^2} \quad (5.13)$$

De esta forma, podemos representar los parámetros de Stokes en términos de los parámetros de la elipse de polarización de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} I_p &= A^2 + B^2; \\ M &= (A^2 - B^2) \cos(2\theta); \\ C &= (A^2 - B^2) \sin(2\theta); \\ V &= 2AB \cdot \text{sgn}(V) \end{aligned} \quad (5.14)$$

De las ecuaciones anteriores se puede deducir el valor de A , B y Θ :

$$\begin{aligned}
I_p &= A^2 + B^2 \Rightarrow A^2 = I_p - B^2 \\
|L| &= \sqrt{M^2 + C^2} = \sqrt{((A^2 - B^2) \cos(2\theta))^2 + (A^2 - B^2) \sin(2\theta))^2} \\
|L| &= \sqrt{((A^2 - B^2)^2 (\cos(2\theta))^2 + \sin(2\theta))^2} = A^2 - B^2 \\
|L| &= A^2 - B^2 = I_p - B^2 - B^2 = I_p - 2B^2 \Rightarrow B^2 = \frac{1}{2}(I_p - |L|)
\end{aligned} \tag{5.15}$$

Por tanto, el valor de B es:
$$B = \sqrt{\frac{1}{2}(I_p - |L|)}; \tag{5.16}$$

Por otra parte:

$$\begin{aligned}
A^2 &= I_p - B^2 = I_p - \left(\frac{1}{2}(I_p - |L|)\right) = I_p - \frac{1}{2}I_p + \frac{1}{2}|L| \\
A^2 &= \frac{1}{2}(I_p + |L|)
\end{aligned} \tag{5.17}$$

$$A = \sqrt{\frac{1}{2}(I_p + |L|)}; \tag{5.18}$$

$$\theta = \frac{1}{2} \arg(L); \tag{5.19}$$

Dado que hemos normalizado el valor de la intensidad I, los parámetros de la elipse, A y B, se pueden expresar también en función de DOP y DOLP:

$$A = \sqrt{\frac{1}{2}(DOP + DOLP)} \tag{5.20}$$

$$B = \sqrt{\frac{1}{2}(DOP - DOLP)} \tag{5.21}$$

$$\theta = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{C}{M} \right) \tag{5.22}$$

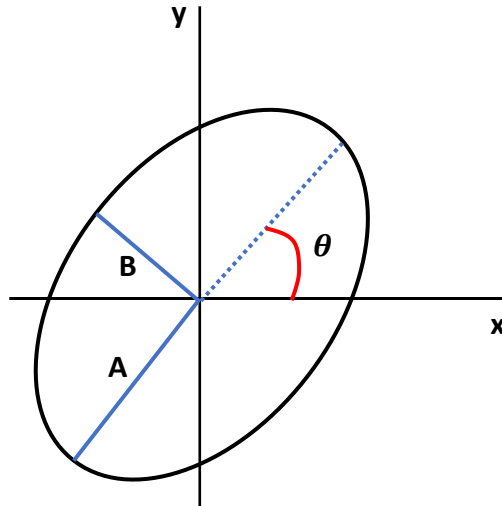


FIGURA V- 2: Elipse de polarización

El uso de los parámetros de Stokes permite caracterizar la polarización de la luz mediante un vector: luz linealmente polarizada horizontal $(1 \ 1 \ 0 \ 0)$, linealmente polarizada vertical $(1 \ -1 \ 0 \ 0)$, lineal a $+45$ grados $(1 \ 0 \ 1 \ 0)$, lineal a -45 grados $(1 \ 0 \ -1 \ 0)$, circular levógira $(1 \ 0 \ 0 \ -1)$, circular dextrógira $(1 \ 0 \ 0 \ 1)$ o luz no polarizada $(1 \ 0 \ 0 \ 0)$. Para ello, se suele normalizar los valores de intensidad anteriores (I, M, C, V) respecto al valor de intensidad I .

En un medio biológico, los cambios en el grado de polarización (DOP) suelen estar asociados a procesos de scattering en el tejido. Un aumento del scattering está relacionado con una disminución del grado de polarización [2]. Además, el scattering también influye en las características de transmisión del medio biológico ya que la transmisión a distancias grandes de la muestra puede escribirse como $T = \exp(-(\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda))L)$, siendo $\mu_a(\lambda)$ el coeficiente de absorción de la muestra, $\mu_s(\lambda)$ el coeficiente de scattering y L el espesor de la muestra. Así, zonas en las que el DOP sea muy pequeño puede producir transmisiones también bajas, incluso con coeficientes de absorción pequeños, si lo que denota es un scattering grande.

1.1.2 La lámina de cuarto de onda

La lámina de cuarto de onda es una lámina retardadora que introduce un desfase relativo de $\frac{\pi}{2}$ entre las dos componentes ortogonales de la onda de luz polarizada. Al colocar tras un polarizador lineal una lámina de un cuarto de longitud de onda con su eje óptico a 45° con respecto al plano de polarización de la luz incidente, la luz emergente se convierte en luz polarizada circular [5].

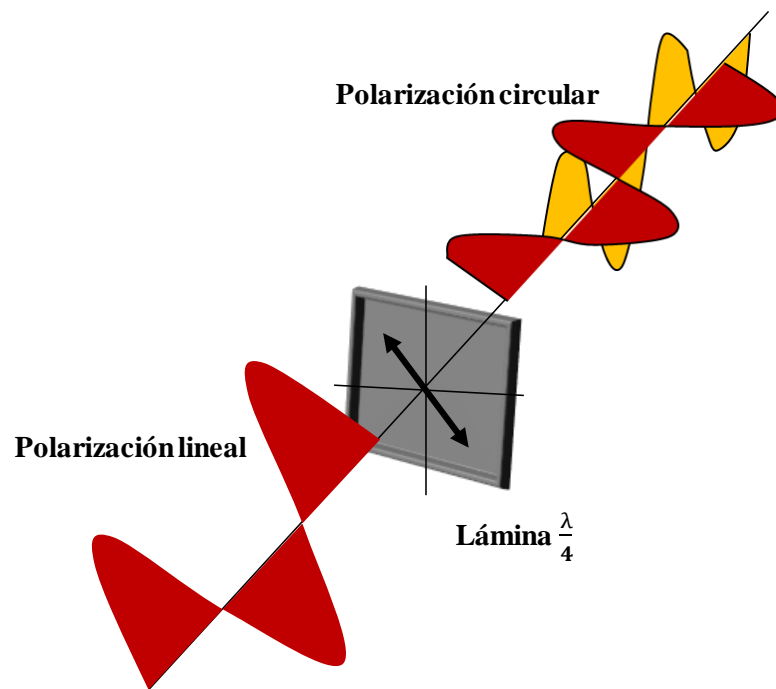


FIGURA V- 3: Polarización de la luz a través de una lámina de cuarto de onda

1.2 Descripción del experimento

El primer objetivo de este capítulo será el montaje de un sistema de laboratorio para la medida del estado de polarización de la luz tras atravesar las muestras biológicas que estamos analizando. El sistema del montaje experimental se muestra en las figuras V-4 y V-5. Asimismo, la figura V-6 muestra las distancias del banco de montaje. Estas figuras describen el proceso realizado para llevar a cabo la medición de los parámetros de Stokes. En general, el sistema está compuesto de los siguientes elementos:

- Una fuente de luz sintonizable TLS 25C de la casa Optometrics que nos permite cambiar la longitud de onda λ de la luz de entrada al sistema. Su rango espectral es de 360 nm a 1000 nm con una resolución de 25nm. Tal como se muestra en la figura V-7, los espectros tienen una anchura de banda pequeña. Por esta razón, vamos a considerar la fuente sintonizable como una fuente cuasi-monocromática. En esta misma figura, se puede ver que el nivel de intensidad es distinto para las diferentes longitudes de onda. En este experimento de medida de los parámetros de Stokes, para cada ojo, se van a medir los parámetros de Stokes para 3 longitudes de onda: Azul (445nm), verde (540nm) y roja (660nm).
- Doblete acromático: de la fuente sintonizable sale una fibra que se sitúa en el foco del doblete a fin de colimar la luz. Dicho doblete se monta sobre un tornillo micrométrico con una resolución de 0.01 mm, de esta forma se puede situar la salida de la fibra en un punto cercano al foco.
- Tras el doblete, se coloca el primer polarizador lineal (P1). Este polarizador fuerza a tener luz polarizada lineal. Se coloca de tal modo que la dirección de polarización es vertical.
- Tras P1 se coloca la muestra sobre un posicionador micrométrico con tres ejes de libertad (X,Y,Z) (figura V-8). Tras la muestra, se sitúa la lámina de cuarto de onda seguida por el segundo polarizador o analizador (P2). Para conocer la posición del eje del polarizador P2 respecto al de P1, se realiza una calibración previa en la que se gira el segundo polarizador respecto al primero para encontrar el máximo de señal (ejes paralelos), junto con la posición de señal mínima (ejes cruzados). Las distancias entre todos los elementos aparecen en la figura V-6.
- A continuación, se coloca una lente (L2) de +20D ($f=50$ mm), seguida por otra lente (L3) de +2.50D ($f=400$ mm).
- Finalmente, la transmisión de la luz a través de L3 se colecta por una cámara CCD de la casa IMAGINGSOURCE modelo DFK21AF04. La cámara tiene un sensor de un 1/4 de pulgada con 640x480 píxeles de tamaño 5.6 μ m cada uno. La cámara posee una

conexión firewire a través de la cual se conecta al ordenador control. La configuración de la cámara se realiza a través del software *IC Capture* de la propia casa. Con él se fija el tiempo de exposición de 1/15 segundos y un nivel de brillo de 51 adecuado al rango dinámico de la cámara. Las imágenes se toman con el interfaz de *imaqtool* de Matlab. Para cada toma de imágenes, se toma un conjunto de 50 imágenes consecutivas. Los 50 fotogramas son promediados pixel a pixel para rebajar la influencia del ruido temporal de los detectores de la cámara CCD. Las imágenes son tomadas en escalas de gris de 0 a 256 niveles de gris con la toolbox de Matlab.

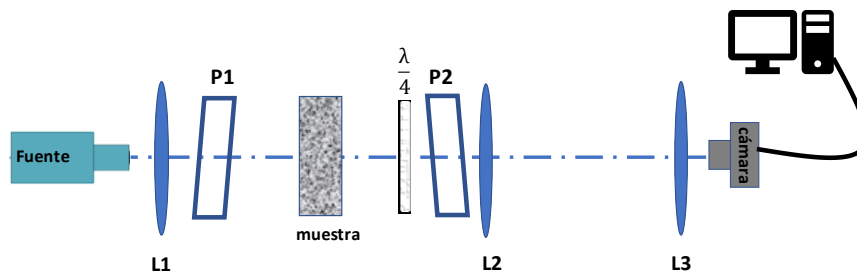


FIGURA V- 4: Esquema general del dispositivo experimental para la toma de imágenes y medir los parámetros de Stokes. L1: lente colimadora, L2 y L3: lentes convergentes. P1 y P2: polarizadores lineales.

Las imágenes tomadas por la cámara fueron procesadas y analizadas mediante el programa de cálculo Matlab. En este Software, diseñamos varios programas para el tratamiento de los parámetros de Stokes, que nos van a permitir calcular la distribución de polarización en cada pixel del conjunto de imágenes.

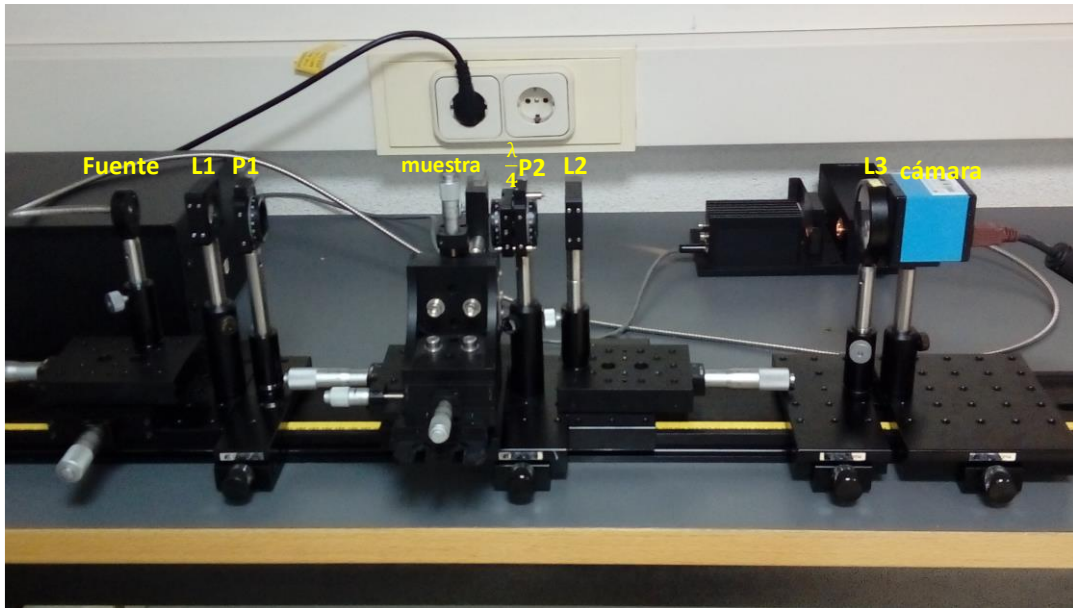


FIGURA V- 5: Componentes del montaje experimental. L1, lente colimadora, P1, polarizador, $\frac{\lambda}{4}$ lámina de cuarto de onda, P2, analizador, L2 y L3, lentes convergentes.

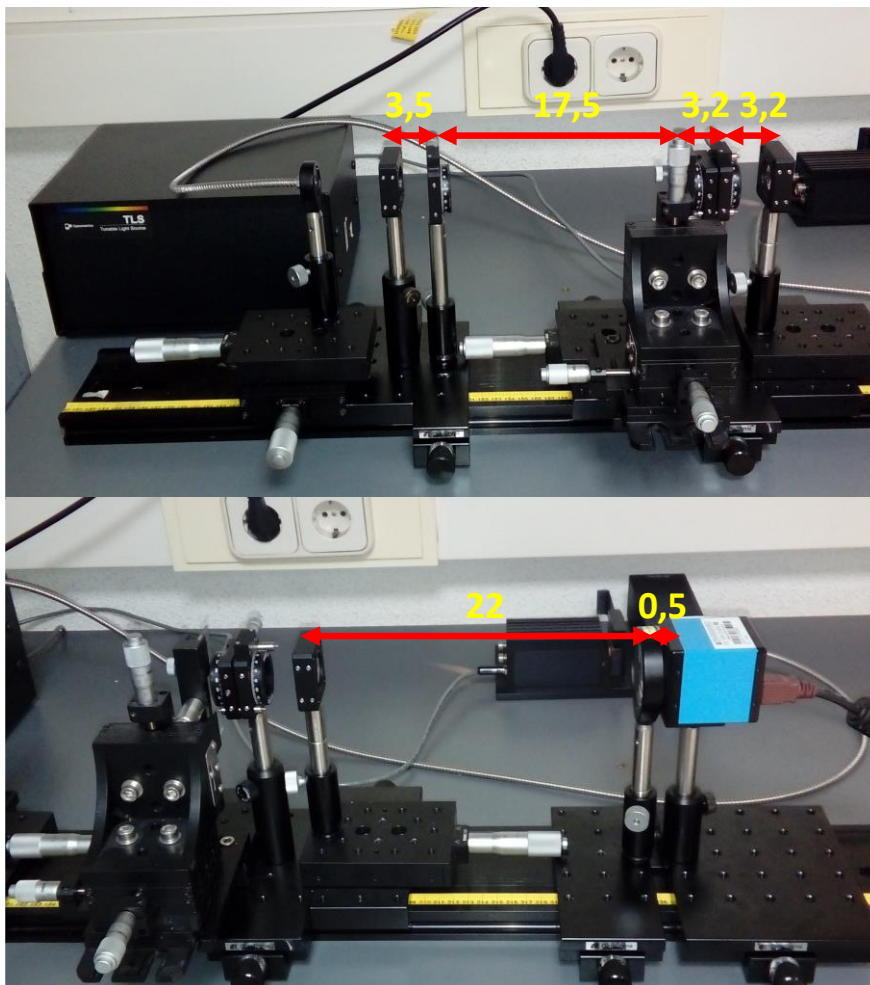


FIGURA V- 6: Distancias del banco de montaje. Todas las distancias están en cm.

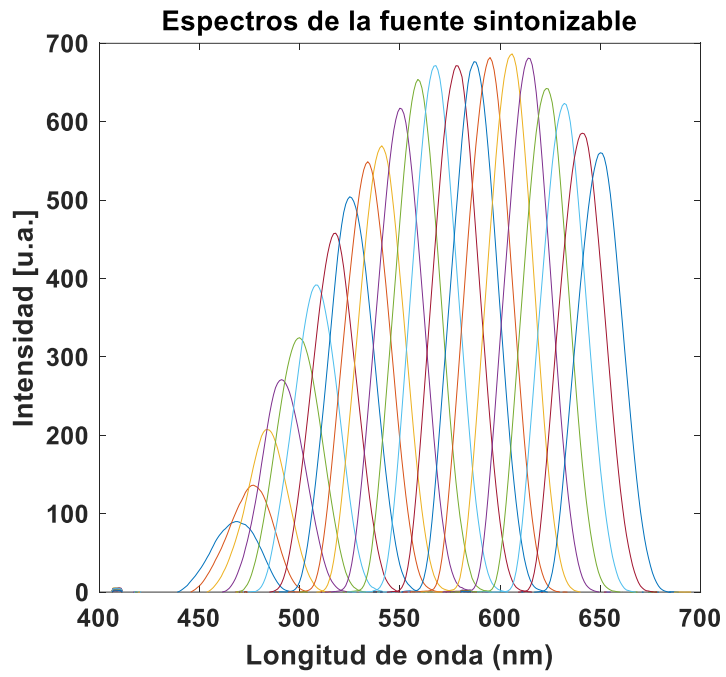


FIGURA V- 7: Espectros de la fuente sintonizable desde 450 nm a 657 nm.

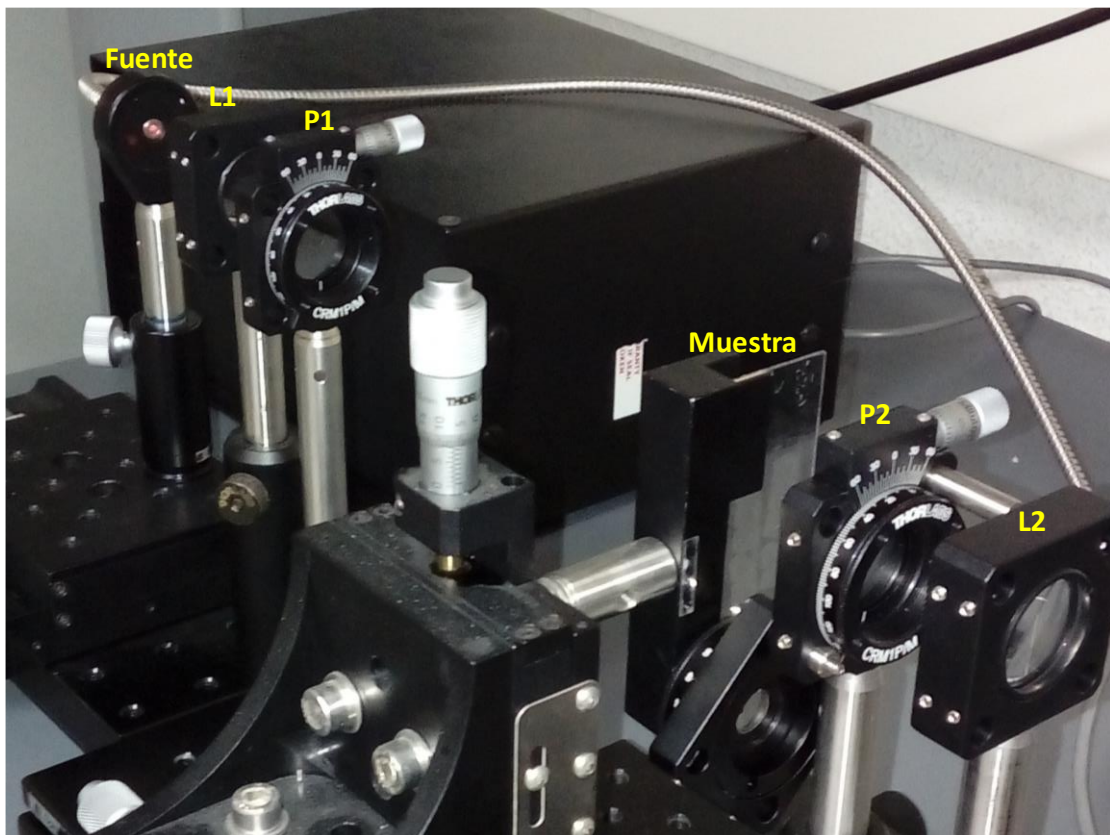


FIGURA V- 8: Fotografía de la plataforma porta muestras con tornillo micrométrico.

Tras situar las muestras en su posición, estas se enfocan sobre la cámara con ayuda de los posicionadores. El montaje óptico utilizado permite enfocar con comodidad tanto la capa anterior y posterior de la parafina, así como la muestra que se encuentra en su interior. Se calcula y mide experimentalmente el aumento del sistema sobre el plano de la CCD resultando un valor de 3,5.

El registro de la imagen sobre la CCD permite calcular los parámetros de Stokes para cada punto de la imagen según el procedimiento siguiente:

$$S = \begin{bmatrix} I \\ M \\ C \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_H + I_V \\ I_H - I_V \\ I_{+45^\circ} - I_{-45^\circ} \\ I_R - I_L \end{bmatrix} \quad (5.23)$$

Donde I_H es la intensidad de la imagen con el polarizador de análisis P2 en horizontal, I_V , la intensidad de la imagen con el polarizador de análisis P2 en vertical, I_{+45° , I_{-45° , las imágenes con el polarizador P2 a +45 y -45 grados respectivamente e I_R , I_L las imágenes con el eje de la lámina retardadora a +45 y -45 respectivamente [10, 11].

1.3 Calibración de los polarizadores cruzados

El proceso de medida consiste en hacer pasar un haz de luz con longitud de onda 540nm (verde) a través de P1, la luz polarizada linealmente incide sobre la muestra. En este caso, vamos a hacer incidir la luz polarizada sobre tres muestras: una del grupo control, otra del grupo D2 y la última del grupo D8. La luz transmitida por la muestra va a atravesar al analizador P2 y a los siguientes componentes hasta que este captada por la cámara. Para cada muestra, se comienza el giro de la rueda de grados del analizador P2, donde se sitúa el punto cero cuando el eje de P2 está horizontal. Las imágenes captadas, para cada muestra, corresponden a cada grado de giro. En total, se tomarán 90 imágenes correspondientes a ángulos que van desde 0° a 356° en pasos de 4°. La figura V-9, muestra las gráficas de calibración de los polarizadores para cada grupo. En este caso se ha tomado la media de toda la imagen. La figura V-9 muestra que el polarizador P2 está paralelo a P1 en torno a 95 grados. Las figura V-10 y V-11 representan las imágenes capturadas cuando $P_1 \parallel P_2$ y $P_1 \perp P_2$, en el caso de toda la cabeza o del ojo, respectivamente.

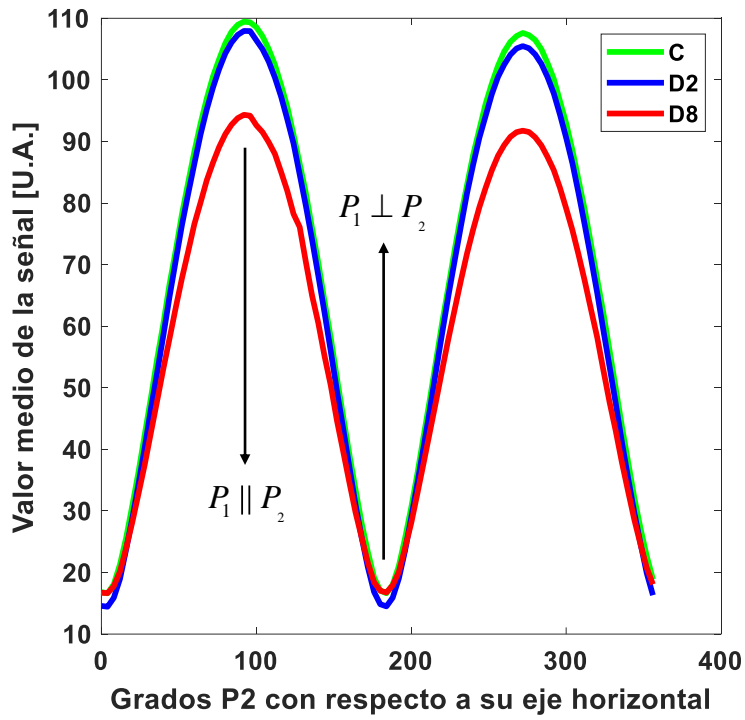


FIGURA V- 9: Valor medio de la señal en función del ángulo barrido en las mediciones.

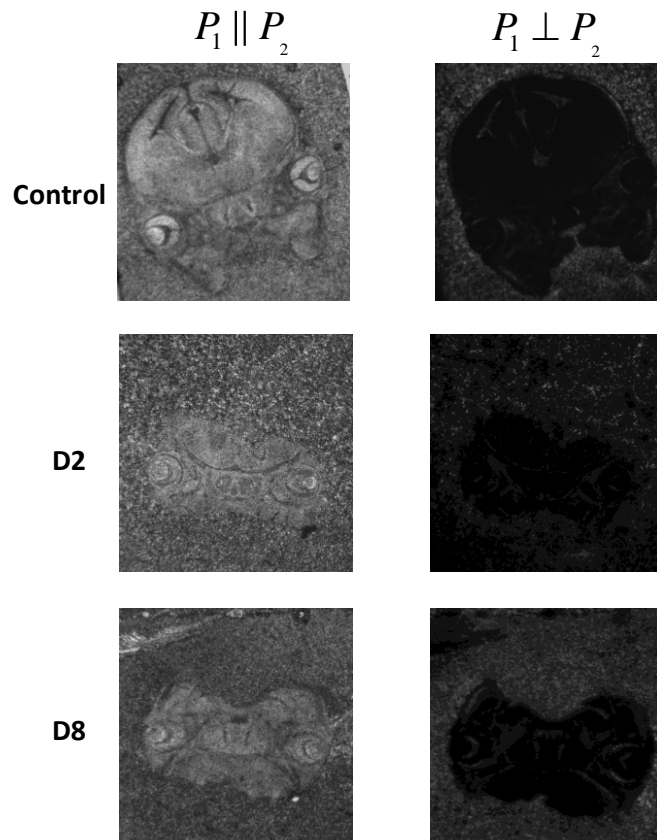


FIGURA V- 10: Imágenes de cortes de cabeza frontales tomadas cuando P1 y P2 están paralelos o cruzados.

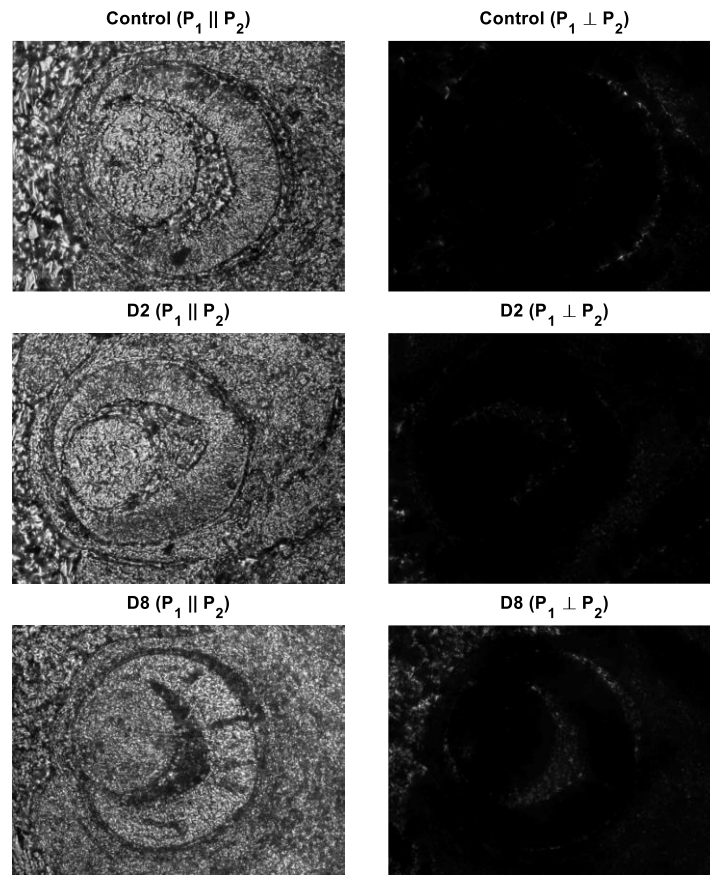


FIGURA V- 11: Imágenes de ojos tomadas cuando P1 y P2 están paralelos o cruzados.

Las figuras V-10 y V-11 muestran claramente que el tejido observador cambia el estado de polarización de la luz ya que cuando los polarizadores están cruzados subsiste luz transmitida, sobre todo en el caso D8, en la zona de vítreo y coroides. En la siguiente sección se van a estudiar más detenidamente estos cambios en el estado de polarización de la luz.

2. RESULTADOS

2.1 MAPAS DE DISTRIBUCIÓN DE POLARIZACIÓN

En las siguientes figuras (Fig. V-12, V-13, V-14, V-15 y V-16), se encuentran los resultados obtenidos de los mapas de distribución del grado de polarización DOP, DOLP, DOCP, el ratio entre los ejes de la elipse de polarización (B/A) y el ángulo de giro, respectivamente. Cada figura incluye ejemplo de un ojo control (primera fila), de D2 (segunda fila) y el último pertenece a D8 (tercera fila), iluminados con tres longitudes de onda: 445nm (primera columna), 540nm (segunda columna), 660nm (tercera columna).

Tanto en la figura V-12 que muestra los resultados del DOP como en la figura V-13 que representa el DOLP se puede observar, para el caso del control, un alto grado de despolarización de la luz sobre todo en la parte posterior del ojo que comprende la coroides. No obstante, para el D2, el aumento del grado de polarización solo se observa en el vítreo y en una pequeña parte de la coroides. En cambio, en el tercer grupo (D8) es en el que se observa un alto grado de despolarización de la luz sobre todo en la coroides, en todo el vítreo, en algunas zonas del cristalino, en la membrana pupilar próxima al endotelio corneal y en la retina.

Por otra parte, las imágenes de DOCP, mostradas en la figura V-14, y las del ratio B/A, mostradas en la figura V-15, indican que cuando la luz polarizada linealmente incide sobre los tejidos de los grupos D2 y D8 cambia su estado de polarización y se convierte en luz polarizada circularmente. Ambas figuras revelan la capacidad de estos tejidos para generar polarización circular a partir de una luz incidente polarizada linealmente. Al observar estas imágenes se puede deducir un aumento en el estado de polarización en varias estructuras oculares: membrana pupilar pegada a la córnea, cristalino, vítreo, retina, coroides y vasos que rodean la parte posterior del globo ocular.

Es conocido que los cambios en el estado de polarización incidente en una muestra se deben a dos fenómenos: la birrefringencia del tejido, así como la despolarización por scattering. Aunque, en el caso de la birrefringencia, ésta solo cambia el estado de polarización incidente y no despolariza la luz [12]. Por ende, esto puede significar dos cosas: en primer lugar, puede que se induzca un efecto de birrefringencia $\Delta n = n_o - n_e$, adquirido cuando las hembras de ratón son sometidas a una dieta carente en AF. En general, la birrefringencia induce desfase o retardo $\Delta \varepsilon$ entre los dos componentes del rayo polarizado incidente: ordinario y extraordinario. Ambos rayos están polarizados en direcciones perpendiculares y con distintas velocidades de propagación. Al atravesar el tejido, los dos rayos mantienen el

retardo hasta que vuelvan a transmitirse a la misma velocidad. Podemos entonces calcular la birrefringencia teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\Delta\varepsilon = \frac{2\pi}{\lambda}(n_o - n_e)d \Rightarrow \Delta n = n_o - n_e = \frac{\lambda \cdot \Delta\varepsilon}{2\pi \cdot d} \quad (5.24)$$

donde d , es el espesor de la muestra $5\mu\text{m}$, λ es la longitud de onda de la luz incidente, y $\Delta\varepsilon$ es el retardo que habíamos calculado previamente para las tres longitudes de onda. Medido en estas unidades de incremento de índice de refracción los mapas de retardo son más fácilmente interpretables. De ahí que podamos realizar mapas de “variaciones de índice equivalentes” a comparar con los mapas de despolarización, a fin de poder apreciar los efectos de orientación de fibras (birrefringencia), respecto de los cambios más generales de despolarización. De esta forma, medimos y representamos en la figura V-17 la “birrefringencia equivalente” de los tejidos para las tres longitudes de onda $\lambda=445\text{nm}$, $\lambda=540\text{nm}$ y $\lambda=660\text{nm}$.

Por lo tanto, tomando un valor de $\Delta n = n_o - n_e = 5 \cdot 10^{-3}$, se observa claramente un aumento en la birrefringencia en los grupos D2 y D8 comparados con el control. Dicha birrefringencia se ve incrementada prácticamente en todas las estructuras del ojo especialmente en el grupo D8. En este sentido, es muy interesante comparar estos mapas de birrefringencia con los mapas del grado de polarización de la luz circular (DOCP). Dado que la luz que entra a la muestra es lineal, los puntos de la imagen con un DOCP alto serán aquellos en los que la luz ha tenido un retardo considerable sin perder su grado de polarización. Véase como estos puntos coinciden en la imagen con los vasos que rodean la parte posterior del globo ocular. Esto sugiere el aumento de la birrefringencia en las muestras D2 y D8 respecto al grupo control, donde ésta es pequeña en comparación.

También es interesante destacar como el DOLP baja en los puntos donde el DOCP aumenta.

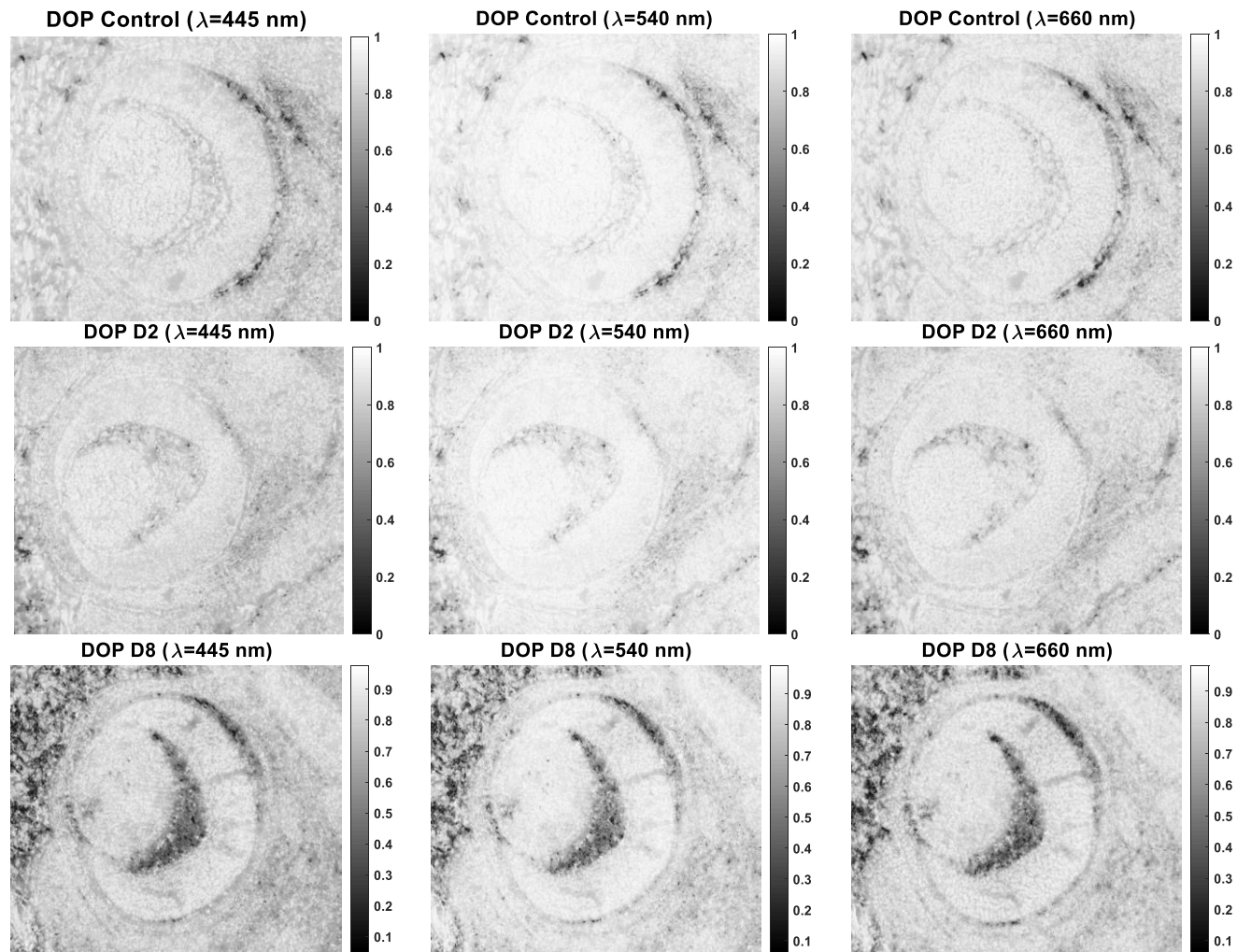


FIGURA V- 12: Mapas del grado de polarización DOP para los tres grupos muestrales (control, D2 y D8). Obtenidas al iluminar los tejidos o culares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

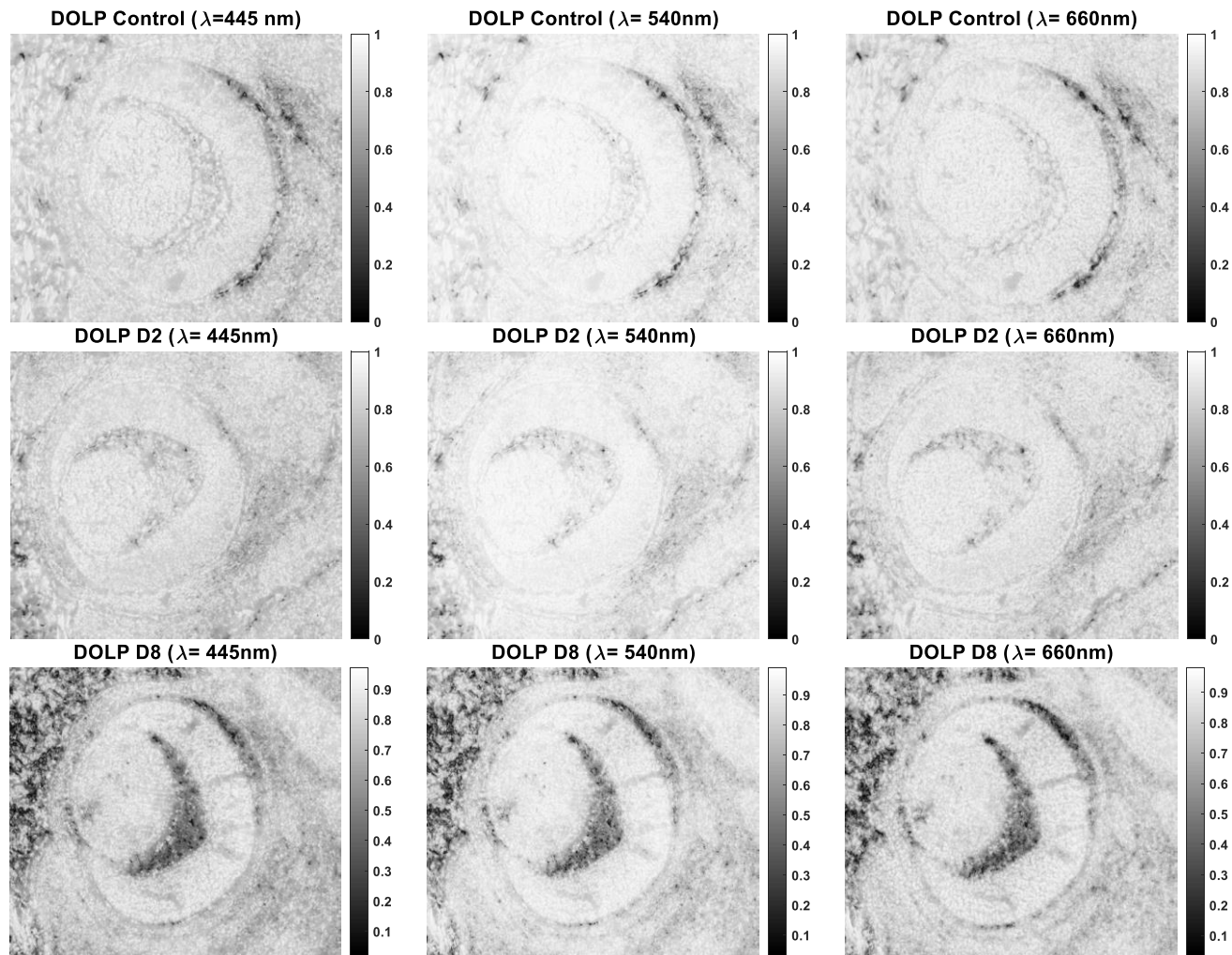


FIGURA V- 13: Mapas de polarización lineal DOLP para los tres grupos muestrales (control, D2 y D8). Obtenidas al iluminar los tejidos oculares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

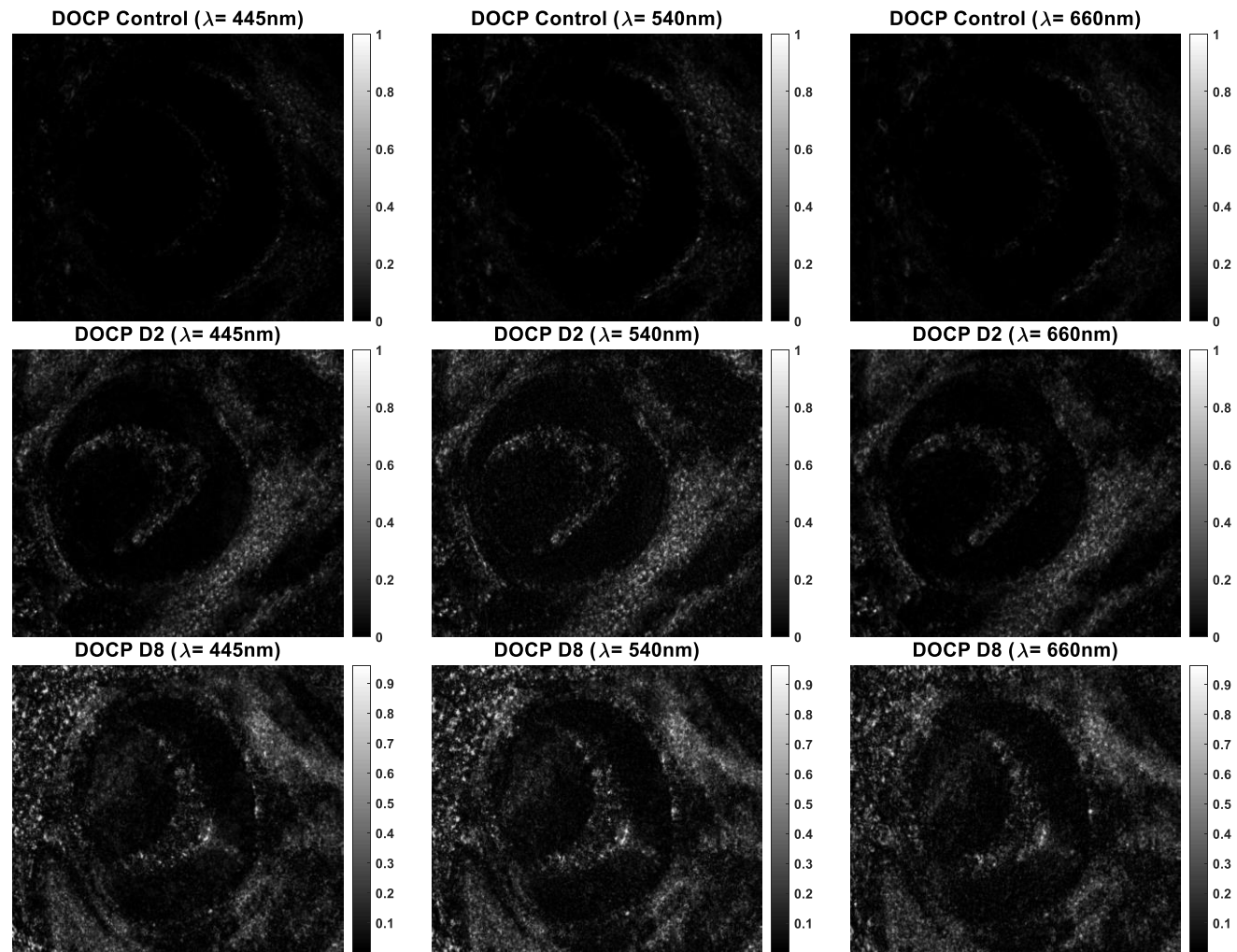


FIGURA V- 14: Mapas de polarización circular DOCP para los tres grupos muestrales (control, D2 y D8). Obtenidas al iluminar los tejidos oculares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

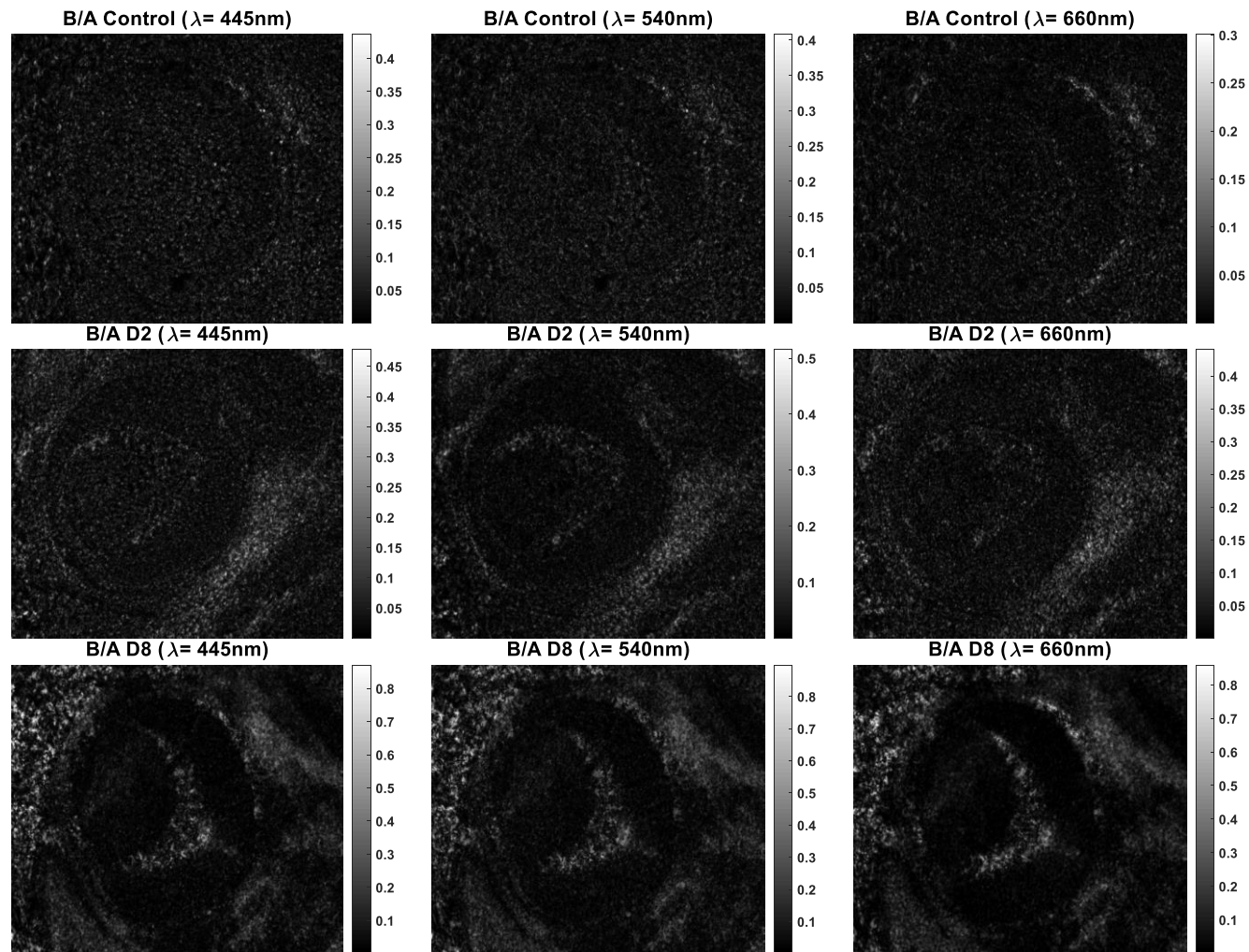


FIGURA V- 15: Mapas que representan el ratio entre los dos ejes de la elipse de polarización para los tres grupos muestrales (control, D2 y D8). Obtenidas al iluminar los tejidos oculares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

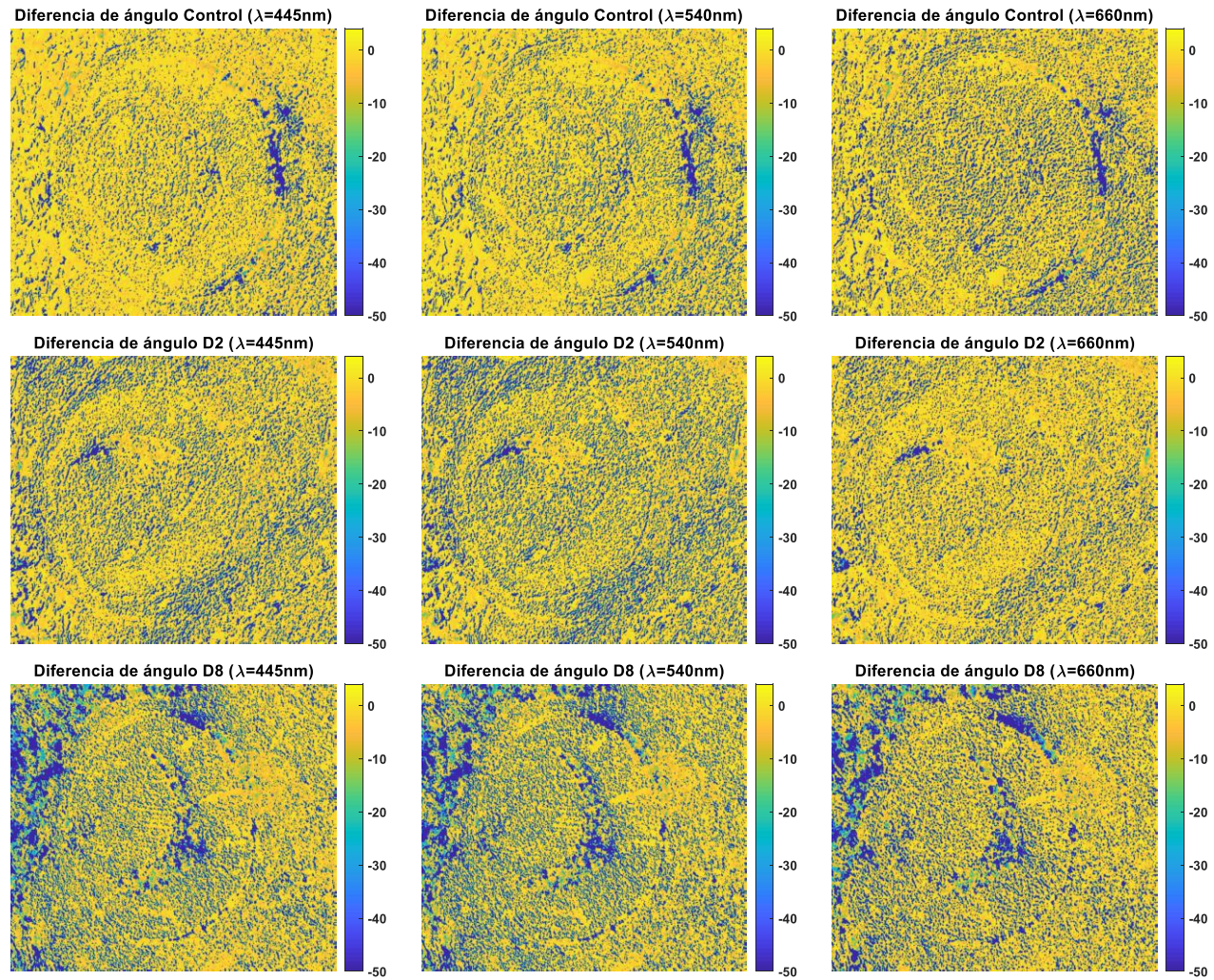


FIGURA V- 16: Mapas que representan el ángulo de giro para los tres grupos muestrales (control, D2 y D8). Obtenidas al iluminar los tejidos oculares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

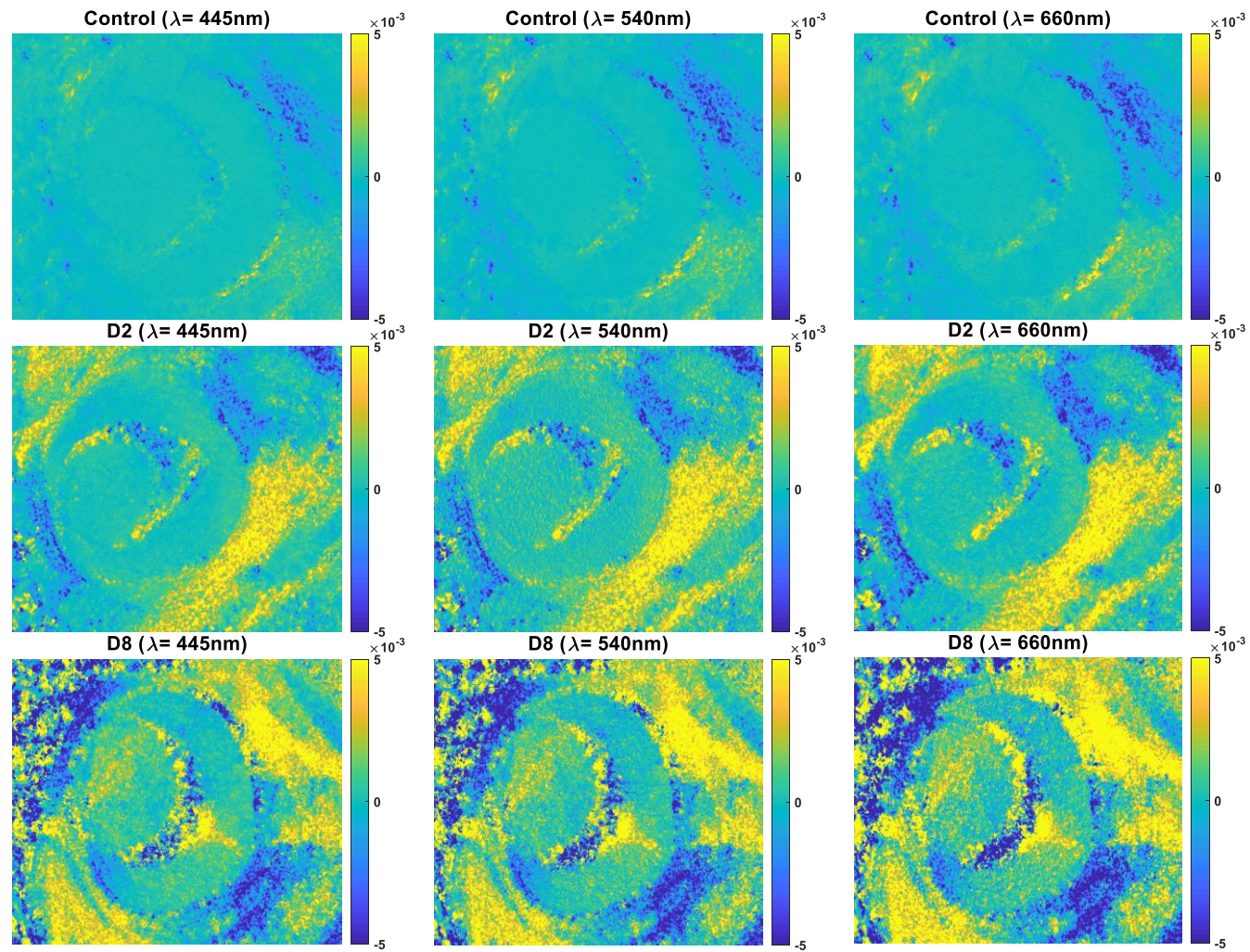


FIGURA V- 17: Mapas que representan la birrefringencia en los tres grupos control, D2 y D8, obtenidas al iluminar los tejidos oculares con tres longitudes de onda distintas: 445nm, 540nm y 660nm.

En segundo lugar, es probable que el cambio en el grado de polarización (sobre todo DOP) en los tejidos de los grupos D2 y D8 se deba a sus diferentes propiedades ópticas. Hay que indicar que la polarimetría es además sensible a la absorción y esparcimiento (scattering) de los tejidos, lo que significa que son también importantes de medir, ya que son las dos propiedades principales que difieren entre un tejido sano y otro patológico, más que la diferencia en la rugosidad de las superficies [13] o birrefringencia.

En este sentido sería muy interesante correlacionar los cambios en el grado de polarización con la infra o sobreexpresión de las moléculas que hemos visto en capítulos anteriores (colágeno IV y laminina-1), con el fin de ver si esta infra o sobreexpresión afecta solamente a la absorbancia o también al scattering en el tejido. Esta idea viene reforzada por los cambios en la estructura fractal y multifractal que hemos detectado en el capítulo anterior.

Para ello, vamos a realizar el mismo tratamiento establecido en el capítulo III donde hemos implementado un sistema automatizado para cuantificar la expresión de las proteínas y su distribución en los tejidos. Aunque es este caso, solo vamos a tratar los cristalinos para cuantificar y regionalizar el incremento del DOP dentro de esta estructura. Por otro lado, en la segunda parte de este capítulo vamos a medir las propiedades de absorbancia en todo el ojo para arrojar luz sobre si los cambios en el grado de polarización entre el control y los grupos D2 y D8 se debe en parte a cambios en la absorbancia óptica de estos tejidos debido al déficit materno de AF.

2.2 Evaluación del incremento del DOP en el cristalino

En esta sección, el procedimiento seguido para evaluar el incremento del DOP dentro del cristalino es prácticamente idéntico al explicado en el capítulo III. Razón por la cual, no vamos a volver a explicarlo y pasaremos directamente a exponer los resultados obtenidos. Únicamente hay que señalar, que la estimación del incremento del DOP dentro del cristalino se va a realizar para las tres longitudes de onda incidentes mencionadas anteriormente comparando los resultados de los grupos D2 y D8 con el control.

2.2.1 Incremento del DOP para la luz incidente con $\lambda = 445$ nm

El gráfico de sedimentación para $\lambda = 445$ nm (Fig. V-18) muestra que solo el primer CP comprende varianza que supera el 99 %. Por ello, al realizar el tratamiento, vamos a considerar únicamente dos procesos: el primero, P1, contiene el primer CP y el segundo proceso comprende el resto de los procesos (CPs #2-10). Los resultados del incremento de DOP respecto al grupo control para la luz que incide con longitud de onda 445nm se observan en la figura V-19. Se recuerda al lector que, de acuerdo con lo expuesto en el capítulo III, las imágenes de la figuras siguientes representan el valor medio sobre los ojos de la reconstrucción de los datos con el CP#1(grupo D2 o D8) menos el valor medio de la reconstrucción de los datos con el CP#1 para el grupo control.

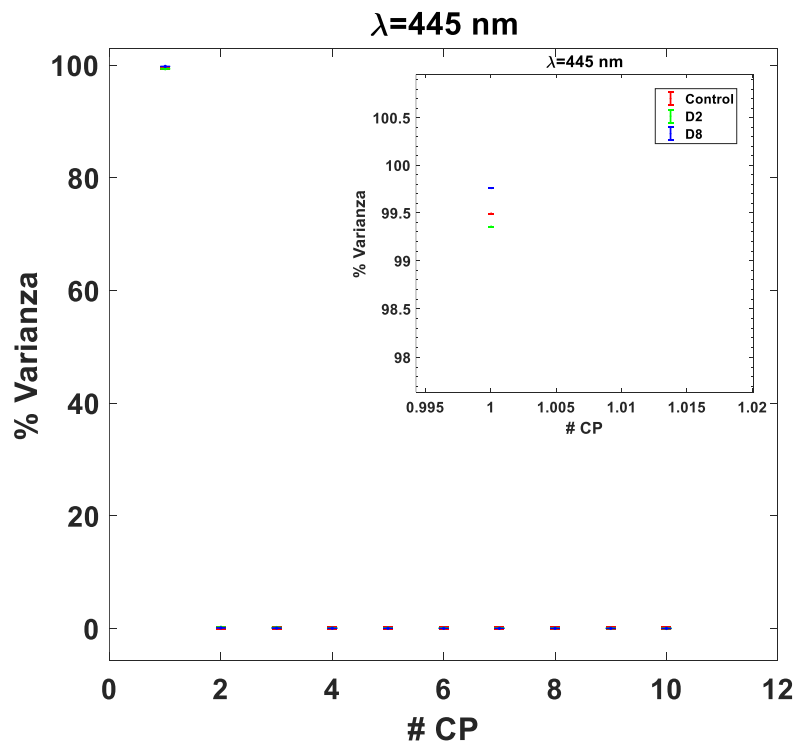


FIGURA V- 18: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza.

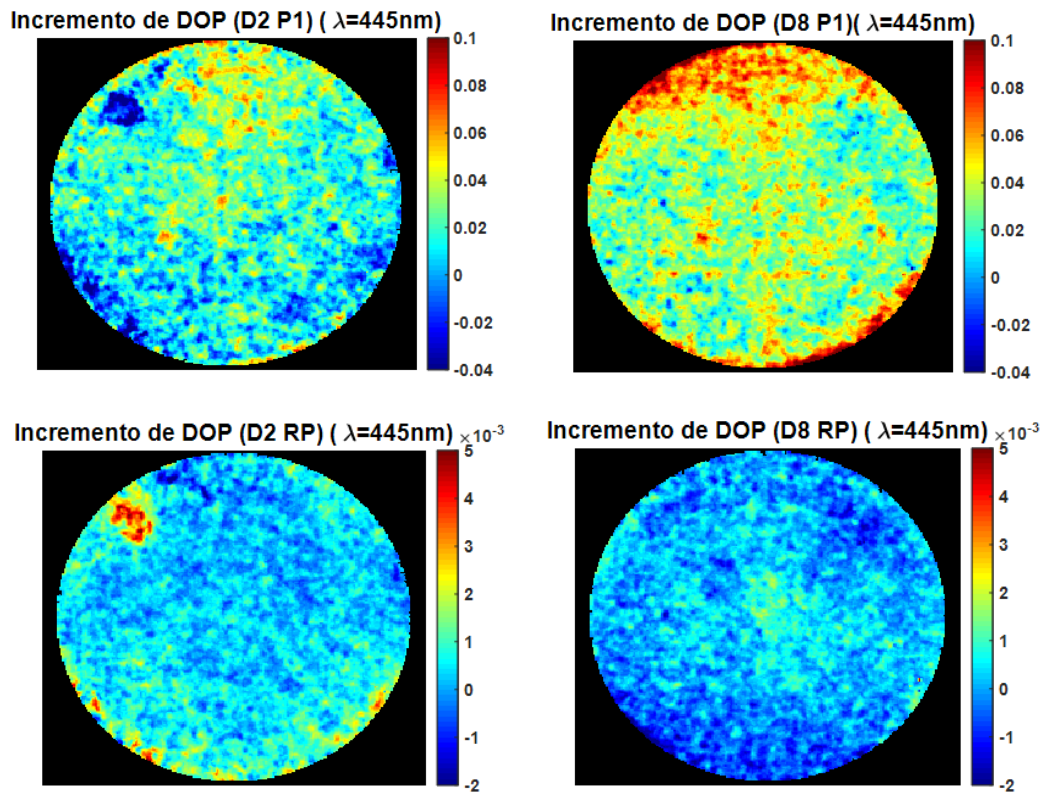


FIGURA V- 19: Incremento de DOP para los grupos D2 (primera columna) y D8 (segunda columna) en comparación con el grupo control. Arriba, se representa el resultado del primer proceso P1. Abajo, se representa el resultado del resto de procesos RP (#2-10).

El primer proceso, P1, de la figura V-19 muestra una disminución en el valor de DOP del 4% en la zona germinativa, zona de transición (Bow region) y algunas zonas de las fibras (grupo D2) y solo en la zona germinativa y Bow region (grupo D8). Por otra parte, se observa un aumento del 10 % en pocas zonas del cristalino (grupo D2) y casi en todas las áreas del cristalino (grupo D8). Respecto al resto de procesos, RP, para ambos grupos D2 y D8 se reduce el valor del DOP a una cantidad muy pequeña (0.5%) en todo el cristalino. Ya que P1 contiene más del 99% de la variabilidad, solo vamos a evaluar este proceso.

En general, el DOP disminuye a medida que aumenta el scattering [2]. Así que, es posible que la disminución de DOP en los cristalinos de D2 y D8 se deba a fenómenos de scattering. Para averiguar si estos fenómenos ocurren debido a cambios en la concentración de proteínas en el cristalino, vamos a comparar los mapas del primer proceso, P1, del incremento del DOP en el cristalino con los mapas obtenidos en la reconstrucción de P1 realizados en el estudio de la sobre/infraexpresión de las moléculas colágeno IV y laminina-1 (capítulo III). Aunque, es verdad que no estamos comparando entre las mismas imágenes ni individuos, creemos que sería interesante hacer esta comprobación ya que la forma y las zonas del cristalino a comparar son las mismas. De hecho, es el único análisis de este tipo que podemos realizar ya que las imágenes del capítulo III son las que se encuentran

marcadas con anti-colágeno IV y anti-laminina-1. Sobre estas imágenes también se ha realizado en el capítulo IV un análisis de la dimensión fractal conectada local (DFCL) en las zonas del cristalino. Una comparación entre estos tres elementos del cristalino (incremento del DOP, infra o sobreexpresión de colágeno IV y laminina 1 y DFCL) es a lo que se dedica el resto de la sección. La característica principal de comparación será el DOP.

Las figuras V-20 y V-21, muestran la comparación entre los mapas del incremento del DOP respecto al grupo control y la sobre/infraexpresión para los dos grupos D2 y D8, respectivamente. Además, la tabla V-1 muestra los valores del coeficiente de correlación de Pearson entre los píxeles de las imágenes del incremento de DOP (D2 y D8), los mapas de la infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 expuestos en el capítulo III (Fig. III-10 (A y C) y Fig. III-11 (A y D) y el incremento de la DF del cristalino respecto al grupo control (Fig. IV-19, IV-20 para el colágeno IV y Fig. IV-21 y IV-22 para la laminina-1). En resumen, la comparación a realizar será:

- Incremento DOP & zonas con sobreexpresión de colágeno IV o laminina-1: se toma la parte de la imagen con sobre o infraexpresión de colágeno IV o laminina-1. A continuación, se toman sólo los mismos puntos sobre las imágenes de incremento del DOP. Previamente, todas las imágenes son escaladas y remuestreadas para que el tamaño del cristalino coincida en todas ellas y que todas tengan el mismo número de píxeles. De este modo los píxeles de cada una de ellas representan la misma zona del cristalino.
- Incremento DOP & incremento de la DFCL: para este análisis se toma para cada punto sólo los puntos de la imagen donde el software ha podido calcular una DF. Estos mismos puntos se toman en la imagen que muestra el incremento medio del DOP. Previamente también las imágenes se remuestran con el mismo procedimiento anterior.

Para llevar a cabo la comparación, las imágenes de sobre o infraexpresión también se toman como la media de las rectificadas con el proceso P1 (mayor varianza) e igualmente para el caso del incremento de la DFCL. Seguidamente se realiza un análisis de correlación de Pearson de las imágenes, utilizándose la técnica Bootstrap (librería estadística de MATLAB) para obtener una incertidumbre del coeficiente de correlación. Los resultados aparecen en la tabla V-1.

TABLA V- 1: Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre los pixeles de las imágenes de infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1, las del incremento de la DFCL y las del DOP con luz incidente con $\lambda = 445\text{nm}$, junto con su incertidumbre. Todos los valores son significativos ($p < 0.05$).

	Coeficiente de correlación de Pearson
DFCL Col-IV grupo D2	0.131±0.003
DFCL Col-IV grupo D8	-0.009±0.003
DFCL Lam-1 grupo D2	-0.179±0.003
DFCL Lam-1 grupo D8	-0.094±0.003
Sobreexpresión Col-IV grupo D2	0.025±0.003
Sobreexpresión Col-IV grupo D8	0.088±0.004
Sobreexpresión Lam-1 grupo D2	-0.109±0.003
Sobreexpresión Lam-1 grupo D8	-0.01±0.01
Infraexpresión Col-IV grupo D2	0.028±0.004
Infraexpresión Col-IV grupo D8	-0.107±0.004
Infraexpresión Lam-1 grupo D2	0.050±0.006
Infraexpresión Lam-1 grupo D8	-0.109±0.003

El mismo tipo de análisis puede realizarse de manera más visual representando las zonas donde el incremento del DOP es mayor o menor que cero, con las zonas de sobre e infraexpresión de colágeno IV y laminina-1 (Fig. V-20 y V-21). En vista de los resultados observados en las figuras V-20 y V-21 y en la tabla V-1, existe una pequeña correlación entre el DOP y la sobre/infraexpresión de las moléculas especialmente la laminina-1 (correlación negativa). Se observa que cuando el incremento del $DOP < 0$ (eso ocurre especialmente en la zona germinativa, Bow region y en la parte posterior de los cristalinos) la sobreexpresión de ambas moléculas sucede en las mismas zonas. Como se ha dicho anteriormente, la disminución del DOP está relacionada con el scattering. Esto puede significar quizás que el scattering se deba a un aumento en la concentración de las moléculas/proteínas en el tejido.

Por otro lado, $DOP > 0$ se observa en la zona de fibras y células epiteliales. Si lo comparamos con las imágenes de infraexpresión de ambas moléculas observamos que prácticamente coinciden. Eso quiere decir que es posible que el aumento del DOP signifique una disminución de la expresión de algunas moléculas en el tejido.

En cuanto al incremento de la DFCL, ésta se correlaciona negativamente de manera apreciable con el incremento del DOP solamente en el caso de la laminina-1, lo que sugiere que la organización espacial de dicha molécula está involucrada en el cambio de los procesos de scattering. Recordemos que un aumento de la DF quiere decir que la estructura del tejido “llena” más eficazmente el plano y, por tanto, los centros de scattering deberían

de estar más cerca entre sí (aumento de la densidad de fibras), lo cual produce un aumento del coeficiente de scattering [10].

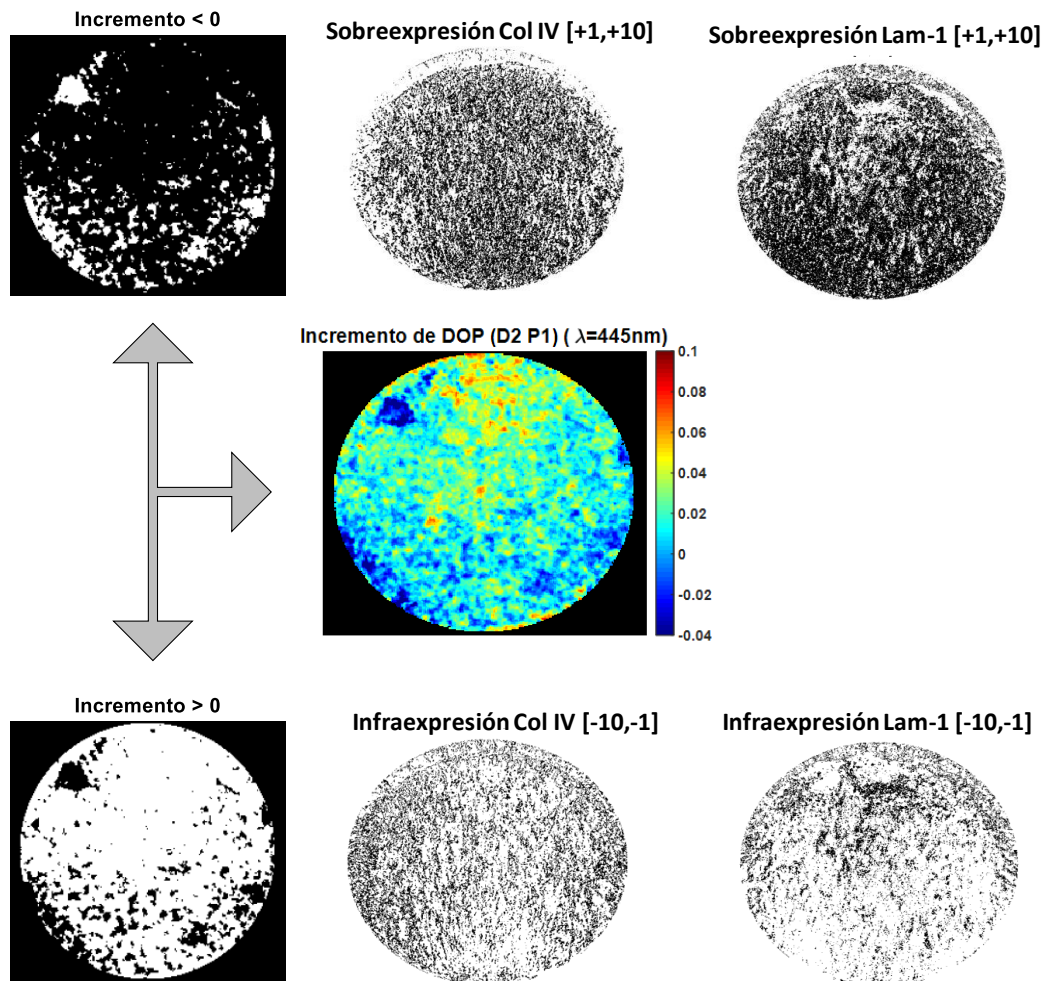


FIGURA V- 20: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=445\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresion de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D2.

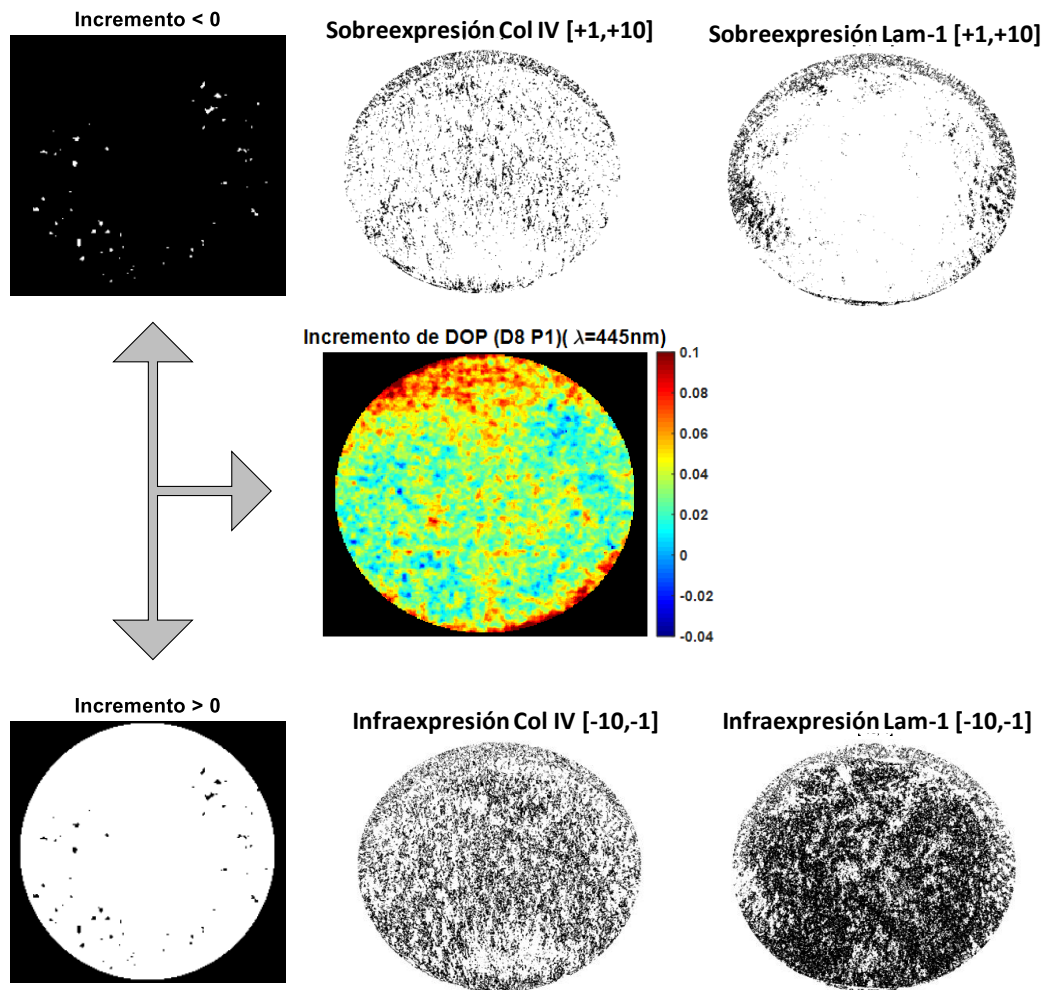


FIGURA V- 21: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=445\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresion de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D8.

2.2.2 Incremento del DOP para luz incidente con $\lambda=540$ nm

En este caso se repite esencialmente el mismo tratamiento que en el caso anterior. En el gráfico de sedimentación para $\lambda= 540$ nm mostrado en la figura V-22 se ve que solo el primer CP contiene varianza que supera el 99 %. Por ello, al realizar el tratamiento, vamos a considerar en este caso también solo dos procesos: el primero, P1, contiene el primer CP; y el segundo proceso comprende el resto de los procesos (CPs #2-10). Los resultados del incremento de DOP para la luz que incide con longitud de onda 550 nm se observan en la figura V-23.

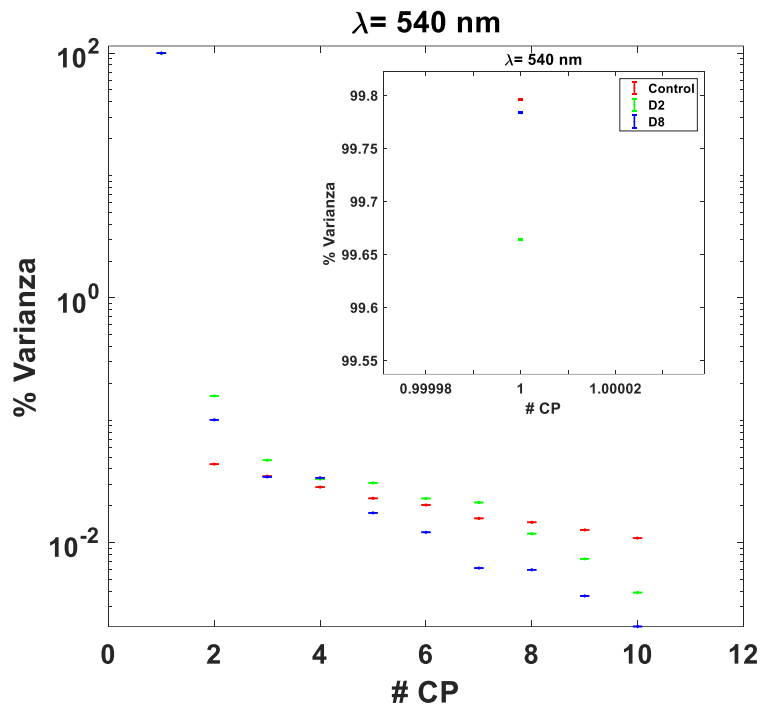


FIGURA V- 22: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza

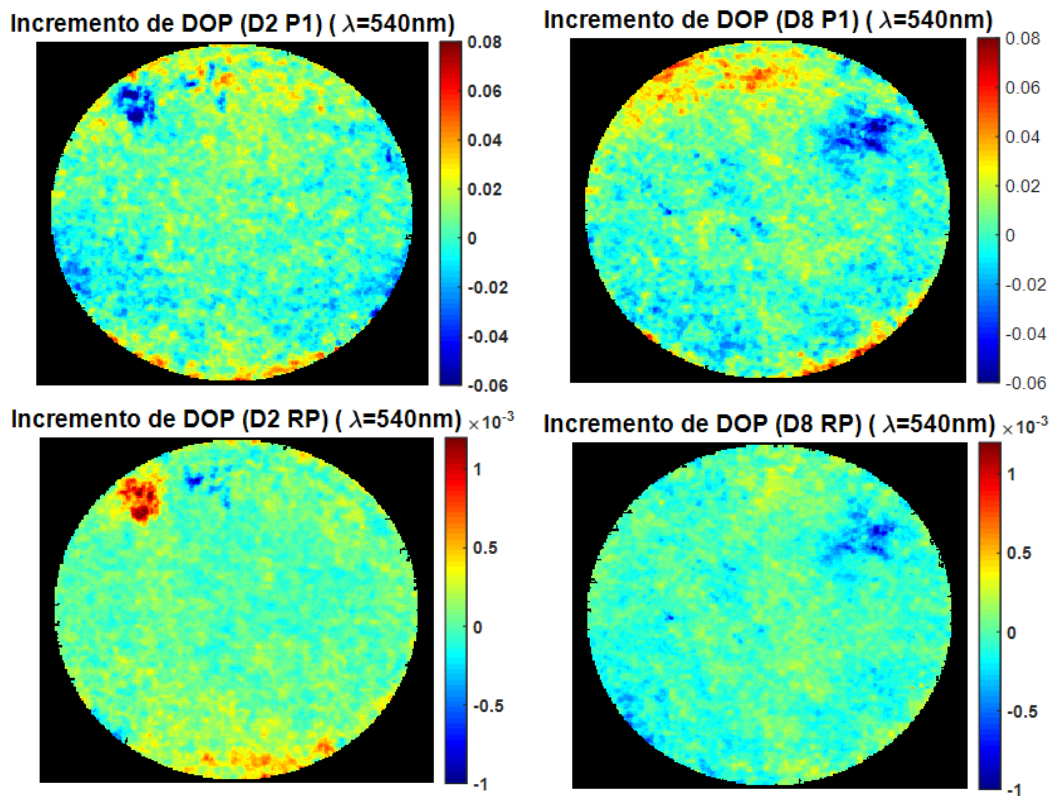


FIGURA V- 23: Incremento de DOP para los grupos D2 (primera columna) y D8 (segunda columna) en comparación con el grupo control. Arriba, se representa el resultado del primer proceso P1. Abajo, se representa el resultado del resto de procesos RP (#2-10).

El grado de polarización con luz incidente verde disminuye en muchas zonas del cristalino, sin embargo, aumenta en la parte anterior de éste. Para ambos grupos, D2 y D8, el primer proceso, P1, muestra una disminución del 6% en el DOP prácticamente en todo el cristalino, salvo en la zona epitelial y una parte de las fibras. Por otro lado, se observa un aumento del 8% en la zona de las células epiteliales y gran parte de las fibras. Respecto al resto de procesos, RP, para ambos grupos D2 y D8 se reduce el valor del DOP una cantidad muy pequeña (0.1%) en casi todo el cristalino y aumenta muy poco (0.1%) en la parte posterior del cristalino (D2).

A continuación, vamos a realizar el mismo estudio de correlación comparando entre los mapas del DOP y sobre/infraexpresión, explicado en el apartado anterior, junto con la correlación del incremento del DOP respecto al incremento de la DFCL. Las figuras V-24 y V-25, muestran la comparación entre los mapas de DOP y la sobre/infraexpresión para los dos grupos D2 y D8, respectivamente. El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson entre los píxeles de las imágenes del incremento de DOP (D2 y D8), los mapas de la infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1 y la DFCL, se resume en la tabla V-2.

TABLA V- 2: Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre los pixeles de las imágenes de infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1, las del incremento de la DFCL y las del DOP con luz incidente con $\lambda = 540$ nm, junto con su incertidumbre. Todos los valores son significativos ($p < 0.05$).

	Coeficiente de correlación de Pearson
DFCL Col-IV grupo D2	0.085±0.003
DFCL Col-IV grupo D8	0.017±0.003
DFCL Lam-1 grupo D2	-0.103±0.003
DFCL Lam-1 grupo D8	-0.076±0.003
Sobreexpresión Col-IV grupo D2	0.056±0.004
Sobreexpresión Col-IV grupo D8	0.090±0.004
Sobreexpresión Lam-1 grupo D2	-0.026±0.004
Sobreexpresión Lam-1 grupo D8	0.10±0.01
Infraexpresión Col-IV grupo D2	-0.063±0.005
Infraexpresión Col-IV grupo D8	-0.091±0.004
Infraexpresión Lam-1 grupo D2	-0.044±0.006
Infraexpresión Lam-1 grupo D8	-0.103±0.003

En el caso de la luz incidente verde, la correlación entre el DOP y la expresión de las moléculas es muy débil. Pero, aun así, se observa cierta coincidencia. Tanto los datos de las figuras V-24 y V-25 como los de la tabla V-2, muestran que existe una correlación débil sobre todo entre el DOP y la infraexpresión. Para ambos grupos D2 y D8, $DOP < 0$ se muestra en la zona germinativa y Bow Region, en estas mismas zonas se observa una sobreexpresión de ambas proteínas. Por otra parte, las zonas donde aumenta el $DOP > 0$ coinciden, en parte, con la infraexpresión. De nuevo, la correlación negativa se da de manera más fuerte con la expresión de la laminina-1. En el caso del incremento de la DFCL, también la correlación negativa es más fuerte en el caso de la laminina-1, por lo que, de nuevo, es esta molécula la que parece estar más relacionada con los procesos de scattering.

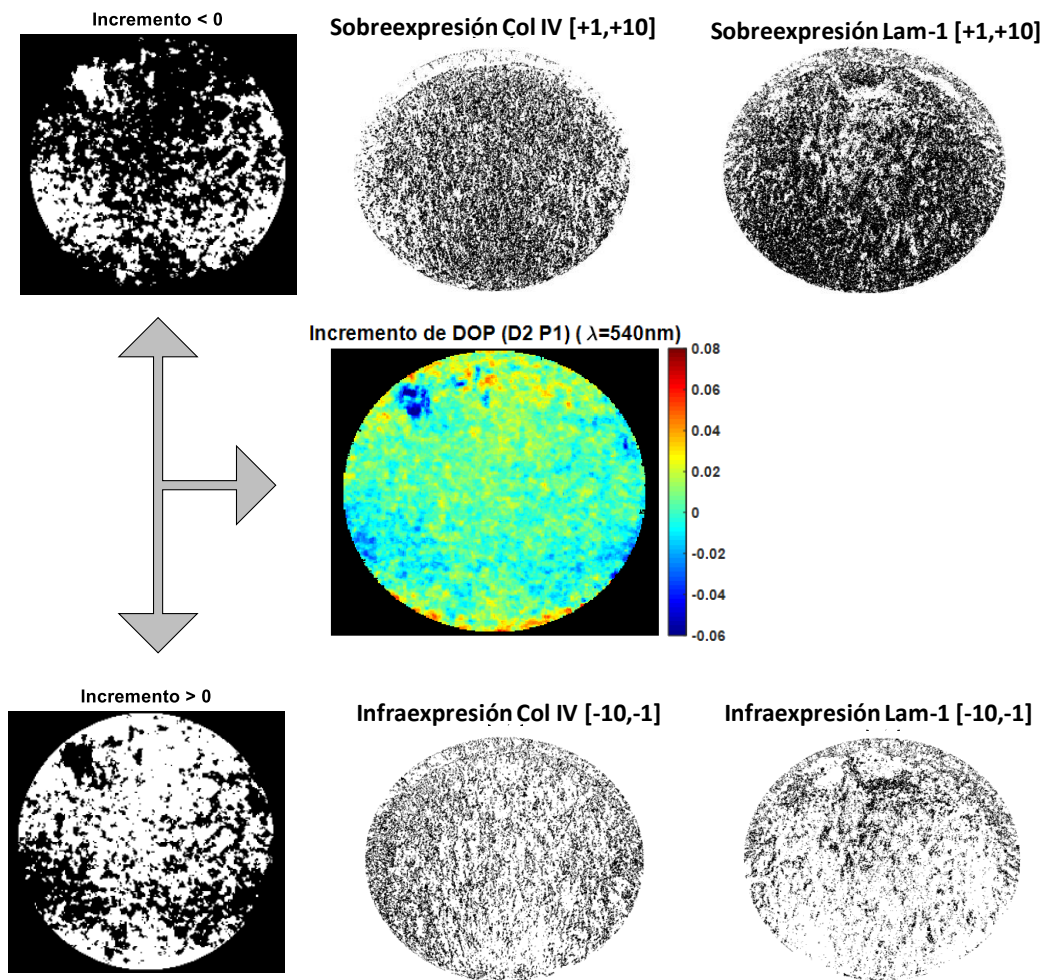


FIGURA V- 24: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=540\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresion de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D2.

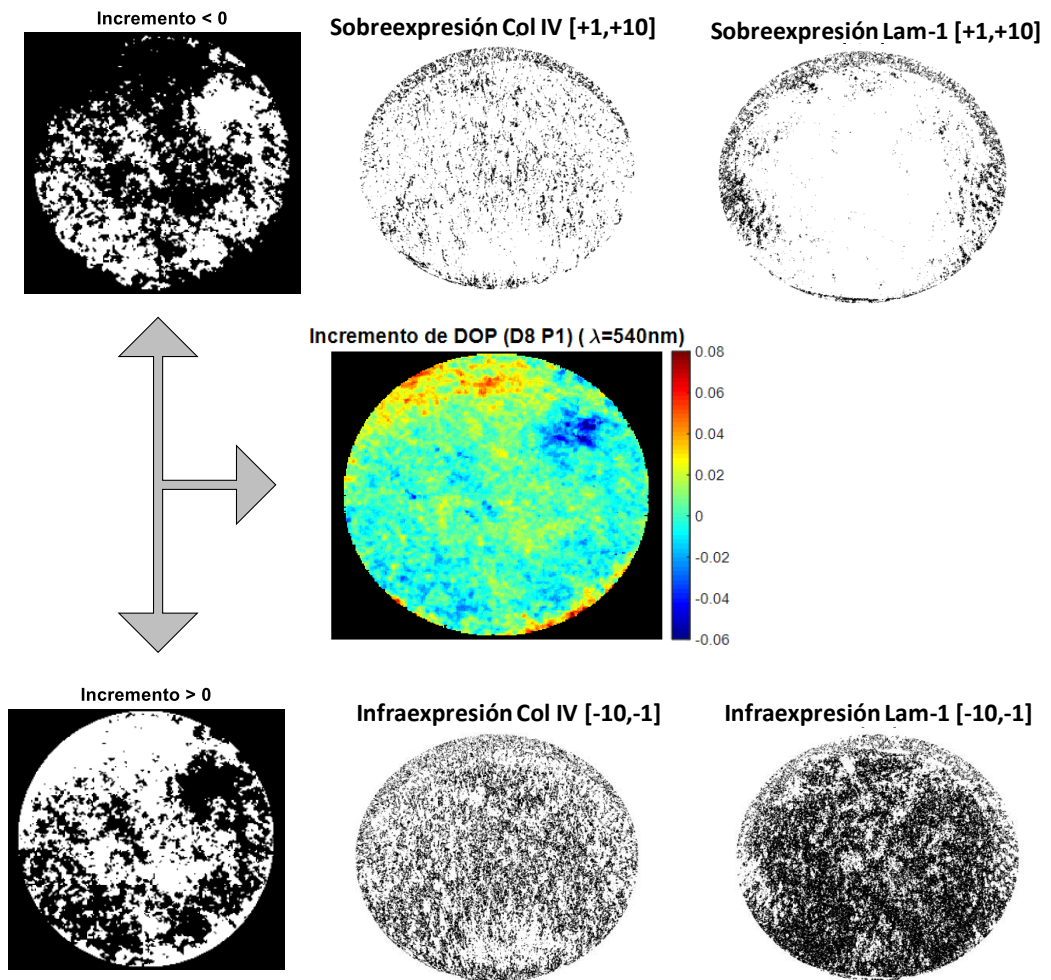


FIGURA V- 25: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=540\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresion de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D8.

2.2.3 Incremento del DOP para luz incidente con $\lambda=660$ nm

Para el caso de la luz incidente roja ($\lambda=660$ nm), en el gráfico de sedimentación mostrado en la figura V-26 se observa también que el primer CP abarca una varianza que supera el 99 %. Así que, al realizar el tratamiento, vamos a considerar en este caso también solo dos procesos: el primero, P1, contiene el primer CP y el segundo proceso engloba el resto de los procesos (CPs #2-10). El resultado del incremento de DOP para esta longitud de onda se observa en la figura V-27.

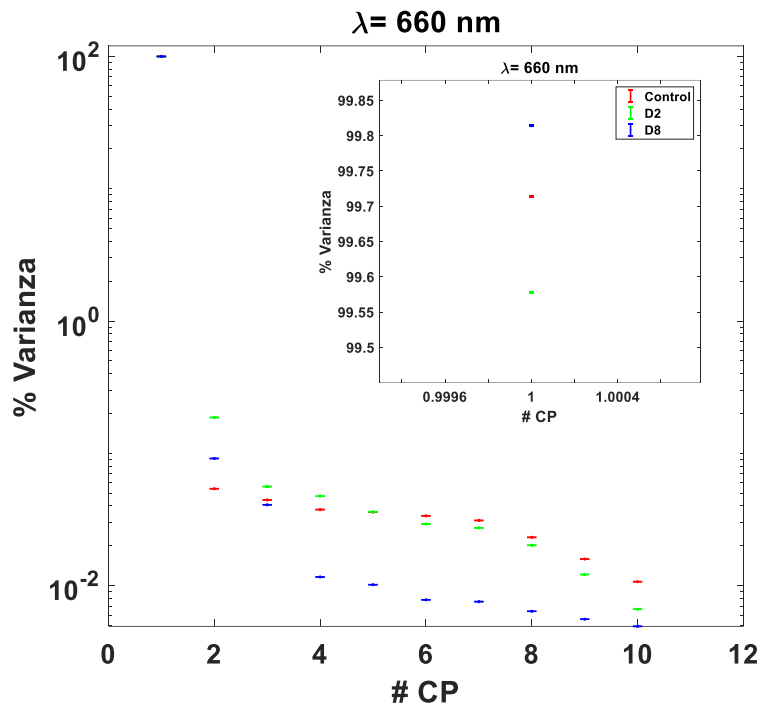


FIGURA V- 26: Diagrama de Scree Plot para los autovalores de todos los grupos muestrales (control, D2 y D8) expresado en % de varianza.

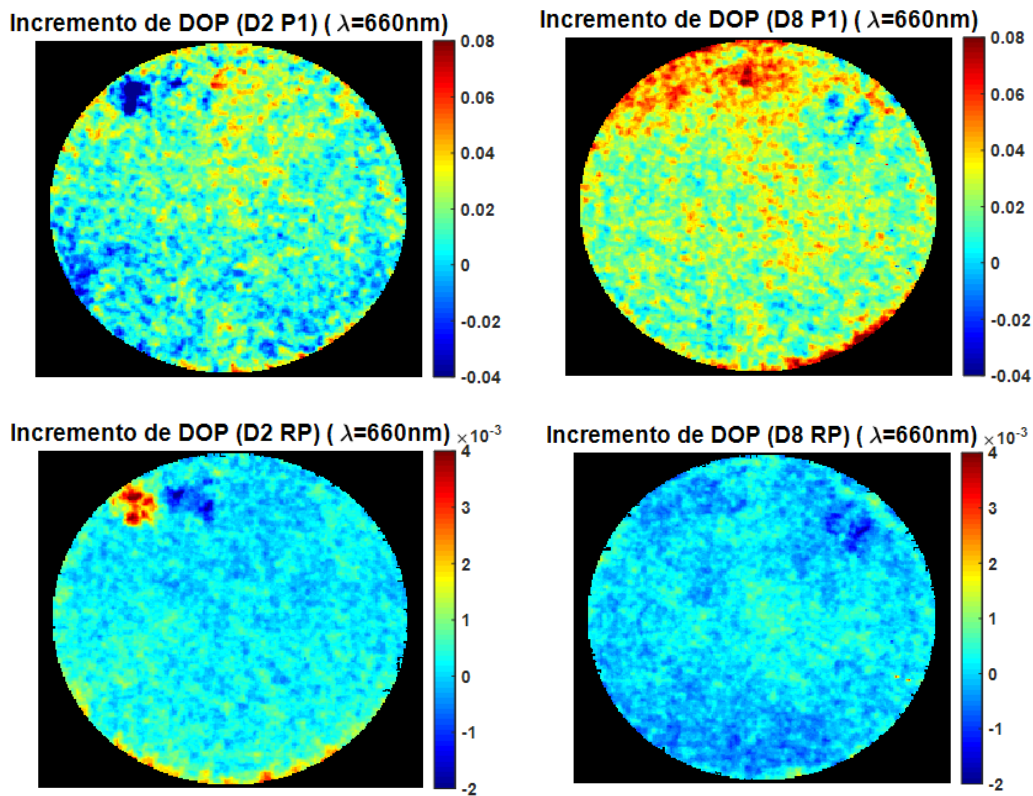


FIGURA V- 27: Incremento de DOP para los grupos D2 (primera columna) y D8 (segunda columna) en comparación con el grupo control. Arriba, se representa el resultado del primer proceso P1. Abajo, se representa el resultado del resto de procesos RP (#2-10).

El primer dato que llama la atención al comparar la figura V-27 con la V-19, es que el resultado del incremento de DOP es casi similar tanto si la luz incidente es azul como si es roja, sobre todo para el grupo D8. A partir de los datos de la correlación mostrados en la tabla V-3 y como se puede observar también en las figuras V-28 y V-29, la infraexpresión de la laminina-1 en el grupo D8 tiene una correlación débil negativa con el DOP.

En suma, las zonas donde el incremento del DOP es inferior a cero coinciden con las zonas donde hay sobreexpresión y viceversa. Respecto al incremento de la DFCL, de nuevo la correlación es mucho más negativa en el caso de la laminina-1 que en el caso del colágeno IV con el incremento del DOP, lo cual indica de nuevo que esta molécula parece estar más relacionada con cambios en el proceso de scattering.

TABLA V- 3: Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre los píxeles de las imágenes de infra/sobreexpresión de colágeno IV y laminina-1, las del incremento de la DFCL y las del DOP con luz incidente con $\lambda= 660 \text{ nm}$, junto con su incertidumbre. Todos los valores son significativos ($p<0.05$).

	Coeficiente de correlación de Pearson
DFCL Col-IV grupo D2	0.013 ± 0.003
DFCL Col-IV grupo D8	0.017 ± 0.003
DFCL Lam-1 grupo D2	-0.157 ± 0.003
DFCL Lam-1 grupo D8	-0.156 ± 0.003
Sobreexpresión Col-IV grupo D2	0.048 ± 0.004
Sobreexpresión Col-IV grupo D8	0.078 ± 0.004
Sobreexpresión Lam-1 grupo D2	-0.095 ± 0.004
Sobreexpresión Lam-1 grupo D8	-0.03 ± 0.01
Infraexpresión Col-IV grupo D2	0.026 ± 0.005
Infraexpresión Col-IV grupo D8	-0.047 ± 0.004
Infraexpresión Lam-1 grupo D2	-0.020 ± 0.006
Infraexpresión Lam-1 grupo D8	-0.124 ± 0.003

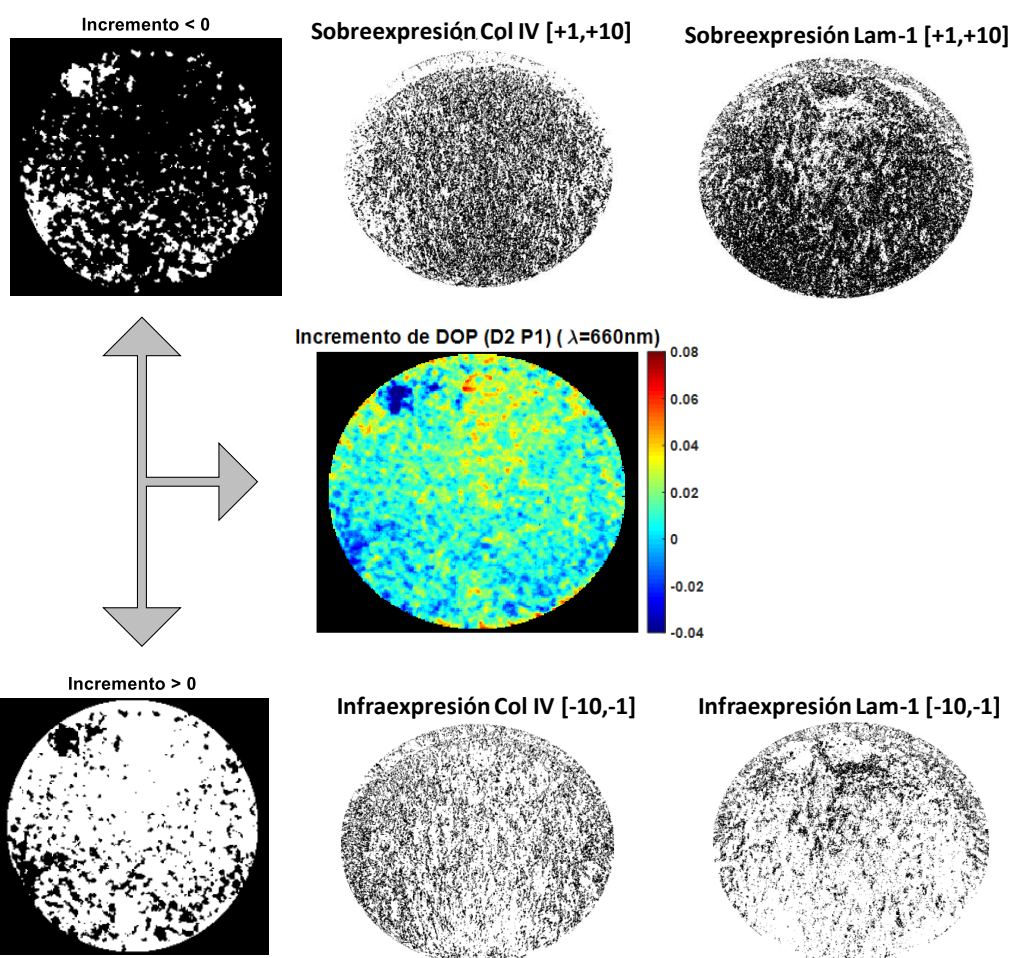


FIGURA V- 28: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=660\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresión de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D2.

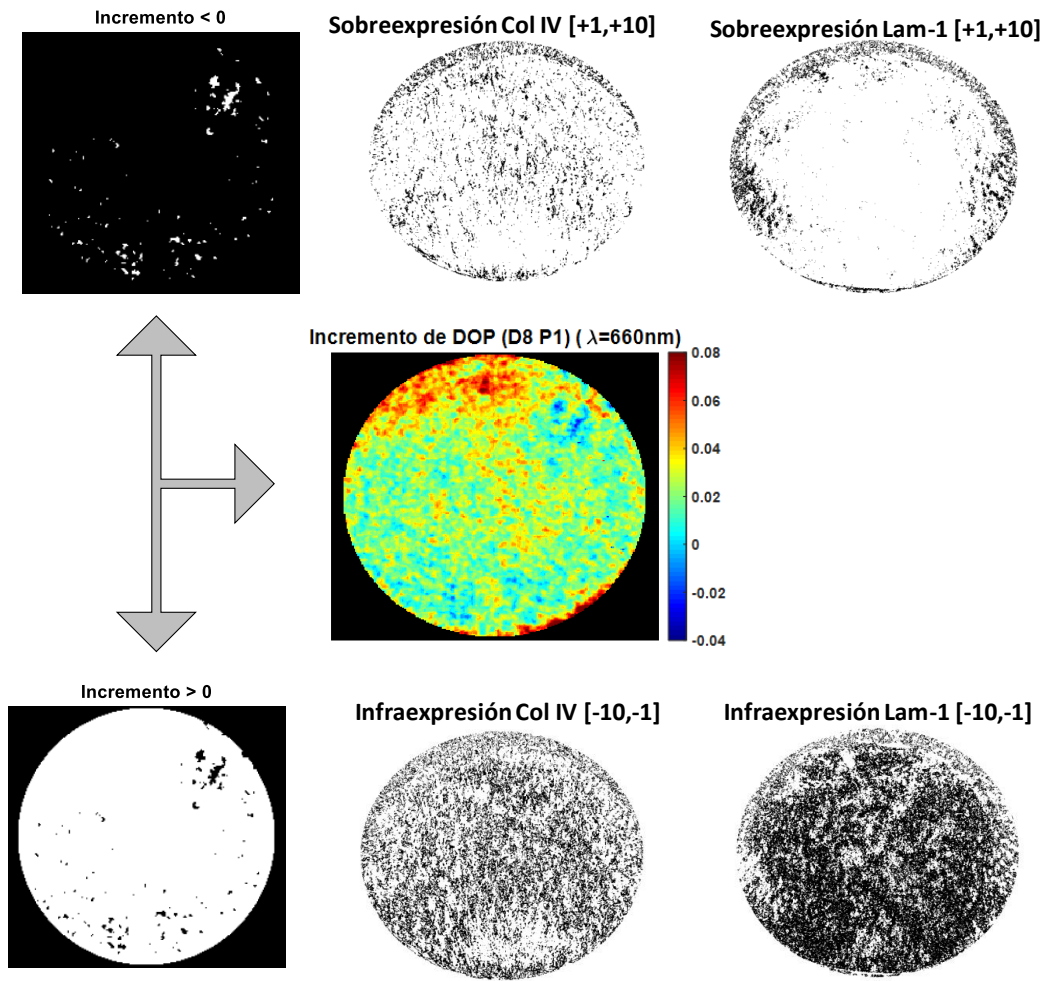


FIGURA V- 29: Comparación entre mapas de DOP ($\lambda=660\text{nm}$) y mapas de sobre y infraexpresion de colágeno IV y laminina-1, para el grupo D8.

II. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LOS TEJIDOS: IMÁGENES MULTIESPECTRALES

La Espectrometría se define como el estudio de la interacción entre la radiación y la materia. El análisis espectral nos permite detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética por la materia/sustancia a ciertas longitudes de onda. Este tipo de análisis se obtiene mediante las imágenes multiespectrales que se adquieren a partir de la captura de varias imágenes con dimensiones (x, y, λ) donde, x e y , indican dimensiones espaciales y λ indica la dimensión espectral como se muestra en la figura V-30.

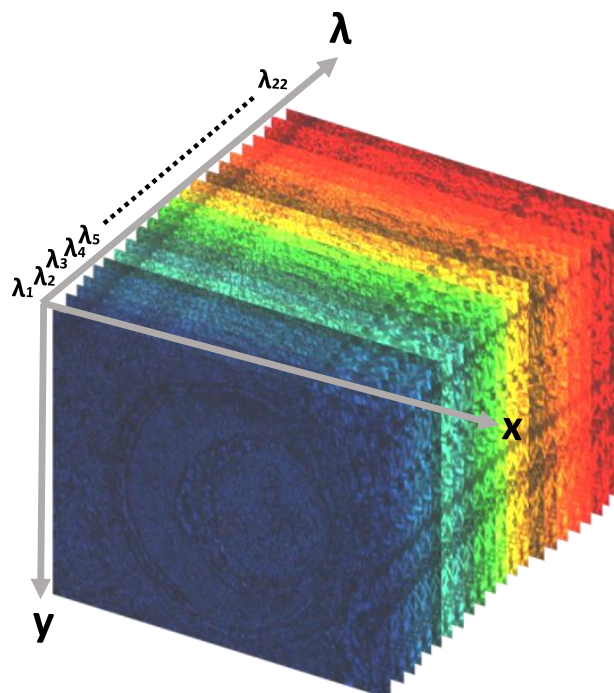


FIGURA V- 30: Cubo de datos multiespectrales de 22 bandas obtenido a partir de un ojo control.

En esta sección, para tomar las imágenes multiespectrales, vamos a utilizar el mismo dispositivo experimental usado en la sección anterior. El objetivo principal es aprovechar la información multiespectral para analizar las diferencias espectrales entre el grupo de control y los grupos D2 y D8. La toma de estas imágenes se realiza cuando los ejes de transmisión del polarizador P1 y el analizador P2 están paralelos. La razón por la cual se colocan de esta forma es porque cuando el eje de P2 está orientado de forma paralela respecto al primero, la luz lo atravesará sin perder casi nada de su intensidad.

El procedimiento de la toma de imágenes multiespectrales es el siguiente: para cada ojo analizado, se enfoca la muestra y se toman 50 fotogramas consecutivos a una determinada longitud de onda. En total se han capturado imágenes de 30 ojos (10 por cada grupo). La

toma de imágenes se efectúa desde 390 nm hasta 705 nm en pasos de longitud de onda de 15 nm. Al igual que el experimento anterior de polarización, los 50 fotogramas son promediados pixel a pixel para no tener en cuenta el ruido temporal de los detectores de la cámara CCD. Las imágenes son tomadas en escalas de gris de 0 a 256 niveles con la toolbox de Matlab.

Por otra parte, para cada longitud de onda se toma también la imagen de la cámara sin el ojo muestra. La razón por la cual se toma dicho valor es para dividir la imagen recogida por la cámara con la muestra por lo que la imagen final registrada es la transmisión de la muestra. De esta forma, para cada uno de los 30 ojos analizados se obtiene un conjunto de imágenes multiespectrales $T_{Gi}(x, y, \lambda_0)$, siendo G el grupo (Control, D2, y D8), i el ojo analizado ($i=1 \dots 10$), xy el pixel en la imagen y λ_0 la longitud de onda seleccionada mediante la fuente sintonizable. En total, todas las imágenes forman un grupo de 660 imágenes multiespectrales. Como se ve, es una enorme cantidad de información por lo que para analizarla vamos a utilizar la técnica estadística de Análisis de Componentes Principales (ACP) descrita en los capítulos anteriores.

1. CÁLCULO DE LA ABSORBANCIA O DENSIDAD ÓPTICA

Para una determinada longitud de onda λ_0 , se puede definir la absorbancia de una determinada muestra como:

$$A_{Gi}(x, y, \lambda_0) = -\ln T_{Gi}(x, y, \lambda_0) \quad (5.24)$$

Donde las transmitancia de la muestra, T_{Gi} , se puede definir de la siguiente forma:

$$T_{Gi}(x, y, \lambda_0) = e^{-\sum_{j=1}^n \varepsilon_j(\lambda_0) C_j(x, y) L} \quad (5.25)$$

De esta forma, la absorbancia definida en la ecuación (5.24) se escribir como:

$$A_{Gi}(x, y, \lambda_0) = \sum_{j=1}^n \varepsilon_j(\lambda_0) C_j(x, y) L \quad (5.26)$$

donde, ε_j es el coeficiente de absorción total de un determinado componente j presente en la muestra, $C_j(x, y)$ es la concentración de j en el punto (x, y) de la imagen, y L es el espesor de la muestra que en nuestro caso es de $5\mu\text{m}$. Si aplicáramos ahora una descomposición de componentes principales sobre los datos de absorbancia definidos en la (5.26), obtendríamos

$$A_{Gi}(x, y, \lambda_0) - \langle A_{Gi}(\lambda_0) \rangle_{x, y} = \sum_{\alpha=1}^N a_{\alpha}(\lambda_0) \cdot CP_{\alpha}(x, y) \quad (5.27)$$

Hay que señalar que se ha quitado a cada una de las imágenes de absorbancia su valor medio $\langle A_{Gi}(\lambda_0) \rangle_{x, y}$ con el fin de obtener imágenes con media 0. Donde a representa los autovectores y α los autovalores.

La varianza de las imágenes resultantes se descompone en CPs. Dicha descomposición ve cada una de las imágenes como una mezcla de las imágenes originales que tienen una correlación nula entre ellas. Dichas imágenes son los CPs. Los autovectores a nos dicen cómo debemos mezclar los CPs para obtener las imágenes de partida. Dado que las distintas imágenes están tomadas a diferentes longitudes de onda λ_0 los autovectores son los que llevan la tendencia en λ_0 , mientras que los CPs llevan la dependencia espacial. Si comparásemos entonces (5.27) con (5.26) veremos que los autovectores están relacionados

con los coeficientes de absorción y los CPs con la distribución espacial de dicho componente. Los autovalores α representan la varianza total de cada CP.

Para clarificar los conceptos anteriores, vamos a realizar un ejemplo práctico sobre un ojo control.

1.1 Ejemplo práctico de un ojo control

Hemos calculado la absorbancia para un ojo control, los resultados se muestran en la figura V-31. En esta figura proyectamos 3 longitudes de onda, solo para clarificar el tipo de imágenes analizadas en esta sección.

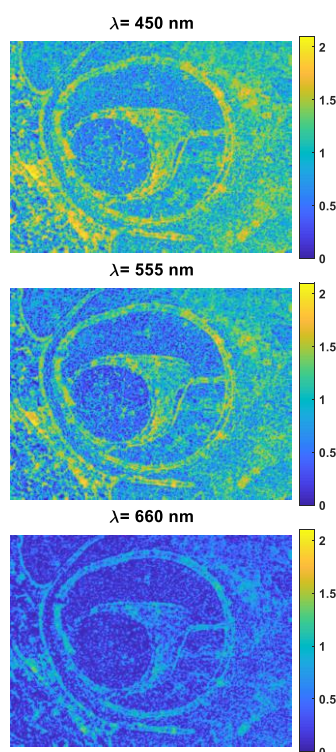


FIGURA V- 31: imágenes de absorbancia para un ojo control, obtenidas a partir de 3 longitudes de onda 450nm, 555nm y 660nm.

Los autovalores calculados para las 22 longitudes de onda se observan en la figura V-32 expresados en % de la varianza. Al lado de cada autovalor, figura el CP de dicha varianza. Los 5 primeros CP representan el 99% de la varianza total. Como se puede ver en la figura, el componente número 15 representa prácticamente ruido y que no tiene ninguna estructura espacial.

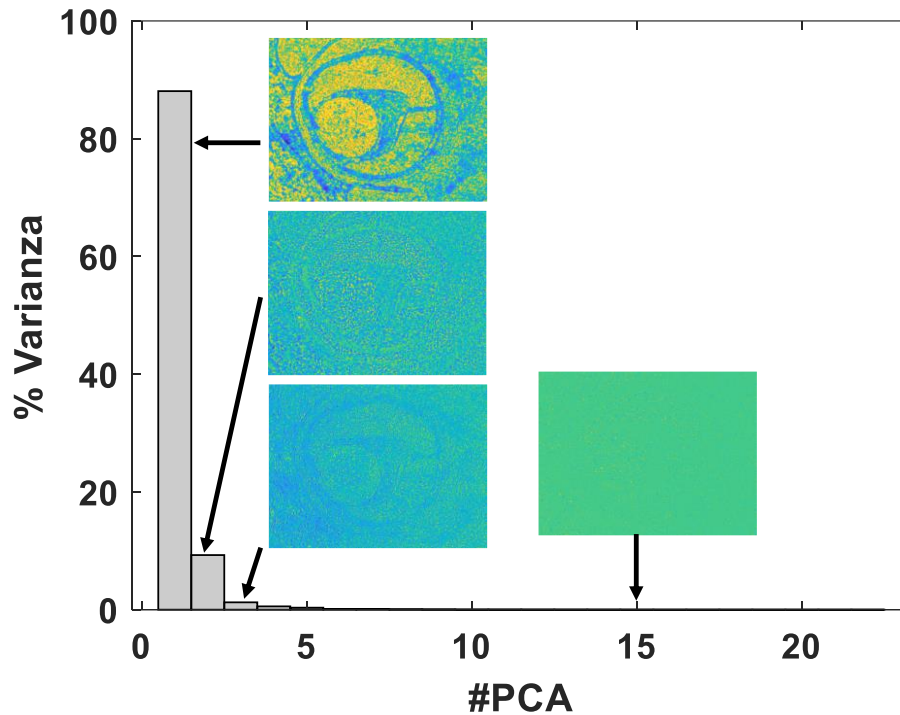


FIGURA V- 32: Pesos relativos de los componentes principales para un ojo control analizado.

Para entender mejor el significado de los CPs y los autovectores, la figura V-33 sirve como resumen. Las imágenes originales están situadas en un espacio de configuración, donde cada dirección simboliza una determinada λ . En negrita aparecen tres ejes asociados a λ_1 , λ_2 y λ_3 tomadas, respectivamente que están asociadas por tanto a las direcciones $(1, 0 \dots 0)$, $(0, 1, \dots 0)$ y $(0, 0, 1, \dots 0)$. Al lado de estos ejes aparecen las imágenes de absorbancia tomadas para cada una de estas longitudes de onda. Las imágenes tienen un covarianza no nula ya que muestran un gran parecido entre ellas. Podemos ver la descomposición de los CPs como una búsqueda de nuevas direcciones en este espacio (los autovectores) tal que cuando mezclamos las imágenes originales tomando como coeficientes de la combinación lineal los componentes de los autovectores obtenemos unas nuevas imágenes (los CPs) que muestran una correlación nula entre ellas. Estas nuevas direcciones principales (los autovectores $a_\alpha(\lambda_0)$) aparecen como línea punteadas en la figura. Junto a ellas están representados los autovectores y el CP asociado a esa dirección. Por último, los autovalores representarían la varianza del CP asociado a esa dirección (dispersión de los datos a lo largo de esa combinación de longitudes de onda).

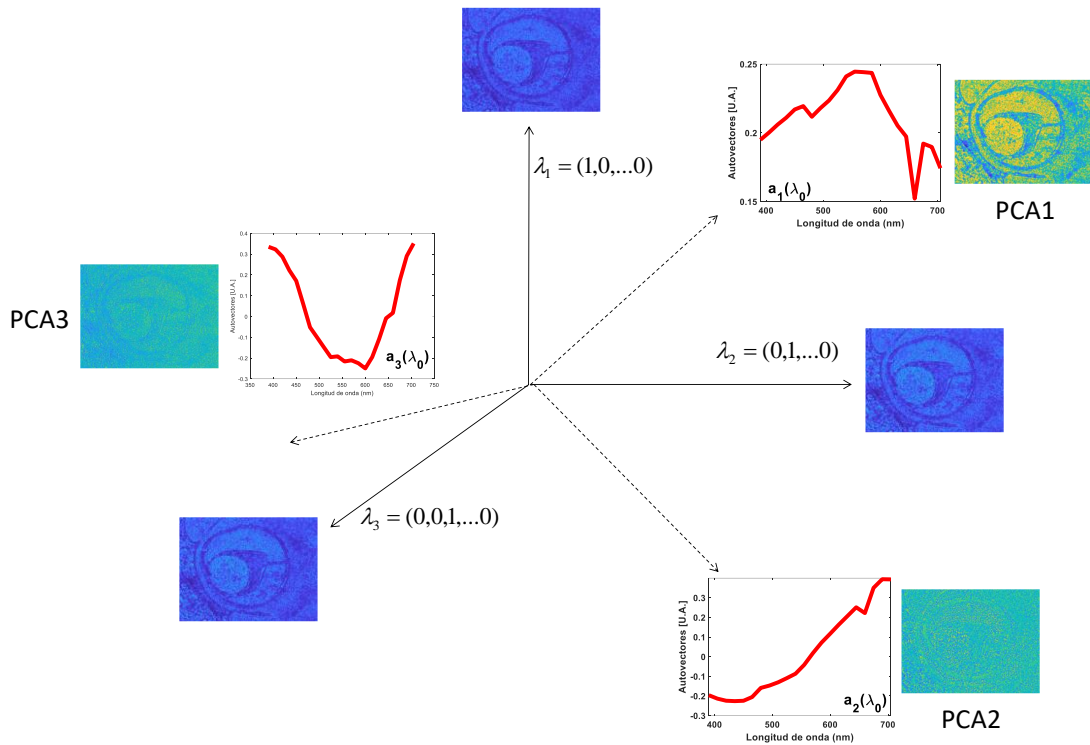


FIGURA V- 33: Ejemplo de descomposición en CPs. Los autovectores (en línea discontinua) designan formas de mezclar las imágenes originales (al final de las líneas continuas) para obtener imágenes descorrelacionadas (CPs). Los CPs son combinaciones lineales de las imágenes originales. Los coeficientes de estas combinaciones lineales son los componentes de los autovectores

1.2 Caracterización de los tres grupos: control, D2 y D8

Para la caracterización de un conjunto de ojos que forman un grupo muestral, hay que evaluar 3 cosas para cada ojo: los CPs, autovectores y autovalores. Estos datos los representaríamos como

$$[\beta_\alpha, a_\alpha, CP_\alpha]_{Gi} \quad (5.28)$$

Siendo β_α el autovalor, a_α el autovector CP_α el componente principal, del ojo i ($i=1\dots 9$), (aunque en la captura de imágenes habíamos tomada para cada grupo 10 ojos, hemos tenido que prescindir de un ojo en cada grupo porque los datos de uno de los ojos del grupo control ocasionaba errores en el análisis), del grupo G (control, D2, D8).

Así que, para cada grupo se van a considerar solamente los autovalores que represente aproximadamente el mismo porcentaje de varianza en todos los ojos. Los autovectores asociados a los autovalores deben de representar direcciones en el espacio de configuración más o menos iguales, y finalmente los CPs se analizarán con más cuidado, ya que son

imágenes diferentes para cada ojo. Y dado que existe una diferencia intrínseca entre los ojos ya que provienen de individuos diferentes, su individualidad anatómica (diferencia de tamaño, orientación de la muestra, centrado del ojo en la imagen, etc.), puede enmascarar la información espectral. Por tanto, lo que va a caracterizar al grupo es el conjunto de autovalores que representa más o menos el mismo porcentaje de varianza y sus autovectores asociados, siempre que representen la misma dirección en el espacio de configuración. Para ver la información contenida en los CPs examinaremos ojo a ojo. A continuación, veamos lo explicado anteriormente en cada grupo.

1.2.1 Grupo control

La siguiente figura V-34 muestra el valor medio de los autovectores para los ojos del grupo control, representados como barras de error que indican la desviación estándar de los autovalores para cada uno de los ojos. Por regla general, los CPs más relevantes se seleccionan tomando los que tengan autovalores cuya incertidumbre en varianza no solapa con los demás. Esto significa que la estructura aparece en todos los ojos del mismo grupo. Si nos fijamos en los autovectores del 6 al 22, vemos que se solapan de forma continua por lo tanto estarían asociados a lo aleatorio de la muestra, los individuos.

Los autovalores del grupo control expresados en % de la varianza total se observan en la figura V-35. Como se puede ver, existen 5 autovalores relevantes que comprenden el 99.49% de la variabilidad total entre los ojos del grupo control. La figura V-36 muestra el valor medio de los autovectores del 1 al 5 junto con su error para el grupo control. A partir de esta figura se puede deducir que cada autovector es aproximadamente el mismo para todos los ojos ya que las barras de error son pequeñas. Por esta razón, sus valores medios se tomarán como una base de autovectores representativa de todo el grupo control. Por comparación, en la figura V-37, se representa el sexto autovector junto con su desviación estándar para ver que a partir del este autovector comienza a ser importante la variabilidad entre los individuos y por tanto no representa a todo el grupo.

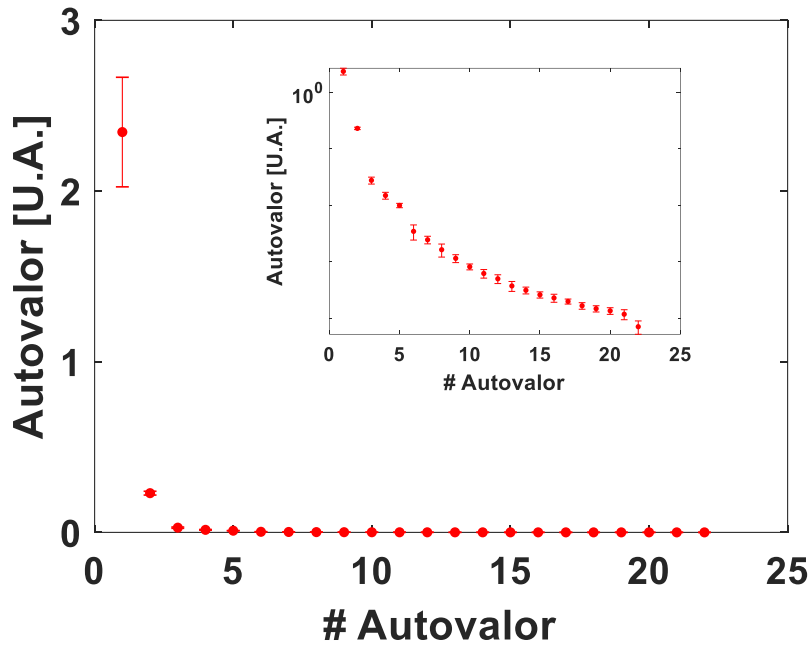


FIGURA V- 34: Autovalores del grupo control, representados en escala lineal y logarítmica para apreciar el solape entre las barras de error desde el autovalor #6 hasta #22.

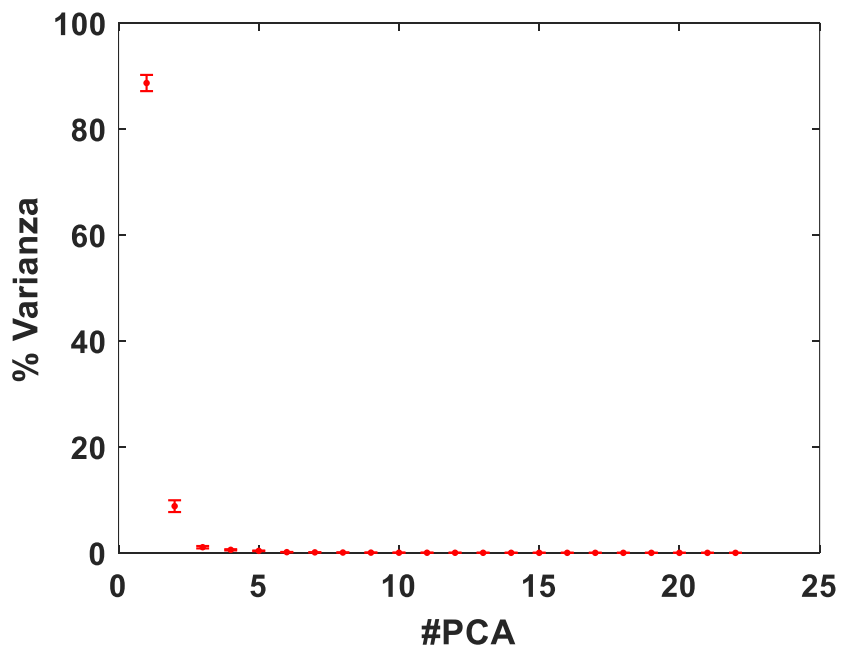


FIGURA V- 35: Autovalores del grupo control expresados en % de varianza explicada.

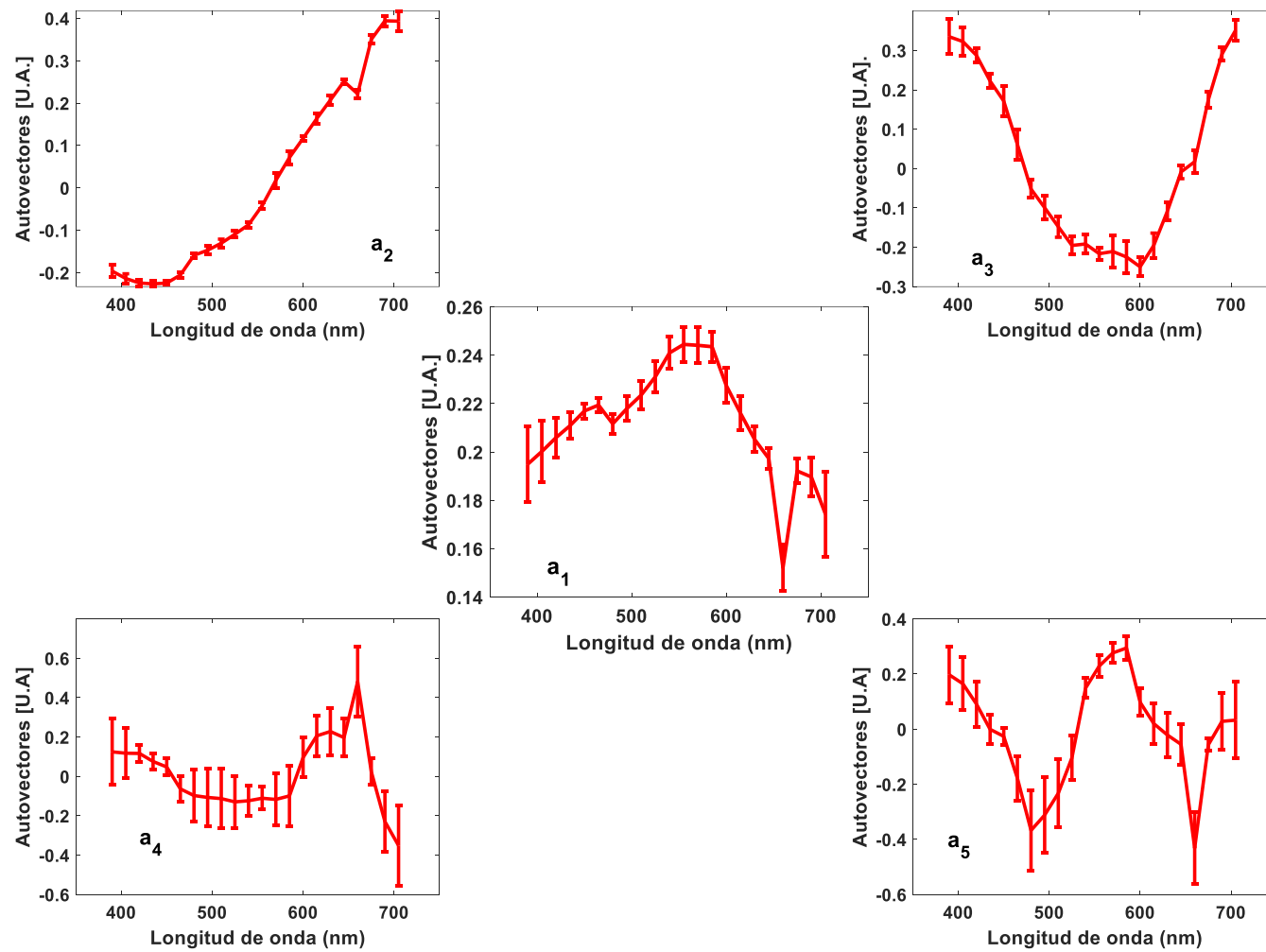


FIGURA V- 36: Representación de los 5 autovectores más relevantes del grupo control.

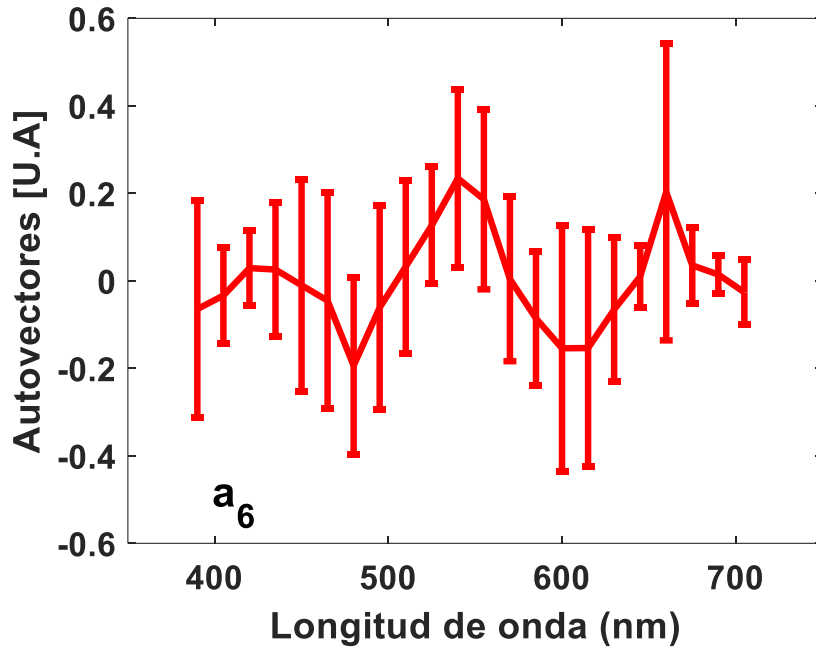


FIGURA V- 37: Representación del sexto autovector del grupo control.

A continuación, en las figuras V-38, V-39 y V-40 representamos los CPs#1,2,3, respectivamente, para cada uno de los ojos control con el fin de relacionarlos con algunas estructuras oculares relevantes.

En la figura V-38, representamos el primer CP (distribución espacial de la varianza) para los nueve ojos del grupo control. Dicha CP comprende el 88.08% de la variabilidad. Estas imágenes indican las zonas de gran varianza en el ojo control que son: córnea, cristalino, retina y algunos vítreos.

La figura V-39, representa el segundo CP para el mismo grupo. Representa el 9,27% de la variabilidad. En él aparece marcado el vítreo, la coroides y la lámina basal del EPR.

Finalmente, el tercer CP está representado en la figura V-40. Contiene, el 1.25% de la varianza total. Lo más destacado en estas imágenes, quizás, es la textura del cristalino y la retina. Aunque ambas estructuras están menos marcadas.

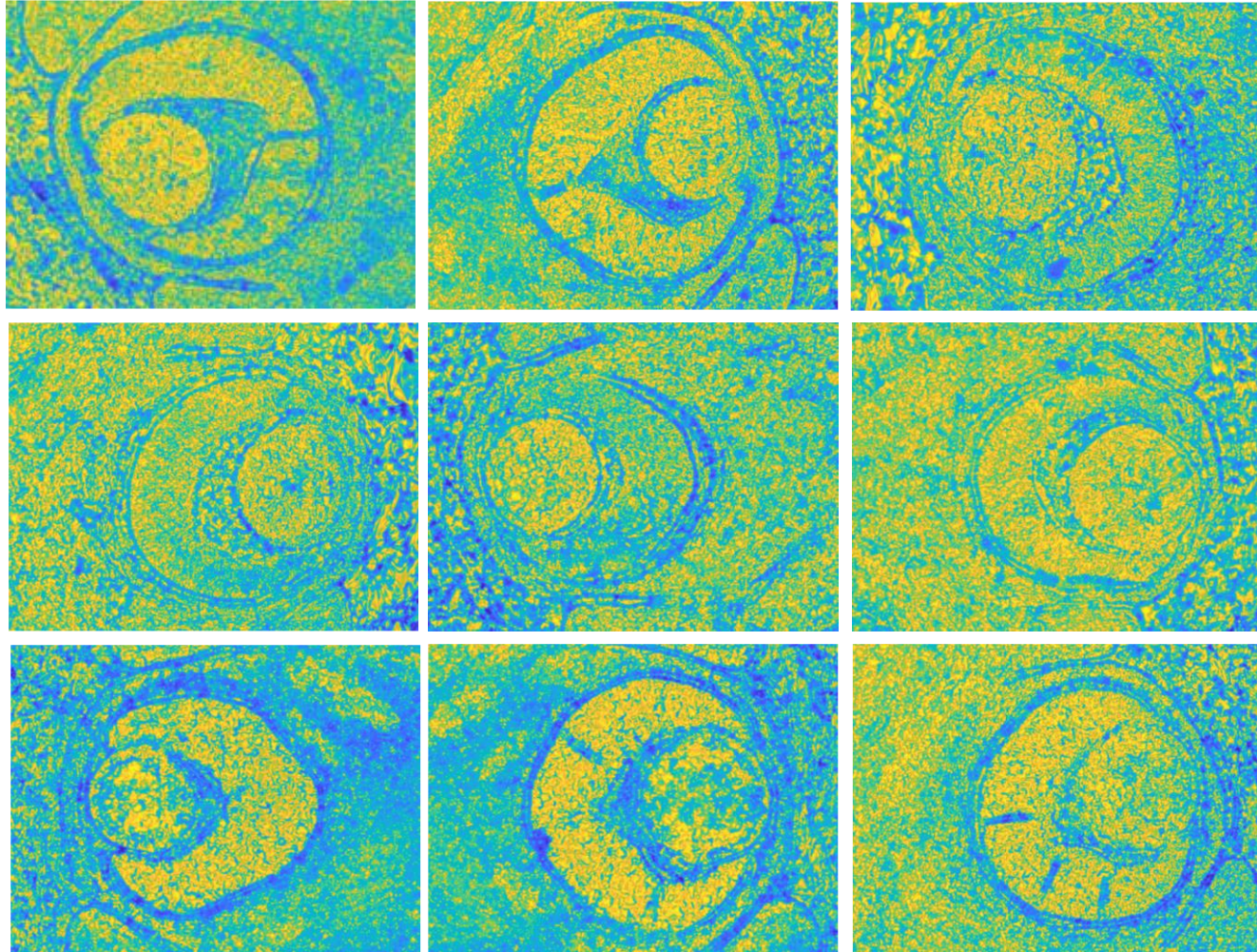


FIGURA V- 38: CP#1 para los nueve ojos control

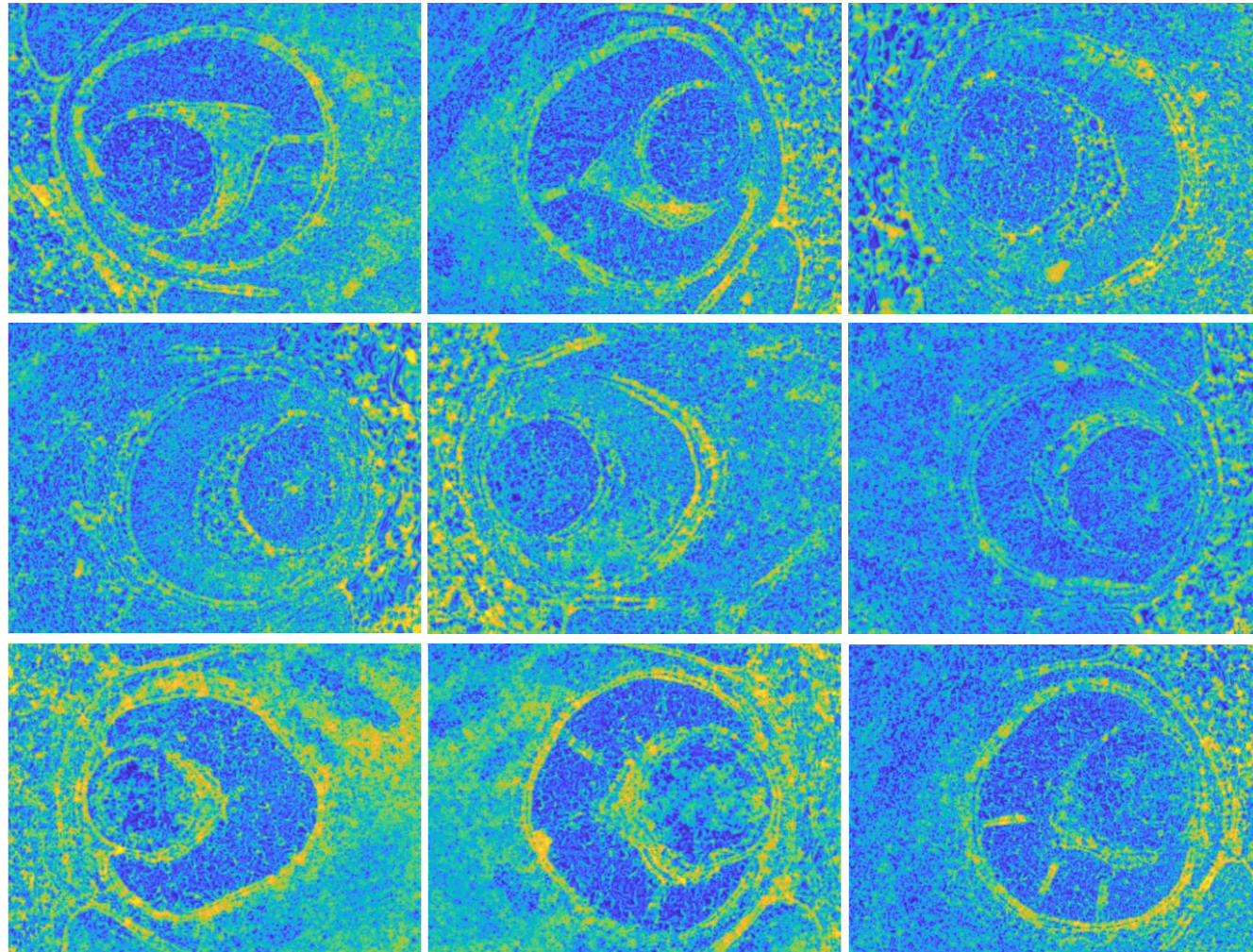


FIGURA V- 39: CP#2 para los nueve ojos control

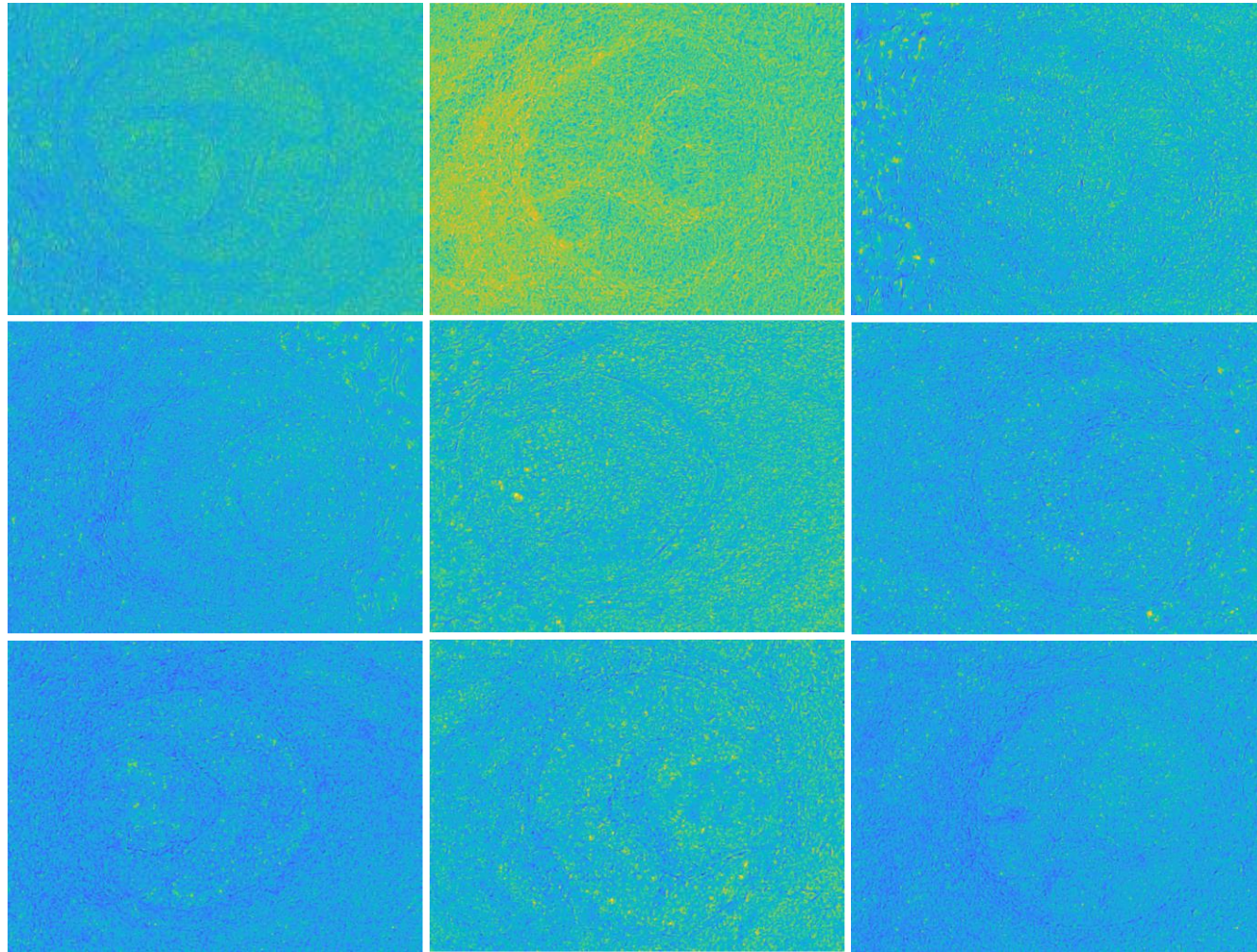


FIGURA V- 40: CP#3 para los nueve ojos control

Por último, en la figura V-41 representamos la absorbancia media para el grupo control: $\langle A_{Ci}(\lambda_0) \rangle_{x,y}$. Como se puede ver, la longitud de onda donde más se absorbe está alrededor de 420 nm.

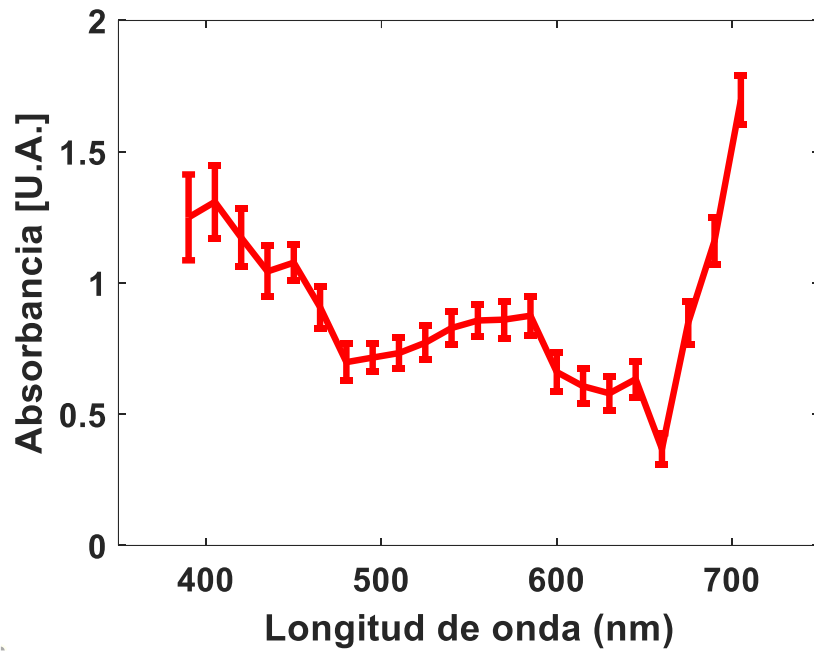


FIGURA V- 41: Absorbancia del grupo control

1.2.2 Grupos D2 y D8

En este apartado, vamos a seguir los mismos pasos realizados para el grupo control. Las figuras V-42 y V-43 muestran los cinco autovalores más relevantes para el grupo D2; mientras que las figuras V-44 y V-45 muestra los del grupo D8.

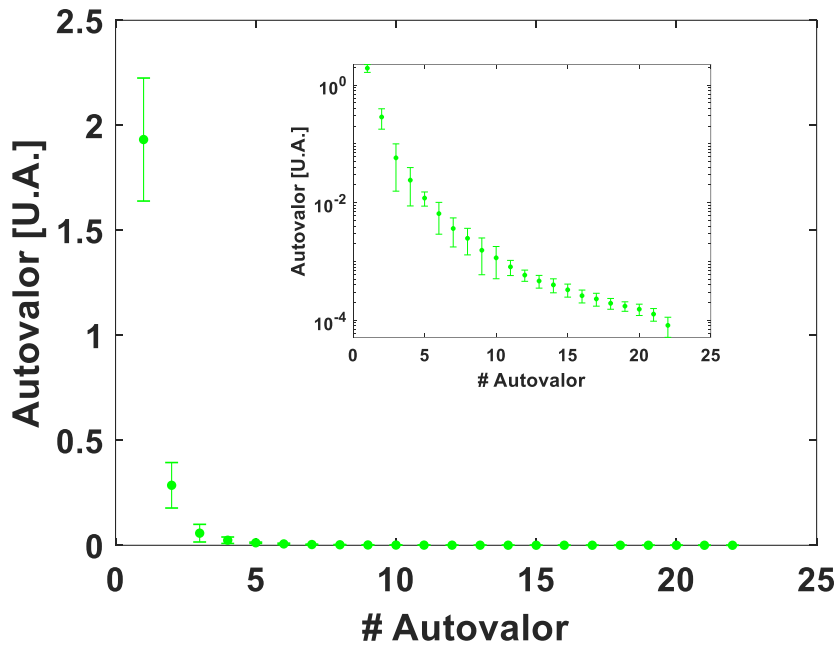


FIGURA V- 42: Autovalores obtenidos para el grupo D2. Para apreciar mejor el solape entre las barras de error de los autovalores desde el #6 al #22 se representan también en escala logarítmica.

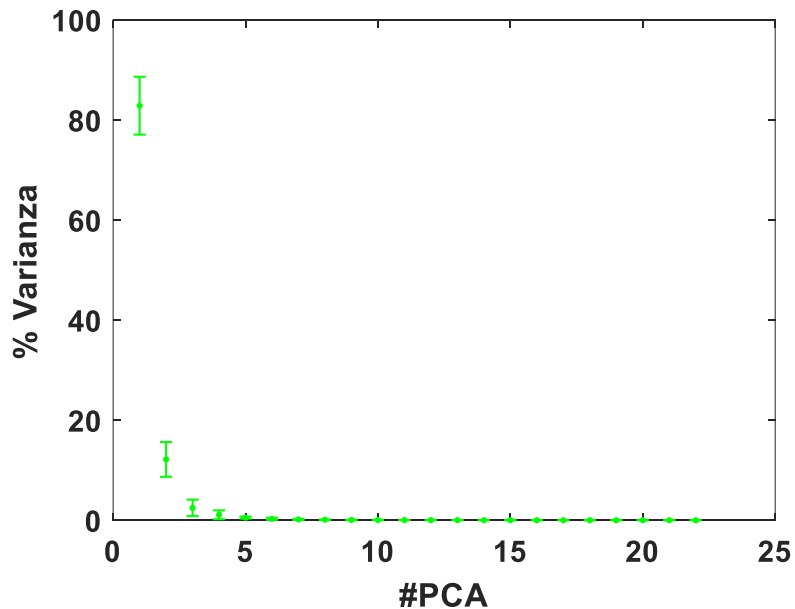


FIGURA V- 43: Autovalores del grupo D2 expresados en % de varianza.

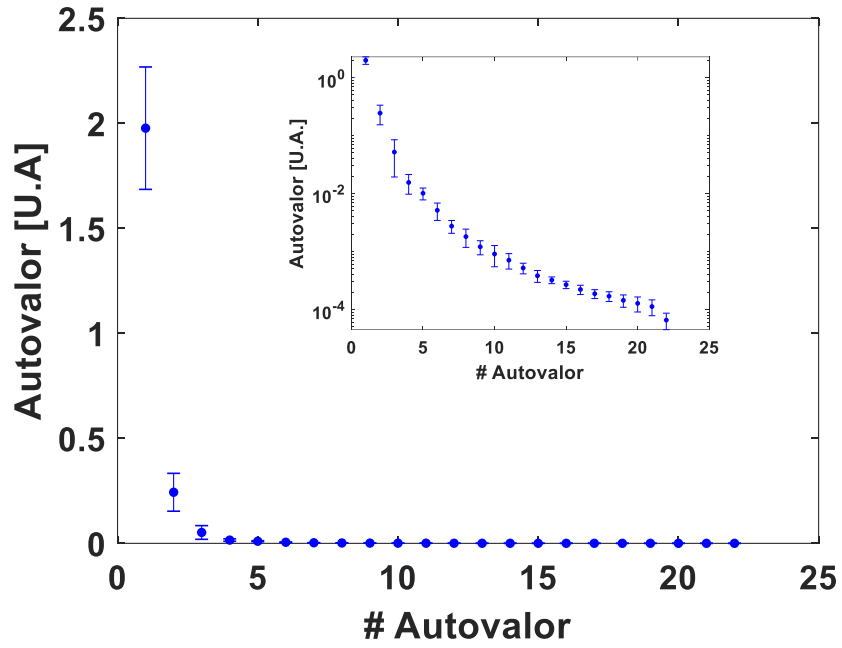


FIGURA V- 44: Autovalores obtenidos para el grupo D8. Para apreciar mejor el solape entre las barras de error de los autovalores desde el #6 al #22 se representan también en escala logarítmica.

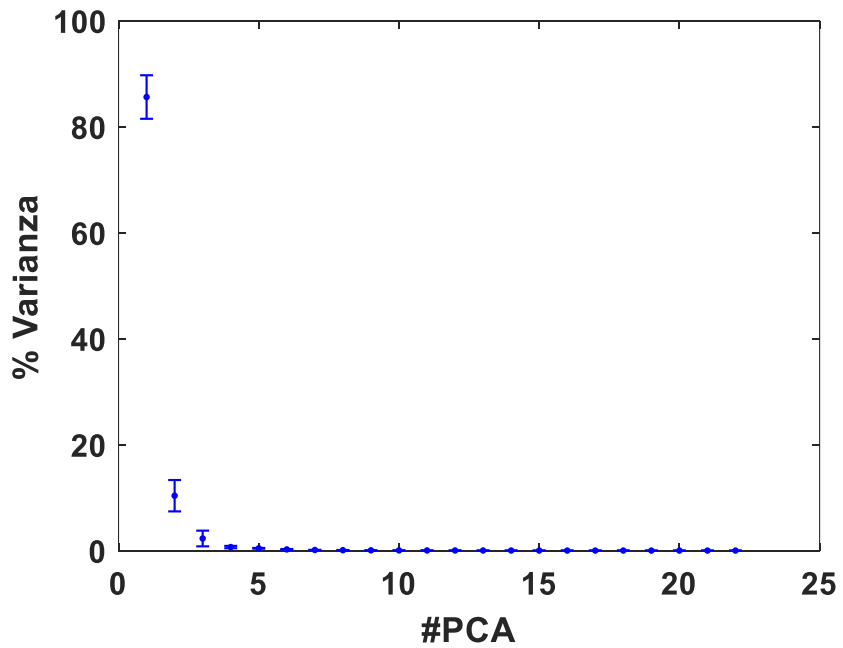


FIGURA V- 45: Autovalores del grupo D8 expresados en % de varianza.

Resumimos en las tablas V-4 y V-5 la media de los pesos relativos de cada grupo en los 5 CPs relevantes. Se observa que en los grupos D2 y D8 disminuye la importancia del primer CP en favor a los demás. Además, vemos que los grupos D2 y D8 tienen una varianza en los datos mayor que el control para casi todos los componentes estudiados.

TABLA V- 4: Valor de la varianza para cada componente principal de cada grupo: control, D2 y D8.

# CP	Control	D2	D8
1	2,41	1,83	1,93
2	0,25	0,24	0,19
3	0,03	0,03	0,06
4	0,02	0,01	0,02
5	0,01	0,01	0,01

TABLA V- 5: Valor de la varianza asociada para cada componente principal de cada grupo control, D2 y D8.

# CP	Control	D2	D8
1	88,08	85,63	86,79
2	9,27	11,04	8,65
3	1,25	1,39	2,51
4	0,56	0,65	0,79
5	0,33	0,42	0,49

Si representásemos los cinco autovectores más relevantes, observamos que es posible formar también una base igual que la del control, promediando de nuevo sobre el número de ojos. La figura V-46 indica los resultados.

Dentro del grupo de D2 y D8, los cinco autovectores forman también una base para esos grupos de ojos ya que se mantienen relativamente estables entre individuos, las desviaciones estándar de sus valores son mayores en D2 y D8, ambos grupos al parecer tienen mayor variabilidad entre individuos. Como se puede ver, los autovectores son bastante parecidos, pero con una ligera diferencia en el comportamiento espectral entre el control y los grupos D2 y D8.

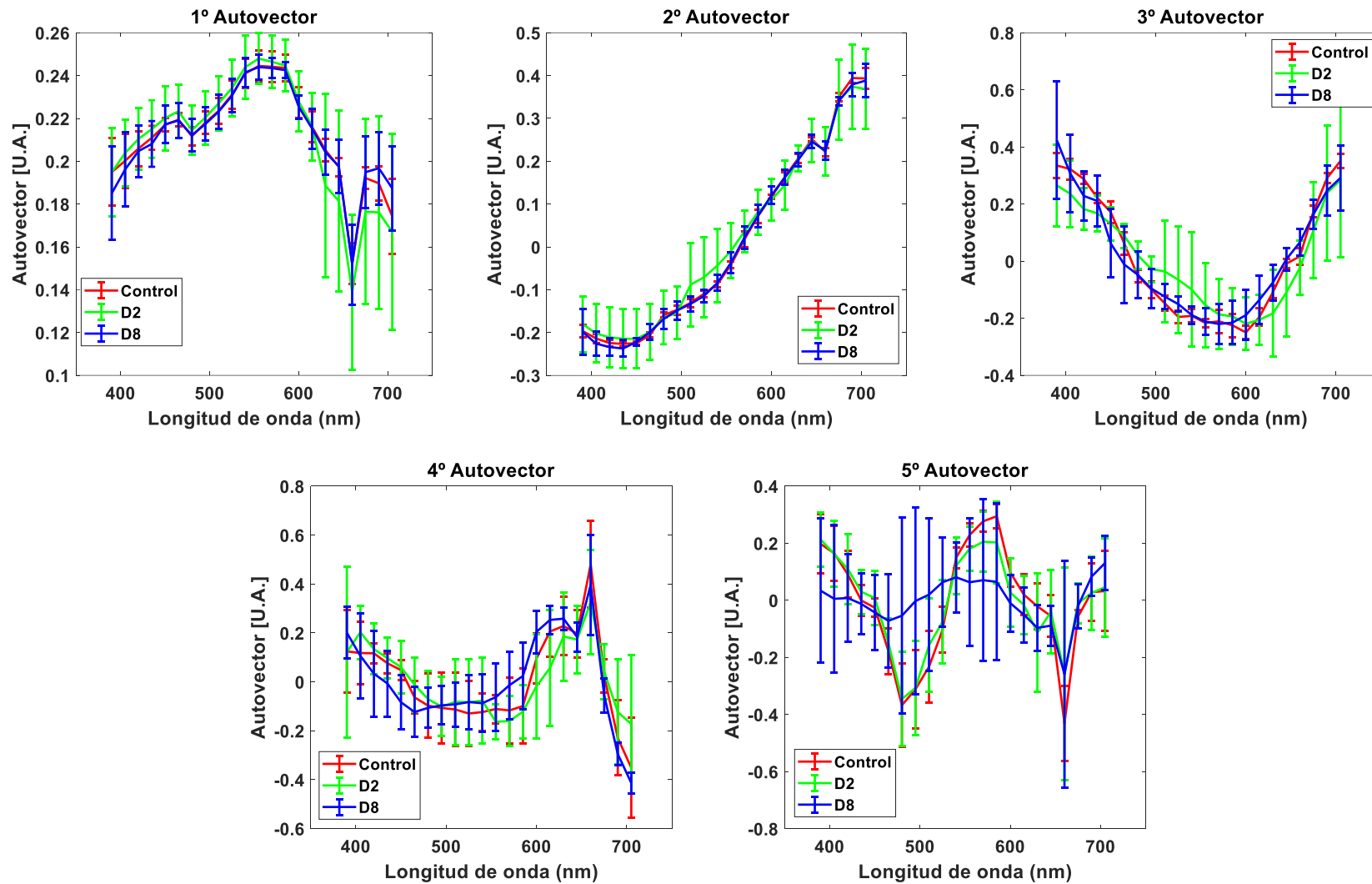


FIGURA V- 46: Autovectores asociados a los CPs#1, 2, 3, 4 y 5 para los tres grupos control, D2 y D8 promediados sobre los 9 ojos de cada grupo.

Dado que los 27 ojos son distintos entre un individuo y otro será difícil comparar directamente las imágenes entre los mismos. Aun así, vamos a realizar una primera comparación para ver si la pequeña diferencia espectral puede considerarse relevante. Para ello vamos a representar los dos primeros autovectores más representativos del grupo control (Fig. V-47). Dicha figura muestra una representación gráfica de la relación entre la base media representativa del grupo de control (se toma el valor medio a lo largo de los ojos para tener una base de todo el grupo) y la base del grupo de D8. Los autovectores de cada uno de los ojos control sostienen un determinado ángulo con el autovector medio representativo de todo el grupo, dando un cierto valor de incertidumbre en el alineamiento a lo largo de esa dirección (en el gráfico conos verdes). Si al colocar los autovectores de los ojos de otros grupos (D2 y D8), estos sostienen ángulos mayores podríamos decir que la diferencia en el comportamiento espectral es significativa.

Realizamos la misma operación para cada uno de los ojos de los grupos D2 y D8 para obtener la estadística sobre el parámetro ángulo, así distinguimos si los autovectores calculados muestran comportamiento espectral distinto del control. Los resultados se presentan en las tablas V-6, V-7 y V-8 para los grupos control, D2 y D8, respectivamente. Mediante el test estadístico Kruskal-Wallis hemos comparado los valores del grupo control con los grupos D2 y D8. Con el asterisco marcamos los valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

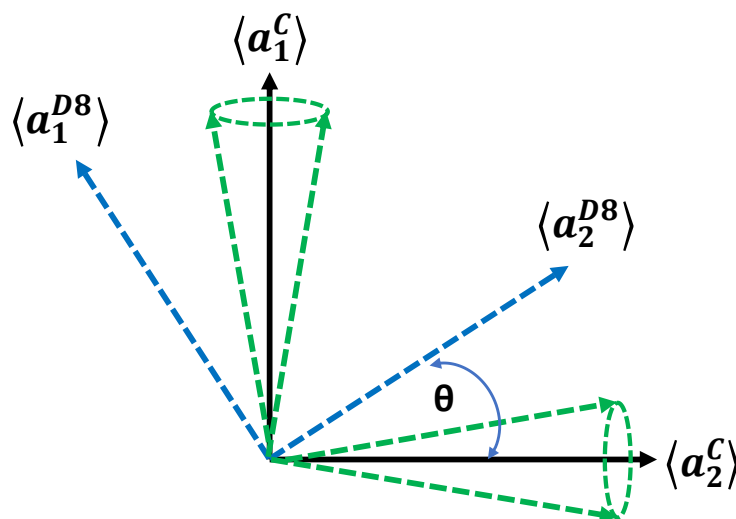


FIGURA V- 47: Representación gráfica de la relación entre la base media representativa del grupo de control y la base del grupo de D8.

TABLA V- 6: Estadística del ángulo de los autovectores del grupo control con la base media del control.

#CP	Media (°)	STD(°)	Skewness(°)	Curtosis(°)
1	2.9	0.3	0.6	2.2
2	3.9	0.5	0.9	2.6
3	10.2	1.7	1.0	2.5
4	42.3	22.1	2.5	7.1
5	30.3	12.8	2.4	6.8

TABLA V- 7: Estadística del ángulo de los autovectores del grupo D2 con la base media del control. El 'asterisco' marca los valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

#CP	Media (°)	STD(°)	Skewness(°)	Curtosis(°)
1	5.4	4.9	2.3	6.6
2	12.8	15.3	1.4	3.3
3	34.1	35.4	2.0	5.7
4	57.4	28.9	1.0	2.2
5	43.3	28.9	1.5(*)	4.1(*)

TABLA V- 8: Estadística del ángulo de los autovectores del grupo D8 con la base media del control. El 'asterisco' marca los valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

#CP	Media (°)	STD(°)	Skewness(°)	Curtosis(°)
1	3.8	0.9	0.7(*)	2.2(*)
2	6.8	1.5	-0.3	1.9
3	24.7	13.6	0.6(*)	1.9(*)
4	46.2	14.9	1.0	2.4
5	75.2	54.3	0.6	1.5

Los resultados de las tablas muestran que los grupos D2 y D8 sostienen ángulos mayores para los 5 CPs, esto significaría que la diferencia en el comportamiento espectral entre estos grupos y el control es significativa. Respecto a los valores de la desviación estándar, los de D2 y D8 son más altos que en el control. Esto significaría que el comportamiento espectral comienza a alejarse del grupo control y va en la línea de los grupos D2 y D8.

Respecto a los valores de la skewness, se observa que del grupos D2 tienen valores más positivos que el control, esto quiere decir entonces que los elementos de la muestra en

general están sesgados hacia los valores que se agrupan más en los niveles bajos. La distribución del grupo D8, sin embargo, tendrá una cola asimétrica hacia los valores negativos, es decir los valores se agrupan más en los niveles más altos (hay más diferencias en el comportamiento espectral). Respecto a los valores de curtosis, el coeficiente del grupo D2 es más positivo que el control, por ende, hay mayor concentración de los datos en torno a la media. Por otra parte, el grupo D8 tiene una distribución similar al control en CP#1,3, y en los demás se aleja de la media. En suma, hemos comprobado que el comportamiento espectral es diferente entre el control y los grupos D2 y D8.

Después de realizar esta última comparación, vamos a realizar otra calculando una nueva estadística a la que llamamos 'Coordenadas'. Antes de explicar el procedimiento seguido para calcularla, hay que recordar que los autovectores representan los coeficientes de combinaciones lineales de las imágenes originales. Los autovalores son la varianza de las imágenes resultantes que hemos interpretado como la dispersión de los datos a lo largo de las direcciones marcadas por los autovectores en el espacio de configuración de las longitudes de onda. Por todo ello, la base del control que ya hemos calculado tiene estas direcciones principales (autovectores) y la varianza media asociada a cada una de ellas. De esta forma vamos a calcular las Coordenadas de la siguiente forma:

- Para cada ojo, proyectamos sus imágenes en la dirección del autovector más relevante de la base de control, $\langle a_i^C \rangle$. La imagen resultante la dividimos por el autovalor medio de la base control en esa dirección $\langle \beta_i^C \rangle$. Al final, obtendremos en el resultado la Coordenada de ese ojo en dicha dirección de la base de control. Ya que la base de control ha sido calculada a partir de los ojos de este grupo, para calcular el valor de las coordenadas para todo ellos su valor promediado a lo largo de todos los ojos del grupo debería estar próximo a 1. Este valor nos servirá como referente de comparación.
- Vamos a realizar el mismo procedimiento para los ojos de los grupos D2 y D8. Primero calculamos sus coordenadas en la base media del control. Luego, promediamos entre los ojos del grupo (D2 o D8).

Los resultados se exponen en la tabla V-9.

TABLA V- 9: valores medios de las coordenadas de los ojos de los grupos control, D2 y D8 en la base media del control.

	Control		D2		D8	
#CP	Media	Std	Media	Std	Media	Std
1	1.0	0.1	0.8	0.1	0.8	0.1
2	1.00	0.05	1.2	0.2	1.1	0.4
3	1.1	0.1	2.4	2.2	1.5	0.7
4	0.67	0.08	0.9	0.4	0.8	0.4
5	0.9	0.1	1.3	0.7	1.0	0.3

Según los datos de esta tabla, el valor de las coordenadas en el control es 1 en casi todas los CP, salvo en el #4. Respecto a los grupos D2 y D8, se observa un aumento en el valor de las coordenadas en los CP# 2,3,4,5 en comparación con el control. Esto indica que la diferencia principal entre los grupos de control, D2 y D8 no está tanto en los autovectores principales como en la dispersión de los datos a lo largo de ellos. Esto indica que los espectros que representan los autovectores tienen una distinta distribución espacial en el grupo control, D2 y D8. A estudiar esta distribución espacial se dedica la siguiente sección.

1.2.3 Otros análisis zonales

En esta sección vamos a realizar un análisis más detallado de las diferentes zonas que nos permite distinguir el ACP. Una de las primeras acciones del ACP es la de sustraer la absorbancia media y analizar las desviaciones respecto a este valor. En la figura V-48 aparece esta absorbancia media, junto con su incertidumbre (desviación estándar) para los nueve ojos de cada grupo.

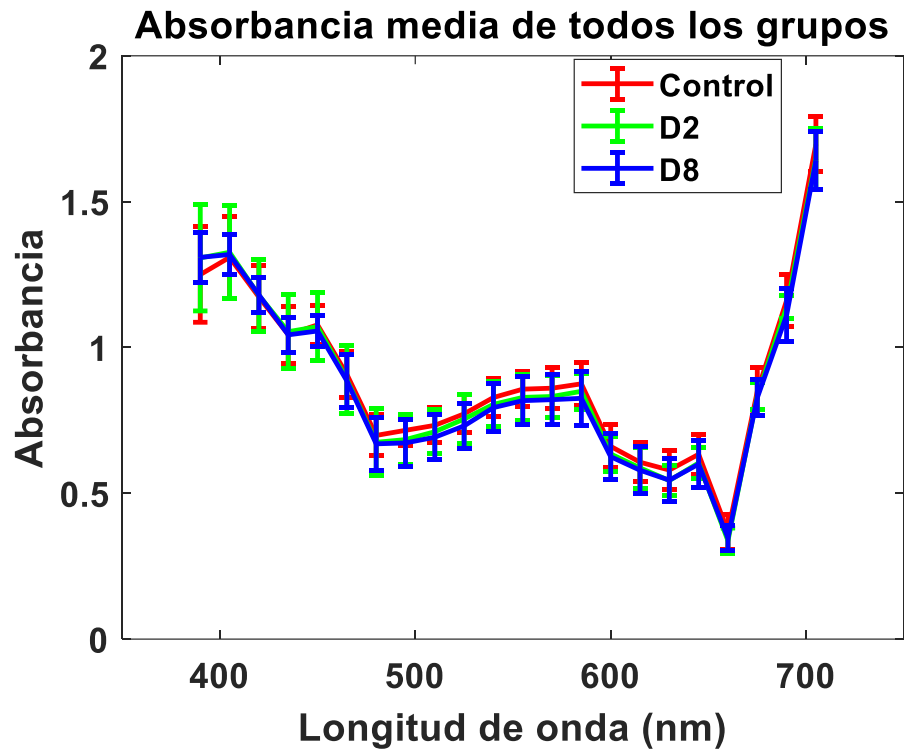


FIGURA V- 48: Absorbancia media para los grupos de imágenes estudiados.

Para que sirva también como comparación, se ha procedido a medir la absorbancia del vidrio utilizado en las muestras a fin de ver si puede tener alguna influencia sobre las medidas. Los resultados aparecen en la figura V-49. Como puede verse, su influencia sobre las medidas es muy pequeña.

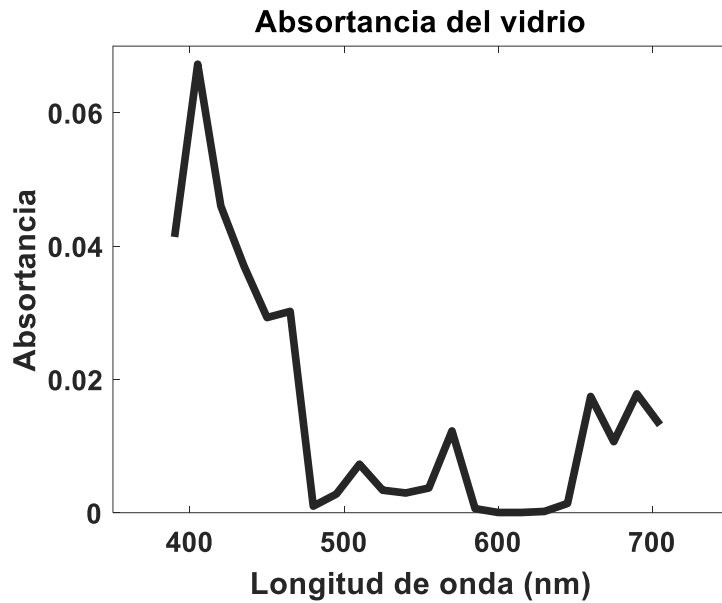


FIGURA V- 49: Absortancia del vidrio utilizado como soporte para las muestras.

En la figura V-50 aparece la distribución de probabilidad (pdf) de la absorbancia para tres longitudes de onda seleccionadas, realizando la media para los nueve ojos de cada grupo (control, D2 y D8). En las figuras de la izquierda aparecen junto con las barras de error (desviación estándar) para el grupo control, a fin de poder estimar el nivel de significación de las diferencias. Como puede verse, estas diferencias no son muy grandes, siendo mayores en el caso de la longitud de onda central de 540 nm. En todos los casos hay valores de absorbancia donde el grupo control está o bien por encima o bien por debajo de los grupos D2 y D8 (aunque como hemos dicho anteriormente, estas diferencias no son muy grandes), con dos puntos de corte de las curvas de control y D2/D8 en cada caso. Estos puntos de corte de absorbancia son entre 0.61 y 1.34 para la longitud de onda azul, 0.33 y 1.1 para el verde, 0.17 y 0.57 para el rojo.

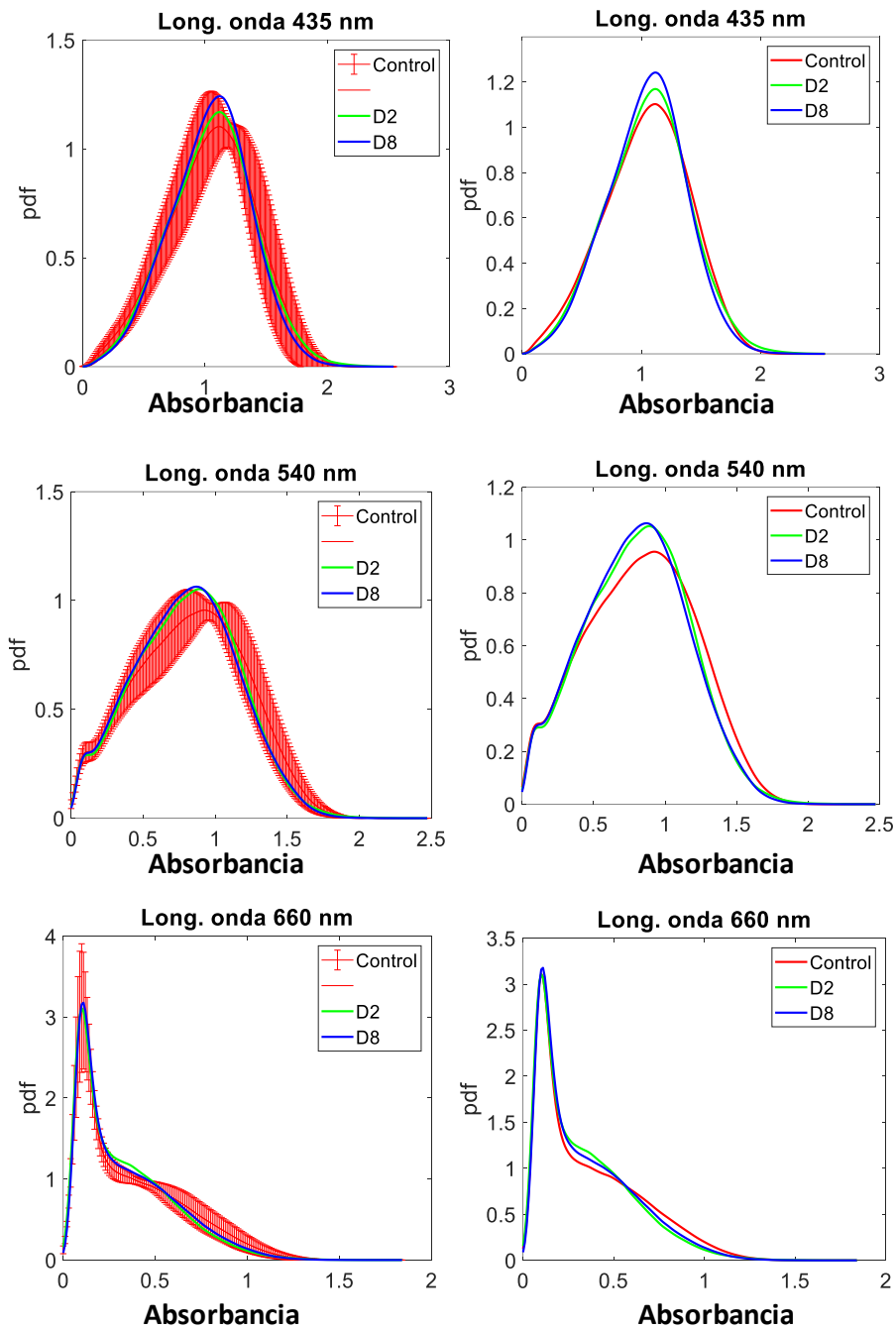


FIGURA V- 50: Función de distribución de probabilidad (media de los nueve ojos-dcha., con barras de incertidumbre para el caso del grupo control-izqda.) de la absorbancia para tres longitudes de onda.

En las figuras V-51, 52, y 53 aparecen seleccionados los puntos (en blanco) de las imágenes que cumplen con el criterio de que la absorbancia esté por debajo (gráfica izquierda), entre (gráfica central) o por encima de los anteriores límites (gráfica derecha) para cada longitud de onda. Por motivos de concreción sólo se ha representado un ojo de cada grupo: control (fila superior), D2 (fila intermedia), D8 (fila inferior).

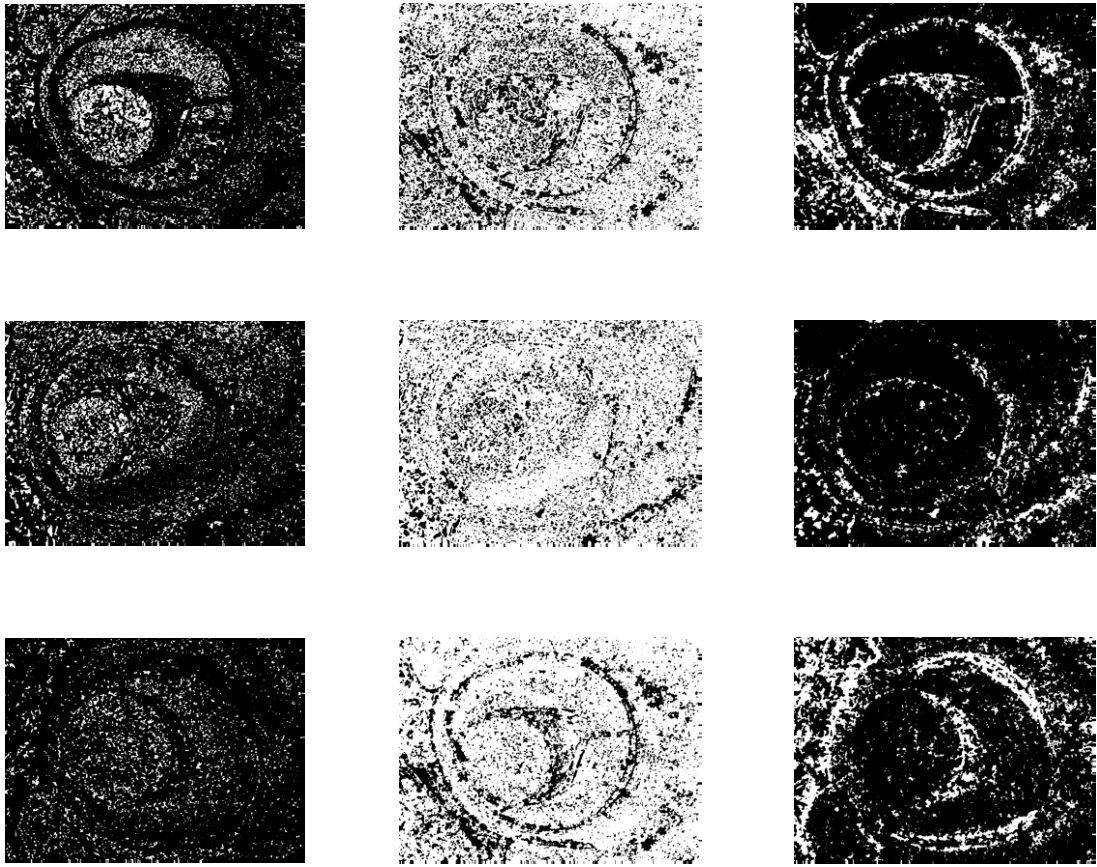


FIGURA V- 51: Representación de los puntos de la imagen cuya absorbancia está por debajo de 0.61 (izq.), entre 0.61 y 1.34 (central) y por encima de 1.34 (dcha.) para el caso de un ojo control (arriba), D2 (fila central), D8 (fila inferior). Longitud de onda del azul.

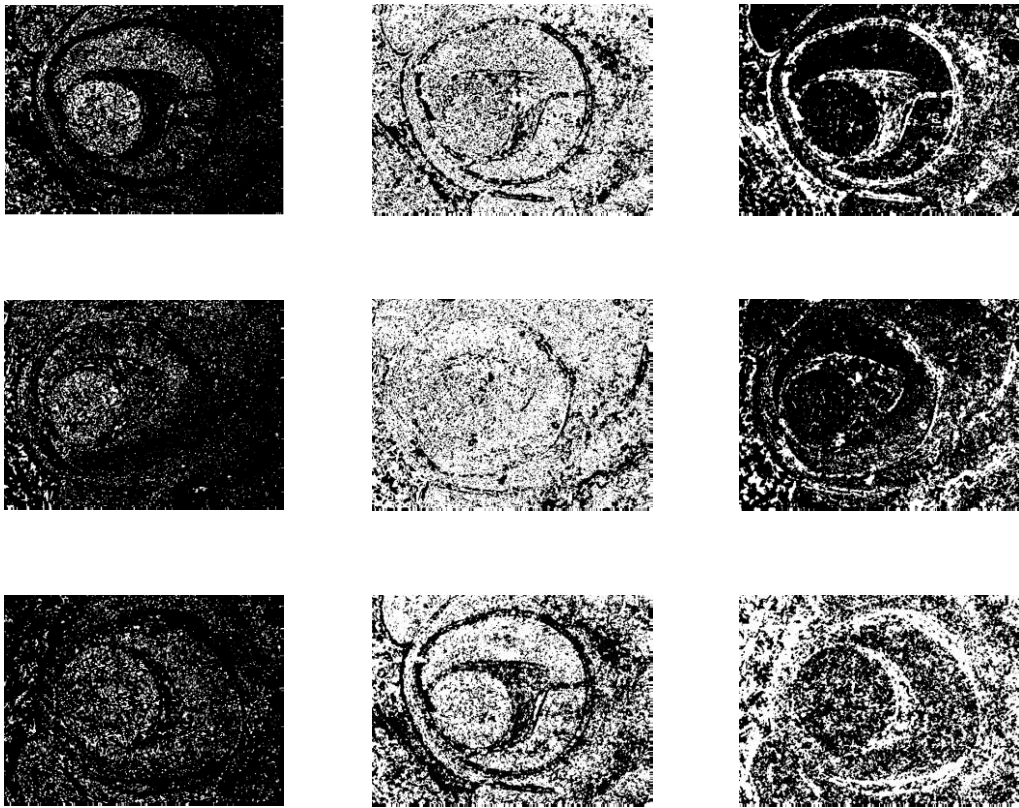


Figura V- 52: Representación de los puntos de la imagen cuya absorbanca está por debajo de 0.33 (izq.), entre 0.33 y 1.1 (central) y por encima de 1.1 (dcha.) para el caso de un ojo control (arriba), D2 (fila central), D8 (fila inferior). Longitud de onda del verde.

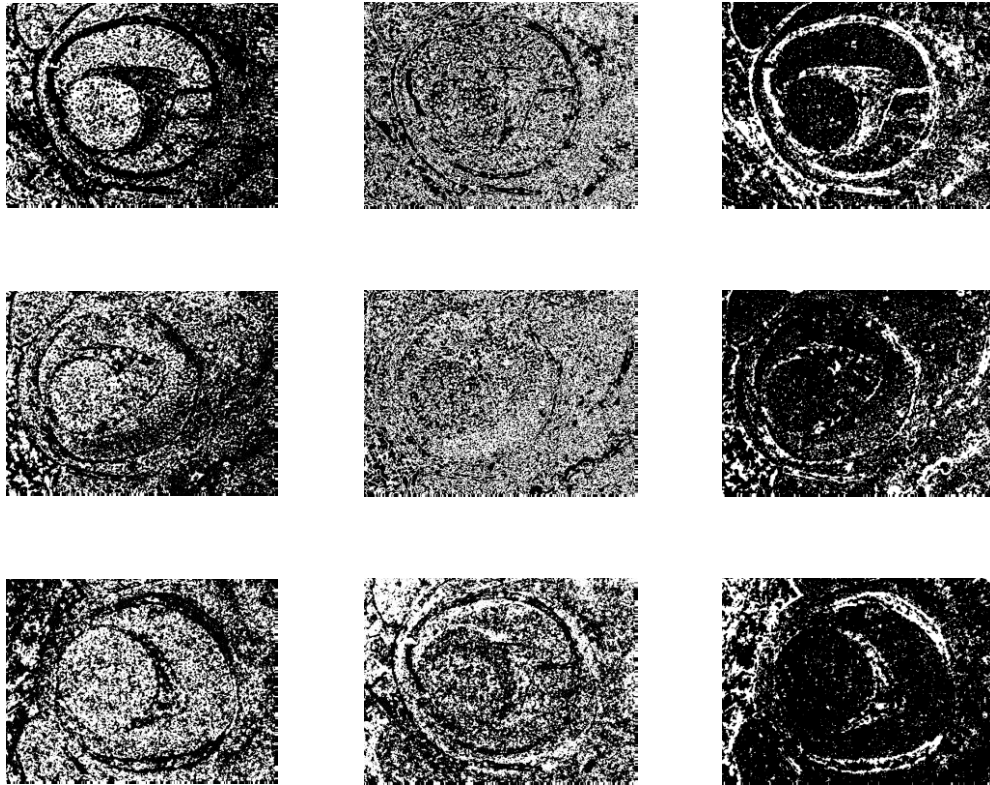


Figura V- 53: Representación de los puntos de la imagen cuya absorbanca está por debajo de 0.17 (izq.), entre 0.17 y 0.57 (central) y por encima de 0.57 (dcha.) para el caso de un ojo control (arriba), D2 (fila central), D8 (fila inferior). Longitud de onda del rojo.

Como puede verse, para las tres longitudes de onda, los valores “bajos” de absorbanca suelen darse en las estructuras de cristalino y retina, mientras que los valores “altos” suelen estar asociados la coroides y zona del vítreo, con una zona central de transición que aparece mucho más marcada en el caso del verde que en el caso del rojo y azul. En cualquier caso, sí que aparecen zonas con estructura en la imagen, asociadas a los valores de absorbanca donde las curvas de densidad de probabilidad del grupo control y los grupos D2y D8 se cruzan.

Sería muy difícil repetir este análisis para cada una de las longitudes de onda estudiadas y ver qué zonas de la imagen aparecen marcadas como diferentes. Aquí es donde el análisis de CPs nos puede ayudar. Recordemos que este análisis sustituye las 22 imágenes (cada una con una longitud de onda diferente) por sólo 5 relevantes (los cinco CPs relevantes que

hemos encontrado en las secciones anteriores y que mantienen su estructura en los tres grupos en cuanto a los autovectores, como direcciones principales).

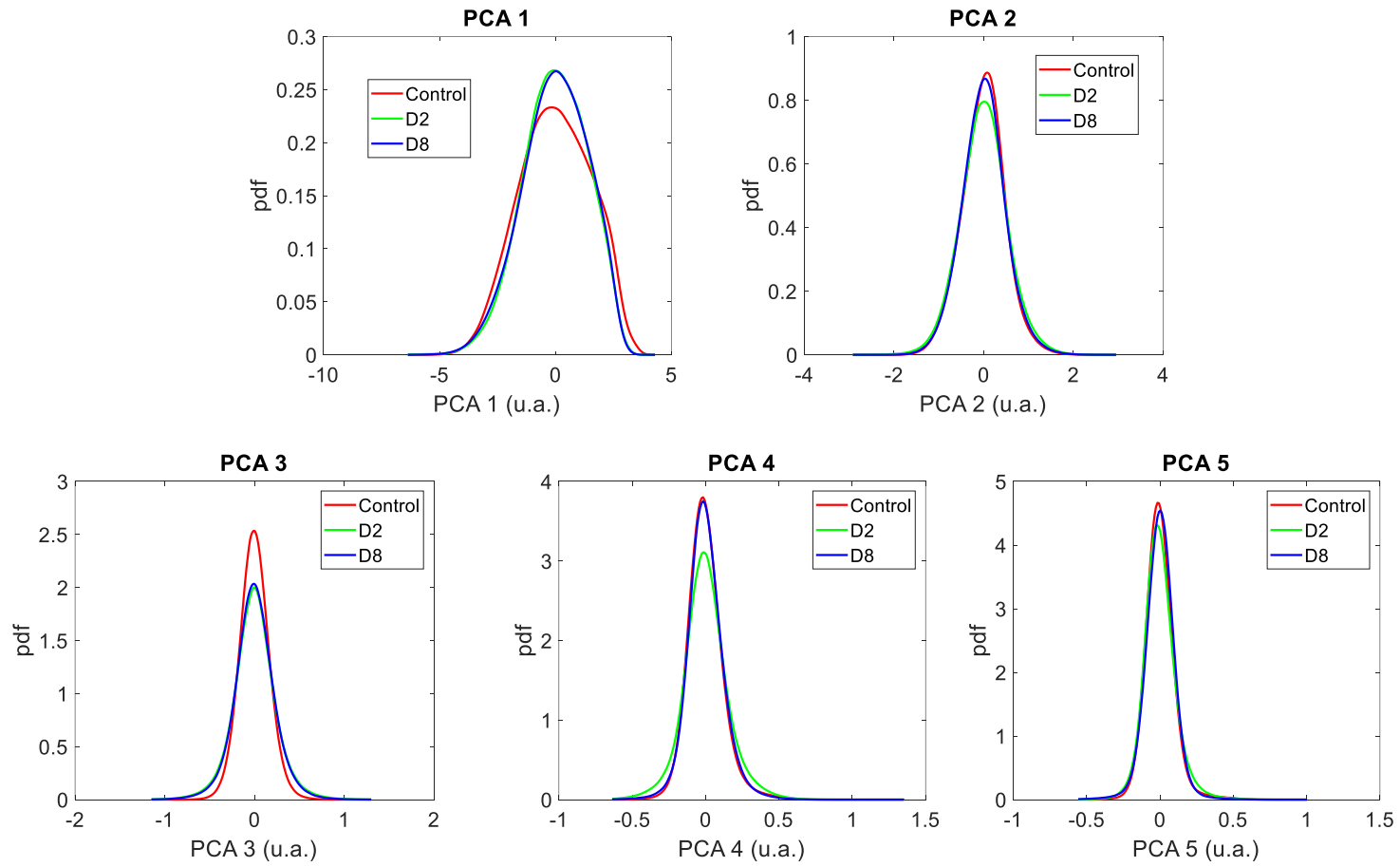


FIGURA V- 54: Función de distribución de probabilidad (pdf) para los valores medios de los componentes principales (CPs) relevantes del #1 al #5 para los grupos control, D2 y D8.

En la figura V-54 aparece el mismo tipo de análisis realizado sobre las imágenes de absorbancia para tres longitudes de onda, pero ahora para las imágenes de los cinco CPs encontrados como relevantes en las secciones anteriores. La pdf mostrada como representativa del grupo es la media de los CPs de cada ojo de ese grupo. En esta figura vemos que los únicos componentes que muestran claramente unos valores diferentes en su distribución entre los grupos control y D2, D8 son el #1 y el #3, y de nuevo, zonas donde la curva de control se cruza con las de D2 y D8. Análogamente al caso anterior, en las siguientes figuras se representa los puntos del CP #1 y #3 para varios ojos de cada grupo: control, D2 y D8 divididos en tres zonas de acuerdo con los puntos de corte entre las gráficas del grupo control y D2, D8 de la figura V-54.

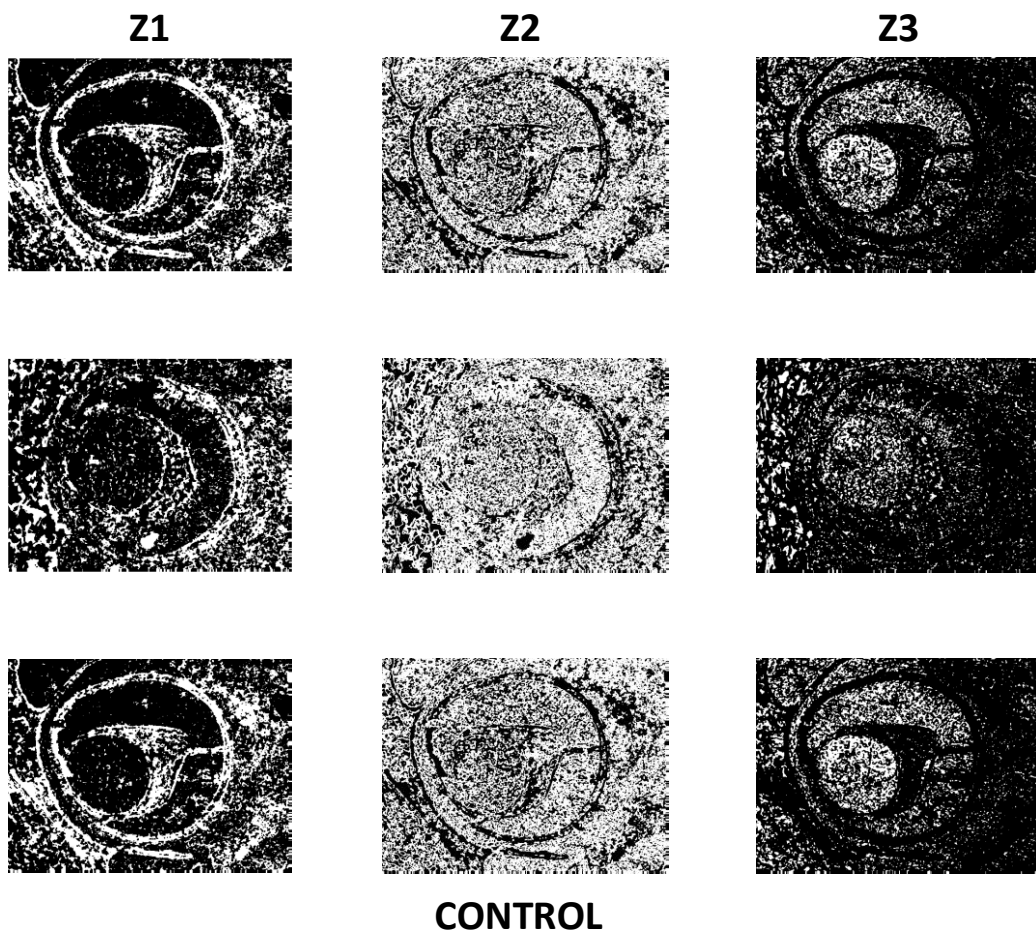
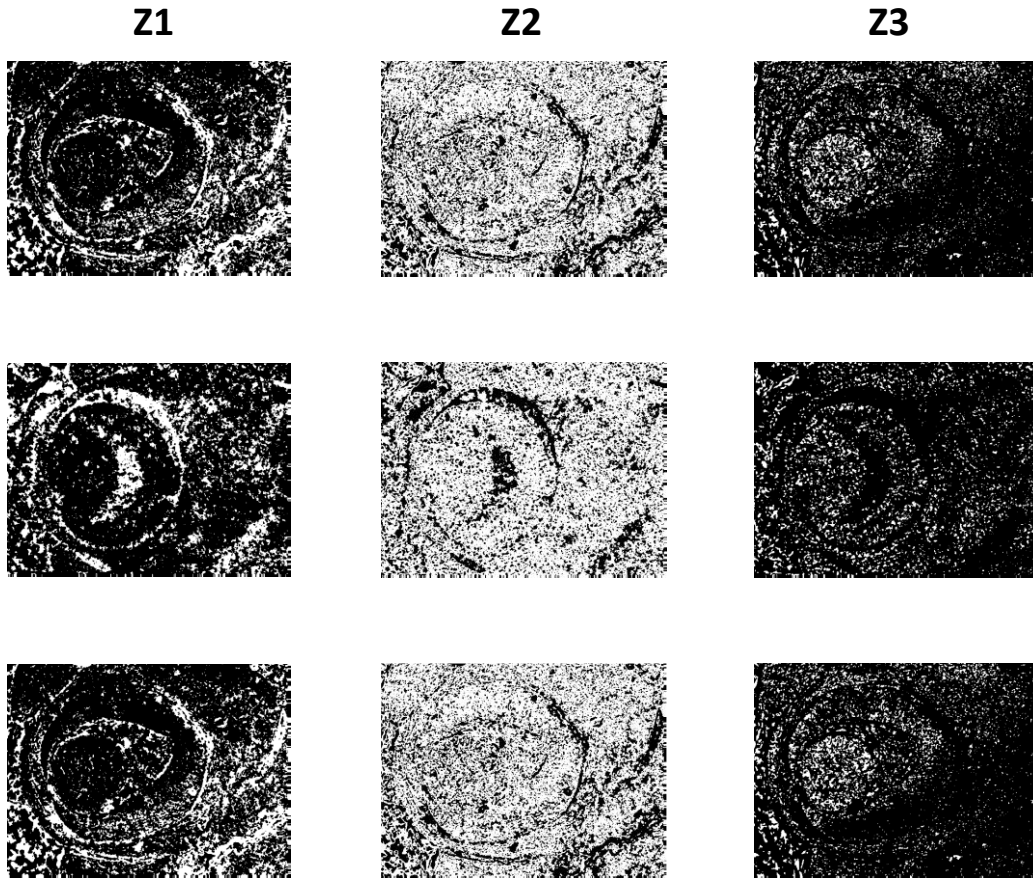
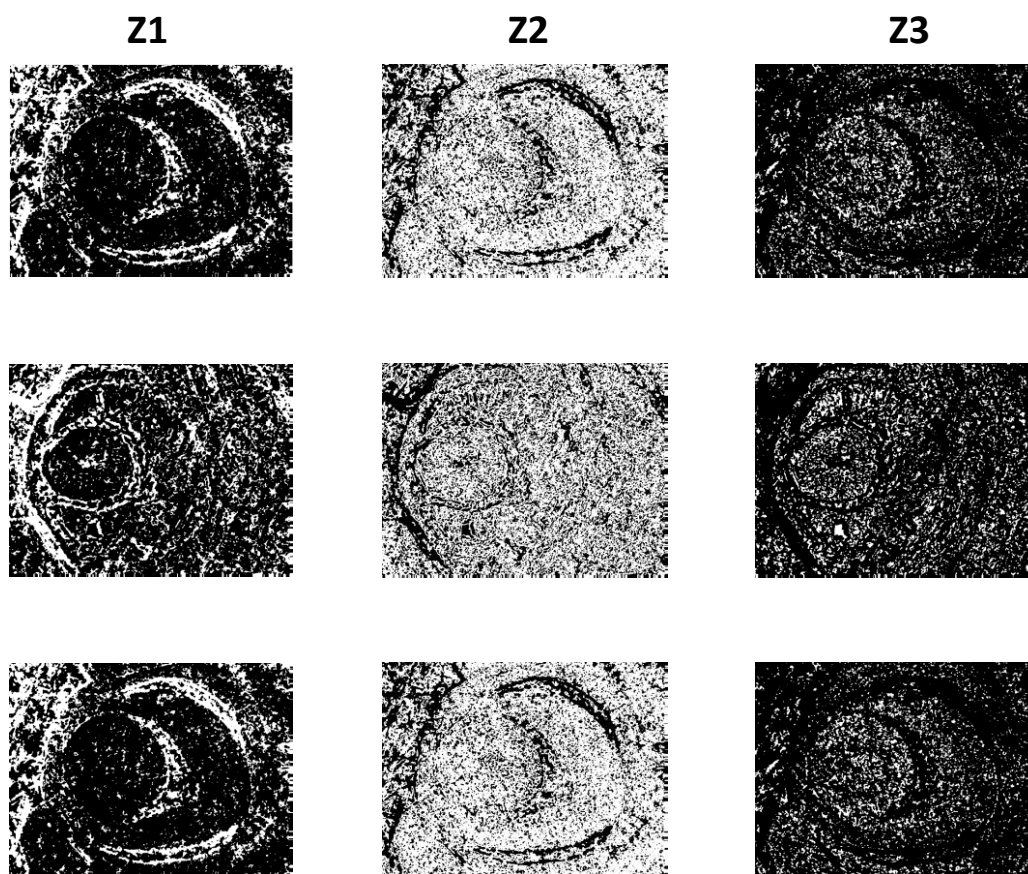


FIGURA V- 55: Puntos de la imagen del CP #1 para tres ojos del grupo control (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -1 (Z1), entre -1 y 1 (Z2) y mayor que 1 (Z3).



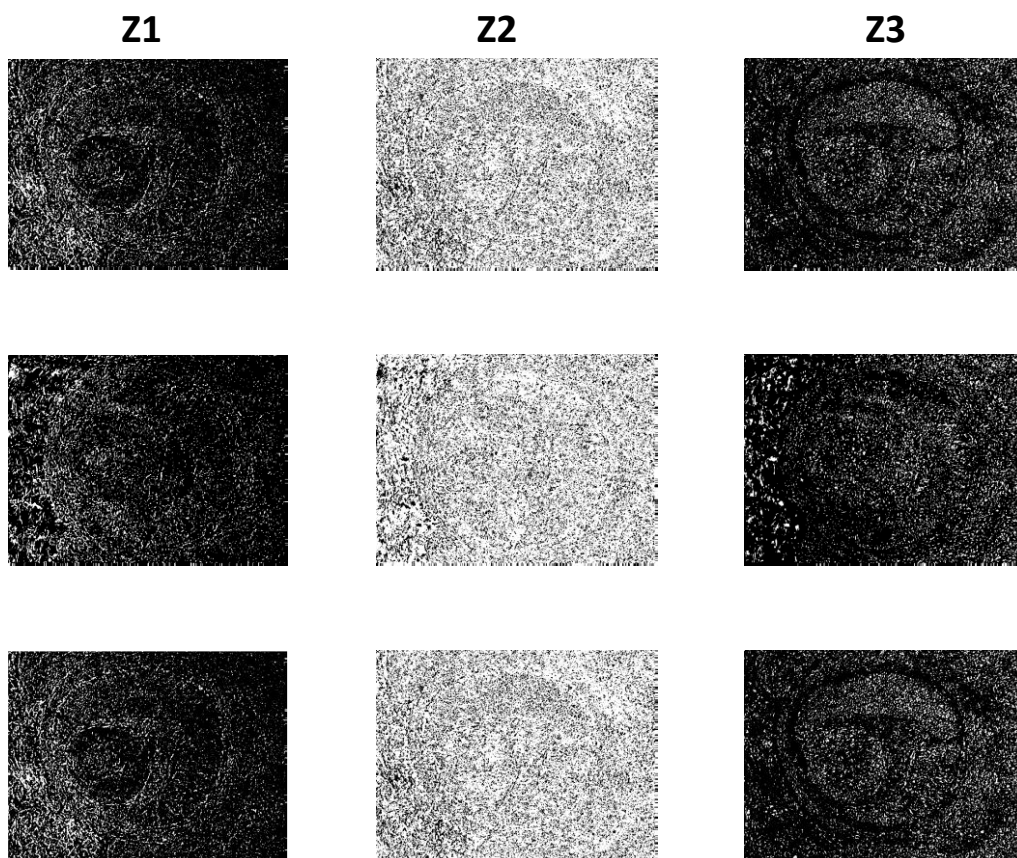
GRUPO D2

FIGURA V- 56: Puntos de la imagen del CP #1 para tres ojos del grupo D2 (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -1 (Z1), entre -1 y 1 (Z2) y mayor que 1 (Z3).



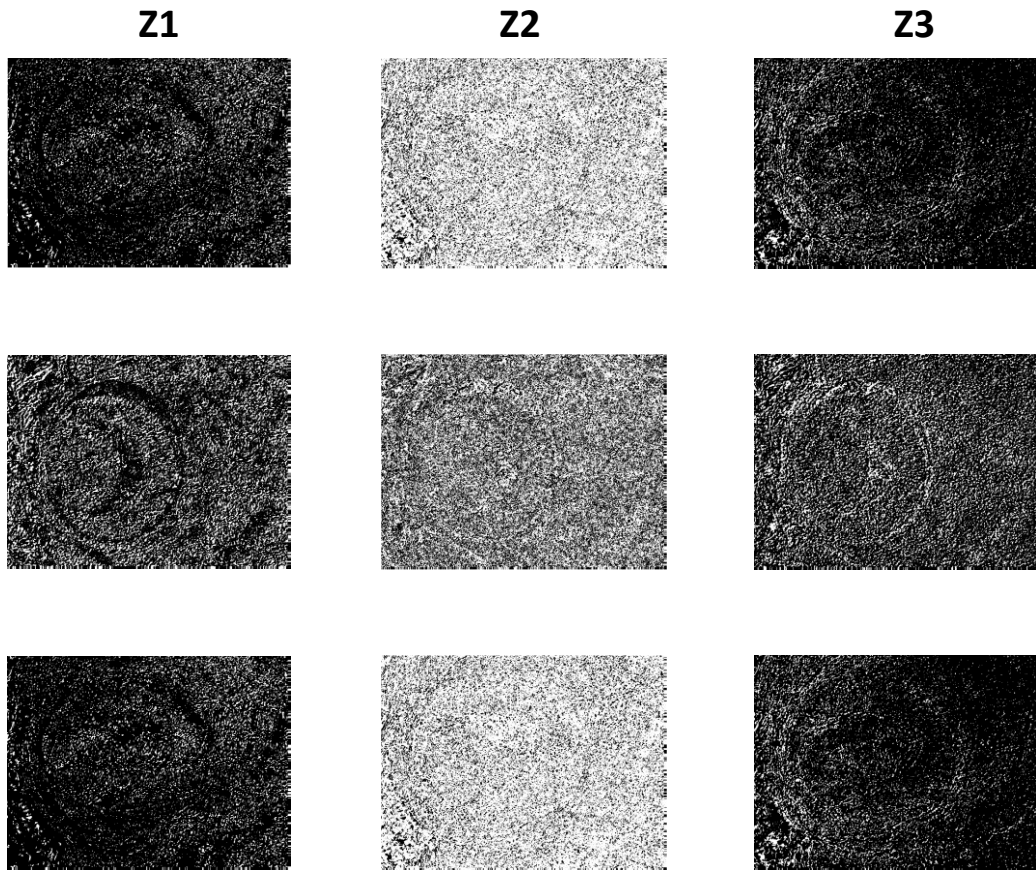
GRUPO D8

FIGURA V- 57: Puntos de la imagen del CP #1 para tres ojos del grupo D8 (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -1 (Z1), entre -1 y 1 (Z2) y mayor que 1 (Z3).



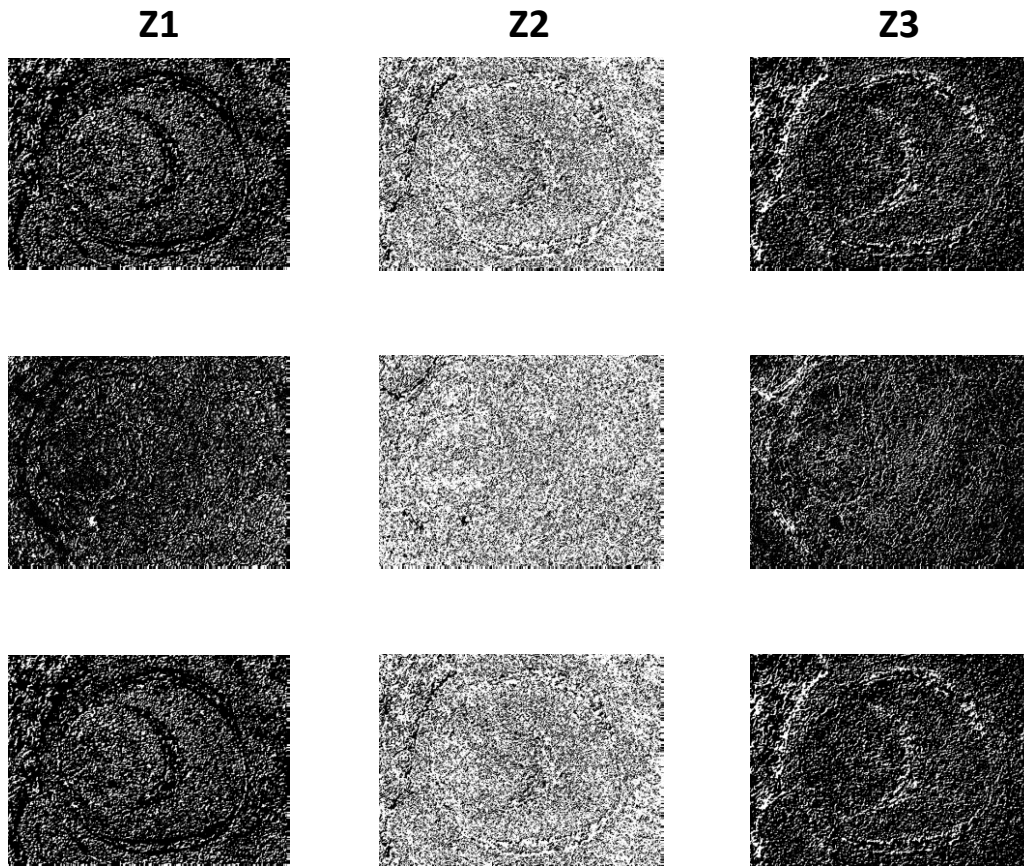
CONTROL

FIGURA V- 58: Puntos de la imagen del CP#3 para tres ojos del grupo control (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -0.2 (Z1), entre -0.2 y 0.2 (Z2) y mayor que 0.2 (Z3).



GRUPO D2

FIGURA V- 59: Puntos de la imagen del CP #3 para tres ojos del grupo D2 (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -0.2 (Z1), entre -0.2 y 0.2 (Z2) y mayor que 0.2 (Z3).



GRUPO D8

FIGURA V- 60: Puntos de la imagen del CP #3 para tres ojos del grupo D8 (fila superior, central e inferior) para la zona inferior a -0.2 (Z1), entre -0.2 y 0.2 (Z2) y mayor que 0.2 (Z3).

Para analizar las imágenes anteriores es importante recordar que la varianza de cada CP es su autovalor y estos están ordenados en orden decreciente de importancia, siendo el primero el mayor de todos. Por otro lado, la varianza de una imagen puede ponerse en relación con el “contraste” que presenta, ya que un fondo uniforme tendrá una varianza cero, mientras que una imagen muy contrastada tendrá una varianza alta. En este sentido es lógico que el CP #1 presente imágenes de mucho mayor contraste que las imágenes del CP#3, donde casi no se advierte ninguna separación importante de estructura en las mismas (véase Fig. V-58, V-59 y V-60). Es en las imágenes del CP#1 donde se ve una clara diferencia entre los puntos de la zona Z1 y los de la zona Z3, correspondientes a los valores menores de -1 y mayores de 1, respectivamente. Estas zonas se corresponden con la zona de vítreo y coroides, frente a la de cristalino y retina, con comportamientos diferenciados. Aunque en los grupos de D2 y D8 esta división entre zonas sigue estando presente (véase Fig. V-56, V-57), su extensión es algo menor que en el grupo control (véase Fig. V-55) y las estructuras espaciales del ojo aparecen más difuminadas y entremezcladas.

Sin embargo, el hecho de que los CPs tengan valores negativos y positivos dificulta a veces su interpretación y comparación entre grupos. Es por ello por lo que se ha realizado un análisis en donde se intente formar imágenes análogas a los CPs, pero con valores positivos a interpretar. A esto se dedica la próxima sección.

1.3 Análisis de abundancias

El análisis de CPs supone descomponer las imágenes de Absorbancia según la descomposición:

$$A(x, \lambda) = A(\lambda) + \sum_{\alpha} a_{\alpha}(\lambda) \cdot CP_{\alpha}(x) \quad (5.29)$$

Siendo x , una coordenada espacial dentro de la imagen, λ la longitud de onda, $a_{\alpha}(\lambda)$ el autovector, y $CP_{\alpha}(x)$, la imagen correspondiente al CP α . Es esta descomposición la que hace que los valores de cada CP tengan de media cero y valores tanto positivos como negativos. Del mismo modo, los autovectores son difíciles de interpretar directamente como espectros ya que también tienen valores positivos y negativos que reflejan valores por encima o por debajo de la Absorbancia media $A(\lambda)$.

Es por esta razón que en el entorno del análisis de imágenes hiperespectrales haya surgido la necesidad de realizar una descomposición análoga a la descrita por la ecuación 5.29, pero del modo:

$$A(x, \lambda) = \sum_k E_k(\lambda) \cdot Ab_k(x) \quad (5.30)$$

Siendo $E_k(\lambda)$ un espectro real que se suele tomar como el de algún pixel representativo en la imagen y denominado “*endmember k*” y $Ab_k(x)$ una imagen espacial de valores positivos que nos da el peso o concentración del *endmember k* en ese punto [14, 15]. La ecuación (5.30) supone resolver no un solo sistema de ecuaciones, sino uno para cada punto x de la imagen, con la condición de que las abundancias deben de ser números mayores que cero (no negativos).

Este algoritmo de mínimos cuadrados no negativos (NNLS), está sujeto a que todas las soluciones sean mayores o iguales a cero. Matemáticamente, obtener las abundancias equivale a resolver para cada punto “ x ” un sistema del tipo $Ux = b$, donde se calcularía x como, $x = U^{-1} \cdot b$. Sin embargo, la matriz U , en nuestro caso la colección de *endmembers k* generalmente no es una matriz cuadrada (el número de longitudes de onda habitualmente es mayor que el número de espectros considerados relevantes), por lo que sólo tiene sentido

hablar de resolver el sistema de manera aproximada mediante el uso de pseudo-inversas. Esto es, usar que $U^T U x = U^T best$, con solución $x = (U^T U)^{-1} U^T best$, que no es exacta ya que $best$ es una aproximación de b [14]. Además, la solución está restringida a considerar sólo valores en los que “ x ” toma valores positivos. Este algoritmo se conoce como NNLS (“Non Negative Least Squares”) y requerir tiempo y potencia de cálculo. Para este trabajo se ha utilizado la implementación del NNLS que aparece en la librería de funciones HyperSpectralToolbox de Matlab de acceso libre [16]. En concreto su función [14].

El problema inicial del cálculo de abundancias es encontrar los espectros que se van a considerar como endmembers. Para ello hay varios algoritmos en la literatura, muchos de los cuáles pueden encontrarse en la librería de MATLAB reseñada más arriba, se basan en diferentes propuestas y están adaptados a diferentes contextos. En general, lo que buscan es que sean espectros que aparezcan en el propio cubo de imágenes y que estén lo más alejados posibles del espectro medio, pero no tanto como para ser considerados como espectros anómalos. Además, una propiedad deseable es que estén situados en el espacio de configuración de tal modo que, respecto a ellos, el conjunto de los espectros forme un conjunto convexo con los endmembers en los extremos de dicho conjunto [15, 17]. Siendo este el requerimiento principal, otras consideraciones como que representen características disjuntas entre sí (ortogonalidad) o que representen estructuras con decreciente orden de varianza, no suelen ser tan relevantes.

Podemos utilizar la estructura de los autovectores asociados a los CPs para producir unos “endmembers” con propiedades interesantes. En la figura V-61 se ha representado en un diagrama “Scatter plot” el valor de los pixeles de las imágenes de absorbancia de un ojo control para las longitudes de onda de las figuras anteriores (azul, verde, rojo). En la misma se han representado las direcciones asociadas a los autovectores de ese “Scatter plot”. Su longitud es proporcional a la dispersión de los datos a lo largo de esas direcciones. Recordemos que la desviación estándar de esa dispersión viene dada por $\sqrt{\Gamma_\alpha}$, siendo Γ_α el autovalor asociado a la dirección α , y que los autovectores tienen módulo unidad. De ahí que si formamos el vector $E_\alpha(\lambda) = A(\lambda) + 2\sqrt{\Gamma_\alpha} a_\alpha(\lambda)$, estamos formando un espectro que se representaría como un pixel situado en los extremos de las flechas rojas de la figura V-61. Estos nuevos vectores seguirían relacionados con los autovectores y a la vez representarían espectros situados en el “exterior” de la nube de puntos que forma el “Scatter plot”, cumpliendo también las condiciones para ser considerados endmembers.

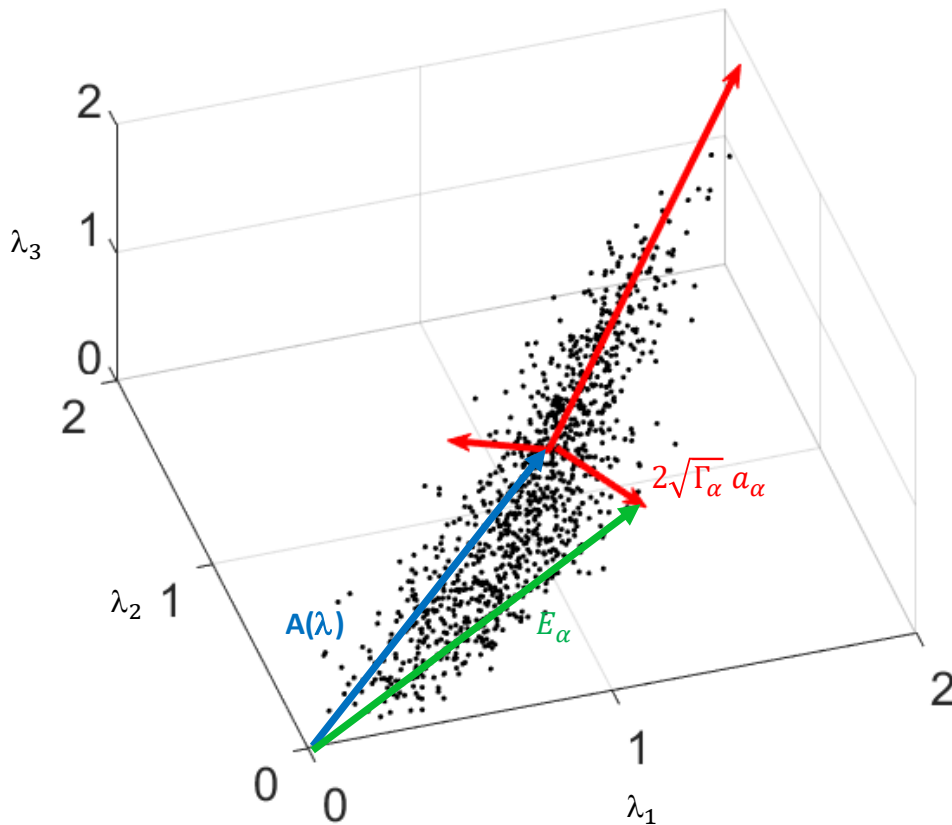


FIGURA V- 61: Representación en diagrama de nube de puntos (scatter plot) de los pixeles de tres imágenes de absorbancia, junto con el vector que representa la absorbancia media, $A(\lambda)$, en azul, junto a los autovectores de las direcciones principales, $a_\alpha(\lambda)$ en rojo. En la parte izquierda, representación de la formación de los endmembers E_α .

Con estos endmembers E_α se puede ya aplicar el algoritmo NNLS que da la imagen de abundancia $Ab(x)$ para cada uno de ellos como un número positivo que podemos relacionar directamente con la “concentración” de dicho espectro en la imagen. Además, dada la ortogonalidad de los autovectores de los que provienen, reflejarán estructuras en la imagen lo más disjuntas posibles y ordenadas en orden de importancia en los datos [18] (es decir, los mapas de abundancia del E1 tenderán a tener valores más altos que los del E2, estos mayores que los del E3, etc.).

En el presente trabajo se va a aplicar el procedimiento anterior, trabajando con los autovectores relevantes del grupo control que hemos visto son representativos también del grupo D2 y D8, dentro de los márgenes de incertidumbre que hemos visto anteriormente. En ese caso, hemos visto que hay cinco autovectores relevantes, por lo que, ahora tendremos

cinco endmembers, según lo explicado anteriormente. Estos endmembers aparecen representados en la figura V-62. Por motivos de visibilidad, sólo se representan los cuatro primeros (el quinto representa una porción de varianza muy pequeña).

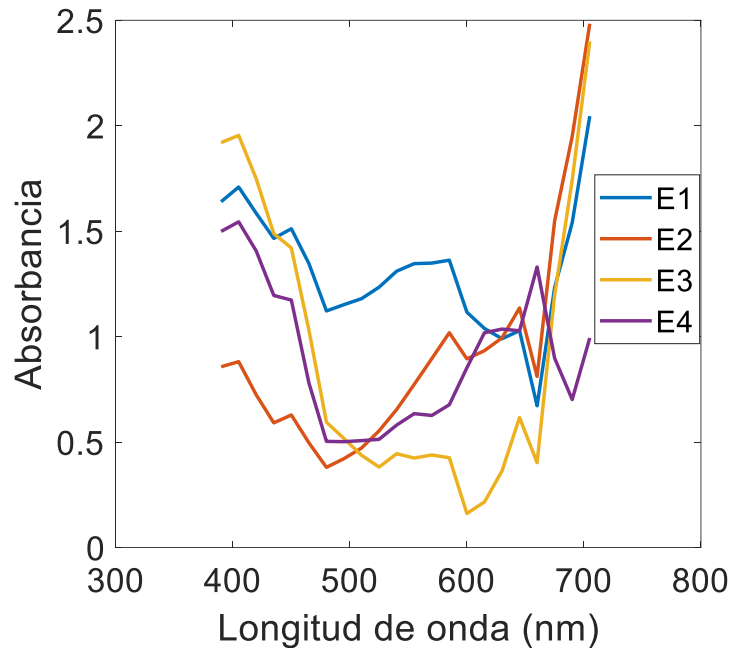


FIGURA V- 62: Endmembers E_{α} del grupo control

Estos endmembers del grupo control serán los usados para calcular los mapas de abundancia, tanto del grupo control como de los ojos del grupo D2 y D8. Para analizar estos mapas, vamos a utilizar de nuevo el procedimiento anterior de estudiar primero la distribución de probabilidad media (media sobre los ojos de cada grupo) de los mapas de abundancia de cada uno de los endmembers de la figura V-62. Los resultados aparecen en la figura V-63. En dicha figura puede verse como las mayores abundancias son para el endmember 1 (primer componente). El segundo tiene valores muy bajos, de ahí que se haya optado por representar sus valores en escala logarítmica. Además, el comportamiento de este endmember es distinto del resto. Para él, los valores de abundancia altos son más probables en el grupo control que en D2 y D8, al contrario que el resto, donde las gráficas del grupo control se sitúan ligeramente por debajo de D2 y D8 para valores altos.

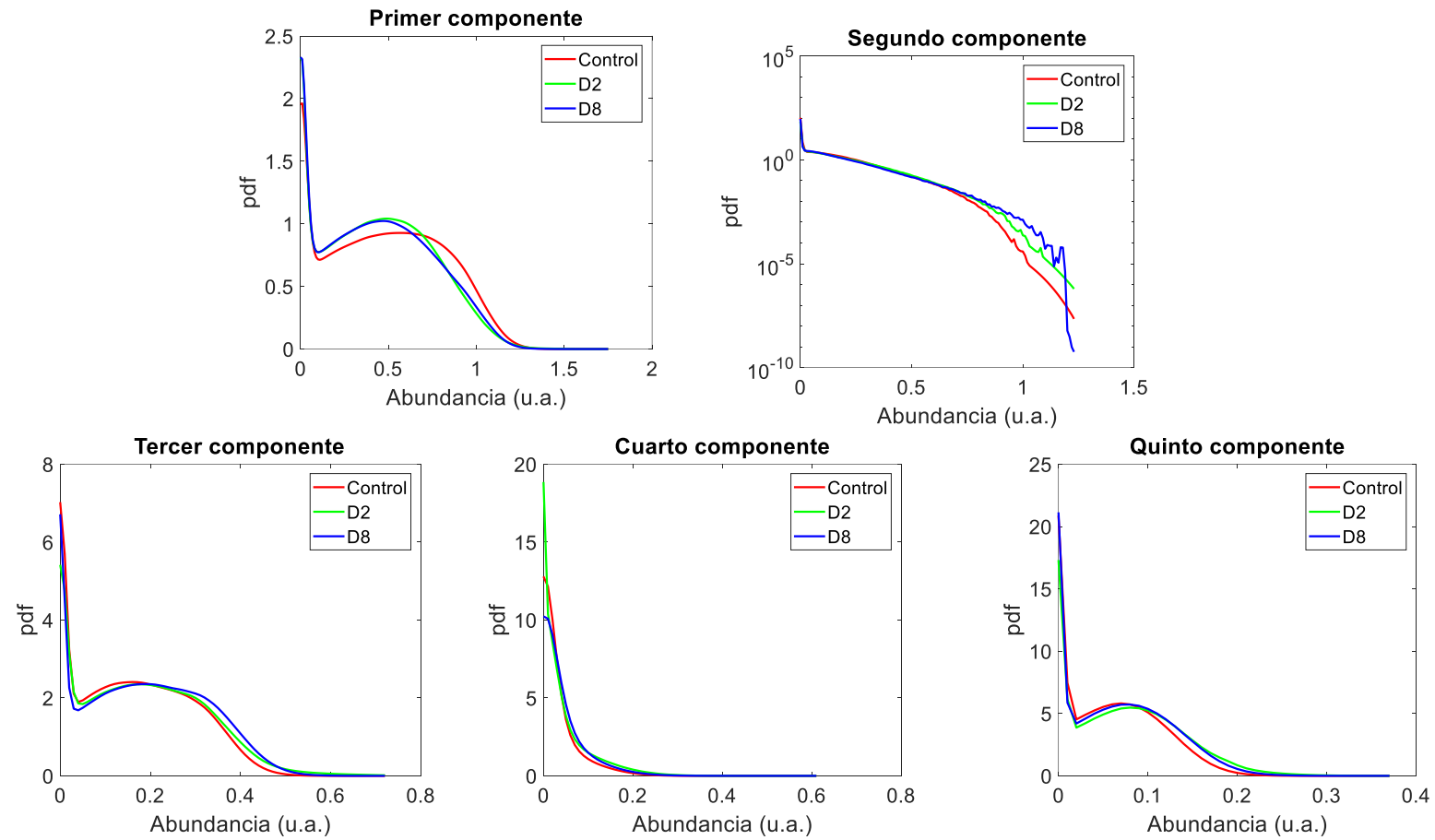


FIGURA V- 63: Distribución de probabilidad media de los mapas de abundancia para cada endmember estudiado para los ojos del grupo control, D2 y D8. Los endmembers utilizados son los del grupo control.

A continuación, se detallan las imágenes de los mapas de abundancias para cada uno de los nueve ojos de cada grupo. Se empieza por el endmember 1 (primer componente), que es el que tiene más relevancia en los datos y el que parece más distinto en su comportamiento entre el grupo control (Fig. V-64) y los grupos D2 y D8 (Fig. V-65 y Fig. V-66).

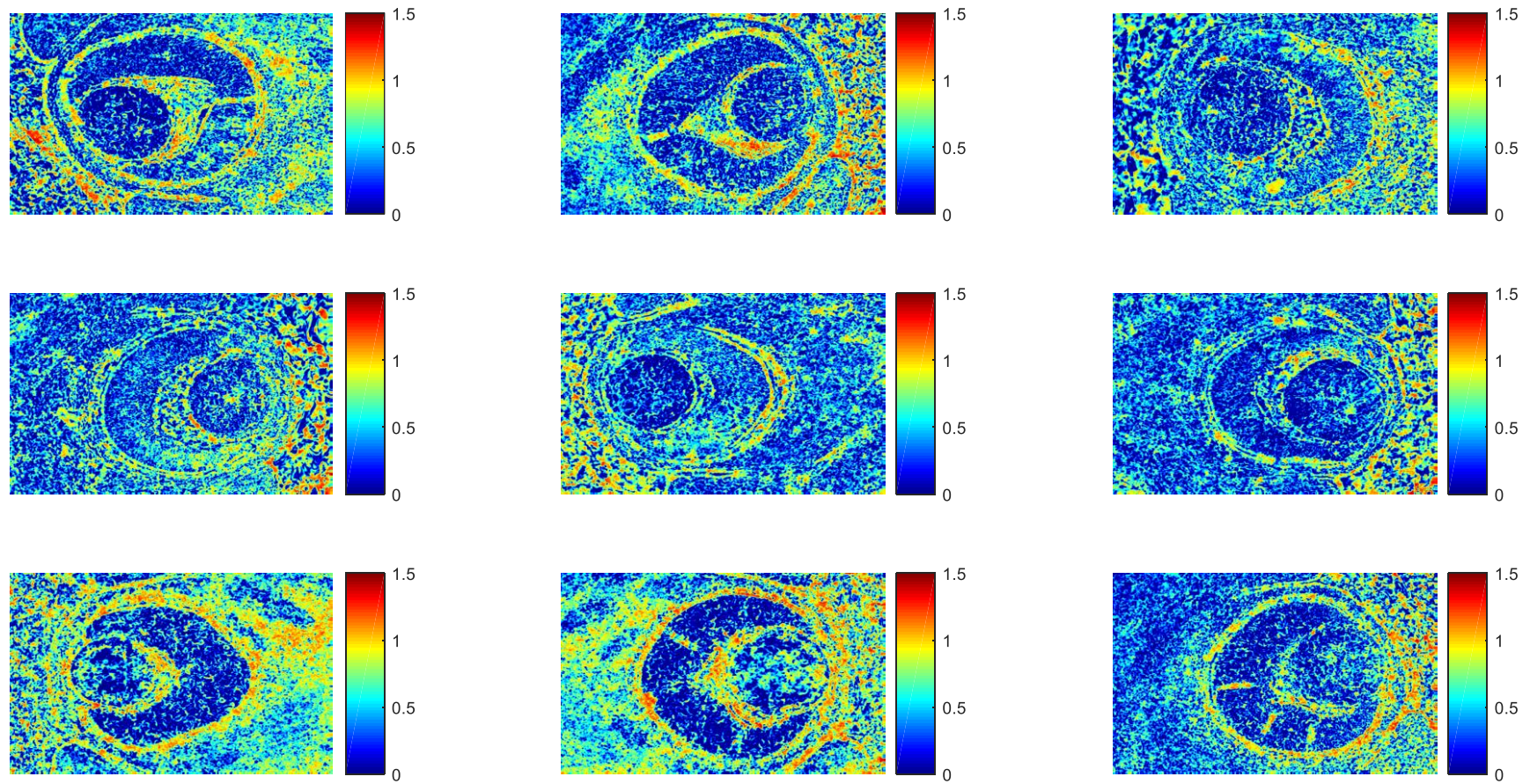


FIGURA V- 64: Mapas de abundancia para el endmember 1 (primer componente) para los nueve ojos del grupo control.

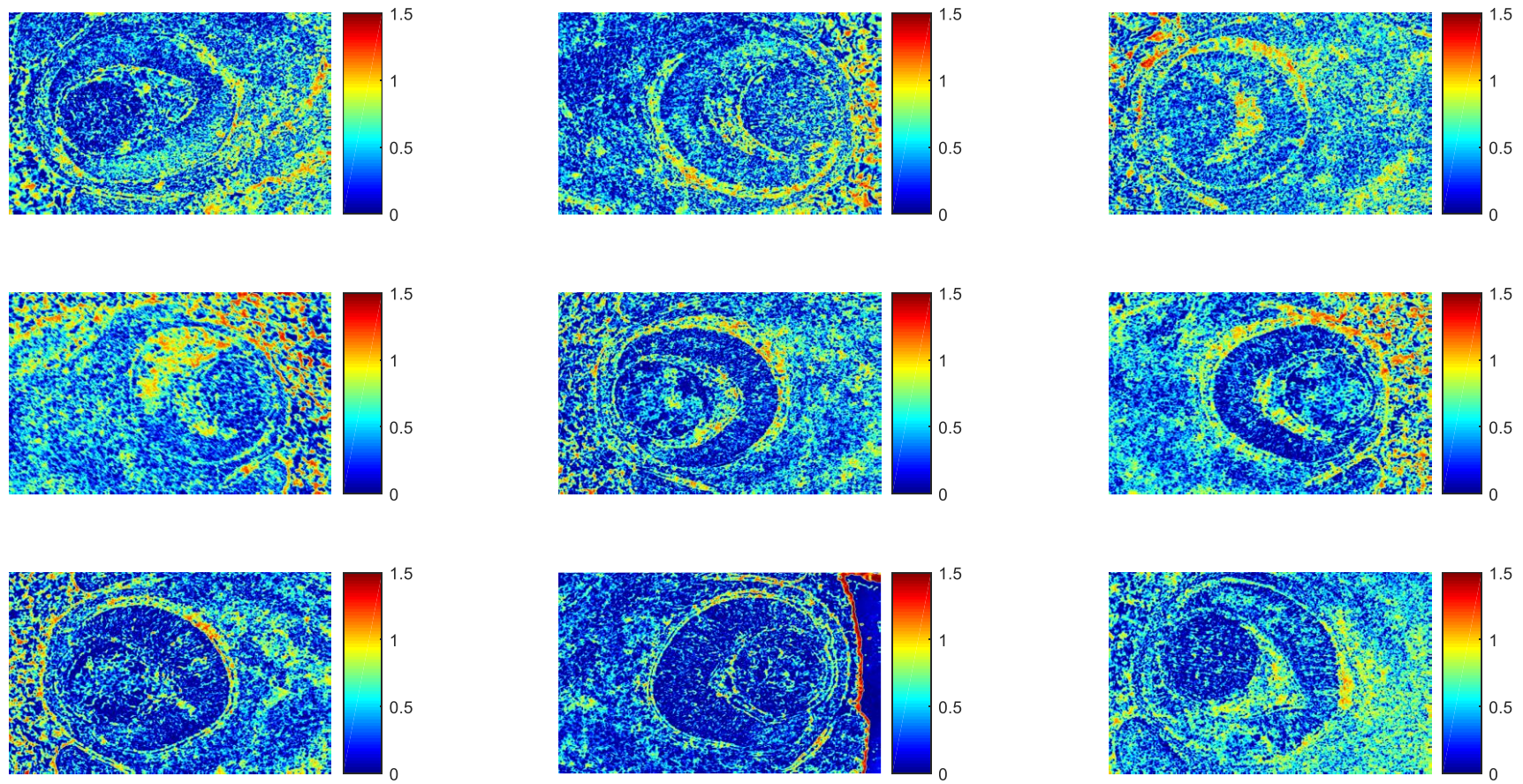


FIGURA V- 65: Mapas de abundancia para el endmember 1 (primer componente) para los nueve ojos del grupo D2.

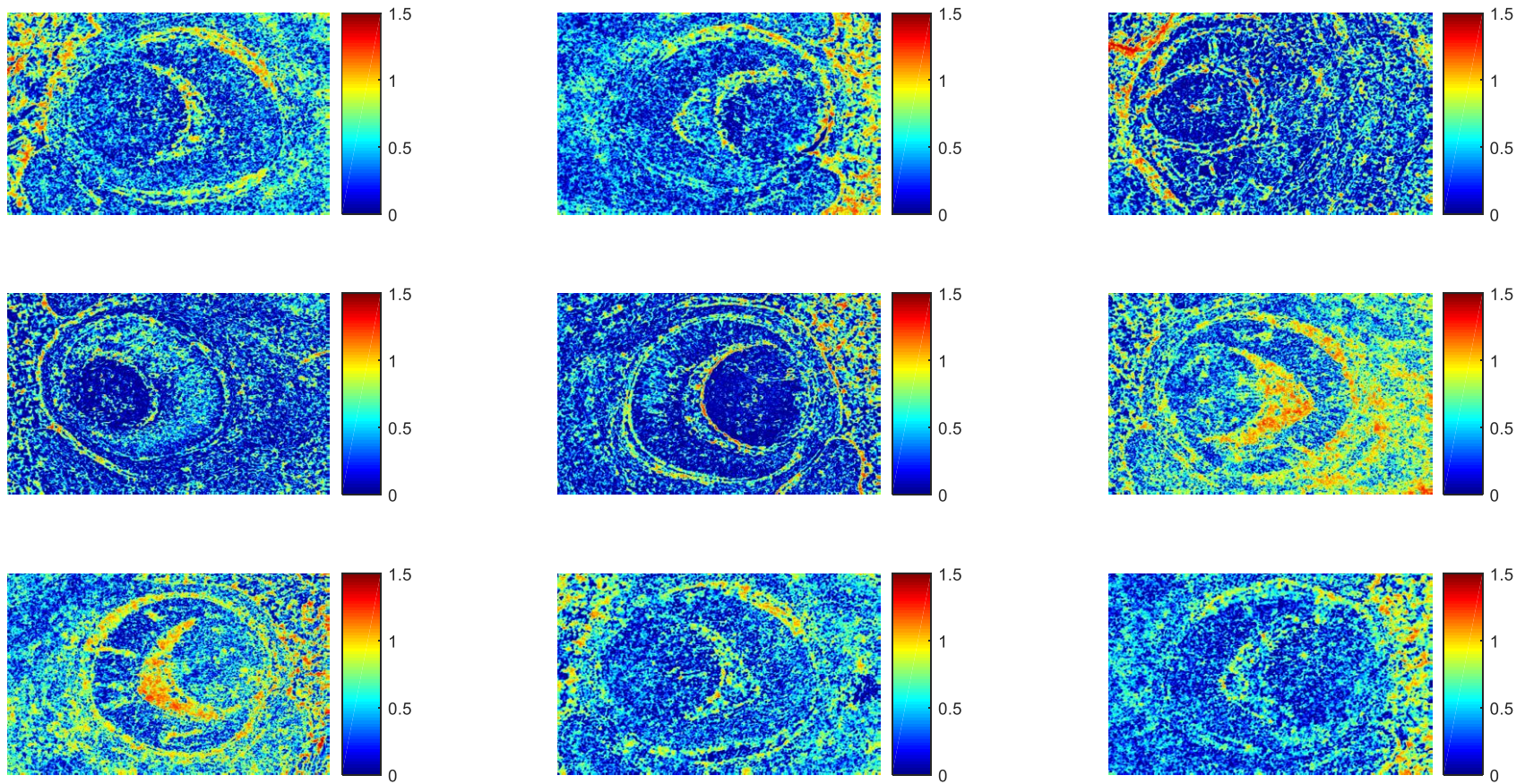


FIGURA V- 66: Mapas de abundancia para el endmember 1 (primer componente) para los nueve ojos del grupo D8.

En los mapas de la abundancia del endmember 1 para los ojos del grupo control (Fig. V-64) puede verse como ese espectro se concentra fundamentalmente en el vítreo y zonas de epitelio, señalando, en la mayoría de los ojos, las zonas de vasos sanguíneos. Sin embargo, en los mapas para las abundancias en el grupo D2 y D8 (Fig. V-65 y V-66, respectivamente), estos puntos de alta abundancia disminuyen, sobre todo en la región del vítreo. En este sentido es de destacar que, en capítulos anteriores, hemos visto como la zona del vítreo tiende a disminuir su tamaño sobre todo en el grupo D8.

El endmember 2 tiene un mapa de abundancias prácticamente igual en todos los grupos. Sus imágenes de abundancias, para todos los ojos, aparecen en las figuras V-67, V-68 y V-69. Tal como se ve, no hay estructuras relevantes asociadas a él, sino que parece deberse a un efecto de la parafina al extenderse por todo el ojo. Los puntos con mayor abundancia (en torno a 1) son escasos y están aislados. Esto remeda un tipo de ruido “salt and pepper” que puede ser debido a efectos de scattering de los granos de parafina sólida.

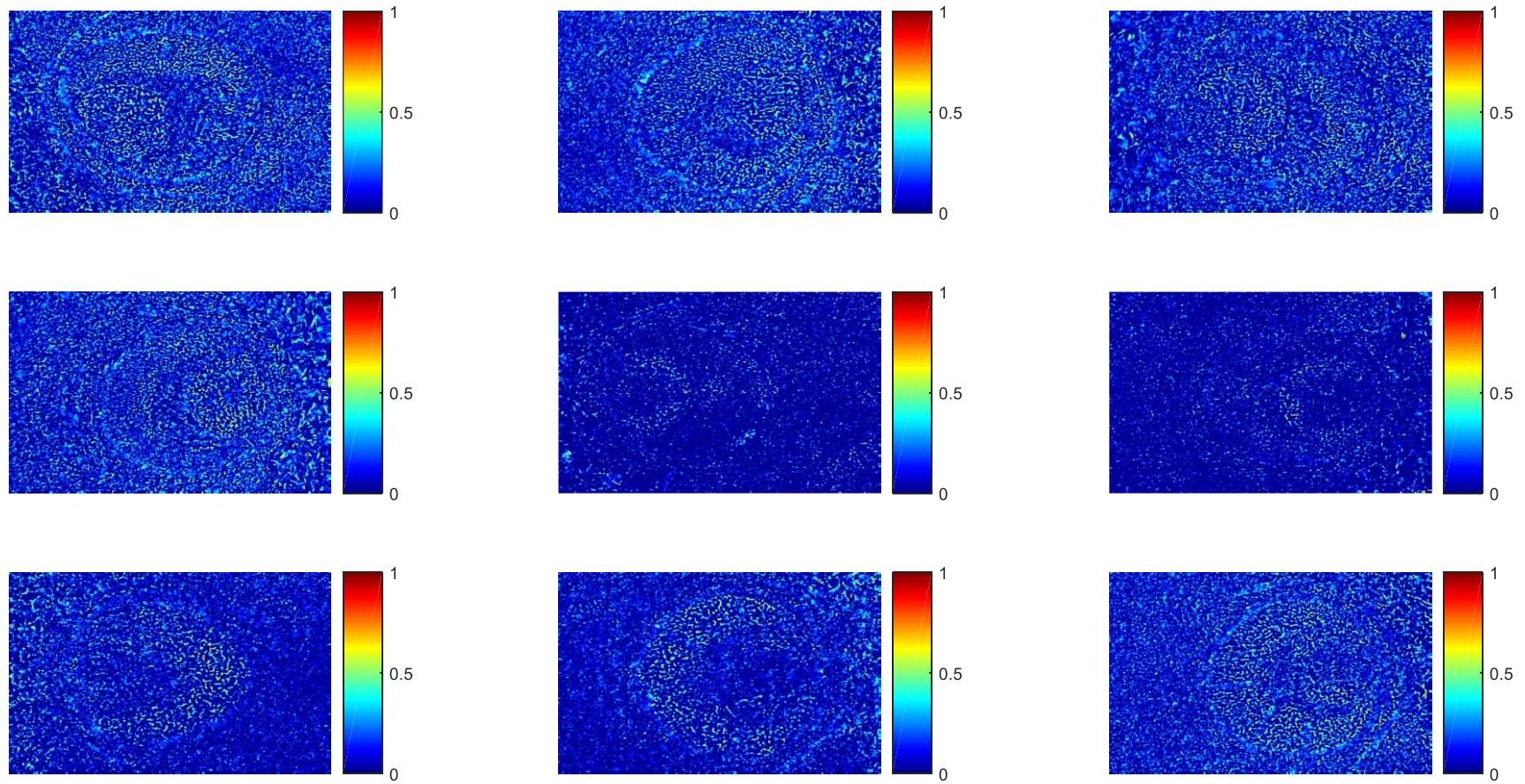


FIGURA V- 67: Mapas de abundancia para el endmember 2 (segundo componente) para los nueve ojos del grupo control.

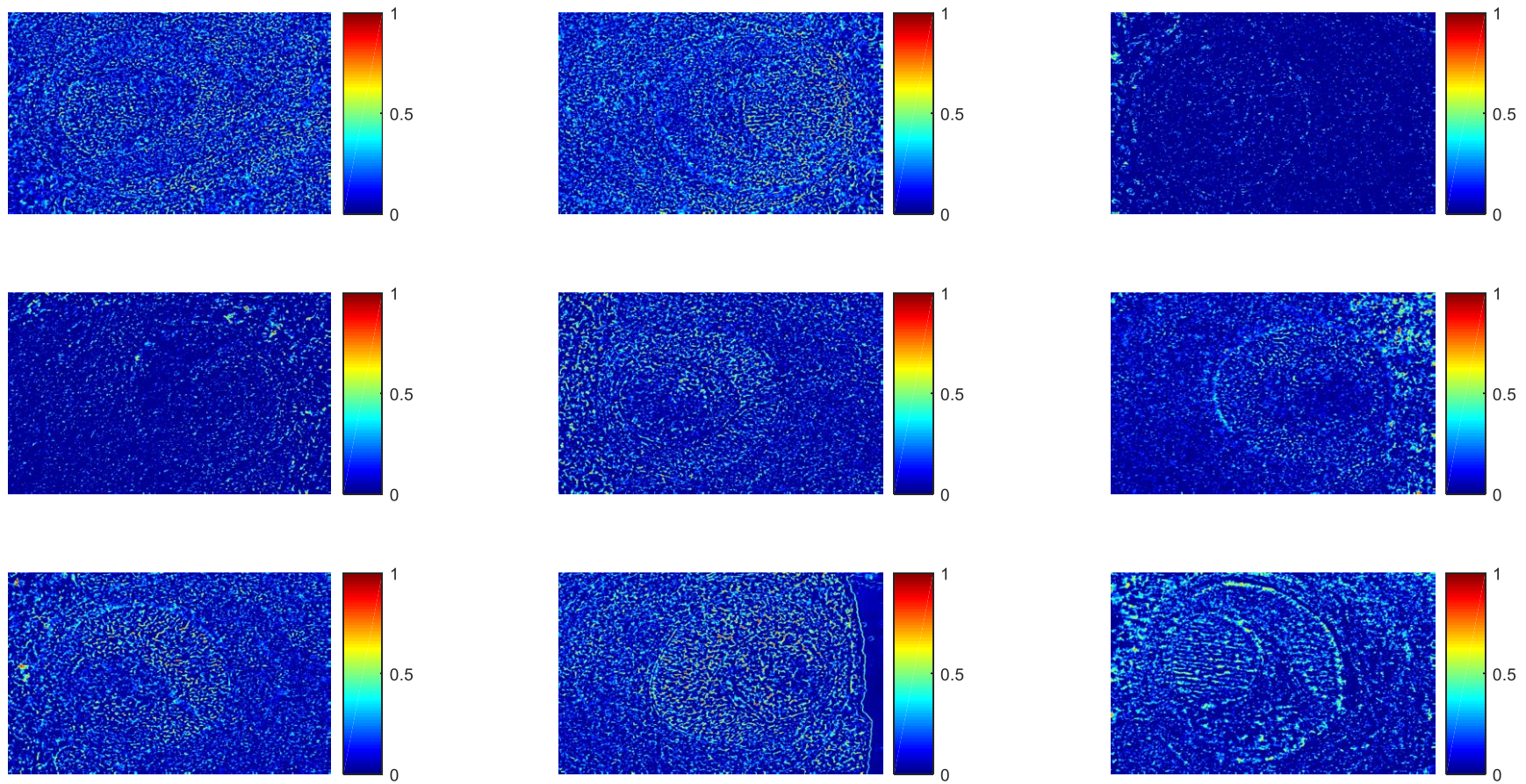


FIGURA V- 68: Mapas de abundancia para el endmember 2 (segundo componente) para los nueve ojos del grupo D2.

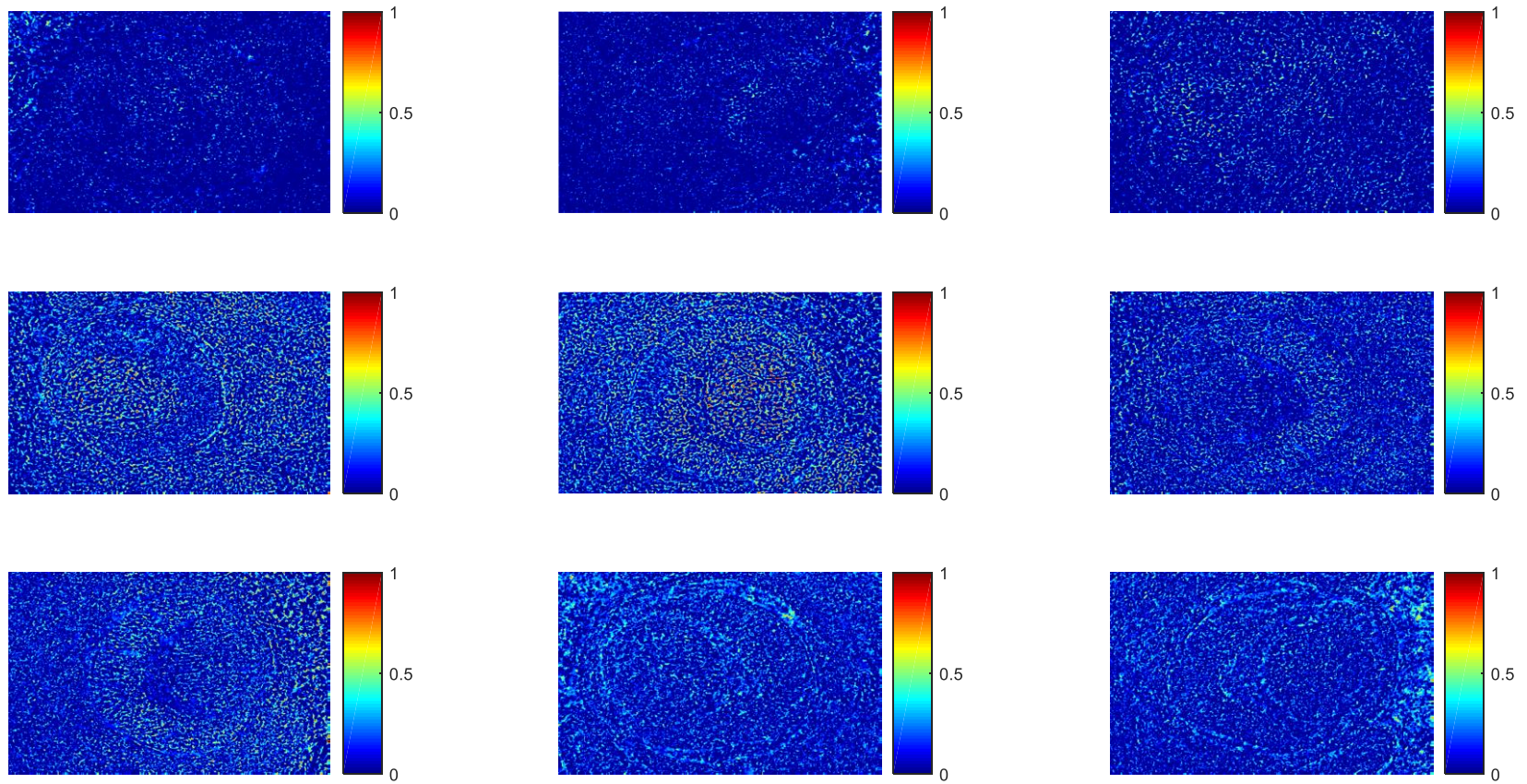


FIGURA V- 69: Mapas de abundancia para el endmember 2 (segundo componente) para los nueve ojos del grupo D8.

En las figuras V-70, V-71 y V-72 se representan los mapas de abundancia de los ojos del grupo control, D2 y D8 para el endmember número 3 (tercer componente). Aparece claramente asociado a estructuras de retina y cristalino y casi ausente en el vítreo y coroides. En el grupo D8, sobre todo por la reducción del vítreo, se produce una extensión espacial de dicho componente y de ahí la mayor presencia de abundancias altas (mayores de 0.2, véase Fig. V-63, 3º componente) en este grupo. En los grupos D2 y D8 el contraste entre coroides y cristalino y retina se hace menos evidente.

Prácticamente el mismo comportamiento puede observarse en los mapas de abundancia del endmember 5 (quinto componente, Fig. V-76, V-77, V-78), también relacionado con las estructuras de cristalino y retina principalmente.

En cambio, los mapas de abundancia asociados al endmember 4 (cuarto componente, Fig. V-73, V-74, V-75) presentan una interesante asociación con la zona de epitelios y laminas basales que rodean vítreo y cristalino, de forma mucho más precisa que los mapas de abundancia del endmember 1. Este efecto no es debido solamente a la distribución de la parafina ya que es distinto en las zonas epiteliales respecto a las zonas anteriores a la córnea donde sólo hay parafina. Esto permite ver cómo, respecto del grupo control, en los grupos de D2 y D8, las líneas que marcan estas zonas están más desdibujadas sugiriendo una posible desestructuración de los epitelios de los grupos D2 y D8 respecto al control (véase Fig. V-63).

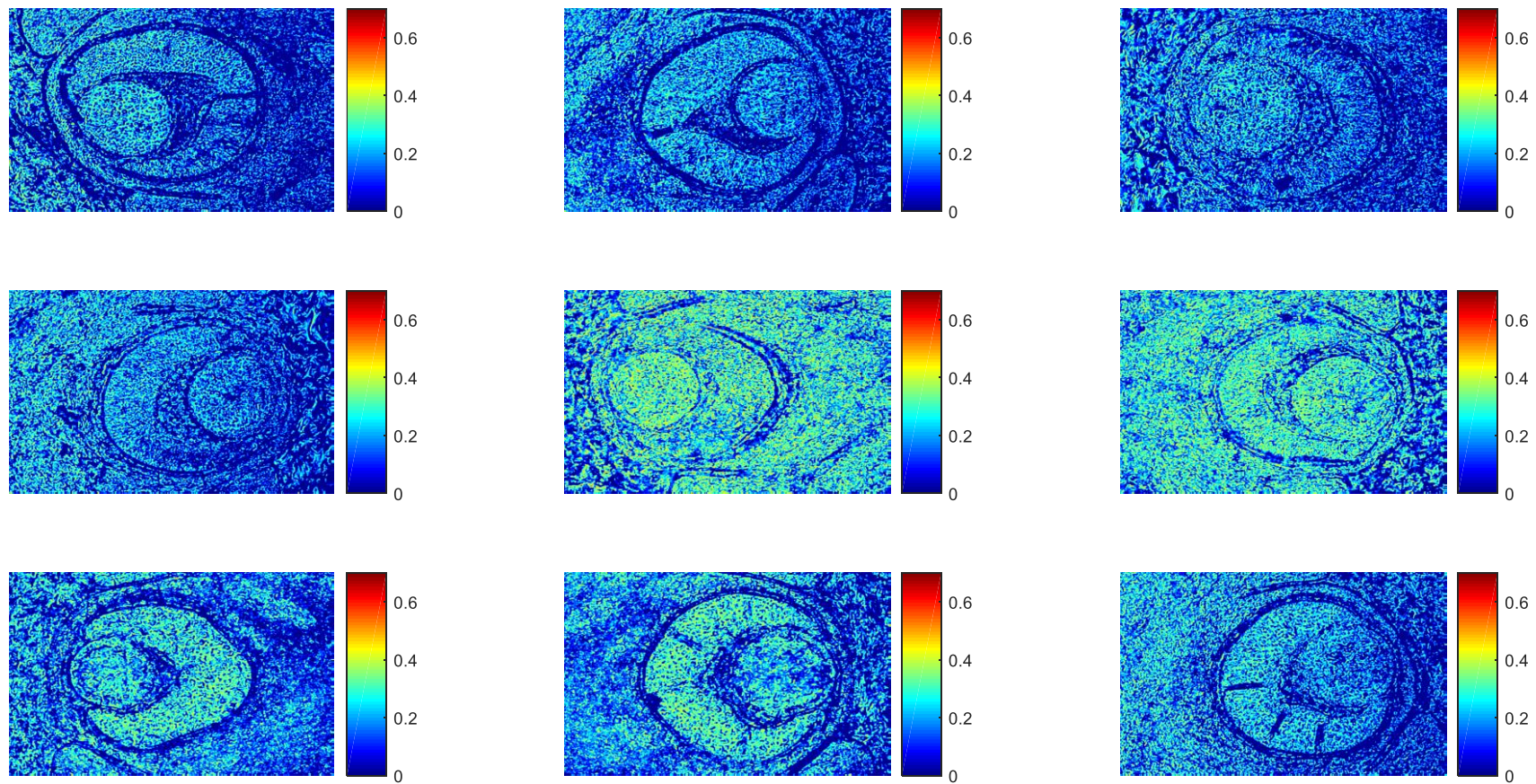


FIGURA V- 70: Mapas de abundancia para el endmember 3 (tercer componente) para los nueve ojos del grupo control.

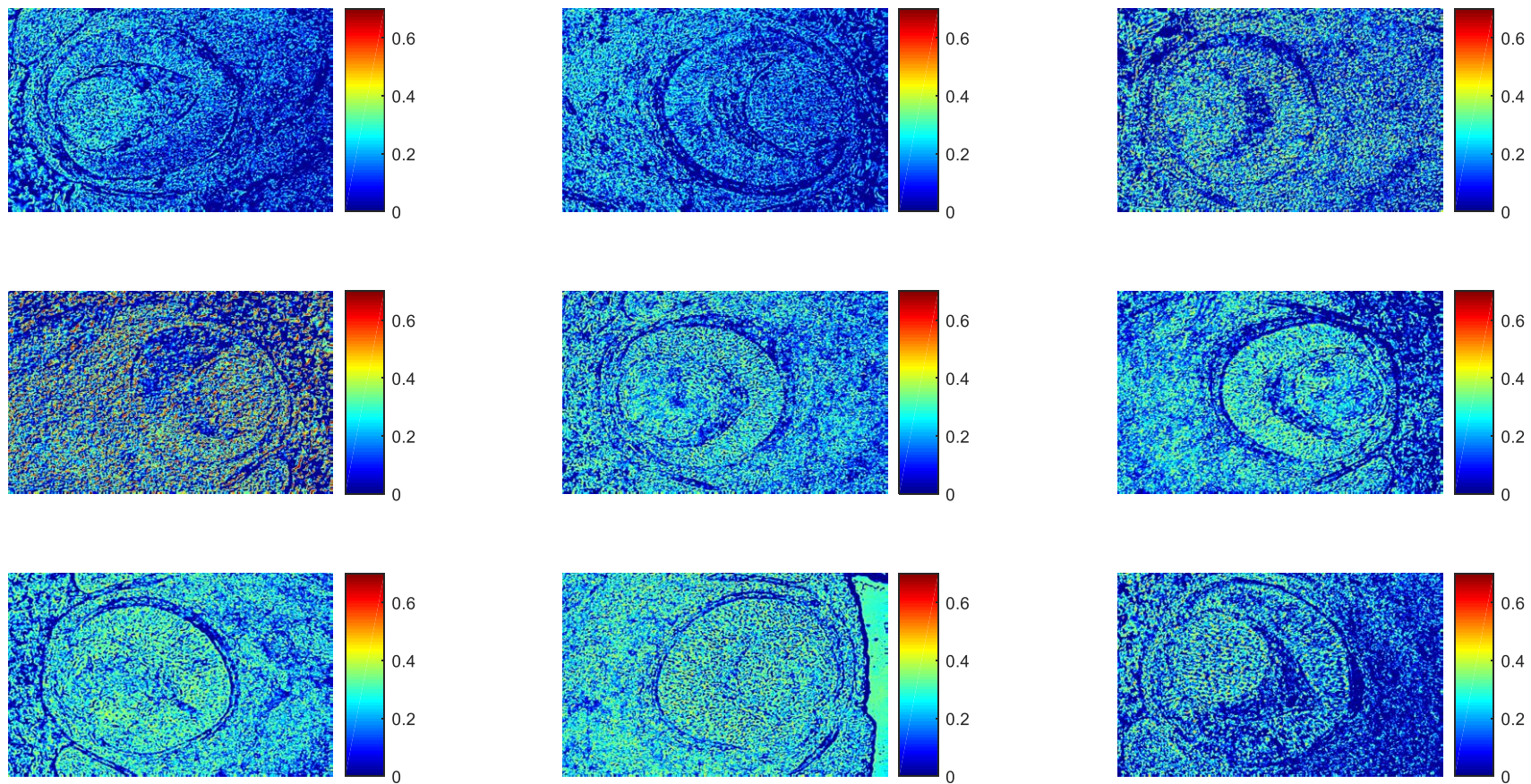


FIGURA V- 71: Mapas de abundancia para el endmember 3 (tercer componente) para los nueve ojos del grupo D2.

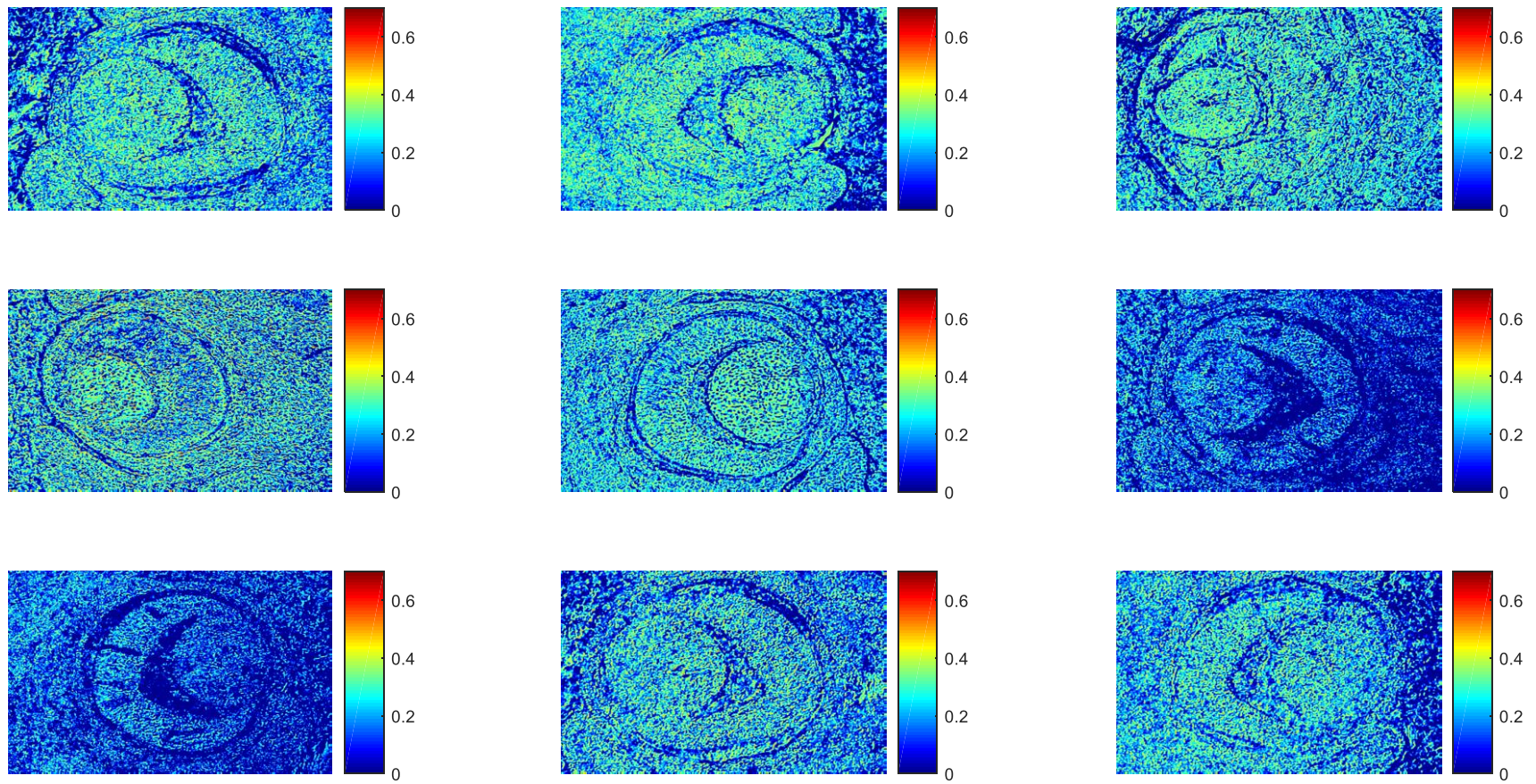


FIGURA V- 72: Mapas de abundancia para el endmember 3 (tercer componente) para los ojos del grupo D8.

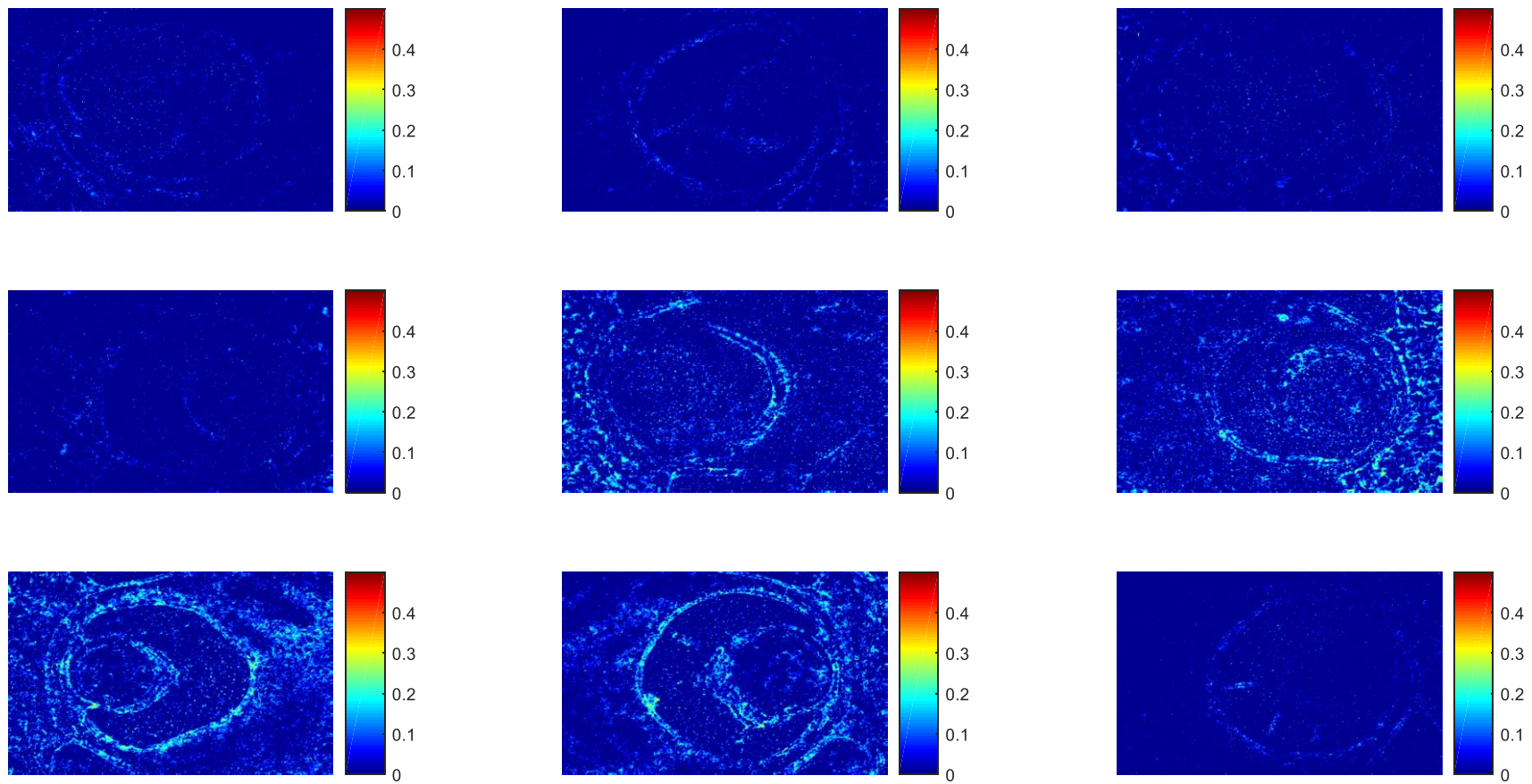


FIGURA V- 73: Mapas de abundancia para el endmember 4 (cuarto componente) para los nueve ojos del grupo control.

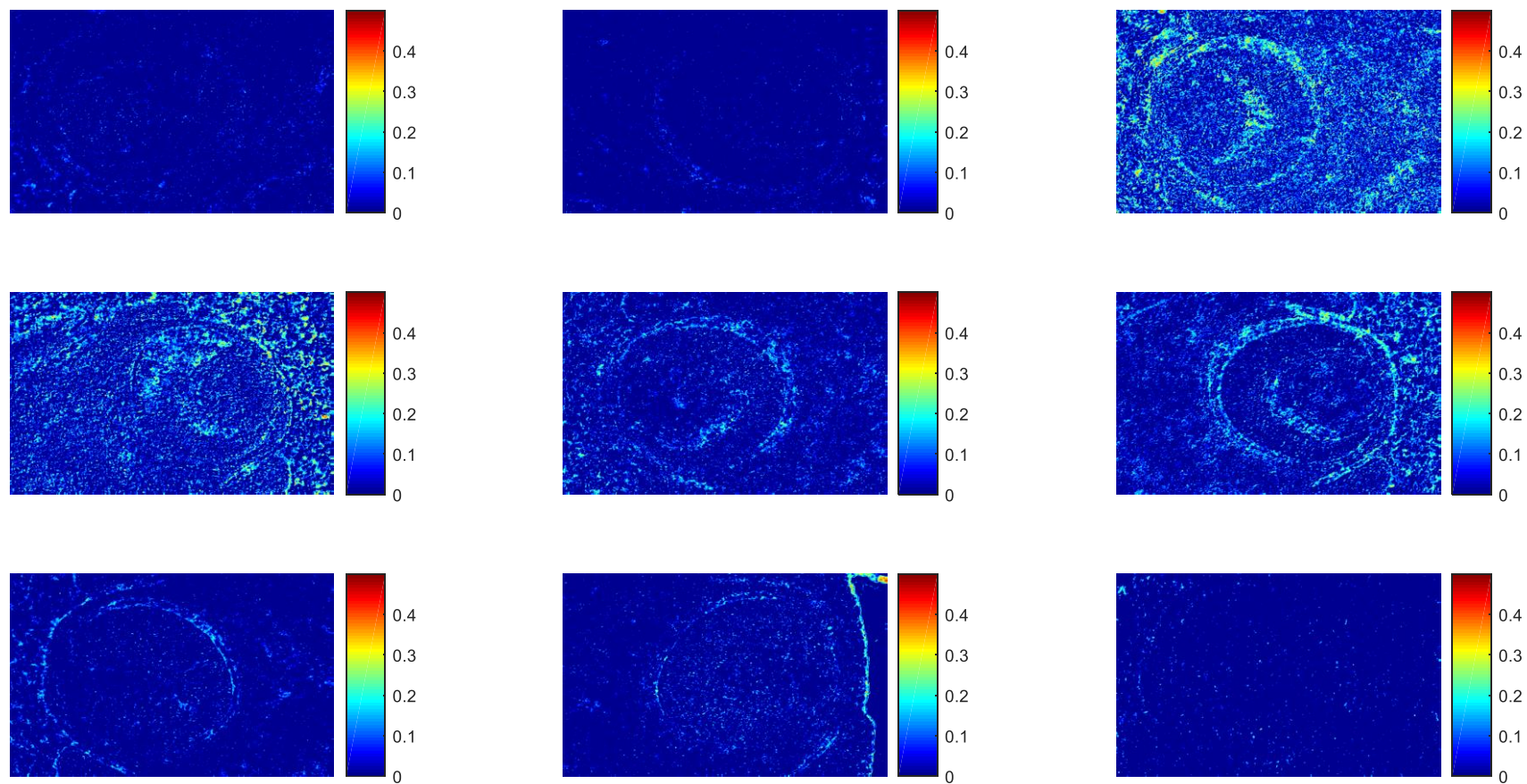


FIGURA V- 74: Mapas de abundancia para el endmember 4 (cuarto componente) para los nueve ojos del grupo D2.

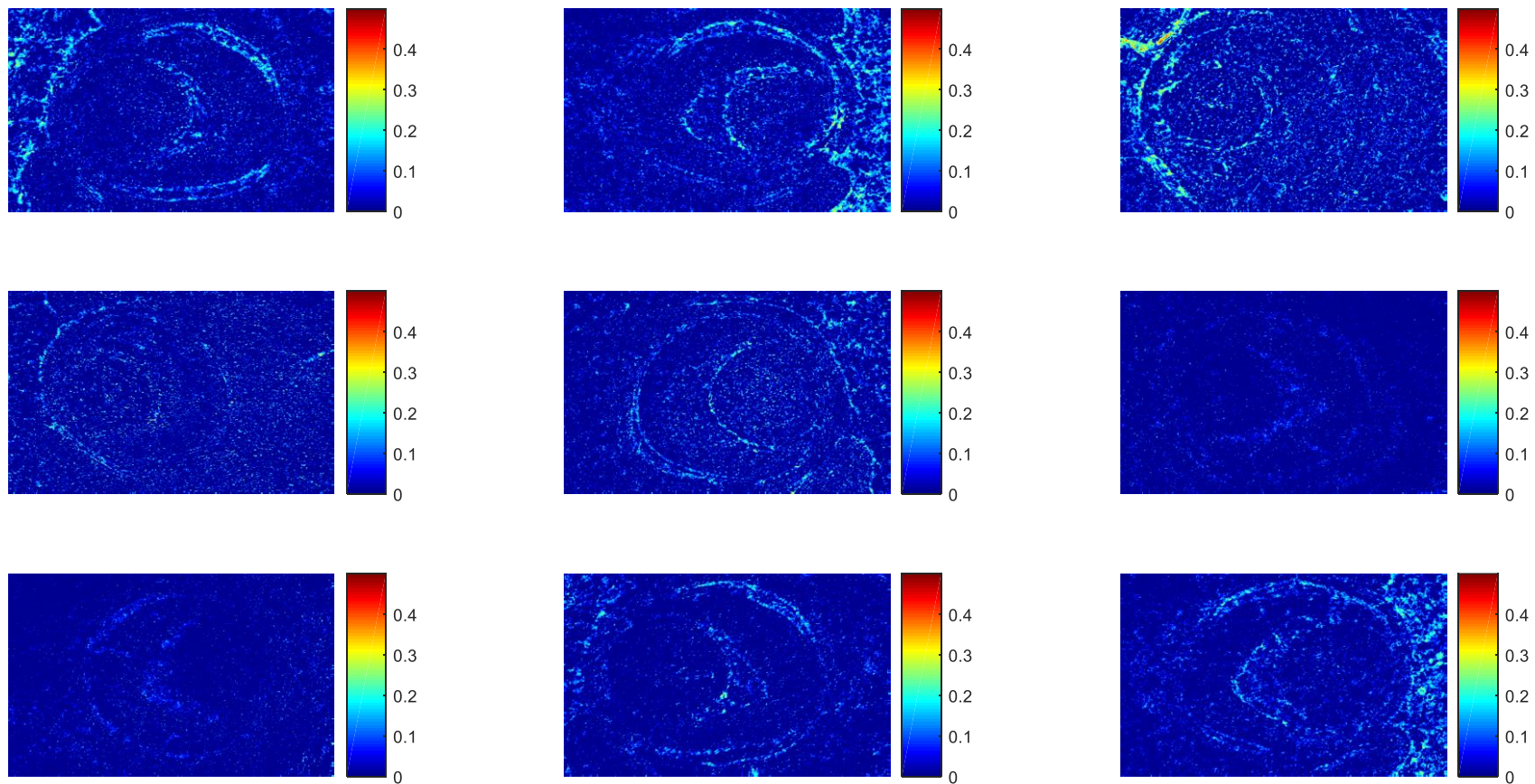


FIGURA V- 75: Mapas de abundancia para el endmember 4 (cuarto componente) para los nueve ojos del grupo D8.

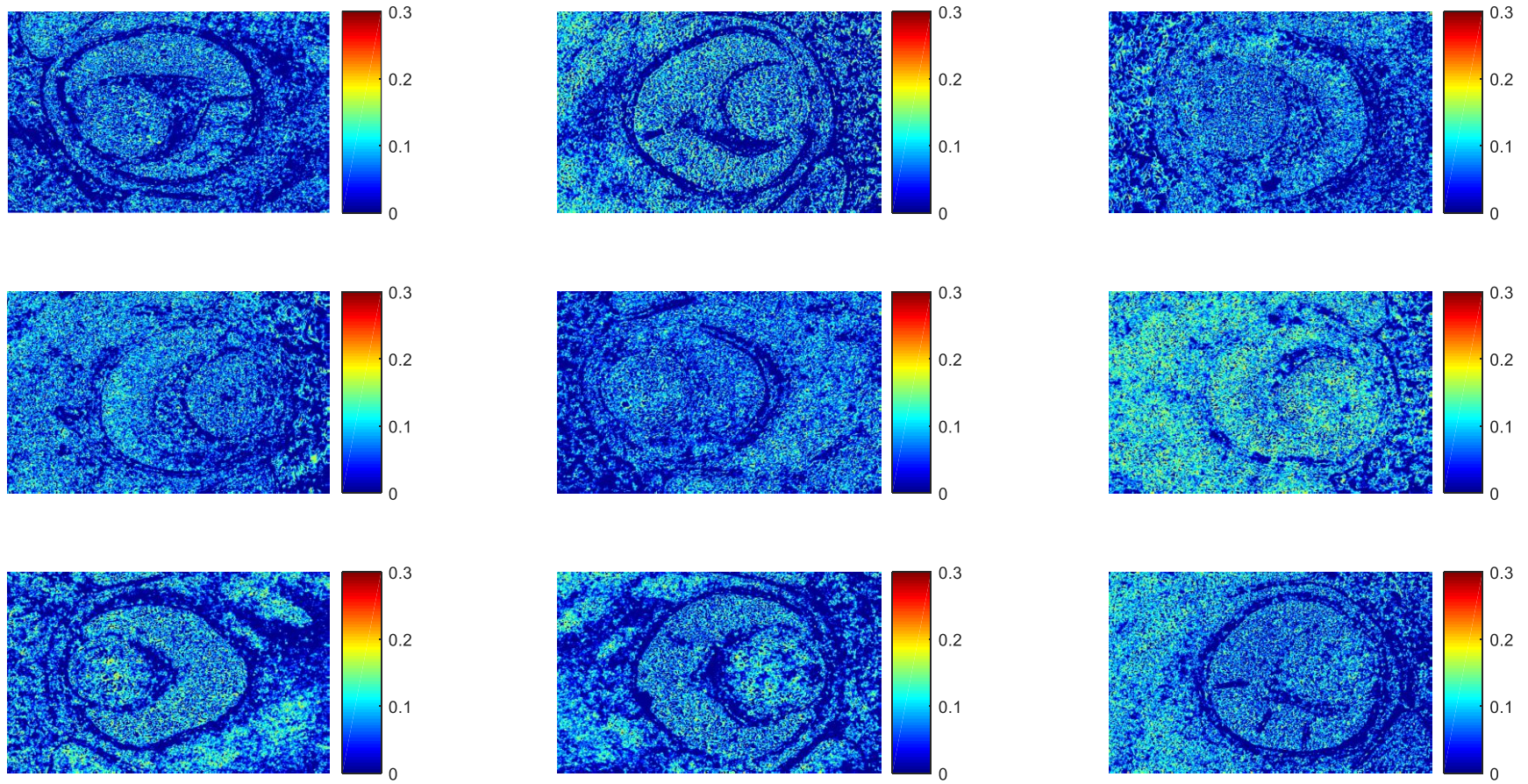


FIGURA V- 76: Mapas de abundancia para el endmember 5 (quinto componente) para los nueve ojos del grupo control.

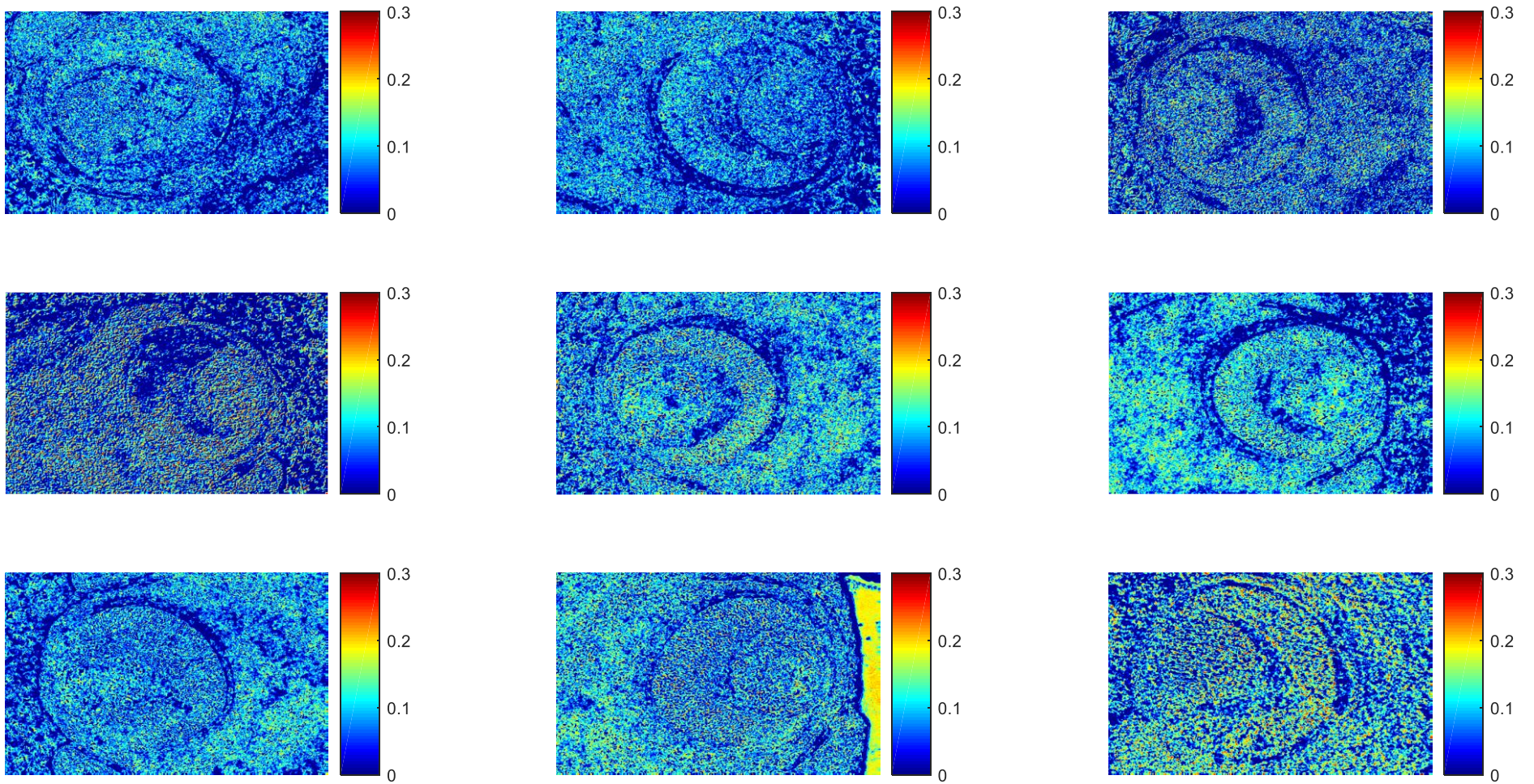


FIGURA V- 77: Mapas de abundancia para el endmember 5 (quinto componente) para los nueve ojos del grupo D2.

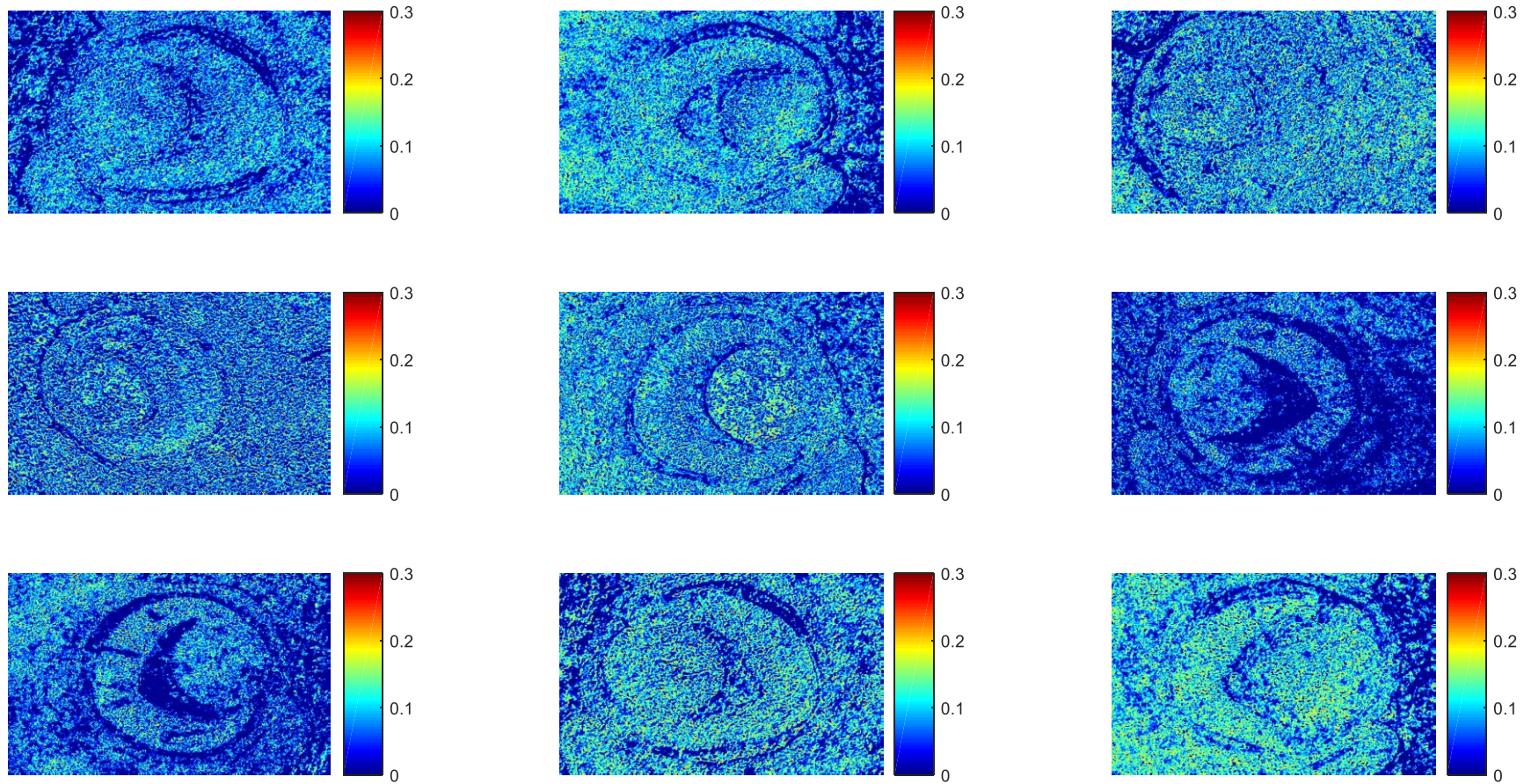


FIGURA V- 78: Mapas de abundancia para el endmember 5 (quinto componente) para los nueve ojos del grupo D8.

III. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO V

En este capítulo presentamos una descripción de un método mediante el cual se mide a la vez el estado de polarización y la diferencia espectral entre las estructuras oculares del control y los grupos deficitarios D2 y D8. Ambos experimentos presentados en este capítulo resultan útiles en la medida en que ciertos cambios observados en las estructuras de los ojos de los embriones (D2 y D8) pueden ser empleados para estudiar con otras técnicas, y más detalladamente, las alteraciones encontradas. En general, dado que las alteraciones se ven reflejadas tanto en el experimento de polarización como en el de imágenes multiespectrales hace de ambas técnicas una herramienta excelente para diagnosticar cambios en los tejidos.

Los resultados de polarización muestran que a medida que aumenta el déficit materno de AF, algunas estructuras oculares (cristalino, córnea, retina, vítreo y coroides) de los embriones de los grupos D2 y D8 tienen valores de DOP y DOLP menores que el control, esto significa que la luz en estos lugares se despolariza. Al analizar los resultados obtenidos del DOCP se observa que en estas mismas estructuras se produce un aumento de DOCP. La explicación es que, al incidir luz polarizada lineal sobre estas estructuras se convierte en luz polarizada circular. Como se ha dicho anteriormente, los cambios en el estado de polarización incidente en una muestra se deben a dos fenómenos: la birrefringencia del tejido, así como la despolarización por scattering. Basándonos en los resultados, hemos decidido comprobar el primer fenómeno calculando la birrefringencia de los tejidos oculares y hemos observado un aumento en la birrefringencia en los grupos D2 y D8 comparados con el control. Cabe señalar que la birrefringencia circular (retardo) en el tejido puede surgir debido a la presencia de moléculas quirales ópticamente activas asimétricas como la glucosa, las proteínas y los lípidos [19]. Además, los cambios en la anisotropía en los tejidos se deben a varias causas como por ejemplo la progresión de una enfermedad. Ésta suele alterar las propiedades ópticas de birrefringencia [20].

Nuestra técnica de polarimetría usa tres longitudes de onda distintas (445nm, 540nm y 660nm) para evaluar el DOP, DOLP, DOCP y la birrefringencia y, en general, el resultado obtenido está formado por mapas de imágenes que contienen información detallada de la estructura estudiada (el ojo) con un buen contraste y resolución. La información que nos aporta las tres longitudes de onda es prácticamente similar con una pequeña diferencia en

algunas zonas. Por ello, con usar solo una de ellas podríamos comprobar cambios espaciales relevantes en el estado de polarización de la luz transmitida desde el ojo.

Por otra parte, se ha demostrado que la despolarización está asociada intrínsecamente con el scattering [21]. Por esta razón se ha aplicado el método de ACP a una secuencia de imágenes DOP (tomadas en diferentes longitudes de onda) de cristalinos control y de los grupos D2 y D8 para comprobar este hecho. Hemos observado que en muchos casos la disminución de DOP está correlacionada negativamente con la sobreexpresión de las proteínas, especialmente con la laminina-1. Esto, se observa fundamentalmente cuando correlacionamos la DFCL con el incremento del DOP. Si trasladamos toda esta información al ojo, donde la disminución del DOP se da sobre todo en el vítreo y la coroides, es probable que esté relacionada también con la sobreexpresión de la laminina-1 (y seguramente otras moléculas) ya que la laminina-1 y el colágeno IV son dos constituyentes importantes de las láminas basales vasculares [22].

Por otra parte, hemos observado en el capítulo IV que los cambios más grandes en el espectro multifractal, con un aumento de la DF se daban en el vítreo para el caso de marcajes con anti-laminina-1. Lo cual concuerda con la disminución del DOP que hemos visto en esta zona.

Respecto a la caracterización de las imágenes multiespectrales hemos visto como el componente 1 y 4 marcan varias estructuras como el vítreo, la lámina basal del EPR y la coroides de manera más notable, mientras que el 3 y 5 aparecen asociados al cristalino y retina. El componente 2 es el que aparece más ligado a una distribución espacial de la parafina reflejando componentes claramente aleatorios. La forma espectral del componente 2 también se parece al comportamiento espectral de las capas de parafina sólida, aunque estas son fuertemente dependientes del grosor y también del modo en que se agregan formando estructuras granulares que pueden cambiar las propiedades de scattering de las muestras [23].

Por orden de relevancia es el componente 1 el que da un mayor contraste por estructuras tanto en las imágenes del propio CP como en las de abundancia. Su comportamiento espectral muestra la tendencia general de la absorbancia media. Las zonas donde hay más diferencia son 450-500 nm, un pico a 550 nm y una caída a partir de 600 nm. De todos los cromóforos que pueden estar presentes en el ojo y que puedan exhibir un comportamiento de este tipo se ha seleccionado a la Hemoglobina-Oxihemoglobina, cuyo coeficiente de absorción molar se muestra en la siguiente figura V-79.

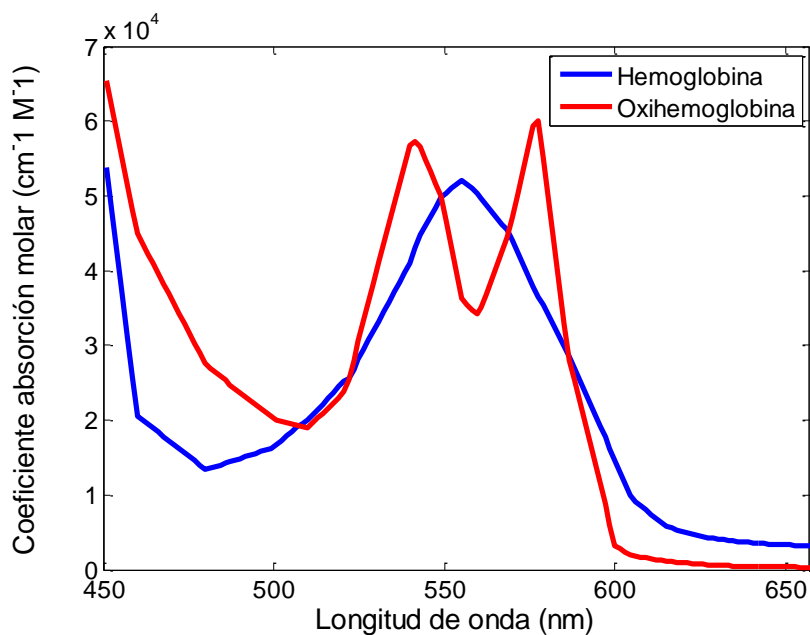


FIGURA V- 79: Coeficiente de absorción molar de la Hemoglobina y Oxihemoglobina.

Es conocido que el déficit de AF afecta muy directamente al metabolismo de los glóbulos rojos y el balance de oxígeno que estos pueden llevar a los tejidos. De hecho, es la falta de oxígeno en los tejidos es la que, por déficit de ácido fólico, desencadena toda una serie de respuestas adaptativas por parte del organismo. En especial la proliferación y cambio de tamaño de vasos sanguíneos, así como cambios en la forma de los glóbulos rojos (suelen deformarse tendiendo a una forma esférica) [24, 25].

Estas alteraciones deberían verse, por tanto, en aquellas zonas donde es normal ver vasos sanguíneos, como vítreo y coroides. Estas zonas son, precisamente, las que aparecen como marcadas en las imágenes de diferencias en comportamiento espectral entre el grupo control y los grupos D2 y D8 para el primer CP (ver también endmember 1). Es tentador, por tanto, vincular los cambios detectados, a un desequilibrio en los niveles de Hemoglobina y Oxihemoglobina producidos por el déficit de AF. De hecho, ya hemos observado en el capítulo II que en los embriones con déficit materno de AF se observan alteraciones en el patrón vascular. En los individuos donde el epitelio pigmentado continúa su desarrollo sin conexión con la retina neural, los vasos de la coroides están poco desarrollados y son muy pequeños. En contraste, cuando ambas capas permanecen juntas los vasos aumentan considerablemente de tamaño y son mayores que los de embriones control. En algunos mutantes de ratón, los vasos de la coriocapilar están muy dilatados como consecuencia de un incremento de factores angiogénicos [26].

La alteración del patrón vascular observado en el cuerpo vítreo y en la coroides, podría estar desencadenada por la hipoxia dependiente del déficit de AF. Como consecuencia de la hipoxia se produce angiogénesis, eritropoyesis y vasodilatación [27]. Así, las alteraciones del patrón vascular que hemos observado en nuestro estudio, tanto en la coroides como en el vítreo, podría ser causado por la hipoxia generada por el déficit de AF.

El resto de los componentes que representarían la variabilidad restante estarían asociados a un diferente componente espectral en el cristalino y retina fundamentalmente y también estarían asociados a los componentes de la MEC. Nos podemos aventurar y pensar que esto se debería a modificación en la expresión de los componentes de las láminas basales (colágeno IV, laminina-1, fibronectina...), ya que en el capítulo III hemos mostrado que el déficit dietario materno de AF altera la expresión de las moléculas del colágeno IV y la laminina-1, en varias estructuras oculares.

Nuestros resultados experimentales muestran que la caracterización óptica de tejidos mediante la polarimetría y las imágenes multiespectrales se puede utilizar para discriminar tejidos patológicos de manera eficiente. Los dos métodos revelan información sobre cambios estructurales y bioquímicos en los distintos componentes de los órganos corporales.

IV. REFERENCIAS DEL 5º CAPÍTULO

1. Jacques SL, Roman JR, Lee K: **Imaging superficial tissues with polarized light.** *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* 2000, **26**(2):119-129.
2. Tuchin VV: **Light scattering study of tissues.** *Physics-uspekhi* 1997, **40**(5):495.
3. Makita S, Yasuno Y, Endo T, Itoh M, Yatagai T: **Polarization contrast imaging of biological tissues by polarization-sensitive Fourier-domain optical coherence tomography.** *Applied optics* 2006, **45**(6):1142-1147.
4. Demos S, Alfano R: **Optical polarization imaging.** *Applied optics* 1997, **36**(1):150-155.
5. Hecht E: **Óptica**, Tercera edición edn: Pearson Educación-Madrid (España); 2000.
6. Stokes G: *Trans Cambridge Philos Soc* 1852, **9**:399.
7. Collett E: **Polarized light. Fundamentals and applications.** *Optical Engineering, New York: Dekker,| c1992* 1992.
8. Bickel WS, Bailey WM: **Stokes vectors, Mueller matrices, and polarized scattered light.** *American Journal of Physics* 1985, **53**(5):468-478.
9. Collett E: **Field guide to polarization.** In: *2005*: Spie Bellingham, WA; 2005.
10. Tuchin VV: **Polarized light interaction with tissues.** *Journal of biomedical optics* 2016, **21**(7):071114.
11. Li J, Yao G, Wang LV: **Degree of polarization in laser speckles from turbid media: Implications in tissue optics.** *Journal of Biomedical Optics* 2002, **7**(3):307-312.
12. Sankaran V, Walsh JT, Maitland DJ: **Comparative study of polarized light propagation in biologic tissues.** *Journal of biomedical optics* 2002, **7**(3):300-307.
13. Louie DC, Phillips J, Tchivaleva L, Kalia S, Lui H, Wang W, Lee TK: **Degree of optical polarization as a tool for detecting melanoma: proof of principle.** *Journal of biomedical optics* 2018, **23**(12):125004.
14. Bro R, De Jong S: **A fast non-negativity-constrained least squares algorithm.** *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* 1997, **11**(5):393-401.
15. Martínez PJ, Pérez RM, Plaza A, Aguilar PL, Cantero MC, Plaza J: **Endmember extraction algorithms from hyperspectral images.** *Annals of Geophysics* 2006, **49**(1).
16. Gerg I, Kun D: **Matlab hyperspectral toolbox.** In.; 2012.
17. Chaudhry F, Wu C-C, Liu W, Chang C-I, Plaza A: **Pixel purity index-based algorithms for endmember extraction from hyperspectral imagery.** *Recent advances in hyperspectral signal and image processing* 2006, **37**(2):29-62.
18. Van der Meer FD, Jia X: **Collinearity and orthogonality of endmembers in linear spectral unmixing.** *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 2012, **18**:491-503.
19. McNichols RJ, Cote GL: **Optical glucose sensing in biological fluids: an overview.** *Journal of biomedical optics* 2000, **5**(1):5-17.
20. Angelsky OV, Ushenko AG, Ushenko YG, Tomka YY: **Polarization singularities of biological tissues images.** *Journal of biomedical optics* 2006, **11**(5):054030.
21. Bass M, DeCusatis C, Enoch J, Lakshminarayanan V, Li G, Macdonald C, Mahajan V, Van Stryland E: **Handbook of Optics, Volume I: Geometrical and Physical Optics, Polarized Light, Components and Instruments (set):** McGraw-Hill, Inc. New York, NY, USA; 2010.
22. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, Fässler R, Gu G, Gerber H-P, Ferrara N: **The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and β cell proliferation.** *Developmental cell* 2006, **10**(3):397-405.

23. Goia F, Zinzi M, Carnielo E, Serra V: **Characterization of the optical properties of a PCM glazing system.** *Energy Procedia* 2012, **30**:428-437.
24. Mozos I: **Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases.** *BioMed research international* 2015, **2015**.
25. Verduzco LA, Nathan DG: **Sickle cell disease and stroke.** *Blood* 2009, **114**(25):5117-5125.
26. Janssen A, Hoellenriegel J, Fogarasi M, Schrewe H, Seeliger M, Tamm E, Ohlmann A, May CA, Weber BH, Stöhr H: **Abnormal vessel formation in the choroid of mice lacking tissue inhibitor of metalloprotease-3.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2008, **49**(7):2812-2822.
27. Xu B, Doughman Y, Turakhia M, Jiang W, Landsettle CE, Agani FH, Semenza GL, Watanabe M, Yang Y-C: **Partial rescue of defects in Cited2-deficient embryos by HIF-1 α heterozygosity.** *Developmental biology* 2007, **301**(1):130-140.

Conclusiones

A la vista de los resultados y discusiones que hemos desarrollado en esta tesis se concluye:

- ✓ El déficit dietario materno de AF durante las dos primeras semanas de gestación produce malformaciones estadísticamente significativas en el segmento anterior del ojo y en los vasos coroideos. Periodos más prolongados de déficit de AF producen aumento de defectos oculares congénitos.
- ✓ La biometría ocular está afectada por la falta de AF. El cristalino resultó más pequeño y esférico, y la retina más engrosada respecto al control.
- ✓ El déficit de AF altera la expresión de las proteínas de la MEC, colágeno IV y laminina-1, en el cristalino, córnea y retina. Además, hemos determinado cambios en la localización de la expresión de estas moléculas.
- ✓ La utilización conjunta de varias técnicas de procesamiento de imágenes tales como el análisis multifractal, la Transformada de Fourier y la autocorrelación, han determinado alteraciones en la organización espacial de las moléculas estudiadas y cambios significativos en la textura de estructuras oculares. Estas herramientas se muestran como métodos fáciles y rápidos para un análisis preliminar de tejidos biológicos.
- ✓ Los cambios encontrados de colágeno IV y laminina-1 están relacionados con el déficit dietario materno de AF y por tanto involucrados en la aparición de malformaciones oculares congénitas.
- ✓ La aplicación de las técnicas ópticas, polarimetría e imágenes multiespectrales, para caracterizar los tejidos nos ha proporcionado excelente información sobre todo a nivel vascular. Hemos podido comprobar cambios en el grado de polarización y en el comportamiento espectral en el vítreo y en la coroides. Además de cambios en la textura del cristalino y la retina. Los dos métodos descritos podrían ser aplicados en diagnósticos clínicos ya que permiten visualizar mejor los detalles en los tejidos o estructuras.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

Publicaciones:

1. **Sijilmassi O.**, López Alonso J. M., Barrio Asensio M.C., & Del Río Sevilla A.: Collagen IV and laminin-1 expression in embryonic mouse lens using principal components analysis technique. *Journal of Microscopy* 2018, 271(2): 207-221.
2. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A., Murillo González J., & Barrio Asensio M.C.: Biometric alterations of mouse embryonic eye structures due to short-term folic acid deficiency. *Current eye research* 2019, 44(4): 428-435.
3. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Barrio Asensio M.C., & Del Río Sevilla A.: Alteration of lens and retina textures from mice embryos with folic acid deficiency: image processing analysis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2019, 257(1):111-123.
4. **Sijilmassi O.**: Folic acid deficiency and vision: a review. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2019, 257(8):1573-1580.
5. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Multifractal analysis of embryonic eye structures from female mice with dietary folic acid deficiency. Part I: Fractal Dimension, lacunarity, divergence, and multifractal spectrum. (Enviado).
6. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Multifractal analysis of embryonic eye structures from female mice with dietary folic acid deficiency. Part II: Local Connected Fractal Dimension Analysis. (Enviado).

Comunicaciones a congresos:

1. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M.: Comunicación Poster: "Análisis multifractal aplicado a imágenes multiespectrales de tejidos oculares con déficit de ácido fólico", XII Jornadas Complutenses, XI congreso nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y XVI congreso de ciencias veterinarias y biomédicas, *Psychologia Latina (Suplemento SJP)*, Volumen especial, Madrid, España, (2017).
2. **Sijilmassi O.**, Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación Poster: " Estudio estadístico de las malformaciones oculares debidas al déficit de ácido fólico", XII Jornadas Complutenses, XI congreso nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y XVI congreso de ciencias veterinarias y biomédicas, *Psychologia Latina (Suplemento SJP)*, Volumen especial, Madrid, España, (2017).

3. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación oral: " Estudio inmunohistoquímico y óptico de tejidos oculares con malformaciones congénitas asociadas al déficit de ácido fólico", PhDay-UCM Facultad de Óptica y Optometría pp:21-22, Madrid, España, (2017). [**Primer premio a la mejor comunicación**]
4. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación oral: "Estudio experimental de las malformaciones oculares congénitas asociadas con dieta materna deficitaria en Ácido Fólico", 25º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica, OPTOM 18, Madrid, España, (2018).
5. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación oral: "Técnicas de procesamiento digital de imágenes para el análisis de tejidos de embriones con déficit materno de ácido fólico", II Congreso Nacional/ IV Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la interdisciplinariedad, JIFFI, Granada, España, (2019).
6. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación Poster: " Caracterización de diferencias multiespectrales entre grupos de imágenes biológicas: componentes principales y tratamiento de imágenes", XI Reunión Española de Optoelectrónica, OPTOEL19, Zaragoza, España, (2019).
7. **Sijilmassi O.**, López-Alonso J.M., Del Río Sevilla A, & Barrio Asensio M.C.: Comunicación Poster:" Caracterización de imágenes corneales mediante herramientas de procesado de imagen: Transformada de Fourier y Autocorrelación", XI Reunión Española de Optoelectrónica, OPTOEL19, Zaragoza, España, (2019).

Otras Comunicaciones:

1. **Sijilmassi O.**, Hamoudan D., De la Orden M.U, Lasagabaster A., Carballo J., & López-Alonso J.M.: Comunicación oral: " Estudio comparativo de filtros solares de baja y alta gama", 24º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica, OPTOM 16, Madrid, España, (2016).

APÉNDICE: códigos de cálculo

A continuación, se detallan algunos códigos de Matlab elaborados:

- **Capítulo III: Cálculo de la sobreexpresión de proteínas**

```
load Matriz_total_C.mat %Datos del grupo control
load Matriz_total_D2.mat %Datos del grupo D2
load Matriz_total_D8.mat %Datos del grupo D8

[pc_C,score_C,latent_C,tsquare_C]=pca(Matriz_total_C);
[var_pc_C]=covpc(score_C);
[errores_C]=sqrt(diag(var_pc_C));

[pc_D2,score_D2,latent_D2,tsquare_D2]=pca(Matriz_total_D2);
[var_pc_D2]=covpc(score_D2);
[errores_D2]=sqrt(diag(var_pc_D2));

[pc_D8,score_D8,latent_D8,tsquare_D8]=pca(Matriz_total_D8);
[var_pc_D8]=covpc(score_D8);
[errores_D8]=sqrt(diag(var_pc_D8));

%% Representaciones graficas
figure;imagesc(reshape(tsquare_C,601,665),[5
80]);colorbar;title('Dispersión Control colágeno IV');
figure;imagesc(reshape(tsquare_D2,601,665),[5
80]);colorbar;title('Dispersión D2 colágeno IV');
figure;imagesc(reshape(tsquare_D8,601,665),[5
80]);colorbar;title('Dispersión D8 colágeno IV');

%% Representaciones de las reconstrucciones control
rec_pca_1_control=recons2(pc_C,Matriz_total_C,[1]);
rec_pca_resto_control=Matriz_total_C-rec_pca_1_control;
media_1_control=mean(rec_pca_1_control,2);
std_1_control=std(rec_pca_1_control,0,2);
media_resto_control=mean(rec_pca_resto_control,2);
std_resto_control=std(rec_pca_resto_control,0,2);

%% Representaciones de las reconstrucciones grupo D2
rec_pca_1_D2=recons2(pc_C,Matriz_total_D2,[1]);
rec_pca_resto_D2=Matriz_total_D2-rec_pca_1_D2;
media_1_D2=mean(rec_pca_1_D2,2);
std_1_D2=std(rec_pca_1_D2,0,2);
media_resto_D2=mean(rec_pca_resto_D2,2);
std_resto_D2=std(rec_pca_resto_D2,0,2);

%% Reconstrucciones grupo D8
rec_pca_1_D8=recons2(pc_C,Matriz_total_D8,[1]);
rec_pca_resto_D8=Matriz_total_D8-rec_pca_1_D8;
```

```

media_1_D8=mean(rec_pca_1_D8,2);
std_1_D8=std(rec_pca_1_D8,0,2);
media_resto_D8=mean(rec_pca_resto_D8,2);
std_resto_D8=std(rec_pca_resto_D8,0,2);

%% Señal ruido control
snrControl1=media_1_control./std_1_control;
snrControlresto=media_resto_control./std_resto_control;

%% Señal ruido D2
snrD2_1=media_1_D2./std_1_D2;
snrD2_resto=media_resto_D2./std_resto_D2;

%% Señal ruido D8
snrD8_1=media_1_D8./std_1_D8;
snrD8_resto=media_resto_D8./std_resto_D8;

%% Representaciones de sobre/infraexpresión.
%% Formación de medias.
media_control=mean(Matriz_total_C,2);
%% Formación de la máscara.
mascara=(media_control>0.2);

%% Calculo de la sobre/infraexpresión (control & D2).
sobre_D2_1_mascara=((media_1_D2.*mascara)-
(media_1_control.*mascara))./(media_control.*mascara);
sobre_D2_resto_mascara=((media_resto_D2.*mascara)-
(media_resto_control.*mascara))./(media_control.*mascara);

%% Calculo de la sobre/infraexpresión (control & D8). Esta está en
positivo.
sobre_D8_1_mascara=((media_1_D8.*mascara)-
(media_1_control.*mascara))./(media_control.*mascara);
sobre_D8_resto_mascara=((media_resto_D8.*mascara)-
(media_resto_control.*mascara))./(media_control.*mascara);

%% Representaciones gráficas de la sobre expresión del grupo D2
figure;imagesc(reshape(-sobre_D2_1_mascara*100,601,665),[-60
30]);colorbar;title('Expresión D2 rec PCA 1');axis off
figure;imagesc(reshape(-sobre_D2_resto_mascara*100,601,665),[-60
6]);colorbar;title('Expresión D2 rec PCA resto');axis off
%% Representación gráfica de la sobre expresión del grupo D8
figure;imagesc(reshape(-sobre_D8_1_mascara*100,601,665),[-60
30]);colorbar;title('Expresión rec D8 PCA 1');axis off
figure;imagesc(reshape(-sobre_D8_resto_mascara*100,601,665),[-60
6]);colorbar;title('Expresión rec D8 PCA resto');axis off

```

- **Capítulo IV:**

```

%%Análisis estadístico Bootstrap & Kruskal-Wallis tamaño de grano
%%cristalino
%% Se va a calcular la skewness, luego se hará lo mismo con la media,
la std, y la kurtosis para dar rangos de confianza, para los tres
grupos.
%%calculo skewness
ps_CD2_m=[];
ps_CD8_m=[];
for n=100:100;
    n
    for veces=1:1
        ps_CD2=[];
        ps_CD8=[];
        mc=bootstrp(n,@skewness,B1_Ccol);
        mD2=bootstrp(n,@skewness,B2_D2col);
        mD8=bootstrp(n,@skewness,B8_D8col);

        pc_D2=kruskalwallis([mc mD2],{'Control'
'D2'},'on');title('Skewness cristalino colágeno C/D2')
        pc_D8=kruskalwallis([mc mD8],{'Control'
'D8'},'on');title('Skewness cristalino colágeno C/D8')

        ps_CD2=[ps_CD2 pc_D2];
        ps_CD8=[ps_CD8 pc_D8];
        end
        ps_CD2_m=[ps_CD2_m mean(ps_CD2)];
        ps_CD8_m=[ps_CD8_m mean(ps_CD8)];
    end
end
figure;pp=kruskalwallis([mc mD2 mD8],{'Control' 'D2'
'D8'},'on');title('Skewness cristalino colágeno')

```

- **Capítulo IV: polarización**

Cálculo de los parámetros de Stokes

```

%% Calcula los parámetros de Stokes y a partir de ellos se calcula el
%% DOP,DOLP,B/A, ángulo.

function
[DOPC,DOLPC,DOPCPC,DOPCPCpara, ratio_ejesC,thetaC_dnoise,retardance,S0C
,S1C,S2C,S3C]=calculo_stokes_ojo_retardo(C_0,C_135,C_45,C_90,C_l_135,C
_l_135para,C_l_45,C_l_45para);
%% Toma de valores medios

C_0=mean(C_0,4);C_135=mean(C_135,4);C_45=mean(C_45,4);C_90=mean(C_90,4
);C_l_135=mean(C_l_135,4);C_l_135para=mean(C_l_135para,4);C_l_45=mean(
C_l_45,4);C_l_45para=mean(C_l_45para,4);

% Cálculo de los parámetros de Stokes.
I0C=C_0; I90C=C_90; I45C=C_45; I135C=C_135;
I45C=C_l_45;
I135C=C_l_135;
I45Cpara=C_l_45para;
I135Cpara=C_l_135para;

IC=I0C+I90C;
MC=I0C-I90C;
CC=I45C-I135C;
SC=I45C-I135C;

SCpara=I45Cpara-I135Cpara;

S0C=IC./IC;
S1C=MC./IC;
S2C=CC./IC;
S3C=SC./IC;

S3Cpara=SCpara./IC;

%% Cálculo de DOPC, DOLPC AC, BC, thetaC

DOPC=sqrt((S1C.^2)+(S2C.^2)+(S3Cpara.^2));
[DOPC,mascaraC]=prueba_denoising_v3(DOPC);
DOLPC=sqrt((S1C.^2)+(S2C.^2));
[DOLPC,mascaraLC]=prueba_denoising_v3(DOLPC);
mascara=(DOPC>1);
DOPCPC=sqrt(S3C.^2);
[DOPCPC,mascaraCC]=prueba_denoising_v3(DOPCPC);
DOPCPCpara=sqrt(S3Cpara.^2);
[DOPCPCpara,mascaraCCpara]=prueba_denoising_v3(DOPCPCpara);

% retardance

retardance=atan2d(S3C,sqrt((S1C.^2)+(S2C.^2)));

%% Parámetros de la elipse de polarización
AC=sqrt(0.5*(DOPC+DOLPC)); [AC_dnoise,mascara]=prueba_denoising_v3_masc
ara(AC,mascara);

```

```

BC=sqrt(0.5*(DOPC-
DOLPC));[BC_dnoise,mascara]=prueba_denoising_v3_mascara(BC,mascara);
thetaC=0.5*atan2d(S2C,S1C);[thetaC_dnoise,mascara]=prueba_denoising_v3
_mascara(thetaC,mascara);
ratio_ejesC=real(BC_dnoise)./real(AC_dnoise);

```

```

%% Función para comparar un ojo con la luz correspondiente.

```

```

function
[DOP,DOLP,DOPCP, ratio, angulo, retardance, diferencia_ratio, diferencia_an
gulo, diferencia_retardo]=calculo_comparacion_ojo_luz_retardo_verde(C_0
,C_135,C_45,C_90,C_l_135,C_l_135para,C_l_45,C_l_45para,V_0,V_135,V_45,
V_90,V_l_135,V_l_135para,V_l_45,V_l_45para);

```

```

[DOPC,DOLPC,DOPCPC,DOPCPCpara, ratio_ejesC, thetaC_dnoise, retardance, SOC
,S1C,S2C,S3C]=calculo_stokes_ojo_retardo(C_0,C_135,C_45,C_90,C_l_135,C
_l_135para,C_l_45,C_l_45para);

```

```

[DOPCluz,DOLPCluz,DOPCPCluz,DOPCPCparaluz, ratio_ejesCluz, thetaC_dnoise
luz, retardanceluz, SOCluz, S1Cluz, S2Cluz, S3Cluz]=calculo_stokes_ojo_reta
rdo(V_0,V_135,V_45,V_90,V_l_135,V_l_135para,V_l_45,V_l_45para);

```

```

%% Generación de gráficas y grabar los datos. El programa pedirá una
ruta de acceso junto con un nombre para los datos.

```

```

figure;imagesc(DOPC, [0 1]);title('DOP control');colorbar
figure;imagesc(DOLPC, [0 1]);title('DOLP control');colorbar
figure;imagesc(DOPCPC, [0 1]);title('DOPCPC control');colorbar

```

```

figure;imagesc(ratio_ejesC);title('B/A control');colorbar
figure;imagesc(thetaC_dnoise);title('theta control');colorbar
figure;imagesc(retardance);title('retardo control');colorbar

```

```

figure;imagesc(thetaC_dnoise-
thetaC_dnoiseluz);colorbar;title('Diferencia de angulo del control luz
de entrada');
figure;imagesc(ratio_ejesC-ratio_ejesCluz);colorbar;title('Diferencia
entre ratios de la elipse control luz');
figure;imagesc(retardance-retardanceluz);colorbar;title('Diferencia
entre retardo control luz');

```

```

%% Asignación de variables de salida

```

```

DOP=DOPC;
DOLP=DOLPC;
DOPCP=DOPCPC;
ratio=ratio_ejesC;
angulo=thetaC_dnoise;
diferencia_ratio=ratio_ejesC-ratio_ejesCluz;
diferencia_angulo=thetaC_dnoise-thetaC_dnoiseluz;
diferencia_retardo=retardance-retardanceluz;

```

```

%% Grabación de datos.

```

```

directorio=input('directorio para los datos: ','s');
nombre_fichero=input('nombre para el fichero: ','s');
nombre=[directorio nombre_fichero];

```

```

eval([nombre_fichero '_DOP=DOPC;']);
eval(['save ' nombre '_DOP.mat ' nombre_fichero '_DOP;']);

eval([nombre_fichero '_DOLP=DOLPC;']);
eval(['save ' nombre '_DOLP.mat ' nombre_fichero '_DOLP;']);

eval([nombre_fichero '_ratioejes=ratio_ejesC;']);
eval(['save ' nombre '_ratioejes.mat ' nombre_fichero '_ratioejes;']);

eval([nombre_fichero '_theta=thetaC_dnoise;']);
eval(['save ' nombre '_theta.mat ' nombre_fichero '_theta;']);

eval([nombre_fichero '_retardance=retardance;']);
eval(['save ' nombre '_retardance.mat ' nombre_fichero
'_retardance;']);

eval([nombre_fichero '_dif_theta=thetaC_dnoise-thetaC_dnoiseluz;']);
eval(['save ' nombre '_dif_theta.mat ' nombre_fichero '_dif_theta;']);

eval([nombre_fichero '_dif_ratio=ratio_ejesC-ratio_ejesCluz;']);
eval(['save ' nombre '_dif_ratio.mat ' nombre_fichero '_dif_ratio;']);

eval([nombre_fichero '_dif_retardo=diferencia_retardo;']);
eval(['save ' nombre '_dif_retardo.mat ' nombre_fichero
'_dif_retardo;']);

```

Calculo del Incremento de DOP:

```
load Matriz_total_CL.mat %datos cristalinos control (longitud de onda azul)
load Matriz_total_DL2.mat %datos cristalinos D2 (longitud de onda azul)
load Matriz_total_DL8.mat %datos cristalinos D8 (longitud de onda azul)

[pc_C,score_C,latent_C,tsquare_C]=pca(Matriz_total_CL);
[pc_D2,score_D2,latent_D2,tsquare_D2]=pca(Matriz_total_DL2);
[pc_D8,score_D8,latent_D8,tsquare_D8]=pca(Matriz_total_DL8);

%% Representaciones graficas
figure;imagesc(reshape(sqrt(tsquare_C),224,238),[0,sqrt(30)]);colormap('jet');colorbar;title('Distancia de Mahalanobis Control ({\lambda}=540)');axis off;axis equal
figure;imagesc(reshape(sqrt(tsquare_D2),224,238),[0,sqrt(30)]);colormap('jet');colorbar;title('Distancia de Mahalanobis D2 ({\lambda}=540)');axis off;axis equal
figure;imagesc(reshape(sqrt(tsquare_D8),224,238),[0,sqrt(30)]);colormap('jet');colorbar;title('Distancia de Mahalanobis D8 ({\lambda}=540)');axis off;axis equal
%% Representaciones de las reconstrucciones control

rec_pca_1_control=recons2(pc_C,Matriz_total_CL,[1]);
rec_pca_2_control=Matriz_total_CL-rec_pca_1_control;

media_1_control=mean(rec_pca_1_control,2);
std_1_control=std(rec_pca_1_control,0,2);

media_2_control=mean(rec_pca_2_control,2);
std_2_control=std(rec_pca_2_control,0,2);

%% Representaciones de las reconstrucciones grupo D2

rec_pca_1_D2=recons2(pc_C,Matriz_total_DL2,[1]);
rec_pca_2_D2=Matriz_total_DL2-rec_pca_1_D2;

media_1_D2=mean(rec_pca_1_D2,2);
std_1_D2=std(rec_pca_1_D2,0,2);

media_2_D2=mean(rec_pca_2_D2,2);
std_2_D2=std(rec_pca_2_D2,0,2);

%% Reconstrucciones grupo D8

rec_pca_1_D8=recons2(pc_C,Matriz_total_DL8,[1]);
rec_pca_2_D8=Matriz_total_DL8-rec_pca_1_D8;

media_1_D8=mean(rec_pca_1_D8,2);
std_1_D8=std(rec_pca_1_D8,0,2);

media_2_D8=mean(rec_pca_2_D8,2);
std_2_D8=std(rec_pca_2_D8,0,2);
```

```

%% Representaciones del incremento del DOP.

%% Formación de medias.
media_control=mean(Matriz_total_CL,2);

%% Formación de la máscara.

mascara=(media_control>0);

%% Calculo del incremento del DOP (control & D2).
sobre_D2_1_mascara=((media_1_D2.*mascara)-
(media_1_control.*mascara));
sobre_D2_2_mascara=((media_2_D2.*mascara)-
(media_2_control.*mascara));

%% Calculo del incremento del DOP (control & D8).
sobre_D8_1_mascara=((media_1_D8.*mascara)-
(media_1_control.*mascara));
sobre_D8_2_mascara=((media_2_D8.*mascara)-
(media_2_control.*mascara));

%% Representaciones gráficas del incremento del DOP del grupo D2

figure;imagesc(reshape(sobre_D2_1_mascara,224,238),[-
0.06,0.08]);colorbar;title('Incremento de DOP (D2 P1)
({\lambda}=540nm)');axis off;colormap('jet')
figure;imagesc(reshape(sobre_D2_2_mascara,224,238),[-
0.001,0.0012]);colorbar;title('Incremento de DOP (D2 RP)
({\lambda}=540nm)');axis off;colormap('jet')

%% Representación gráfica del incremento del DOP del grupo D8

figure;imagesc(reshape(sobre_D8_1_mascara,224,238),[-
0.06,0.08]);colorbar;title('Incremento de DOP (D8 P1)
({\lambda}=540nm)');axis off;colormap('jet')
figure;imagesc(reshape(sobre_D8_2_mascara,224,238),[-
0.001,0.0012]);colorbar;title('Incremento de DOP (D8 RP)
({\lambda}=540nm)');axis off;colormap('jet')

```

- **Capítulo IV: imágenes multispectrales**

```

function
[matriz_pca,latent, pesos, errores_pesos, pca, autovectores, distancias]=an
alisis_pca_camara_v2_tesis_v2(ruta_grupo, ruta_vidrio, nombre);

cd(ruta_grupo);
g_muestra=[1023 1023 1023 1023 1023 994 965 939 925 914 923 942 941
868 781 738 704 702 694 730 788 843];
g_aire=[1023 1023 1005 961 934 915 874 849 821 808 805 810 798 766 701
658 632 630 651 672 730 798];
longitudes=[78:3:141];
tam_long=max(size(longitudes));
matriz_pca=[];

for t=1:tam_long;

    eval(['load ' nombre int2str(longitudes(t)) '.mat;']);
    eval(['Imag_trabajo=' nombre int2str(longitudes(t)) ';'']);

    Imag_trabajo_gris=double(mean(Imag_trabajo,4));
    Imag_trabajo_gris=Imag_trabajo_gris/g_muestra(t);

    cd(ruta_vidrio);
    eval(['load landa_' int2str(longitudes(t)) '.mat;']);
    eval(['Imag_trabajo_vidrio=landa_' int2str(longitudes(t)) ';'']);
    Imag_trabajo_vidrio=double(mean(Imag_trabajo_vidrio,4));

    Imag_trabajo_vidrio=Imag_trabajo_vidrio/g_aire(t);

    Imag_trabajo_gris_norm=(Imag_trabajo_gris)./mean2(Imag_trabajo_vidrio)
;
    mascara=(Imag_trabajo_gris_norm>1);

    [transmision,mascara]=prueba_denoising_v3_mascara(Imag_trabajo_gris_no
rm,mascara);
    matriz(:, :, t)=transmision; %Esto sería la transmision

    matriz_pca=[matriz_pca -log(transmision(:))]; %% Esto analiza en
pca, las absorbancias
    cd(ruta_grupo);
end

componentes=size(Imag_trabajo);
pc,score,latent,tsquare]=pca(matriz_pca);
covas=covpc(score);
pesos=(latent/sum(latent))*100;
errores_pesos=4*sqrt(diag(covas))*(100/sum(latent));

%% Generación de los autovalores y autovectores.
for t=1:tam_long
    pca(:, :, t)=reshape(score(:, t),componentes(1),componentes(2));
end
[autovectores,s,v]=svd(cov(matriz_pca));

distancias=tsquare;

```

```

%% Para calcular todo el análisis pca para un grupo de ojos.

%% Estas rutas y programas son para ojos control. Los datos de las
imágenes están en matriz_pca

rutas_control1='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C0D\';
rutas_control2='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C0I\';
rutas_control3='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C655D\';
rutas_control4='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C655I\';
rutas_control5='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C660D\';
rutas_control6='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C660I\';
rutas_control7='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C698D\';
rutas_control8='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C698I\';
%rutas_control9='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Co
ntrol\C750D\';
rutas_control9='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\Con
trol\C750I\';

nombre='landa_'
ruta_vidrio='C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\imagen
es_multiespectrales_sin_vidrio\';

%% Análisis de los pca del grupo de control.

pesos_totales=[];
errores_pesos_totales=[];
distancias_totales=[];
latent_totales=[];
Absortancias_totales_control=[];

for c=1:9

    c

eval(['[matriz_pca,latent,pesos,errores_pesos,pca,autovectores,distanc
ias]= analisis_pca_camara_v2_tesis_v2(rutas_control' int2str(c)
',ruta_vidrio,nombre);']);

    pca_totales(:, :, :, c)=pca;
    autovectores_totales(:, :, c)=autovectores;
    latent_totales=[latent_totales latent];
    pesos_totales=[pesos_totales pesos];
    errores_pesos_totales=[errores_pesos_totales errores_pesos];
    distancias_totales=[distancias_totales distancias];
    Absortancias_totales_control(:, :, c)=matriz_pca;
    cd('C:\Users\Usuario\Desktop\Imágenes_multiespectrales\');
end

```

```

tam_matriz_autovectores=size(autovectores_totales);
%% Comparamos con el primer ojo
autovectores_comparacion=autovectores_totales(:, :, 1);

for t=1:tam_matriz_autovectores(2);

    autovector_comparacion=autovectores_comparacion(:, t);
    [maximo indice]=max(autovector_comparacion);

    for ojos=2:9
        if (sign(autovectores_totales(indice, t, ojos)) ~= sign(maximo))
            autovectores_totales(:, t, ojos) = -
autovectores_totales(:, t, ojos);
            pca_totales(:, :, t, ojos) = -pca_totales(:, :, t, ojos);
        end
    end
end
end

```

```

%% Programa para calcular las abundancias de determinados espectros en
las absorciones de grupos. Se utiliza el algoritmo hyperFnnls de la
toolbox multispectral de mathworks.
%% Formación de los espectros relevantes.

relevantes=5;
factor=2;
load autovectores_totales_control.mat;
load Absortancias_totales_control.mat;
load latent_totales_control.mat;
autovectores_totales=-autovectores_totales;
autovectores_totales(:,3,:)=autovectores_totales(:,3,:);

%% Todos los datos anteriores están para los 10 ojos. Para hacer una
base control hay que hacer las medias.
pixel_medio_todos_los_ojos_control=mean(mean(Absortancias_totales_cont
rol,3),1)';
autovectores_control=mean(autovectores_totales,3); %% Media de los del
control
autovalores_medios_control=mean(latent_totales,2);
endmembers=[];
for t=1:relevantes;

endmember=pixel_medio_todos_los_ojos_control+autovectores_control(:,t)
*sqrt(autovalores_medios_control(t))*factor;

endmember=pixel_medio_todos_los_ojos_control+autovectores_control(:,t)
)*factor;
    endmembers=[endmembers endmember];
end
for ojo=1:9
    ojo
[X]=hyperFnnls(Absortancias_totales_control(:,:,ojo)',endmembers);
abundancias(:,:,ojo)=X;
end

%% Programa para reconstruir los datos de cada ojo teniendo en cuenta
la agrupación por procesos.
%% Se hará uno que será P1 (sólo la media y el primero), P2(2-5) y P3
(resto,hasta 22).

load Absortancias_totales_control.mat;
load autovectores_totales_control.mat;

ojos=3;
for t=1:ojos;
    absortancia_ojo=Absortancias_totales_control(:,:,t);
    autovectores_ojo=autovectores_totales(:,:,t);

    %% reconstrucción con el P1. Lleva la media.
    p1=recons2(autovectores_ojo,absortancia_ojo,[1]);
    p2=absortancia_ojo-recons2(autovectores_ojo,absortancia_ojo,[1
6:22]);
    p3=absortancia_ojo-(p1+p2);

    %% Representaciones gráficas.
    %% P1;

```

```

    figure;
    imagesc(reshape(mean(p1,2),480,640));colormap('gray');title('valor
medio p1');axis off;colorbar
    figure;
    imagesc(reshape(std(p1,0,2),480,640));colormap('gray');title('std
p1');axis off;colorbar

    %% P2
    figure;
    imagesc(reshape(mean(p2,2),480,640));colormap('gray');title('valor
medio p1');axis off;colorbar
    figure;
    imagesc(reshape(std(p2,0,2),480,640));colormap('gray');title('std
p1');axis off;colorbar

    %% P3
    figure;
    imagesc(reshape(mean(p3,2),480,640));colormap('gray');title('valor
medio p1');axis off;colorbar
    figure;
    imagesc(reshape(std(p3,0,2),480,640));colormap('gray');title('std
p1');axis off;colorbar
end

```