



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DISEÑO INDUSTRIAL

Grado en Ingeniería Electrónica Industrial y Automática

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO LONGITUDINAL DE IMÁGENES DE
RESONANCIA MAGNÉTICA DEL CEREBRO DE RATONES
CONTROL Y TRANSGÉNICOS CON DESARROLLOS
NEURODEGENERATIVOS: COMPARATIVA ENTRE LAS
TÉCNICAS VBM Y ROIS

Autor: Víctor Fernández Marín

Tutor: Carlos Platero Dueñas

Departamento: Ingeniería Eléctrica, Electrónica, Automática y Física
Aplicada

Madrid, Febrero, 2021



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DISEÑO INDUSTRIAL

Grado en Ingeniería Electrónica Industrial y Automática

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO LONGITUDINAL DE IMÁGENES DE
RESONANCIA MAGNÉTICA DEL CEREBRO DE RATONES
CONTROL Y TRANSGÉNICOS CON DESARROLLOS
NEURODEGENERATIVOS: COMPARATIVA ENTRE LAS
TÉCNICAS VBM Y ROIS

Firma Autor

Firma Tutor

Copyright ©2021. Víctor Fernández Marín

Esta obra está licenciada bajo la licencia Creative Commons

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 3.0 Unported (CC BY-NC-ND 3.0). Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es> o envíe una carta a Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, EE.UU.

Todas las opiniones aquí expresadas son del autor, y no reflejan necesariamente las opiniones de la Universidad Politécnica de Madrid.

Título: Estudio longitudinal de imágenes de resonancia magnética del cerebro de ratones control y transgénicos con desarrollos neurodegenerativos: comparativa entre las técnicas VBM y ROIs.

Autor: Víctor Fernández Marín

Tutor: Carlos Platero Dueñas

EL TRIBUNAL

Presidente:

Vocal:

Secretario:

Realizado el acto de defensa y lectura del Trabajo Fin de Grado el día de de ... en, en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Diseño Industrial de la Universidad Politécnica de Madrid, acuerda otorgarle la CALIFICACIÓN de:

VOCAL

SECRETARIO

PRESIDENTE

Agradecimientos

Debo comenzar por la compañía y apoyo que todavía continúan dándome mis amigos de carrera, los que han luchado, sufrido, reído y disfrutado conmigo todo este tiempo. Miguel, Jesús, José, Alex, Chuchi y demás cuadrilla Asensiers. Gracias.

A mi madre y a mi padre, mi fuerza y mi calor, por vuestro apoyo incondicional, por todo vuestro esfuerzo en hacerme ser quien soy hoy, por darme la vida y un futuro en el que prosperar. Gracias.

A mi hermano, mi guía y mi soporte, por siempre creer en mí, por tu consejo y experiencia. Gracias.

A mis amigos de siempre, por crecer conmigo y mantenerme en pie tantas veces, por todos los buenos momentos, las penas y triunfos vividos juntos. Gracias.

A mi familia, por siempre estar ahí, pese a la distancia, arropándome con tanto cariño. Gracias.

A Eva, mi compañera de viaje, mi amiga y mi pareja, por tu apoyo y tu amor, por tu ánimo y tu confianza en mí. Por hacer de mi vida un camino precioso, a pesar de las cuestas. Gracias.

Este trabajo, lejos de ser uno más en mi carrera universitaria, ha supuesto un antes y un después en mi vida, dando pie a la que quizás sea una de las decisiones más importantes que he tomado tanto académica como profesionalmente. Y esta oportunidad no habría sido posible sin mi tutor, Carlos, al que le debo mucho más que este proyecto. Por tu paciencia y comprensión, por tu dedicación y esfuerzo y, sobretodo, por la pasión que me has transmitido. Gracias.

En los tiempos que vivimos, no puedo ni debo olvidar una mención especial a los sanitarios, luchadores por la vida que han dado y siguen dando todo por la salud y el bienestar ajeno. Por vuestra entrega y sacrificio. Gracias.

Resumen

El aumento continuado de la esperanza de vida a lo largo de los últimos sesenta años ha traído consigo un incremento del número de pacientes con enfermedades neurodegenerativas y la previsión es que continúe esta tendencia. A día de hoy, numerosas líneas de investigación se centran en atajar lo ya es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una prioridad sanitaria a nivel mundial. Los esfuerzos están focalizados principalmente en la detección presintomática de la enfermedad, lo cual condiciona considerablemente la evolución del paciente.

Existen diversas técnicas para llevar a cabo un diagnóstico precoz, aunque una de las más ampliamente utilizadas es el análisis de imágenes de resonancia magnética. El estudio de estas permite conocer si existe o no diferencia volumétrica en distintas regiones del cerebro. Los procesos que sigue esta técnica tienen la ventaja de que pueden ser automatizados gracias a los últimos avances en computación e inteligencia artificial. El objetivo está fijado ahora en la mejora de estos procesos.

Pero al igual que en otras disciplinas propias de la medicina, por motivos éticos, económicos o que atañen a la integridad o bienestar del paciente, las investigaciones se ven obligadas a ser trasladadas a otras especies, con el objetivo de observar y probar en estas el funcionamiento de nuevos modelos de diagnóstico para, posteriormente, ser aplicados en seres humanos. La especie más comúnmente utilizada para estos fines es el ratón, el cual lleva siendo empleado desde hace décadas y del que ya se tiene un gran conocimiento.

Este proyecto sigue una de las múltiples líneas de investigación, centrada en el estudio de técnicas de análisis volumétrico para el desarrollo de futuros modelos predictivos de enfermedades como el de Parkinson o el Alzheimer. Se emplean imágenes de resonancia magnética del cerebro de ratones comunes y transgénicos, estos últimos con la peculiaridad de haber sido modificados genéticamente para desarrollar un proceso degenerativo similar al que ocurre en un cerebro humano que padece este tipo de enfermedades.

Se estudian las técnicas de análisis por regiones de interés (*Region Of Interest*, ROI) y de análisis mediante morfometría basada en vóxel (*Voxel-Based Morphometry*, VBM), buscando diferencias y semejanzas entre ambas. Además, se comparan los tipos de imágenes empleadas, *ex vivo* e *in vivo*, examinando nuevamente divergencias en el empleo de estas y su utilidad en análisis longitudinal.

Palabras clave: Neurodegenerativo, diagnóstico, ratón, VBM, ROI, longitudinal.

Abstract

Continuous growth of life expectancy over the last sixty years has resulted in a rise in the number of patients with neurodegenerative diseases, and the forecast is the trend will continue. Now, numerous lines of research are focused on tackling what is considered by the World Health Organization as an health priority at globally.

There are several techniques to early diagnose, being one of the most used the magnetic resonance images (MRI). This technique allows us to know whether there are any volumetric differences between different cerebral regions or not. This technique has the advantage of being automated thanks to the latest advances in computing and artificial intelligence. The goal is now set to improve this processes.

Just like other medical disciplines, because of ethical, economical or security and wellbeing reasons of patients, scientific studies must be initially shifted to other species, to observe and rehearse new diagnosis models that could subsequently be applied to humans. The specie that is used the most for these puposes is mice, which have been used for many decades and is well understood nowadays.

This proyect follows one of the multiple existing research lines, focused on study of volumetric analysis techniques for future developments of predictive models of neurodegenerative disorders like Parkinson or Alzheimer. Magnetic resonance imaging of control and transgenic mice is used, having transgenic mice the peculiarity of having been genetically modified to develop neurodegenerative pathology similar to those in humnas.

Region of Interes analysis and Voxel-based Morphometry are the techniques studied, looking for differences and similarities between both. Also, *in vivo* and *ex vivo* images are compared, examining again divergences in their use and their usefulness in longitudinal analysis.

Keywords: Neurodegenerative, diagnosis, mice, VBM, ROI, longitudinal.

Índice general

Agradecimientos	IX
Resumen	XI
Abstract	XIII
Índice	XVII
Referencias externas	XXV
1. Introducción	1
1.1. Las enfermedades neurodegenerativas	1
1.1.1. Causas	1
1.1.2. Epidemiología	2
1.1.3. Impacto socioeconómico	4
1.1.4. Diagnóstico	5
1.1.5. Importancia del diagnóstico preclínico	5
1.2. El empleo de animales en investigación	6
1.2.1. Implicaciones éticas	6
1.2.2. Animales transgénicos	6
1.3. Motivación del proyecto	6
1.4. Objetivos	7
1.5. Estructura del documento	7
2. Estado del arte	9
2.1. Líneas de investigación: precedente del proyecto	9
2.1.1. <i>Comparison of in vivo and ex vivo MRI for the Detection of Structural Abnormalities in a Mouse Model of Tauopathy</i> [1]	9
2.1.2. <i>In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strainspecific structures in the mouse brain</i> [2]	12
2.1.3. <i>A stereotaxic MRI template set of mouse brain with fine sub-anatomical delineations: Application to MEMRI studies of 5XFAD mice</i> [3]	13
2.1.4. <i>Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry</i> [4]	14

2.1.5.	<i>Study the longitudinal in vivo and cross-sectional ex vivo brain volume difference for disease progression and treatment effect on mouse model of tauopathy using automated MRI structural parcellation</i> [5]	16
3.	Materiales	21
3.1.	Sujetos de estudio	21
3.2.	Software de procesamiento y análisis	21
3.3.	Software adicional y de soporte	22
4.	Métodos	25
4.1.	Análisis por VBM	25
4.1.1.	Introducción	25
4.1.2.	Registro de imágenes	25
4.1.3.	Segmentación	29
4.1.4.	Suavizado	33
4.1.5.	Análisis estadístico	36
4.2.	Análisis por ROIs	48
4.2.1.	Introducción	48
4.2.2.	Registro	48
4.2.3.	Segmentación	49
4.2.4.	Análisis estadístico	50
5.	Resultados y discusión	53
5.1.	Resultados por VBM	53
5.1.1.	Registro	53
5.1.2.	Segmentación	54
5.1.3.	Suavizado	54
5.1.4.	Análisis estadístico	55
5.1.5.	Evaluación en MATLAB	61
5.1.6.	Localización neuroanatómica y volumetría	64
5.2.	Resultados por ROIs	69
5.2.1.	Registro y segmentación	69
5.2.2.	Extracción volumétrica y análisis estadístico	70
5.3.	Comparativa entre VBM y ROIs	70
5.3.1.	<i>Ex vivo</i>	70
5.3.2.	<i>In vivo</i>	75
6.	Conclusiones	79
6.1.	Conclusión	79
6.2.	Limitaciones	81
6.2.1.	Sujetos	82
6.2.2.	Herramientas software	82
6.2.3.	Metodología	82
6.3.	Desarrollos futuros	82

A. Anexo A	85
A.1. Puesta a punto	85
A.1.1. En análisis por VBM	85
A.1.2. En análisis por ROIs	85
A.2. Uso de SPMOUSE	86
A.2.1. Ejecución	86
A.2.2. Uso en segmentación	89
A.2.3. Uso en suavizado	90
A.2.4. Uso en análisis estadístico	91
A.2.5. Uso para visualización de imágenes y cambio de coordenadas .	95
B. Anexo B	97
B.1. Imágenes de resonancia magnética	97
B.2. Biomarcadores	100
B.3. Análisis de imágenes: técnicas de morfometría	100
C. Anexo C	101
C.1. Análisis de varianza ANOVA	101
D. Protocolos bioéticos	103
E. Tablas de resultados	105
Glosario de acrónimos	115
Bibliografía	117

Índice de figuras

1.1.	Acción del Ca^{2+} en los procesos neurodegenerativos.	2
1.2.	Esperanza de vida en España. Naranja: mujeres, Azul: hombres	3
2.1.	Diagrama de flujo del procesamiento y análisis de las imágenes. . . .	14
2.2.	Diagrama de flujo del procesamiento de las imágenes.	15
4.1.	Diagrama de flujo de VBM.	26
4.2.	Transformaciones: (a) Traslación, (b) Rotación, (c) Escalado	27
4.3.	Proceso de correlación cruzada	28
4.4.	(a) Imagen plantilla, (b) Imagen <i>ex vivo</i> de FVB_Ncr1 original.	29
4.5.	Distribución de intensidades por vóxel según el tipo de tejido en MRI ponderada en T1.	30
4.6.	Kernel.	34
4.7.	Aplicación de un filtro mediante kernel.	34
4.8.	Comparación de resultado después de un suavizado. (a) Sin suavizar, (b) Suavizada.	34
4.9.	Representación gráfica del valor FWHM.	35
4.10.	Ejemplo de mapa paramétrico, coloreado en tonos rojo y amarillo sobre una imagen plantilla.	38
4.11.	Representación gráfica del p-valor y las regiones de aceptación y rechazo de H_0 en la distribución t de Student.	40
4.12.	a) Clúster con FWE no corregido ($\alpha = 0,1$), p-valor no corregido. b) Clúster con FWER corregido ($\alpha = 0,1$), p-valor corregido.	42
4.13.	Ejemplo de atlas de parcelación.(a) Vista coronal, (b) Vista sagital. . . .	48
4.14.	Diagrama de flujo de procesamiento de imágenes para parcelación de las mismas mediante el software Multi-atlas Segmentation [6].	49
5.1.	Imagen registrada con <i>overlay</i> de la imagen plantilla.	53
5.2.	Segmentación de las imágenes de C57BL/6J, <i>ex vivo</i> . (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebroespinal.	54
5.3.	Segmentación de las imágenes de FVB_Ncr1, <i>ex vivo</i> . (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebroespinal.	54
5.4.	Suavizado de las imágenes de C57BL/6J, <i>ex vivo</i> . (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebroespinal.	55
5.5.	Suavizado de las imágenes de FVB_Ncr1, <i>ex vivo</i> . (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebroespinal.	55

5.6.	Mapas de clústeres, resultados de la prueba F. (a) Mapa para imágenes <i>ex vivo</i> , (b) Mapa para imágenes <i>in vivo</i> con corrección del FWER, (c) Mapa para imágenes <i>in vivo</i> sin corrección del FWER.	58
5.7.	Mapas de clústeres, resultados de la prueba t en imágenes <i>ex vivo</i> . (a) Mapa de atrofia, (b) Mapa de inflamación.	60
5.8.	Mapas de clústeres, resultados de la prueba t en imágenes <i>in vivo</i> sin corrección del FWER. (a) Mapa de atrofia, (b) Mapa de inflamación.	61
5.9.	Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores $t/10$) como con MATLAB (escala verde de p-valores) para atrofia en imágenes <i>ex vivo</i> . (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos. .	62
5.10.	Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores t) como con MATLAB (escala roja de p-valores) para inflamación en imágenes <i>ex vivo</i> . (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos. .	62
5.11.	Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores $t/10$) como con MATLAB (escala verde de p-valores) para atrofia en imágenes <i>in vivo</i> . (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos. .	63
5.12.	Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores t) como con MATLAB (escala roja de p-valores) para inflamación en imágenes <i>in vivo</i> . (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos. .	63
5.13.	Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes <i>ex vivo</i> , representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t, y en escala de azul-verde los atróficos, en valores de $t/10$. Abreviaciones: Bulbo olfatorio (<i>Olfactory Bulb</i> , OB), Neocórtex (Nc), Amígdala (A), Colículo inferior (<i>Inferior Colliculi</i> , IC), Hipotálamo (Ht), Tálamo (<i>Thalamus</i> , Th), Cerebelo (Ce), Tronco encefálico (BS).	66
5.14.	Visualización del solapamiento de regiones sobre el mismo clúster. Se aprecia que la cápsula externa (EC) presenta una mayor diferencia volumétrica, aunque se propaga a regiones colindantes, principalmente al neocórtex (Nc). Cápsula externa (<i>External capsule</i> , EC), Neocórtex (Nc), Fimbria (F), Tálamo (<i>Thalamus</i> , Th). (a) Vista axial, (b) Vista sagital, (c) Vista coronal.	67
5.15.	Clústeres en imágenes <i>ex vivo</i> en escala de calor t-valor sobre la imagen de etiquetas, vista axial. (a) Atrofia, (b) Inflamación.	67
5.16.	Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes <i>in vivo</i> , representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t, y en escala de azul-verde los atróficos, en valores de $t/5$. Abreviaciones: Bulbo olfatorio (<i>Olfactory Bulb</i> , OB), Neocórtex (Nc), Colículo inferior (<i>Inferior Colliculi</i> , IC), Hipocampo (Hc), Cerebelo (Ce), Fimbria (F).	68
5.17.	Clústeres en imágenes <i>in vivo</i> en escala de calor t-valor sobre la imagen de etiquetas, vista axial. (a) Atrofia, (b) Inflamación.	69
5.18.	Parcelación de una imagen de sujeto transgénico FVB_Ncrl. (a) Imagen original, (b) Imagen parcelada.	70

5.19. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del neocórtex (NNeV) en análisis ROIs, <i>ex vivo</i> . (a) Dcho (RNNcV), (b) Izdo (LNNcV)	72
5.20. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del colículo inferior izquierdo (LNICV) en análisis ROIs <i>ex vivo</i>	73
5.21. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del cerebelo (NCeV) en análisis ROIs, <i>ex vivo</i> . (a) Dcho (RNCeV), (b) Izdo (LNCeV)	73
5.22. Interregionalidad del clúster detectado en VBM a través de las áreas del tálamo (<i>Thalamus</i> , Th), colículo inferior (IC), colículo superior (SC) y resto del mesencéfalo (Rm). (a) Axial, (b) Sagital, (c) Coronal.	74
5.23. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del tálamo (NThV) en análisis ROIs <i>ex vivo</i> . (a) Dcho (RNThV), (b) Izdo (LNThV)	74
5.24. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del neocórtex (NNeV) en análisis ROIs <i>in vivo</i> . (a) Dcho (RNNcV), (b) Izdo (LNNcV)	76
5.25. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del cerebelo (NCeV) en análisis ROIs <i>in vivo</i> . (a) Dcho (RNCeV), (b) Izdo (LNCeV)	76
5.26. Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del hipocampo derecho (RNHcV) en análisis ROIs <i>ex vivo</i>	76
5.27. Interregionalidad del clúster detectado en VBM a través de las áreas del fórnix e inmediaciones. Fimbria (F), Tálamo (<i>Thalamus</i> , Th), Hipocampo (Hc), Hipotálamo (Ht), Ventrículos (V), Putamen Caudado (<i>Caudate putamen</i> , CP), Cápsula externa (<i>External capsule</i> , EC). (a) Axial, (b) Sagital, (c) Coronal.	77
6.1. Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes (a) <i>ex vivo</i> y (b) <i>in vivo</i> , representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t, y en escala de azul-verde los atróficos, en valores de t/10. Se observan los tamaños de los clústeres coincidentes entre VBM y ROIs (Nc, Ce, IC, Hc). Abreviaciones: Bulbo olfatorio (<i>Olfactory Bulb</i> , OB), Neocórtex (Nc), Amígdala (A), Colículo inferior (<i>Inferior Colliculi</i> , IC), Hipotálamo (Ht), Tálamo (<i>Thalamus</i> , Th), Cerebelo (Ce), Tronco encefálico (BS), Hipocampo (Hc), Fimbria (F).	80
6.2. Comparativa de mapas de clústeres obtenidos en VBM para el caso inflamatorio, escala en F valores. (a) <i>Ex vivo</i> , (b) <i>In vivo</i>	81
A.1. Pantalla de carga de SPM, generada mediante el comando <i>spm</i>	86
A.2. Pantalla de carga de SPMMOUSE, generada mediante el comando <i>spmmouse</i>	87
A.3. Selección de la configuración previa por cepa de ratón.	87
A.4. Pantalla de bienvenida de SPMMOUSE.	88
A.5. Ventana de opciones de SPMMOUSE.	88
A.6. Ventana de opciones de segmentación de SPMMOUSE.	89
A.7. Selección de TMPs y orden de los mismos.	90
A.8. Ventana de opciones de suavizado de SPMMOUSE.	91

A.9. Ventana de opciones de análisis estadístico en Basic Models de SPMMOUSE.	92
A.10. Ventana de resultado de la generación de los modelos lineales en SPM-MOUSE.	93
A.11. Selección de contraste en SPMMOUSE.	94
A.12. Ventana de opciones de resultados de SPMMOUSE.	94
A.13. Ventana de resultados en SPMMOUSE.	95
A.14. Ventana de visualización de imágenes de SPMMOUSE.	96
B.1. Imagen MRI de la cabeza.	97
B.2. Proceso de obtención de imágenes MRI. Fuente: [7]	98
B.3. Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en densidad. Fuente: [7]	98
B.4. Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en T1. Fuente: [7]	99
B.5. Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en T2. Fuente: [7]	99

Índice de tablas

1.1.	Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas por rango de edad calculadas por distintos estudios. Fuente: [8]	3
1.2.	Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en el mundo. Fuentes: [8][9][10][11]	3
1.3.	Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en España. Fuente: [8]	4
1.4.	Costes de las tres principales enfermedades neurodegenerativas en Europa (UE-27, Islandia, Noruega y Suiza)(2010). Fuentes: [8][12]	4
1.5.	Costes de las tres principales enfermedades neurodegenerativas en España (2014). Fuente: [8]	4
2.1.	Protocolo de escaneo empleado en el estudio.	10
3.1.	Parámetros de las imágenes que se emplean en el estudio.	21
4.1.	Resumen de opciones y parámetros de segmentación que se emplean en SPMOUSE para el presente proyecto.	33
4.2.	Resumen de opciones y parámetros en la opción <i>Basic Models</i> de generación de modelo lineal que se emplean en SPMOUSE para el presente proyecto.	44
4.3.	Valores umbral $-\log(p\text{-valor})$ para la ejecución del algoritmo 2.	45
5.1.	Resultados de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	56
5.2.	Resultados de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	57
5.3.	Resultados de la prueba F sin corrección del FWER con p-valor máximo de 0.001 en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	57
5.4.	Resultados de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	58
5.5.	Resultados de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	59
5.6.	Resultados de la prueba t sin corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	59
5.7.	Resultados de la prueba t sin corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	60
5.8.	Regiones con atrofia en imágenes <i>ex vivo</i> detectadas mediante VBM.	64
5.9.	Regiones con inflamación en imágenes <i>ex vivo</i> detectadas mediante VBM.	65

5.10. Suma de volúmenes por región y tipo de afectación en imágenes <i>ex vivo</i> mediante VBM.	65
5.11. Regiones con atrofia en imágenes <i>in vivo</i> detectadas mediante VBM.	68
5.12. Regiones con inflamación en imágenes <i>in vivo</i> detectadas mediante VBM.	68
5.13. Suma de volúmenes por región y tipo de afectación en imágenes <i>in vivo</i> mediante VBM.	68
5.14. P-valores obtenidos mediante análisis de varianza (ANOVA) para cada región anatómica en imágenes <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	71
5.15. Comparativa de regiones detectadas y sus p-valores asociados, así como el tipo de afectación, entre los métodos VBM y ROIs para imágenes <i>ex vivo</i> . *Las regiones detectadas únicamente en ROIs no pueden ser buscadas en VBM, puesto que esta última solo arroja datos de los clústeres significativos, impidiendo ver los valores estadísticos de otras regiones.	72
5.16. Comparativa de regiones detectadas y sus p-valores asociados, así como el tipo de afectación, entre los métodos VBM y ROIs para imágenes <i>in vivo</i> . *Las regiones detectadas únicamente en ROIs no pueden ser buscadas en VBM, puesto que esta última solo arroja datos de los clústeres significativos, impidiendo ver los valores estadísticos de otras regiones.	75
6.1. Regiones concordantes entre los métodos VBM y ROIs para imágenes <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> con sus p-valores asociados.	80
E.1. Resultados completos de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	106
E.2. Resultados completos de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	106
E.3. Resultados completos de la prueba F sin corrección del FWER en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	107
E.4. Resultados completos de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	108
E.5. Resultados completos de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes <i>ex vivo</i> con SPM.	109
E.6. Resultados completos de la prueba t sin corrección del FWER para atrofia en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	110
E.7. Resultados completos de la prueba t sin corrección del FWER para inflamación en imágenes <i>in vivo</i> con SPM.	110
E.8. Resultados volumétricos de imágenes <i>ex vivo</i> de ratones transgénicos FVB_Ncr1 en mm^3	111
E.9. Resultados volumétricos de imágenes <i>in vivo</i> de ratones transgénicos FVB_Ncr1 en mm^3	112
E.10. Resultados volumétricos de imágenes <i>ex vivo</i> de ratones control C57BL/6J (NeAt) en mm^3	113
E.11. Resultados volumétricos de imágenes <i>in vivo</i> de ratones control C57BL/6J (NeAt) en mm^3	114

Referencias externas

Siendo el presente trabajo el primero en abordar el uso de la herramienta SPMMOUSE (www.spmmouse.org), se presentan los siguientes videotutoriales complementarios al escrito que faciliten el manejo y uso del software en desarrollos futuros:

- **Segmentación en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/gd1b0Z4t3kA>
- **Suavizado en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/4gq00RRJ9JQ>
- **Análisis estadístico en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/4ynf9XZ3zeY>
- **Gestión y muestra de resultados:** <https://youtu.be/6Ttg9o8YGFw>

A su vez, las demos de los procesamientos y análisis que se llevan a cabo se encuentran ubicadas en `/demos/mice/DEMO/`.

Capítulo 1

Introducción

Este capítulo tiene por objetivo adentrar al lector en la materia de estudio para la comprensión de la problemática abordada, además de exponer las motivaciones y objetivos del proyecto y la hoja de ruta sobre la que se estructura el conjunto del trabajo.

1.1. Las enfermedades neurodegenerativas

Dentro del amplio abanico de enfermedades que cursan con alteraciones neurológicas, se define a las neurodegenerativas como aquellas debidas a la muerte de células neuronales, generando desórdenes cognitivos en función de la región afectada. Su avance es gradual, produciendo la aparición progresiva de diversos síntomas. Ejemplos de estas patologías son el Alzheimer, el Parkinson o el ELA [13].

1.1.1. Causas

Aunque a día de hoy no se tienen claras las causas, el estrés oxidativo se sitúa como posible origen fisiológico del desarrollo de este tipo de enfermedades. Este efecto tiene consecuencias dañinas sobre los componentes celulares, produciendo acumulación de agregados intracelulares y otros procesos tóxicos. En el caso del Alzheimer, esta oxidación produce modificaciones en las estructuras péptidas del tipo beta-amiloide, generando plegados erróneos de estas y desencadenando una entrada masiva de Ca^{2+} y activación de caspasas¹. Este proceso desemboca en la muerte celular (Fig. 1.1) [14].

A su vez, mutaciones en el gen de la proteína tau² también son desencadenantes de desórdenes neurológicos. Esta proteína se encuentra en los ovillos de degeneración neurofibrilar³, los cuales están directamente relacionados con la gravedad de la demencia. La cantidad hallada de proteína tau suele ser mayor en zonas con más destrucción neuronal [15].

Un estudio más reciente [16] relaciona infecciones bucales como la periodontitis con la aparición de la enfermedad del Alzheimer. Los patógenos intracelulares involucrados en estas infecciones (*Porphyromonas gingivalis* y bacterias gingipaina) han

¹Enzimas que presentan un residuo que media en la ruptura de proteínas.

²Proteína estabilizadora de microtúbulos axonales.

³Conglomerados anormales de proteínas.

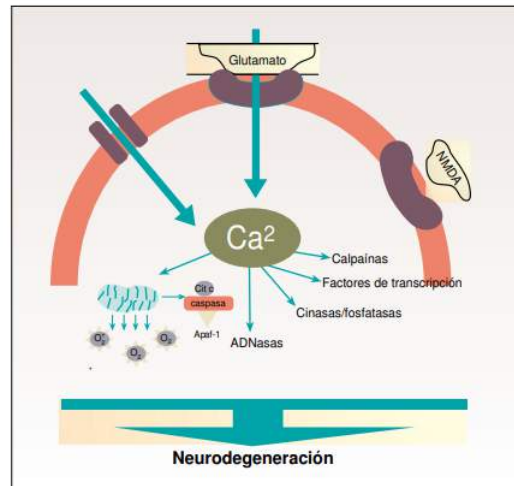


Figura 1.1: Acción del Ca^{2+} en los procesos neurodegenerativos.

sido localizadas en cerebros de personas enfermas de Alzheimer, correlacionándose con los niveles de proteínas tau y ubiquitina. Su estudio en ratones ha demostrado que el patógeno gingipaina coloniza el cerebro y produce un aumento significativo de AB1-42, componente de las placas amiloides. Además, al ser neurotóxico ejerce efectos perjudiciales sobre la proteína tau. En el estudio se hacen ensayos para bloquear esta neurotoxicidad con inhibidores de molécula pequeña dirigidos al patógeno, produciendo en los sujetos una reducción de la neuroinflamación y rescatando neuronas en el hipocampo. Estos resultados podrían conducir a desarrollos futuros de tratamientos más efectivos contra el Alzheimer, de confirmarse como causa estas infecciones.

1.1.2. Epidemiología

Para evaluar el impacto epidemiológico a nivel mundial, existen diversos factores a tener en cuenta, que pueden aumentar las probabilidades de padecer estos desórdenes o inducir error en las mediciones, como pueden ser económicos, sociales, culturales o ambientales. De hecho, los países más pobres, con sistemas de salud deficientes que dificultan el diagnóstico y con condiciones y hábitos de vida poco saludables, sesgan los datos sobre la incidencia real a nivel mundial. Por ello, en función de las distintas regiones globales, la prevalencia de las enfermedades varía.

Sin embargo, hay un factor común: la vejez. El aumento continuado de la esperanza de vida gracias a los avances médicos y tecnológicos acompañado de un incremento poblacional eleva considerablemente la incidencia de la demencia. Pero este hecho supone otra problemática: que la incidencia sea mayor entre personas de edad avanzada provoca que muchos pacientes no acudan a los servicios sanitarios, ya que descartan esta opción al no existir una cura. Esto y la dificultad de diagnóstico en los que sí acuden obliga a recurrir en su lugar a estudios poblacionales que permitan determinar la incidencia de estas patologías. Métodos como el *puerta a puerta*⁴ permiten hallar signos de estas enfermedades estudiando todos los individuos de una

⁴Método que utiliza instrumentos de rastreo o prospección, pudiendo añadir a las estadísticas casos no diagnosticados [17].

población o una muestra representativa de esta [18].

La información epidemiológica sobre incidencia por rangos de edad y a nivel mundial de la que se dispone provienen de estudios como EURODEM, que muestran datos esclarecedores: la incidencia de la demencia se incrementa a partir de los 65 años, llegándose a duplicar a los 85 años. En las tablas 1.1 y 1.2 se aprecian las tasas de prevalencia por rangos de edad y a nivel mundial respectivamente, calculadas por diversos estudios [8].

Grupo etario	Tasa de prevalencia			
	Preston	Jorm	Richtie	EURODEM
65 a 69 años	1,8	1,4	1,4	1,5
70 a 74 años	3,3	2,8	2,6	3,2
75 a 79 años	6,3	5,6	4,7	6,6
80 a 84 años	11,7	10,5	8,1	11,8
85a 89 años	22	20,8	14,9	20,5
90 a 94 años	41,3	38,6	25,7	29,9

Tabla 1.1: Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas por rango de edad calculadas por distintos estudios. Fuente: [8]

Enfermedad	Casos por 100.000 habitantes	Prevalencia	Población afectada a nivel mundial	% mortalidad 2015	% mortalidad para 2030
Alzheimer y otras demencias	400	0,50%	35,6M	0,81	0,92
Parkinson	315	0,34%	23,8M	0,2	0,23
Esclerosis múltiple	30	0,03%	2,28M	0,03	0,02

Tabla 1.2: Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en el mundo. Fuentes: [8][9][10][11]

Epidemiología en España

En la región española, la incidencia de enfermedades neurodegenerativas se acentúa respecto de otras naciones debido fundamentalmente a la vulnerabilidad que surge de tener uno de los ritmos de envejecimiento más altos del mundo.

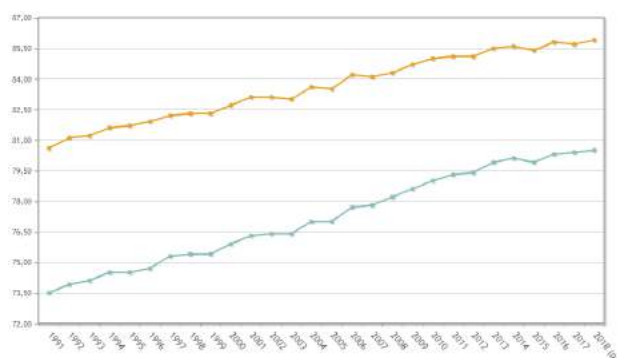


Figura 1.2: Esperanza de vida en España. Naranja: mujeres, Azul: hombres

Esto se traduce en una prevalencia notablemente elevada, alcanzando el 2.08% de población afectada por este tipo de enfermedades (Tabla 1.3).

Enfermedad	Prevalencia	Población
Alzheimer y otras demencias	1,53 %	717.000
Parkinson	0,34 %	160.000
Esclerosis múltiple	0,08 %	47.000
Total	2,08 %	988.000

Tabla 1.3: Tasas de prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en España. Fuente: [8]

1.1.3. Impacto socioeconómico

A la vista de los datos epidemiológicos mostrados, es preciso analizar los efectos económicos que tienen estas patologías sobre la sociedad. En los datos (Tabla 1.4) se puede observar el tremendo impacto sobre las economías, en este caso europeas. Los gastos asociados a las pruebas y tratamientos paliativos, así como los costes indirectos supusieron en 2010 un total de 143.000 millones de euros, correspondiendo el 13.18 % de esta cifra a la enfermedad de Alzheimer.

Enfermedad	Personas		Coste por paciente (€)				Costes totales en Europa (€)			
	Afectados	Directos médicos	Directos no médicos	Indirectos	Total	Directos médicos	Directos no médicos	Indirectos	Total	
Alzheimer y otras demencias	6,3M	2.673	13.911	-	16.584	16.949M	88.214M	-	105.163M	
Parkinson	1,2M	5.626	4.417	1.109	11.152	7.029M	5.519M	1.386M	13.933M	
Esclerosis múltiple	0,8M	9.811	8.438	8.725	26.974	5.295M	4.554M	4.709M	14.559M	
Totales	8,3M				54.710				133.655M	

Tabla 1.4: Costes de las tres principales enfermedades neurodegenerativas en Europa (UE-27, Islandia, Noruega y Suiza)(2010). Fuentes: [8][12]

Impacto socioeconómico en España

Teniendo España un servicio de salud público universal, el impacto económico de estas enfermedades recae casi en su totalidad sobre el Estado, salvando los servicios ofertados por el sector privado. El coste de patologías neurodegenerativas supone un 3.11 % del PIB español, unos 32 mil millones de euros entre costes médicos directos e indirectos (Tabla 1.5).

Enfermedad	Personas		Coste por paciente (€)				Costes totales en España (€)			
	Afectados	Directos médicos	Directos no médicos	Indirectos	Total	Directos médicos	Directos no médicos	Indirectos	Total	
Alzheimer y otras demencias	717.000	5.348	1.237	22.597	29.182	3.835M	887M	16.202M	20.923M	
Parkinson	160.000	3.988	3.325	11.487	18.800	638M	532M	1.838M	3.008M	
Esclerosis múltiple	47.000	28.964	12.370	14.252	55.586	1.361M	581M	670M	2.613M	
Totales	988.000				103.568				26.544M	

Tabla 1.5: Costes de las tres principales enfermedades neurodegenerativas en España (2014). Fuente: [8]

Llegado este punto, es necesario hacer hincapié en la importancia que cobra la inversión, tanto pública como privada, en investigación y desarrollo (I+D), no solo en el tratamiento y detección temprana de estas enfermedades, sino en todo lo relativo con el área de la salud, pues el impacto humano y económico es considerablemente alto, tal y como se ha expuesto, no limitándose únicamente a los pacientes, sino al conjunto de la sociedad.

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de estas enfermedades resulta complejo en muchos casos, llegando al punto de solo esclarecerse mediante el estudio neuropatológico post-mortem. Precisa de un alto grado de compromiso por parte del paciente y de un importante despliegue de medios médicos y tecnológicos de alto coste. Las principales vías de diagnóstico se basan en [19]:

- **Pruebas cognitivo-conductuales:** se basan en pruebas de tipo psiquiátricas y psicológicas que miden el nivel de afectación a nivel conductual, de memoria, lenguaje y función visuoespacial y ejecutiva de la enfermedad. Este tipo de pruebas generan limitaciones dado que precisa de la asistencia del paciente de manera periódica a servicios sanitarios.
- **Biopsia cerebral:** consiste en la extracción de tejido cerebral o líquido cerebrospinal para su posterior análisis. Está desaconsejada debido a la naturaleza de la prueba, dado que resulta invasiva y peligrosa para el paciente.
- **Tomografía computarizada:** se combinan una serie de radiografías tomadas desde distintos ángulos de la cabeza, formando por medio de procesamiento digital estructuras tridimensionales con mayor detalle que las radiografías tradicionales. Su uso es limitado debido a la radiación inducida al paciente, pues puede llegar a ser perjudicial.
- **Imágenes de resonancia magnética (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI):** estas imágenes permiten observar y medir el grado de pérdida o inflamación del tejido neurológico. Su estudio es el más prometedor, pues esta clase de pruebas no generan perturbaciones al paciente, aunque requieren de un compromiso por su parte para analizar longitudinalmente (a lo largo del tiempo) su evolución y esclarecer un diagnóstico.

1.1.5. Importancia del diagnóstico preclínico

A la hora de diagnosticar y tratar desordenes neurológicos, el tiempo juega en contra. Aunque de momento no existe una cura, los tratamientos paliativos tanto psicológicos como farmacológicos ayudan considerablemente al paciente, ralentizando la evolución de su enfermedad. Pero la antelación con la que se detecte es clave para que estos tratamientos sean lo suficientemente eficaces. Por ello, cobra especial importancia el diagnóstico preclínico, es decir, aquel que se realiza antes de que aparezcan los primeros síntomas (fase asintomática). Esta etapa puede durar entre 10 y 15 años, o incluso más si el estilo de vida del paciente es neurosaludable.

El diagnóstico preclínico se realiza haciendo uso de las MRI. El estudio de estas no se limita únicamente a la fase prodrómica (fase sintomática), en el cerebro es posible ver afectaciones en diversas regiones en fases preclínicas. Gracias a los avances en materia de computación e inteligencia artificial, se hace posible la automatización de estos análisis [20].

1.2. El empleo de animales en investigación

Los animales han sido claves en el avance médico y científico. Su uso ha valido tanto para pruebas diagnósticas como terapéuticas o de productos farmacológicos. Suponen una ventaja y mejora significativa de tiempo y bienestar humano, garantizando en la medida de lo posible un trato ético a estos animales. Aunque existen otros métodos, la experimentación animal tendrá siempre una mayor fiabilidad en cuanto a resultados, puesto que frente a según qué investigaciones, la complejidad hace inviable su simulación fuera de un sistema biológico [21].

1.2.1. Implicaciones éticas

Si bien sigue existiendo debate en torno a las connotaciones éticas y morales de la investigación con animales, es difícil llegar a un consenso preciso sobre el tema [21]. Existen varias perspectivas acerca de si los animales son sujetos morales o no. En cualquiera de los casos, al ser seres con capacidad de sentir dolor, sin capacidad de decisión y, en la inmensa mayoría de casos, sin capacidad de defensa, no queda justificado en ningún caso su trato vejatorio o cruel. Los fines de su utilización son, en el caso de la investigación científica, nobles y útiles tanto para el ser humano como para los propios animales, lo cual justifica su empleo en estas prácticas. Por esto, tanto en el presente trabajo como en otros previos y consecutivos, se asegura su correcto trato dentro de la ética y el bienestar animal, garantizando el mínimo sufrimiento posible para los animales. Los protocolos por los cuales han sido tomadas las imágenes empleadas en el presente trabajo pueden ser consultados en el anexo D.

1.2.2. Animales transgénicos

Gracias a los avances en las bases moleculares de multitud de enfermedades, se hace posible el empleo de modelos animales genéticamente modificados para adecuarse a los desarrollos requeridos. De este modo, se crean mutaciones a través de la manipulación genética, obteniendo animales con padecimientos aproximados al del ser humano [21].

Su implicación se ve reflejada directamente en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Concretamente, y en la línea que sigue este trabajo, los estudios se realizan sobre ratones transgénicos. Al ser el ratón el modelo más utilizado en el análisis de enfermedades de todo tipo, se han desarrollado cepas modificadas genéticamente que se adaptan a los ensayos experimentales de enfermedades como el Alzheimer, haciendo posible la investigación de modelos de diagnóstico o tratamiento sin precisar sujetos humanos.

1.3. Motivación del proyecto

Las enfermedades neurodegenerativas, tal y como se ha expuesto, suponen un importante coste económico y, sobretodo, humano. Esto hace que la motivación y financiación en investigación sea absolutamente necesaria. Con el fin de mejorar y ralentizar, en la medida de lo posible, el desarrollo todavía inevitable de estas

enfermedades, se realizan estudios como el presente proyecto, con el cual se pretende contribuir humildemente en una de las múltiples líneas de investigación abiertas, pues toda ayuda aportada a esta causa suma.

1.4. Objetivos

El presente proyecto abre una nueva línea de Trabajos de Fin de Grado dentro del Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica Automática y Física Aplicada, por lo que uno de los principales objetivos es sentar las bases, tanto técnicas como metodológicas de futuros trabajos, pudiendo así asegurar la progresión en este campo de la forma más dinámica y precisa posible. Siguiendo esta idea, el trabajo se presenta con una intención introductoria al procesado de imágenes de resonancia magnética de ratones mediante las técnicas de morfometría basada en vóxel y basada en regiones de interés. Se realiza a su vez una comparativa de ambos métodos con el fin de esclarecer las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Además, se pretenden analizar las diferencias entre imágenes *ex vivo* e *in vivo* en el uso de las técnicas mencionadas, así como su uso en análisis longitudinal.

1.5. Estructura del documento

Para facilitar la lectura del trabajo, se detalla a continuación el contenido de cada capítulo.

- En el capítulo 1 se realiza una introducción a las enfermedades neurodegenerativas y al empleo de animales en la investigación. A su vez, se exponen las motivaciones y objetivos del trabajo.
- En el capítulo 2 se detalla el estado de la técnica exponiendo los principales estudios precedentes del proyecto.
- En el capítulo 3 se definen los materiales y herramientas empleados.
- En el capítulo 4 se desarrolla el marco teórico de las técnicas VBM y ROIs y la metodología seguida por el trabajo.
- En el capítulo 5 se exponen resultados y análisis de los mismos.
- En el capítulo 6 se detallan las conclusiones sacadas en base a los resultados obtenidos, así como las limitaciones y desarrollos futuros del trabajo.

Capítulo 2

Estado del arte

2.1. Líneas de investigación: precedente del proyecto

A continuación se hace un repaso a la literatura científica más significativa que sigue la misma línea de investigación del presente trabajo. Se destacan de estos estudios las problemáticas abordadas, pues son referencia para el desarrollo del proyecto.

2.1.1. *Comparison of in vivo and ex vivo MRI for the Detection of Structural Abnormalities in a Mouse Model of Tauopathy* [1]

Hay una clara diferencia a la hora de analizar imágenes MRI dependiendo de si estas han sido realizadas en sujetos vivos (*in vivo*) o muertos (*ex vivo*). La calidad en ambos casos difiere drásticamente debido a diversos factores, dado que cada forma tiene sus propias características y procedimientos. Para las imágenes *ex vivo*, los tiempos de escaneo son mayores y en ellos se pueden utilizar mayores cantidades de contraste en el sujeto. Esto produce un aumento significativo de la resolución, de la relación señal/ruido (*Signal Noise Ratio*, SNR) y de la relación contraste/ruido (*Contrast Noise Ratio*, CNR). Esto se traduce en mejores resultados en su tratamiento computacional. En cambio, en imágenes *in vivo*, la propia actividad indispensable del propio sujeto (como la respiración) produce un descenso de la calidad de imagen. La ventaja de estas imágenes es la posibilidad del estudio longitudinal, lo cual es imposible en *ex vivo*.

El estudio tiene por objetivos el análisis de la sensibilidad de imágenes MRI *ex vivo* e *in vivo* a diferencias morfológicas. Esto se realiza sobre ratones transgénicos de la cepa rTg4510 (sujetos enfermos) con manifestaciones de proteína tau y ratones salvajes (sujetos control). Además, se busca también esta sensibilidad en sujetos rTg4510 tratados con doxiciclina, un antibiótico que ha demostrado inactivar la proteína tau. Para la caracterización morfológica aplican lo que se conoce como morfometría basada en tensor (*Tensor-based Morphometry*, TBM) (ver Sec. B.3) automatizada. Su razón de uso es por su gran rendimiento para el análisis de la neuroanatomía del ratón, puesto que ya ha sido empleado para otros estudios de trastornos neurológicos.

Es importante destacar los protocolos de escaneo de las imágenes, pues son referencia del presente trabajo. Estos pueden observarse en la tabla 2.1. Se aprecia una

diferencia especialmente importante en la resolución y en los tiempos de escaneo, como ya se ha comentado.

	<i>In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>
Secuencia	<i>Fast spin echo</i>	<i>Gradient echo</i>
Ponderación	T2	T2*
Resolución	150 μm^3	40 μm^3
Tiempo de escaneo	1h 30 m	11h 24 m
Contraste	No	Sí

Tabla 2.1: Protocolo de escaneo empleado en el estudio.

El tratamiento de las imágenes pasa por el registro a un espacio estándar, corrección del sesgo en la intensidad y la eliminación del hueso craneal, además de un suavizado con kernel gaussiano. Se aplica también una máscara atlas. El volumen cerebral total (*Total Brain Volume*, TBV) se calcula a partir de cada una de las imágenes, usando los vóxeles y la máscara atlas aplicada. Se estandarizan las intensidades utilizando un método lineal por partes (*piece-wise linear method*). En el estudio estadístico se realiza una prueba t de dos muestras en cada vóxel, ajustando un modelo lineal para mostrar los vóxeles más significativos respecto a las diferencias globales. A su vez, los mapas paramétricos se corrigen con pruebas iterativas usando la tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate*, FDR).

A raíz de analizar los datos obtenidos, el estudio obtiene distintos resultados para los siguientes escenarios:

- **Efectos del escaneo *ex vivo* e *in vivo* en los valores de SNR y CNR**

El estudio observa un incremento del SNR en las imágenes *in vivo* respecto de las *ex vivo* en 7 de las 9 regiones que investiga, en cada una de ellas en distinto grado. Por contra, el valor CNR aumenta hasta en tres veces en la materia gris y estructuras de la materia blanca en *ex vivo* en comparación con *in vivo*. Estas diferencias están ligadas también con los protocolos de obtención de las imágenes, siendo el valor SNR dependiente en gran medida de la resolución.

- **Efectos de las variaciones en los tejidos debido a la muerte del sujeto y su conservación**

El tratamiento de los sujetos muertos con formalina para su conservación produce un encogimiento de los tejidos, lo cual puede comprometer los resultados. El estudio aprecia un decremento del 10% del volumen total cerebral en las imágenes *ex vivo* respecto de las *in vivo*. Esta situación se aprecia en el resto de sujetos en grados similares. Observa también el efecto regional de esta contracción de tejidos registrando las imágenes *ex vivo* en su correspondiente plantilla *in vivo*. Las mayores diferencias encontradas se sitúan en las estructuras frontales (bulbo olfatorio) y en el tronco encefálico. Este último matiza que puede ser consecuencia de la decapitación de los sujetos. El resto de regiones de interés no parecen verse afectadas.

- **Comparación del efecto de la patología debida a la proteína tau**

En primera instancia, se muestra un tamaño más reducido en el cerebro de los ratones no tratados con doxiciclina, tanto en imágenes *in vivo* como en *ex vivo*.

A continuación, se muestran las diferencias estudiadas entre las imágenes *in vivo* y *ex vivo* obtenidas por morfometría basada en tensor, comparando a su vez los distintos sujetos:

- **Comparación entre sujetos transgénicos y salvajes**

En el análisis volumétrico del cerebro completo en imágenes *in vivo* se resalta una atrofia bilateral en la parte anterior cerebral (córtex, núcleo caudado, putamen, hipocampo, hipotálamo). Se observa también una expansión de los ventrículos laterales tres y cuatro. En las imágenes *ex vivo* se aprecia un patrón de atrofia parecido, pero más extendido.

- **Comparación entre sujetos control transgénicos y transgénicos tratados con doxiciclina**

En las diferencias morfológicas que se ven entre los sujetos tratados y no tratados, las variaciones regionales son menos acusadas que en la comparación previa (sujetos transgénicos control y salvajes). Aunque sí se muestra mayor sensibilidad en la detección en las imágenes *ex vivo*, tanto en estas como en *in vivo* hay correspondencia a nivel volumétrico global entre las variaciones regionales, siendo identificados clústeres en ambos tipos de imágenes.

El estudio finalmente destaca que, a la hora de detectar variaciones más concretas, que requieran de mayor sensibilidad, es recomendable el uso de imágenes *ex vivo*, aunque no desestima el uso de imágenes *in vivo*, pues la utilización de ambas aporta una mayor precisión para detectar diferencias morfológicas.

Remarca la importancia de los protocolos de escaneo para afinar los parámetros SNR y CNR, controlando su efecto en la calidad de las imágenes. A su vez, cita la importancia que tiene la consideración de los efectos de las variaciones en la integridad de los tejidos, lo cual influye fundamentalmente a las imágenes *ex vivo*, generando una disminución en el valor SNR, aunque ofrece una solución incrementando los promedios de señal.

2.1.2. *In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strainspecific structures in the mouse brain* [2]

Debido a la enorme dificultad que supone el análisis morfológico del cerebro de ratones, se ha hecho necesaria la aparición de herramientas cada vez más poderosas que realicen este proceso de forma automática. Aun así, no existe un software concreto que realice esta función específicamente. En su lugar, son empleadas herramientas como VBM y SPM.

El principal objetivo del estudio es la creación de las denominadas *templates*, plantillas que pueden ser utilizadas en las citadas herramientas. Estas son creadas a partir de 4 cepas de ratones distintas (C57Bl/6, BALB/cBy, C3H/He, DBA/2). Cada una de estas plantillas hace referencia a las distintas cepas, aunque también crea una *template* mixta de todas ellas con el fin de ser empleado en análisis por VBM, para detectar diferencias significativas entre las cepas.

El primer paso seguido es la obtención de las imágenes *in vivo* ponderadas en T1 con un tiempo de escaneado de 2h. Se les aplican a las imágenes filtrado de ruido para un análisis posterior más eficaz. Además, se aumenta el tamaño de los vóxeles en 10 veces para su uso en SPM. Para la creación de las *template* se siguen los siguientes procedimientos:

- **Skull-stripping:** Este proceso consiste en la eliminación del hueso craneal de la imagen, el cual se suele realiza con la herramienta BET (*Brain Extraction Tool*). Debido a las diferencias anatómicas entre humanos y ratones, se tiene un efecto negativo en las regiones frontal y occipital, ya que esta herramienta es normalmente utilizada para imágenes MRI humanas. Por ello, el estudio realiza este paso de forma manual.
- **Registro:** Se realiza una normalización de las imágenes a un espacio afín tomando como plantilla una imagen referencia *ex vivo*.
- **Segmentación y creación de la plantilla:** Se segmentan las imágenes en materia gris, materia blanca y líquido cerebroespinal, además de otras regiones no significativas. Se emplea para este paso la herramienta de segmentación que incorpora SPM8. Las referencias de segmentación son dadas por mapas de probabilidad de tejido.

El análisis posterior mediante VBM arroja datos sobre las diferencias morfológicas entre las distintas cepas. Para ello, se genera una *template* mixta de todas las cepas y se realiza un suavizado con un kernel gaussiano isotrópico. El estudio estadístico se sitúa sobre la materia gris con un análisis de varianza ANOVA y un p-valor < 0.05.

Los resultados obtenidos se describen a continuación, comparando la cepa de ratones C57Bl/6 con las restantes:

- **C57Bl/6 y BALB/cBy:** En este caso, el bulbo olfatorio es notoriamente más grande en los C57Bl/6 y el lóbulo 3 del vermis del cerebelo es mayor en los BALB/cBy.
- **C57Bl/6 y C3H/He:** Se encuentra un volumen significativamente mayor en la materia gris, concretamente en la corteza visual bilateral primaria en el caso de

los C57Bl/6. Por contra parte, en los C3H/He el volumen es mayor en muchas de las cortezas del cerebelo, lobulillos simples y crus 2 del lóbulo ansiforme.

- **C57Bl/6 y DBA/2:** En la cepa C57Bl/6 se observa un volumen mayor en la materia gris, región de la corteza auditiva primaria bilateral y en el hipocampo. En los DBA/2 no se observan diferencias significativas.

2.1.3. *A stereotaxic MRI template set of mouse brain with fine sub-anatomical delineations: Application to MEMRI studies of 5XFAD mice* [3]

A la hora de estudiar y comprender el progreso de la enfermedad de Alzheimer en las primeras etapas y de forma longitudinal (a lo largo del tiempo), el análisis de la actividad cerebral está resultando de gran utilidad. Para ello se emplea la técnica de imágenes de resonancia magnética mejoradas con manganeso (*Manganese-enhanced magnetic resonance imaging*, MEMRI), la cual permite rastrear neuronas activas. El estudio desarrolla plantillas útiles en el espacio nombrado como *Paxinos And Franklin*, que se menciona a partir de ahora como IMT (*the Institute of High Energy Physics Mouse template*), utilizando imágenes ponderadas en T2 de ratones C57BL/6 e imágenes MEMRI. Ratones transgénicos 5XFAD en distintas edades son empleados para la evaluación y aplicación del IMT. Además, como complemento indispensable para las plantillas, se presenta un atlas, necesario para conocer la anatomía cerebral del ratón y poder ubicar, de manera automática, las distintas regiones. El análisis de las imágenes tiene especial relevancia para el presente trabajo, pues las técnicas que emplea son VBM y ROIs. Para la construcción de las plantillas en IMT, se sigue el diagrama de flujo mostrado en la figura 2.1.

En el caso de las imágenes T2 se aplica el algoritmo N4, con el objetivo de corregir la uniformidad en la intensidad producida durante el escaneo. A continuación, el paso seguido para ambos tipos de imágenes (MEMRI y T2) es el registro afín y no lineal empleando SPM. La media de las imágenes se acepta como válida.

Para las imágenes T2, se realiza una segmentación basada en intensidades por regiones de materia gris, blanca y fluido cerebroespinal, eliminando tejidos blandos extracraneales y registrando y promediando en SPM. Estas imágenes son empleadas como referencia para segmentar nuevamente las originales empleando DARTEL. Una vez más, los resultados de segmentación son promediados y normalizados, obteniendo una nueva referencia. Este proceso se repite hasta cumplir con la condición de que la diferencia estándar residual (*Standar Difference*, SD) entre dos plantillas de materia gris adyacentes promediadas sea menor al 5%.

En imágenes MEMRI, empleando la plantilla creada con imágenes T2 como referencia, se normalizan en el espacio IMT empleando DARTEL. Se promedia el resultado y se toma como nueva referencia. Se continua con el proceso hasta cumplir la condición de que el valor SD entre dos imágenes promediadas sea menor al 5%.

Todo este proceso se puede ver esquemáticamente en la figura 2.2. El paso seguido a continuación es la estandarización al espacio IMT y la aplicación del atlas de los mismos autores sobre las imágenes, con el fin de poder analizarlas mediante VBM

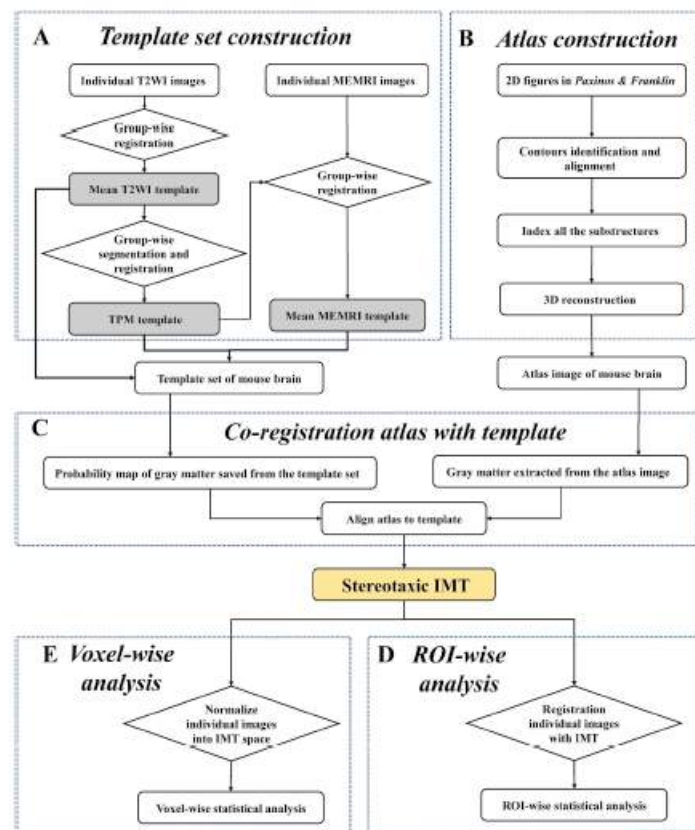


Figura 2.1: Diagrama de flujo del procesamiento y análisis de las imágenes.

y ROIs.

En el caso de las imágenes MEMRI, el análisis se emplea para verificar la precisión y uso del espacio IMT. En VBM, las imágenes se registran en dicho espacio con una transformación no lineal y posteriormente se suavizan con un kernel gaussiano. El estudio estadístico se realiza con una prueba t de dos muestras, identificando variaciones regionales con un p-valor menor de 0.001 y empleando un $FDR < 0.05$. En función de los resultados obtenidos en VBM, se emplean las regiones bilaterales del hipocampo y la amígdala para el análisis por ROIs. El análisis estadístico emplea una prueba t de dos muestras.

Los resultados evaluados en el estudio concluyen que el empleo del espacio IMT es útil, pues se encuentran variaciones significativas en las regiones estudiadas a lo largo de los rangos de edad. Remarca también la importancia de no limitar este espacio IMT únicamente a imágenes MEMRI, puesto que puede ser empleado en imágenes MRI, imágenes funcionales fMRI u otras aplicaciones.

2.1.4. *Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry* [4]

La técnica de análisis VBM, descrita en la sección 4.1, está demostrando ser una poderosa herramienta para hallar diferencias significativas entre imágenes MRI, con

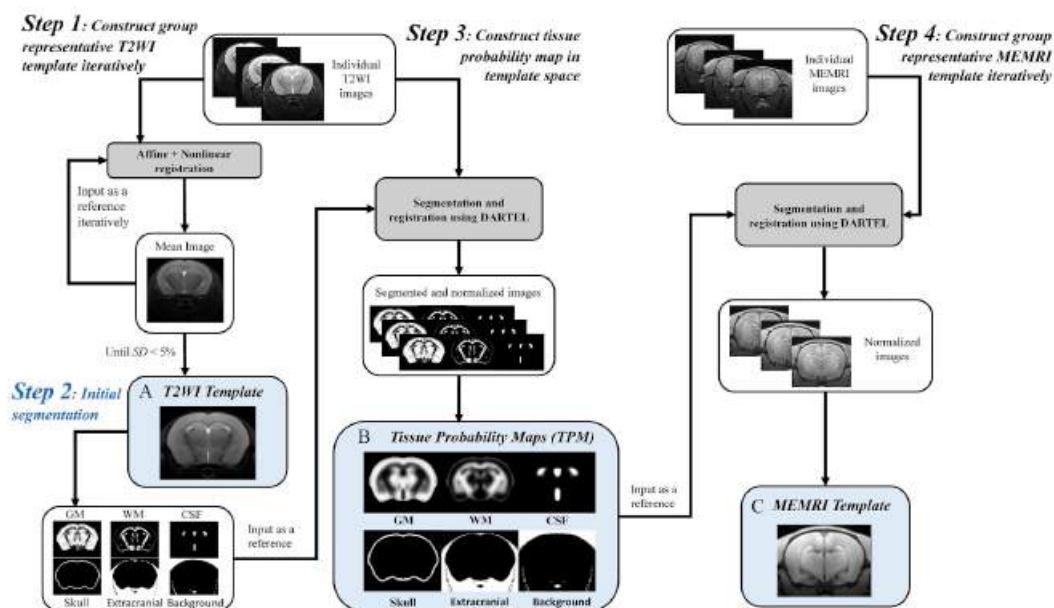


Figura 2.2: Diagrama de flujo del procesamiento de las imágenes.

el objetivo de detectar signos de patologías neurodegenerativas. Este estudio busca desarrollar esta técnica, analizando y comparando resultados, centrado en la enfermedad de Huntington.

El trabajo se realiza comparando imágenes ponderadas en T1 *ex vivo* del cerebro de ratones salvajes y de la cepa transgénica R6/2. La motivación para usar este tipo de imágenes va ligada a los protocolos de adquisición, pues imágenes *ex vivo* permiten mayor tiempo de escaneo y, en consecuencia, una mejoría notable en la calidad de la imagen.

El análisis VBM de las imágenes se realiza con SPM5. Los procesos seguidos son los habituales en VBM. En primer lugar, se realiza una transformación afín al mismo espacio estereotáctico usando como referencia un atlas de la cepa C57Bl/6. Se crearon para el propio estudio mapas de probabilidad de tejido específicos requeridos para el proceso de segmentación. Estos se crean a partir de las imágenes de ambas cepas, pues considera que un atlas mixto mitiga el sesgo en grupos individuales.

La segmentación se hace de materia gris, materia blanca y líquido cefalorraquídeo, matizando que este último puede incluir restos indeseados producto de la fijación del cerebro. Las imágenes entonces se suavizan con un kernel gaussiano. El proceso se continúa creando un mapa probabilístico de la materia gris, empleando un determinante jacobiano para cada vóxel. El resultado se suaviza nuevamente con un kernel gaussiano isotrópico, eliminando imperfecciones.

El análisis estadístico se realiza mediante prueba t. Emplea la técnica FDR con un valor de 0.05.

Los resultados que muestra el estudio son los siguientes:

- No encuentra diferencia significativa de volumen completo cerebral entre grupos, por lo que incorpora al análisis covariables como el sexo y el volumen cerebral individual.
- Se encuentran clústeres en distintas regiones (córtex, cerebelo, ganglio basal, hipocampo, hipotálamo, tálamo) con diferencias significativas en algunos de ellos (tálamo, médula, córtex, amígdala y ganglio basal)

El estudio remarca las diferencias existentes entre el estudio de imágenes en dos y tres dimensiones, siendo estas últimas más útiles para encontrar pequeñas variaciones. A su vez, resalta que también existen diferencias importantes entre morfometrías manuales y VBM, aunque este último, tal y como apuntan otros estudios, no encuentra cambios en la corteza parietal, sí detectados por morfometría manual. Sin embargo, matiza que ambas técnicas pueden ser útiles dependiendo del uso que se les asigne y los resultados que se esperen.

Finalmente, se detallan las regiones donde se encuentran clústeres con diferencias más marcadas entre grupos:

- Estructuras en el ganglio basal.
- Córtex, especialmente la corteza motora y semimotora, así como el cerebelo.
- Hipocampo e hipotálamo.
- Cuerpo estriado, donde el estudio encuentra cambios que ya habían sido datados para la enfermedad de Huntington.

Como consideraciones finales detalla que los resultados pueden no ser concluyentes con un análisis VBM. Las imperfecciones dadas por el registro pueden dirigir a falsos resultados en la comparativa entre grupos. Asimismo, las variaciones de intensidad entre materia gris y blanca pueden ser explicadas por cambios físicos, como contracciones de tejidos o cambios químicos que afecten a las estructuras. Además, debido a la propia naturaleza de la técnica VBM de considerar individualmente cada vóxel, los clústeres normalmente abarcan más de una estructura cerebral.

2.1.5. *Study the longitudinal in vivo and cross-sectional ex vivo brain volume difference for disease progression and treatment effect on mouse model of tauopathy using automated MRI structural parcellation* [5]

Tal y como se ha comentado en el estudio de la sección 2.1.1, la medición volumétrica de las estructuras cerebrales puede realizarse tanto en imágenes *in vivo* como *ex vivo*. En imágenes *in vivo* existe la ventaja de un estudio longitudinal, es decir, tomando muestras a lo largo del tiempo para un estudio del deterioro progresivamente. En cambio, las imágenes *ex vivo* únicamente tiene sentido tomarlas en un momento concreto del tiempo, pues ya no existe evolución de la enfermedad (o en el caso de ratones, del deterioro simplemente). Otra diferencia fundamental se encuentra en la calidad de las imágenes obtenidas: imágenes *ex vivo* se obtienen con tiempos de escaneo mayores y otros factores dotándolas de una calidad de imagen mayor, aunque con condicionantes por causas comentadas en [1], sección 2.1.1 (efecto

de la conservación, fijación. . .). Este estudio realiza un análisis con más profundidad sobre las diferencias entre imágenes *ex vivo* e *in vivo* a la hora de ser empleadas para su análisis. Para ello, emplea información longitudinal *in vivo* e imágenes en un único punto temporal *ex vivo*.

Esta comparativa se realiza mediante la técnica de regiones de interés (ROIs), siendo este un método clave del presente trabajo y, por tanto, teniendo especial relevancia en el desarrollo del mismo.

Los sujetos empleados por el estudio son ratones transgénicos rTg4510 divididos en tres grupos (salvajes, control y tratados), con la capacidad de desarrollar deterioros típicos de enfermedades como el Alzheimer o la demencia frontotemporal, en base a la acumulación de nudos neurofibrilares de proteína tau (*Neurofibrillary Tangles*, NFTs). Los NFTs producen cambios en las estructuras cerebrales del ratón, aunque estas pueden ser mitigadas con el uso del fármaco ya descrito con anterioridad: doxiciclina. Por ello, se realizan dos grupos, uno con sujetos salvajes y otro con sujetos tratados de la misma cepa. Con esto se consigue una comparativa entre variaciones volumétricas marcadas y atenuadas.

Para el análisis de las ROIs, el proceso comúnmente empleado es la parcelación regional del cerebro, esto es, segmentar el cerebro en sus distintas estructuras en base a un atlas previamente desarrollado y etiquetarlas con sus respectivos nombres. Este proceso puede ser manual o automático. El estudio realiza una la parcelación automática, destacando el ahorro de tiempo considerable respecto de la segmentación manual. Esta parcelación requiere de un preprocesamiento de las imágenes, registrándolas al mismo espacio del atlas. Las etiquetas también son registradas.

Se desarrolla a continuación un análisis del contraste con el ruido CNR entre la materia gris (*Grey Matter*, GM) y la materia blanca (*White Matter*, WM) en base a la siguiente fórmula:

$$CNR = \frac{Signal_{GM} - Signal_{WM}}{Noise}$$

Se agrupan las etiquetas de todas las estructuras de la materia gris y blanca, promediando y midiendo la intensidad a través de las regiones completas de acuerdo a las intensidades. Para medir el ruido de fondo, se registran las imágenes en base a una seleccionada aleatoriamente y se toma el promedio de todas ellas. Se toma posteriormente la media de todas las imágenes, segmentando manualmente la ROI de la imagen de fondo, sin contenido en señales relacionadas con tejido. Esta ROI es propagada por el resto de sujetos tomando la transformación inversa de la matriz generada durante el registro. Con esto se procede a la medición de la desviación estándar de la ROI propagada, obteniendo el ruido. Posteriormente se compara el CNR mediante una prueba t de una muestra, con múltiples comparaciones con un FDR de 0.05.

Respecto a la comparación entre los volúmenes estructurales medidos entre imágenes *ex vivo* e *in vivo*, se emplea para el análisis de las diferencias proporcionales el método Bland-Altman, empleado en investigación científica médica para el análisis de diferencias entre dos medidas. Para el estudio de las variaciones volumétricas

medias, se emplea un análisis de varianza ANOVA.

En el análisis de las diferencias grupales concretas, se toma una prueba t de dos muestras en los volúmenes normalizados de todas las estructuras parceladas. El FDR empleado en este caso es de 0.05. Cabe destacar el cálculo del volumen normalizado, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\hat{V}_i = \frac{\varepsilon_i - \mu_{\varepsilon UT}}{\sigma_{\varepsilon UT}}$$

donde $\mu_{\varepsilon UT}$ y $\sigma_{\varepsilon UT}$ son la media y la desviación estándar para el grupo sin doxiciclina. ε_i es el término de error.

Además, debido al estudio longitudinal con imágenes *in vivo*, se estima el ratio de cambio volumétrico ajustando un modelo lineal a datos del volumen longitudinal en tres puntos temporales distintos, descrito por la ecuación:

$$V_j^{t_i} = V_j^{t_0} + R_j(t_i - t_0) + \varepsilon$$

donde $V_j^{t_i}$ es la medida del volumen de la estructura j en un tiempo t_i . El parámetro R_j representa la tasa de cambio de volumen en dicha estructura j y ε el término de error.

En relación con los puntos de tiempo seleccionados, el estudio investiga cuáles son los más óptimos en base al análisis de tres ROIs demostradas como especialmente significativas a la hora de hallar signos de la enfermedad de Alzheimer: el hipocampo, el córtex y los ventrículos. El análisis volumétrico se lleva a cabo en los tres puntos temporales descritos con anterioridad mediante una comparación usando ANOVA (FDR<0.05).

Como resultados se obtiene que, desde la propia parcelación, un aumento de los ventrículos (*in vivo*) y reducción de los ventrículos (*ex vivo*), pudiéndose ver por inspección visual directa de las imágenes. El CNR se aprecia considerablemente mayor en imágenes *ex vivo* en todos los sujetos.

Los resultados del análisis Bland-Altman reflejan una reducción del volumen de los ventrículos tanto en *in vivo* como en *ex vivo*. Muestra también variaciones en las diferencias de volumen, indicando una distribución no uniforme y no lineal de la contracción de sujetos *in vivo* a *ex vivo*. Se observan también diferencias en la mayoría de las estructuras de los tres grupos de sujetos, confirmando la contracción ventricular en todos ellos. Además, se aprecian los cambios comúnmente atribuidos a imágenes *ex vivo* referidos al decremento del volumen general de las principales estructuras de la materia gris, exceptuando la materia gris central, la cual se manifiesta como incrementada respecto de los datos *in vivo*. Las estructuras de la materia blanca se demuestran mayores respecto de las *in vivo*, exceptuando las regiones más pequeñas de esta área y la comisura anterior, que se perciben significativamente menores en *ex vivo*.

A continuación, se detalla si las diferencias en las medidas volumétricas entre *in vivo* y *ex vivo* afectan al análisis estadístico del efecto del tratamiento con doxici-

clina. El resultado muestra una reducción importante en los datos longitudinales *in vivo* del ventrículo después de ser tratados con doxiciclina. Este efecto no se detecta en las imágenes *ex vivo*, debido al colapso de los ventrículos por el tratamiento post-mortem de los tejidos. En la materia blanca no se hallan diferencias significativas salvo un decremento del volumen en la fimbria en los datos *in vivo*. En la materia gris de imágenes *in vivo* se aprecian mayores diferencias con incremento en distintas regiones y decremento en otras. Las imágenes *ex vivo* muestran patrones similares, sin embargo, se detectan contracciones y expansiones volumétricas específicas. Cabe destacar el hecho de la disminución del volumen del cerebelo tanto en *in vivo* como en *ex vivo* en sujetos tratados.

En el estudio longitudinal, se aprecian diferencias significativas en la tasa de cambio volumétrico en regiones como el neocórtex o el hipocampo, comparando sujetos tratados y no tratados. Se muestran también niveles altos de significancia en el putamen caudado en los datos longitudinales respecto de los *ex vivo*.

Cobra especial interés el estudio de resultados para las tres ROIs seleccionadas como principales. Se muestra que las primeras atrofas comienzan pronto, aunque los incrementos de los ventrículos se demoran. El efecto del tratamiento se aprecia también tempranamente en el hipocampo, y más tardío en el córtex y los ventrículos, confirmando una diferencia importante entre sujetos tratados y no tratados.

Se destaca finalmente distintos aspectos a tener en cuenta sobre el estudio, como el uso de diferentes protocolos de adquisición de imágenes, condicionando con diferentes factores los datos y enfatizando en la solución ideal de emplear un mismo protocolo para todas las imágenes. También se detalla el género único femenino de todos los ratones, eliminando la posibilidad de añadir covariables.

Capítulo 3

Materiales

3.1. Sujetos de estudio

El presente proyecto se desarrolla haciendo uso principalmente de imágenes MRI del cerebro de ratones de dos cepas distintas [22][23][24][25][26]:

- **C57BL/6J**: cepa de ratones comunes en su forma salvaje, cuyas imágenes son obtenidas mediante MRI ponderada en T2.
- **rTg4510**: cepa ratones transgénicos modificados de forma que reproducen características significativas de la enfermedad de Alzheimer y de demencia temporal frontal por acumulación de proteína tau, incluyendo la atrofia progresiva de regiones del prosencéfalo. En concreto, las imágenes son de sujetos FVB_Ncrl, la cepa salvaje de los rTg4510.

De ambas cepas se tienen las siguientes imágenes:

- 10 imágenes *ex vivo* y 10 *in vivo* de la cepa C57BL/6J
- 9 imágenes *ex vivo* y 9 *in vivo* de la cepa transgénica FVB_Ncrl (rTg4510)

Se detallan en la tabla 3.1 todos los parámetros relativos a las imágenes mencionadas. Los protocolos bioéticos seguidos para la obtención de las imágenes pueden consultarse en el anexo D.

Nombre	Cepa	Tipo de imagen	Atlas	In/Ex	Parámetros de escaneado	Resolución	Referencia
NaEt	C57BL/6J	T2-weighted	average atlas	<i>In vivo</i>	9.4 T	100 μ m	[22][23]
NaEt	C57BL/6J	T2*-weighted	average atlas	<i>Ex vivo</i>	17.6 T	47 μ m	
FVB_Ncrl	rTg4510	T2-weighted	average atlas	<i>In vivo</i>	9.4 T	150 μ m	[24][25][26]
FVB_Ncrl	rTg4510	T2*-weighted	average atlas	<i>Ex vivo</i>	9.4 T	40 μ m	

Tabla 3.1: Parámetros de las imágenes que se emplean en el estudio.

3.2. Software de procesamiento y análisis

A continuación, se detalla el software del que se hace uso para procesar y analizar las imágenes:

- **MATLAB:** entorno de programación de alto nivel orientado al procesamiento computacional numérico de problemas en diversas disciplinas técnicas. Su empleo como herramienta en el presente proyecto es clave, pues su uso pasa tanto por procesamiento como por el análisis de las imágenes MRI empleadas y los datos extraídos de ellas. Las versiones que se utilizan son MATLAB R2019a, MATLAB R2017b y MATLAB R2010b, siendo su uso e implementación detallados en el anexo A.1.
- **SPM (*Statistical Parametric Mapping*):** extensión software para MATLAB que agrupa un conjunto de funciones y subrutinas empleados en la organización, procesamiento, análisis e interpretación de datos funcionales referentes a neuroimagen. Su uso es de acceso público gratuito. Se emplea tanto la versión más moderna (SPM12) como la versión desactualizada y no oficial (SPM5) desarrollada en paralelo por la comunidad como soporte a la herramienta descrita a continuación.
- **SPMMOUSE:** extensión software basada en SPM desarrollada específicamente para neuroimagen de ratones. Debido a diversos problemas, la versión utilizada no es oficial. Su implementación y uso se detalla en el anexo A.1.1.
- **VBM (*Voxel-Based Morphometry*):** extensión software aplicada en SPM desarrollada para morfometría basada en vóxeles.
- **ANTs:** algoritmo de código abierto desarrollado para el registro de imágenes [27].
- **Multi-Atlas Segmentation:** software destinado a la parcelación estructural automática del cerebro de ratones u otros animales a través de segmentación-propagación basada en el registro y fusión de etiquetas de diversos atlas [5][6].
- **ITK-SNAP:** software para la visualización y estudio de parámetros espaciales de las imágenes MRI.
- **MRIcroGL:** software libre de visualización de imágenes NIfTI con capacidad de renderizado 3D para representación de clústeres o segmentaciones neuroanatómicas.

3.3. Software adicional y de soporte

- **Linux:** sistema operativo sobre el que se ejecutan diversas herramientas descritas, tales como ANTs o Multi-Atlas Segmentation.
- **PuTTY:** software de código abierto que permite emular un terminal para el control y transferencia de archivos en red. Su empleo pasa fundamentalmente por la comunicación y control de computadores especiales a distancia.
- **FileZilla:** aplicación de código abierto que se conecta a servidores FTP (*File Transfer Protocol*) para la compartición y gestión de archivos entre usuarios o computadores. Se utiliza como herramienta para el intercambio de archivos entre ordenador personal y computadores especiales a distancia.

- **Xming:** implementación portátil de sistemas de ventanas X para sistemas operativos Windows. Su uso junto con PuTTY permite visualizar una interfaz gráfica del computador manejado a distancia para un manejo más cómodo.

Capítulo 4

Métodos

4.1. Análisis por VBM

4.1.1. Introducción

La técnica de morfometría basada en vóxel es un método de análisis de neuroimagen desarrollado para caracterizar diferencias estructurales en el tejido cerebral de personas o animales con patologías neurológicas, haciendo uso del mapeo paramétrico estadístico SPM. De esta forma, se comparan diferentes imágenes vóxel a vóxel obteniendo una mayor sensibilidad para la localización de diferencias focales.

Los procesos que implica pasan por la normalización espacial (registro) de todas las imágenes a un mismo espacio estereotáctico¹, la segmentación de la imagen, diferenciando materia gris, materia blanca y líquido cerebroespinal, y finalizando con un suavizado, el cual elimina las imperfecciones generadas en los procesos previos. Posterior a esto, se realiza el análisis estadístico que localiza las diferencias significativas entre las imágenes [28][29][3].

A lo largo de esta sección se detallan tanto las bases teóricas de los procesos mencionados como su aplicación al presente trabajo, desarrollando la metodología aplicada para la obtención de resultados.

4.1.2. Registro de imágenes

En primer lugar, se hace preciso una normalización de todas las imágenes a un mismo espacio afín estereotáctico. Este paso es necesario para poder realizar el estudio basado en vóxel dado que, durante la comparación, se evalúan vóxeles ubicados en la misma región (e.g hipocampo). Si las imágenes no se encuentran en el mismo espacio, el análisis puede resultar erróneo al comparar distintas estructuras cerebrales. Un sistema de coordenadas común elimina este problema, que puede venir dado por la distinta resolución de las imágenes, anatomía de las cepas, orientación del sujeto durante el escaneado, entre otros [27]. Se emplea para este paso el algoritmo ANTs, aunque es posible realizar el registro desde el propio software SPMOUSE.

El proceso consiste en la aplicación de matrices de transformación de rotación, traslación, inclinación y/o escalado sobre todos los puntos de cada una de las imágenes.

¹Espacio referido a un sistema de coordenadas tridimensionales único.

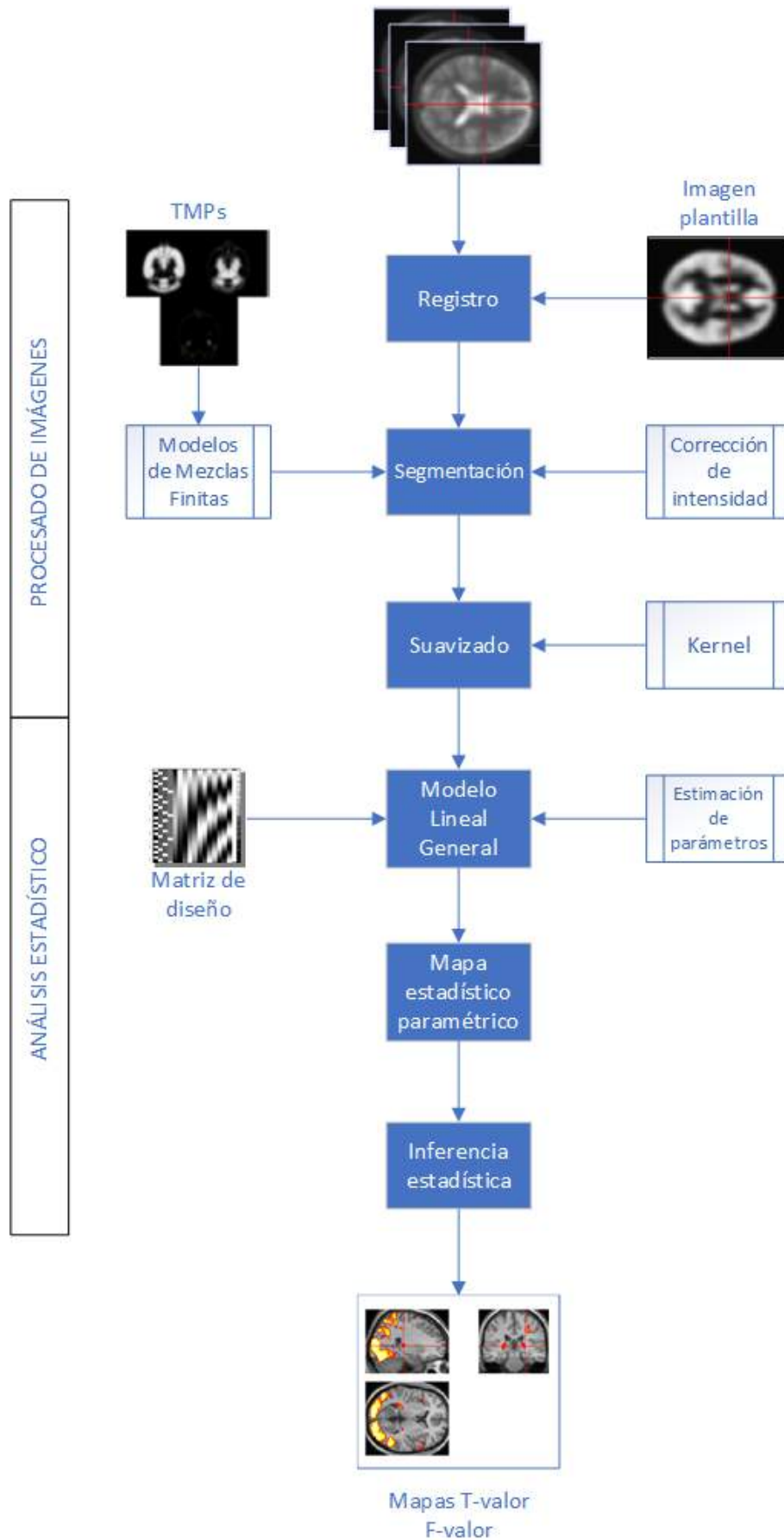


Figura 4.1: Diagrama de flujo de VBM.

nes a registrar. Se toma como espacio referencia el referido a una imagen plantilla.

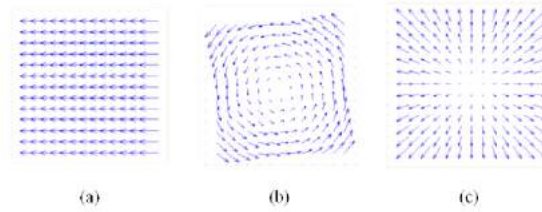


Figura 4.2: Transformaciones: (a) Traslación, (b) Rotación, (c) Escalado

- **Rotación:** Esta transformación gira un punto $p = (p_x, p_y, p_z)$ un ángulo θ alrededor de un eje predefinido (en este caso, por la plantilla) siendo las matrices estándar de rotación en tres dimensiones las siguientes [30][31]:

$$R_x(\theta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \theta & -\sin \theta \\ 0 & \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix}$$

$$R_y(\theta) = \begin{bmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{bmatrix}$$

$$R_z(\theta) = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta & 0 \\ \sin \theta & \cos \theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

- **Traslación:** La traslación consiste en el desplazamiento de un punto de la imagen $p = (p_x, p_y, p_z)$ a otro nuevo punto mediante un vector definido como $t = (t_x, t_y, t_z)$. Al ser una transformación afín particular no lineal, se hace preciso el uso de coordenadas homogéneas para poder ser expresada como matriz de transformación lineal pero en un espacio de orden superior. La matriz de traslación tiene la forma:

$$T = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & t_x \\ 0 & 1 & 0 & t_y \\ 0 & 0 & 1 & t_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

- **Escalado:** El escalado aumenta o disminuye la imagen en tamaño al multiplicar un punto de la imagen $p = (p_x, p_y, p_z)$ por factores de escala S_x, S_y y S_z obteniendo así un nuevo punto q . La matriz es:

$$S = \begin{bmatrix} S_x & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_y & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_z & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Los parámetros referidos a cada una de las matrices se obtienen haciendo coincidir la imagen de entrada y la imagen plantilla. Una vez hallados, el producto de estas matrices da como resultado la matriz de transformación completa, la cual es única para cada imagen con características distintas.

Similitud

Para ejecutar la transformación, es necesario buscar la posición más coincidente entre la imagen a modificar y la imagen plantilla. La similitud se halla mediante correlación cruzada normalizada de vecindad, ampliamente utilizada para transformaciones globales y con gran sensibilidad local. Esta es capaz de encontrar una plantilla en la imagen a registrar.

Se define este proceso de la siguiente forma: considerando una subimagen (imagen a registrar) definida por $w(x, y)$ de tamaño $K \times L$ dentro de una imagen (referencia) definida como $f(x, y)$ con un tamaño $M \times N$, donde $K \leq M$ y $L \leq N$. La correlación entre $w(x, y)$ y $f(x, y)$ en un punto (i, j) está dada por [32]:

$$C(i, j) = \sum_{x=0}^{L-1} \sum_{y=0}^{K-1} W(x, y) f(x + i, y + j) \quad (4.1)$$

donde $i = 0, 1, \dots, M-1$, $j = 0, 1, \dots, N-1$, y el sumatorio se toma alrededor de la región en la imagen donde w y f se superponen. El valor máximo de C indica la posición donde w mejor coincide con f .

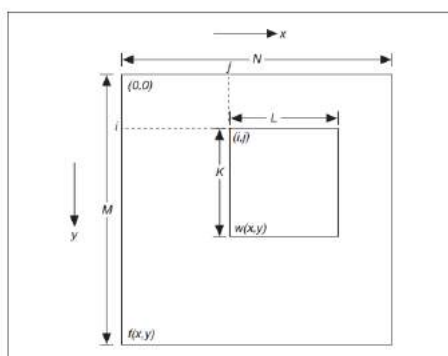


Figura 4.3: Proceso de correlación cruzada

Registro en ANTs

Se toman las 10 imágenes *ex vivo* y 10 *in vivo* de la cepa C57BL/6J y 8 imágenes *ex vivo* y 8 *in vivo* de la cepa transgénica FVB.Ncr1 (rTg4510) (Fig. 4.4).

La imagen plantilla empleada (Fig. 4.4 (a)) se corresponde con el mapa de probabilidad de tejido de materia gris *greyr62* de extensión *.nii*, dado que la segmentación posterior precisa que las imágenes estén en el mismo espacio que los mapas. La dimensión del vóxel es de $0.07 \times 0.07 \times 0.07 \text{mm}^3$, y las dimensiones de la imagen son $x = 165 \text{mm}$, $y = 230 \text{mm}$ y $z = 135 \text{mm}$, con origen en $x = 5,925$, $y = 9,489$ y $z = -8,671$.

Se realiza el registro de todas las imágenes simultáneamente, separando en dos grupos: control y enfermos. Se emplean scripts en MATLAB² para realizar la lectura de los ficheros contenedores y la ejecución del algoritmo ANTs sobre SO Linux. El siguiente comando ejecuta el proceso para hallar la similitud con un radio regional para la computación de la correlación cruzada de 4 unidades:

```
ANTS 3 -m CC[imgPlantilla,imgARegistrar,1,4] -o matrizRegistro -i 0
```

Obtenido el resultado, se aplica la transformación a la imagen a registrar a través de:

```
WarpImageMultiTransform 3 imgARegistrar imgRegistrada -R imgPlantilla matrizRegistro
```

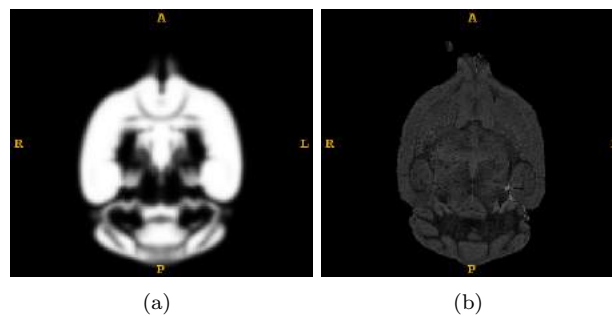


Figura 4.4: (a) Imagen plantilla, (b) Imagen *ex vivo* de FVB_Ncr1 original.

Para garantizar que las imágenes se han registrado correctamente, se emplea la herramienta *Display* de SPMOUSE, de forma que se visualiza la imagen registrada y la imagen plantilla empleada en *overlay* (superpuesta).

4.1.3. Segmentación

El proceso que sigue al registro es la segmentación de las imágenes por regiones (materia gris, materia blanca y líquido cerebrospinal). El software que se emplea es SPMOUSE, el cual realiza las correcciones oportunas y obtiene la segmentación en base a los denominados mapas de probabilidad de tejidos (*Tissue Probability Map*, TMP) usando un algoritmo basado en Modelos de Mezclas Finitas.

Corrección de la intensidad

La inhomogeneidad del campo magnético (*bias field* o *intensity inhomogeneity*, IHH) durante el escaneado genera variaciones de intensidad en las imágenes obtenidas. Esto influye directamente sobre la detección de tejidos, pues las intensidades de

²Disponibles en /demos/mice/DEMO/ANTS/IMAGES

los vóxeles están asociadas a determinadas regiones (Fig 4.5). Si estas intensidades se ven alteradas dentro de un mismo tejido, la segmentación puede proceder con errores. Las variaciones suelen ser espacialmente suaves, lo que facilita su eliminación.

Para solventar este problema, se aplican algoritmos como N3 o su actualización más reciente, el algoritmo N4ITK. En el caso del presente proyecto, se emplea SPM-MOUSE, pues posee herramientas para salvar el sesgo [33][34][35][36].

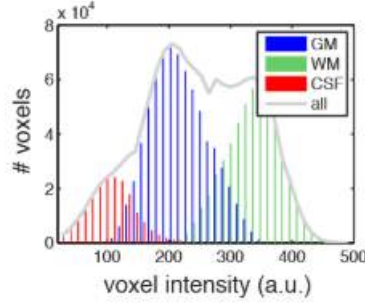


Figura 4.5: Distribución de intensidades por vóxel según el tipo de tejido en MRI ponderada en T1.

Modelos de Mezclas Finitas

En estadística se utilizan los modelos de mezclas como modelos probabilísticos para la localización de subpoblaciones dentro de una misma población. Concretamente, en el caso de la segmentación, se utilizan los modelos de mezcla gaussiana (*Gaussian Mixture Model*, GMM), los cuales crean aproximaciones y predicciones acerca de las características de las subpoblaciones en base a datos poblacionales previamente adquiridos.

Una variable aleatoria d -dimensional y , la cual contiene una serie de características que describen un objeto (en el caso de las imágenes, la intensidad), sigue una distribución de mezcla finita cuando su función de densidad de probabilidad $p(y|\theta)$ es una suma ponderada de las densidades gaussianas. En el caso de imágenes multidimensionales, la función tiene la siguiente forma [36][37][38][39][40][41][42]:

$$p(y|\theta) = \sum_{i=1}^K \alpha_i N(y|\mu_i, \Sigma_i) \quad (4.2)$$

donde K es el número de núcleos (grupos subpoblacionales o regiones) de la mezcla, α_i son las probabilidades a priori que tiene cada vóxel de pertenecer a un subgrupo concreto (región) que cumplen

$$0 \leq \alpha_i \leq 1 \quad \sum_{i=1}^K \alpha_i = 1 \quad i = 1, \dots, K$$

y $N(y|\mu_i, \Sigma_i)$ es la distribución gaussiana multivariante y los parámetros que la caracterizan son la media μ_i y la matriz de covarianza³ Σ_i .

³Matriz en la cual se contienen las covarianzas entre las distintas variables que componen la distribución.

$\theta = \{\{\alpha_1, \sigma_1, \Sigma_1\}, \dots, \{\alpha_K, \sigma_K, \Sigma_K\}\}$ es el conjunto o vector de parámetros a estimar en el modelo de mezcla.

Para no asumir las probabilidades a priori α_i , se emplean los TMPs, los cuales proporcionan esta información. Estos mapas son generados en base a registrar un gran número de imágenes y asignar vóxeles a distintos tipos de tejidos. Junto con la información que ofrecen los TMPs, el proceso asocia los vectores de parámetros a aquella distribución en la imagen que maximiza la probabilidad a posteriori, haciendo posible la asociación de cada vóxel a una región concreta [43].

Segmentación en SPMMOUSE

Para realizar la segmentación, se emplea la herramienta *Segment* de SPMMOUSE⁴ que permite segmentar, normalizar y corregir errores de intensidad en el mismo modelo. Los valores empleados para la segmentación son los indicados en la guía ofrecida por la página oficial del software SPMMOUSE (www.spmmouse.org). Los mapas de probabilidad o TMPs son los proporcionados por el propio programa. Se puede consultar una guía práctica del uso de la función de segmentación en SPMMOUSE en el anexo A.2.2.

En primer lugar, en el apartado *Data* se seleccionan las imágenes a segmentar. Estas se corresponden con las previamente registradas. Se elige segmentar por grupos control/enfermo y característica *ex vivo/in vivo*, de forma que se realizan cuatro grupos de segmentaciones.

En el apartado *Output Files*, para las tres regiones de materia gris, materia blanca y fluido cerebroespinal, se seleccionan la opción modulada normalizada. Los dos parámetros restantes se mantienen por defecto (*Bias corrected: Save Bias Corrected, Clean up any partitions: Dont do cleanup*).

En *Custom*, se destaca la importancia de ajustar los mapas de probabilidad (*Tissue probability maps*) puesto que, debido a un error en el software, los mapas no están correctamente seleccionados por defecto. Estos deben ser *greyr62.nii, whiter62.nii y csfr62.nii*, manteniendo el orden citado en la selección. Cada uno de ellos se corresponde con las tres regiones de materia gris, materia blanca y fluido cerebroespinal respectivamente. A continuación, se detallan las funciones y parámetros más significativos en términos de segmentación modulada normalizada [44][36]:

- **Corrección de intensidad ó *Bias correct***: SPMMOUSE permite corregir las variaciones de intensidad (IIH). Este proceso puede ajustarse en base a los parámetros:
 1. ***Bias Regularisation***: El ajuste de este parámetro permite solventar distintos grados de sesgo. En función del grado se puede elegir entre ocho opciones de regularización, de *No regularisation* a *Extremely heavy regularisation*. El valor empleado se deja por defecto a 0.0001 (*very light regularisation*).

⁴Disponible en /demos/mice/DEMO/VBM

2. ***Bias FWHM***: La eliminación del sesgo IIIH se lleva a cabo mediante un proceso de suavizado definido con el parámetro FWHM. Tanto el suavizado como el valor FWHM son descritos más adelante en el apartado 4.1.4. El correcto ajuste de este parámetro elimina el ruido y previene que el algoritmo modele la obvia variación de intensidades entre los distintos tejidos de cara a la segmentación. Nuevamente se mantiene por defecto en 5mm.
- **Normalización**: En el caso de este proyecto, el registro de las imágenes es previo al proceso de segmentación, por lo que la normalización de la imagen en este paso es opcional, aunque recomendable, puesto que SPMMOUSE ajusta las coordenadas de los vóxeles de las imágenes con los de los mapas de probabilidad para ajustar la segmentación, lo cual puede afinar el registro previo.
 1. ***Affine Regularisation***: En el caso de necesitar una optimización local durante la normalización debido a diferencias significativas entre los tamaños de las imágenes y las plantillas, puede seleccionarse esta opción. Aunque, como requisito, problemas como el IIIH han de ser mínimos. La opción seleccionada se mantiene por defecto en la propia plantilla de SPMMOUSE *ANIMAL toolbox template*
 2. ***Warping Regularisation***: El ajuste de este parámetro permite que, durante la normalización, las deformaciones sean más sutiles, ahorrando ajustes innecesarios. Se mantiene el valor por defecto de 1.
 3. ***Warp Frequency Cutoff***: Establece la frecuencia de corte en la transformada de coseno discreta (*Discrete Cosine Transform, DCT*)⁵, la cual permite modelar deformaciones más detalladas. Su valor se establece en 3, siguiendo las indicaciones de la guía.
 - **Modulación**: El efecto de la normalización espacial, al deformar las imágenes, produce la introducción de variaciones volumétricas que pueden afectar al análisis posterior. La modulación reajusta esta perturbación en base a multiplicar el volumen regional por su volumen relativo antes y después de la deformación. De esta forma, si el volumen de una región concreta se ha visto reducido en tamaño debido a la normalización, la modulación reduce la intensidad de los vóxeles, obteniendo el mismo resultado volumétrico antes y después de la deformación.
 - ***Sampling Distance***: Este valor establece la distancia entre puntos muestreados para la estimación de parámetros del modelo, afectando a la precisión de las tres funciones descritas. Se establece a 0.35, siguiendo nuevamente las indicaciones de la guía.

Como funciones auxiliares se tienen *Masking image* y *Gaussian per class*. Esta última hace referencia al número de gaussianas que se quieren aplicar a cada uno de los tejidos segmentados. La razón de su uso se debe a la incertidumbre asociada a la posición relativa de un vóxel, dado que este puede encontrarse entre dos tejidos y generar un error en la asunción de pertenencia en base a la intensidad. Los valores que se establecen son los definidos por defecto: dos para materia gris, dos para materia blanca, dos para fluido cerebroespinal y cuatro para efectos varios. En el caso de *Masking image* no se selecciona ningún archivo.

⁵Transformada basada en la transformada de Fourier discreta, empleando únicamente números reales [45].

El software proporciona los resultados de la segmentación con distintas nomenclaturas en función de la región segmentada y el método empleado. El patrón adoptado tiene la forma *mwc1*.nii*, donde el número varia en función de la región, siendo las imágenes con valor 1 la materia gris, 2 la materia blanca y 3 el líquido cerebrospinal.

Opción/Parámetro	Valor
Grey Matter	Modulated Normalised
White Matter	Modulated Normalised
Cerebro-Spinal Fluid	Modulated Normalised
Bias Corrected	Save Bias Corrected
Clean up any partitions	Dont do cleanup
Tissue probability Maps	greyr62.nii, whiter62.nii, csfr62.nii
Gaussian per class	2 2 2
Affine Regularisation	ANIMAL toolbox template
Warping Regularisation	1
Warp Frequency Cutoff	3
Bias regularisation	0.0001 (very light regularisation)
Bias FWHM	5
Sampling distance	0.35
Masking image	None

Tabla 4.1: Resumen de opciones y parámetros de segmentación que se emplean en SPMMOUSE para el presente proyecto.

Con el fin de facilitar su reproducción en futuros desarrollos, se exponen los valores de todas las opciones y parámetros mencionados resumidos en la tabla 4.1.

4.1.4. Suavizado

Este proceso se emplea para hacer frente a la variabilidad anatómica funcional que no es compensada durante el registro o normalización. A su vez, aumenta la relación entre la señal y el ruido (SNR) para la eliminación de interferencias. Con esto se consigue que los resultados estadísticos sean más fehacientes. No obstante, su aplicación debe ser cautelosa. Al igual que en la segmentación, se emplea SPMMOUSE para este paso [46][47].

El suavizado se consigue mediante un filtrado gaussiano. Este proceso consiste en la aplicación de un kernel gaussiano (Fig. 4.6), es decir, una matriz, normalmente cuadrada y de tamaño variable cuyos coeficientes son los pesos de la campana gaussiana, en este caso, bivariada [48][49]:

$$w(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}} \quad (4.3)$$

El kernel se desplaza por la matriz de la imagen, de forma que el valor central de este coincida en cada momento con un vóxel distinto de la imagen. El vóxel central $f(x, y)$ de la matriz de la imagen se sustituye por $g(x, y)$, resultado de sumar los productos entre los coeficientes del kernel y los valores contiguos al valor central

$f(x, y)$ (Fig. 4.7):

$$g(x, y) = \sum_{s=-1}^1 \sum_{t=-1}^1 w(s, t) f(x + s, y + t) \quad (4.4)$$

siendo $w(s, t)$ la función gaussiana normalizada (4.3).

$w(x-1, y-1)$	$w(x-1, y)$	$w(x-1, y+1)$
$w(x, y-1)$	$w(x, y)$	$w(x, y+1)$
$w(x+1, y-1)$	$w(x+1, y)$	$w(x+1, y+1)$

Figura 4.6: Kernel.

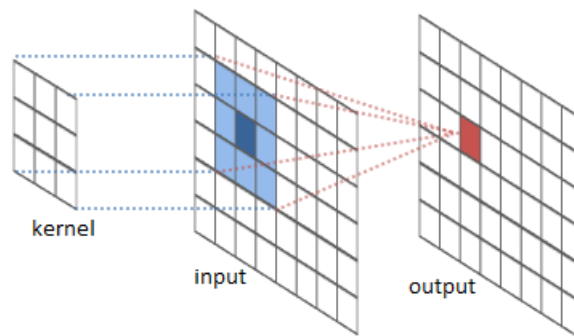


Figura 4.7: Aplicación de un filtro mediante kernel.

FWHM

Uno de los parámetros claves en el suavizado es lo que se conoce como la anchura a media altura (*Full Width at Half Maximum*, FWHM). Se trata de una medida de

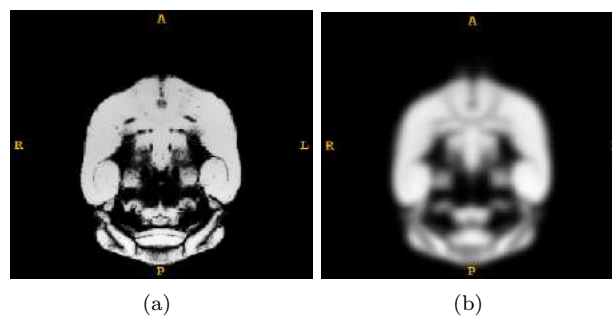


Figura 4.8: Comparación de resultado después de un suavizado. (a) Sin suavizar, (b) Suavizada.

Las imágenes obtenidas se renombran añadiendo una s al principio del nombre, de forma que las distintas regiones suavizadas se leen $smwc^*.nii$, siguiendo el mismo patrón numérico descrito en el apartado de segmentación.

4.1.5. Análisis estadístico

Todo el procesado de imágenes que se ha detallado tiene como fin último garantizar un correcto tratamiento estadístico de los datos contenidos en las imágenes. Llegado este punto, es posible analizar las imágenes y sacar conclusiones. Aunque este proceso se desarrolla, al igual que los anteriores, sobre SPMMOUSE, el fondo técnico que se detalla a continuación hace referencia al funcionamiento de SPM que, para la función estadística, es análogo a SPMMOUSE.

El procesado en SPM comprende dos grandes etapas a nivel estadístico:

- Diseño del Modelo Lineal General (*General Linear Model*, GLM) y estimación de parámetros para obtención de mapas paramétricos.
- Inferencia estadística mediante contraste de hipótesis con prueba t y prueba F.

Modelo Lineal General y estimación de parámetros

El Modelo Lineal General supone la base para la primera fase del procesamiento estadístico. Se trata de un modelo de regresión univariante o multivariante que normalmente se emplea en neuroimagen para modelar la señal observada en las imágenes en términos de una o varias variables independientes o regresores. La señal puede ser una serie de medidas en el tiempo (longitudinales) o bien una sucesión de medidas de una población, es decir, una muestra.

Para definir un modelo de regresión lineal, se detalla a continuación uno muy simple [52][53][54][55]:

$$y = x\beta + \varepsilon \quad (4.9)$$

Este está constituido por un único regresor x y una variable dependiente y , la cual representa la señal modelada. El valor que ajusta al regresor se denomina parámetro de escala, representado por β . El GLM es capaz tanto de modelar como de ajustar el modelo lo máximo posible a la señal, o lo que es lo mismo, primero se desarrolla el modelo y después se analiza la diferencia de este con los datos que están siendo modelados, pudiendo ajustar el mejor parámetro de escala $\hat{\beta}$ buscando el error residual o residuo ε mínimo.

Normalmente, los modelos que se obtienen en el análisis de neuroimagen suelen ser multivariantes, lo que significa que el número de regresores es mayor que uno:

$$y = x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + \dots + x_n\beta_n + \varepsilon \quad (4.10)$$

En este caso, se suele representar de forma matricial, lo cual simplifica la notación, quedando de la siguiente forma:

$$\begin{bmatrix} y_{1,1} \\ \vdots \\ y_{N,1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{1,1} & \cdots & x_{1,p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{N,1} & \cdots & x_{N,p} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_{1,1} \\ \vdots \\ \beta_{p,1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \varepsilon_{1,1} \\ \vdots \\ \varepsilon_{N,1} \end{bmatrix} \quad (4.11)$$

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (4.12)$$

donde N es el número de muestras, p el número de regresores, Y el vector de datos, X los regresores en forma de matriz conocida como matriz de diseño o regresiva, β la matriz de parámetros de escala y ε la matriz de residuos. Cabe destacar que, para cada vóxel, existirá un modelo individual. De esta forma se consigue el objetivo de VBM de focalizar el análisis vóxel a vóxel.

Para la estimación del parámetro de escala $\hat{\beta}$, tal y como se ha comentado anteriormente, se busca la minimización del residuo ε . Para ello, se emplea el método de mínimos cuadrados:

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (4.13)$$

Es importante matizar en este proceso que SPM asume por defecto esfericidad gaussiana en el error. Esta es una condición en la que la matriz de covarianza del error $Cov(\varepsilon)$ tenga varianzas constantes entre todos los pares de puntuaciones [56]. Esto significa que el error puede aproximarse a una distribución normal de la forma:

$$\varepsilon \sim N(0, \sigma^2 I) \quad (4.14)$$

$$Cov(\varepsilon) = \sigma^2 I \quad (4.15)$$

El modelo estimado definitivo queda entonces:

$$\hat{Y} = X\hat{\beta} \quad (4.16)$$

$$Y - \hat{Y} = \varepsilon \quad (4.17)$$

donde el residuo cumple

$$\|\varepsilon\|^2 = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 \quad (4.18)$$

Teniendo en cuenta que para cada vóxel existe un modelo distinto, también serán específicos los parámetros β por vóxel. De esta forma, se obtiene un mapa de valores. Al ser multivariante, habrá tantos mapas como regresores tenga el modelo. Ejemplificando, de existir dos regresores, el modelo por vóxel sería:

$$y = x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + \varepsilon \quad (4.19)$$

Por tanto habría dos mapas: uno para β_1 y otro para β_2 , donde se recojan los parámetros de todos los vóxeles.

Además de estimarse los parámetros β , se estiman también las varianzas asociadas al error, para lo cual se hace preciso definir la distribución de probabilidad de $\hat{\beta}$, pudiéndose aproximar a una normal en forma matricial:

$$\hat{\beta} \sim N(\beta, \sigma^2(X^T X)^{-1}) \quad (4.20)$$

Por lo que la varianza estimada $\hat{\sigma}^2$ es:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{N - (p + 1)} \sum_{i=1}^N \hat{\varepsilon}_i^2 \quad (4.21)$$

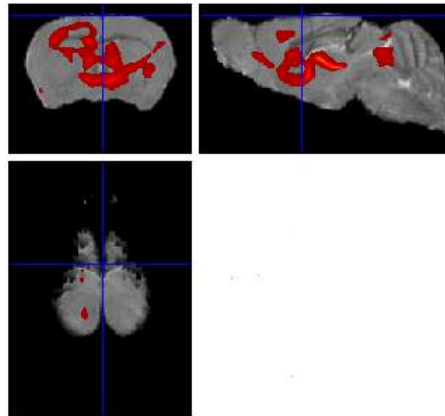


Figura 4.10: Ejemplo de mapa paramétrico, coloreado en tonos rojo y amarillo sobre una imagen plantilla.

donde N es el número de muestras, p el número de regresores del modelo y $\hat{\varepsilon}$ los residuos.

En forma matricial se expresa:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\hat{\varepsilon}^T \hat{\varepsilon}}{N - (p + 1)} \quad (4.22)$$

En este caso, el termino $\hat{\varepsilon}$ hace referencia a la matriz de residuos.

Hipótesis y contraste

El objetivo de la aplicación del GLM y la estimación de parámetros tiene como fondo la estimación de una media de los valores de intensidad en cada vóxel a través de las muestras de forma que, para el contraste de hipótesis posterior, sea posible evaluar las diferencias entre ambos grupos o incluso la influencia de otras covariables, como pueden ser la edad de los sujetos o el sexo. Para poder examinar estas relaciones es necesario prefiar unas hipótesis y aplicar un contraste en base a ellas para, a continuación, realizar el análisis inferencial.

En el caso del análisis de neuroimagen para enfermedades neurodegenerativas, el objetivo es la detección de atrofia o inflamación, comparando sujetos control con enfermos (o, en el caso de ratones, con desarrollos neurodegenerativos). Por tanto, para ambos casos, existen:

- **Hipótesis nula H_0** : No se detectan diferencias significativas de volumen entre sujetos control y enfermos.
- **Hipótesis alternativa H_1** : El caso contrario, y el esperado, de encontrar diferencias volumétricas entre ambos grupos.

La manera de trasladar estas hipótesis al plano estadístico se realiza mediante la aplicación dentro del modelo de lo que se conoce como contraste, otorgando mayor o menor peso a las variables independientes, en función del caso estudiado. De esta forma, si las hipótesis se plantean para atrofia o para inflamación, se selecciona el contraste adecuado que calibra la relación existente entre regresores para poder

realizar el estudio inferencial sobre ese precepto.

Matemáticamente, el contraste se define como un vector de pesos que, aplicado al modelo, modifica los signos de los regresores, de forma que se evalúe la influencia de estos sobre los datos. Se define como [52][57][53][58][59]:

$$C = [c_1, c_2, \dots, c_n] \quad (4.23)$$

siendo n el número de regresores.

En el estudio comparativo entre grupos, siendo este el caso analizado en el presente trabajo, cada grupo representa un regresor. Por tanto, el modelo general es:

$$y = x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + \varepsilon \quad (4.24)$$

Las variables independientes x_1 y x_2 definen las medias de intensidad por vóxel de los grupos control y enfermo, respectivamente. El orden de las variables a nivel analítico no es relevante aunque, durante el uso del software, cobra especial importancia, pues el orden de selección de los grupos condiciona el orden de las variables en el modelo y, en consecuencia, la aplicación del contraste. Esta idea se detalla más adelante.

Como se ha visto, β_1 y β_2 representan los parámetros de escala asociados a cada regresor. La relación entre ellos es la que define el supuesto hipotético. Aplicando el contraste, la relación general tiene la forma [52]:

$$c_1\beta_1 + c_2\beta_2 > 0 \quad (4.25)$$

En función de la hipótesis, la relación cambia:

- **Inflamación:** Se busca que haya una mayor influencia del regresor que representa al grupo enfermo, puesto que su media será mayor que la del grupo control. De esta forma, $\beta_1 < \beta_2$, por tanto:

$$H_0 : c_1\beta_1 + c_2\beta_2 < 0$$

$$H_1 : c_1\beta_1 + c_2\beta_2 > 0$$

con la aplicación del contraste:

$$C = [-1, 1]$$

- **Atrofia:** En este caso, la mayor influencia procede del regresor que representa al grupo control, dado que su media será mayor respecto del grupo enfermo. Por tanto $\beta_1 > \beta_2$. De este modo:

$$H_0 : c_1\beta_1 + c_2\beta_2 < 0$$

$$H_1 : c_1\beta_1 + c_2\beta_2 > 0$$

con la aplicación del contraste:

$$C = [1, -1]$$

Los contrastes, al aplicarse al conjunto de parámetros, se aplican también a la varianza del error. Multiplicando el vector de contraste C^T por la distribución de probabilidad en forma matricial $\hat{\beta}$ (4.20) se obtiene [57][53][58][59]:

$$C^T \hat{\beta} \sim N(C^T \beta, \sigma^2 C^T (X^T X)^{-1} C) \quad (4.26)$$

$$Var(C^T \hat{\beta}) = \sigma^2 C^T (X^T X)^{-1} C \quad (4.27)$$

Prueba t

Siendo el contraste la herramienta empleada para ponderar el efecto de los distintos regresores, la prueba t es el método por el cual se cuantifica este efecto. Esta prueba está basada en la distribución de probabilidad t de Student, caracterizada por estar construida para poblaciones con distribución normal en las que las muestras, al ser pequeñas (normalmente $N < 30$), no tienen sus estadísticos normalmente distribuidos.

La prueba t comienza con el cálculo del estadístico T a partir de los valores obtenidos en las ecuaciones (4.26) y (4.27), de la forma [57][53][58][59][60]:

$$T = \frac{C^T \hat{\beta}}{\sqrt{\sigma^2 C^T (X^T X)^{-1} C}} \quad (4.28)$$

El valor T, por tanto, expresa la relación entre la estimación $\hat{\beta}$ ponderada por el contraste y la desviación estándar de la misma. De esta forma, a mayor sea la relación existente, mayor es el valor de T y, en consecuencia, más próximo se está de rechazar la hipótesis nula.

El umbral de rechazo de la hipótesis nula se establece mediante el p-valor. Este define la probabilidad de obtener un valor T que confirme la hipótesis nula (Fig. 4.11). Matemáticamente se expresa:

$$p - \text{valor} = P(T > t | H_0) \quad (4.29)$$

siendo t el valor estadístico límite a la probabilidad seleccionada.

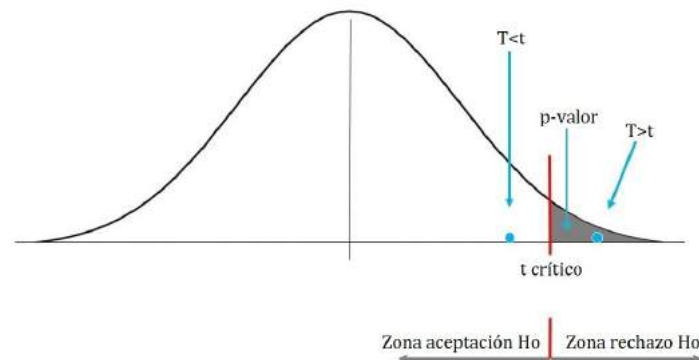


Figura 4.11: Representación gráfica del p-valor y las regiones de aceptación y rechazo de H_0 en la distribución t de Student.

En el caso de no haberse aplicado un contraste que defina la orientación del análisis, se pueden igualmente analizar las hipótesis por separado, evaluando cada una en una cola distinta de la distribución t.

De esta forma, p-valores pequeños se interpretan como una baja probabilidad de aceptar la hipótesis nula y, por tanto, de una alta seguridad para aceptar la hipótesis alternativa.

Desde el punto de vista de la umbralización, cuanto más bajo se fije el p-valor, más discriminante será la prueba. El compromiso entre seguridad y discriminación rige la elección del p-valor.

Prueba F

A partir del análisis de varianza (ANOVA) de los grupos estudiados, es posible realizar un contraste similar al efectuado mediante la prueba t. La prueba F mide la razón entre la varianza entre grupos y la varianza interna de los grupos, de forma que se puede cuantificar el grado de influencia que tiene cada regresor sobre el modelo. Su interpretación es similar a la prueba t, con la diferencia de que en los resultados de la prueba F no es posible apreciar si la influencia es positiva o negativa, es decir, la orientación que determina si es inflamación o atrofia. El resultado se interpreta como las regiones donde existe variación volumétrica, independientemente del tipo de variación.

Así, las hipótesis que se evalúan en este caso son [57][53][58][59][61]:

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = 0$$

$$H_1 : \exists k / \beta_k \neq 0$$

Acerca del análisis de varianza ANOVA y, en consecuencia, de la prueba F y su interpretación, puede consultarse en el anexo C.1.

Errores de tipo I y II

Los resultados obtenidos en el análisis inferencial pueden manifestar errores que, aunque se pretenden reducir al mínimo, siempre pueden existir. Estos están debidos a multitud de factores:

- **Obtención de imágenes y sesgo IIIH:** Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, durante el proceso de obtención de las imágenes mediante resonancia magnética pueden introducirse errores de sesgo en el patrón de intensidades que, aunque se intentan eliminar en los procesos de filtrado posteriores, pueden permanecer en distinto grado.
- **Procesado de imágenes:** El registro, segmentado y suavizado de las imágenes son pasos que modifican los datos originales y, por tanto, pueden transcurrir con fallas. En función de la precisión con la que se lleven a cabo, pueden aparecer más o menos perturbaciones sobre los datos analizados.
- **Estudio estadístico:** Al igual que en los demás procesos, es posible que el análisis inferencial transcurra con errores relacionados con el nivel de precisión de diseño del modelo o la estimación de parámetros.

Las consecuencias a nivel de resultado que pueden tener estos errores pueden interpretarse como resultados no deseados, positivos o negativos. La aparición de clústeres con diferencias volumétricas que en realidad no son reales se conocen como falsos positivos o errores de tipo 1, y las regiones no marcadas como significativas pese a que realmente sí lo son se consideran falsos negativos o errores de tipo 2. En términos de hipótesis, rechazar H_0 siendo esta verdadera es un falso positivo y, en contraposición, aceptar por válida H_0 siendo esta falsa es un falso negativo.

La manera de cuantificar si un análisis carece de este tipo de errores se mide mediante la especificidad y la sensibilidad. La especificidad se define como el grado de exactitud rechazando H_0 y la sensibilidad como el grado de exactitud aceptando H_0 . De esta forma, una alta especificidad garantiza baja probabilidad de falsos positivos y una alta sensibilidad, baja probabilidad de falsos negativos.

FWER

En el análisis inferencial de neuroimagen, al realizar múltiples contrastes de hipótesis, la probabilidad de cometer errores de tipo I en cualquier vóxel se conocen como tasa de error familiar o FWER (*Family Wise Error Ratio*). Para compensar esta problemática, se emplean distintos métodos de control del FWER, siendo la corrección de Bonferroni la empleada por SPM.

Esta corrección controla y compensa el FWER probando cada vóxel en un nivel significativo de tasa de error por vóxel $v = \alpha/m$, donde α es el FWER y m el número de vóxeles independientes entre sí (Fig. 4.12). Esta última característica de independencia hace al método muy conservador debido al grado de suavidad que tienen las neuroimágenes, aunque es efectivo cuando el número de muestras empleadas es muy pequeño como para asegurar resultados con pocos falsos positivos [62].

En términos de p-valores, la aplicación de la corrección da como resultado lo que se conoce como p-valor corregido. Por contra, p-valores previos al uso del FWE se denominan p-valores no corregidos. Esta información es de especial importancia para una correcta interpretación de los resultados obtenidos en SPM que se detallan en capítulos posteriores.

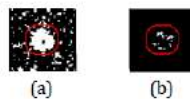


Figura 4.12: a) Clúster con FWE no corregido ($\alpha = 0,1$), p-valor no corregido. b) Clúster con FWER corregido ($\alpha = 0,1$), p-valor corregido.

Modelo Lineal General en SPMMOUSE

A partir de las imágenes segmentadas y suavizadas, se evalúa si existen diferencias en las intensidades por vóxel entre el grupo control y el enfermo, aunque el análisis se limita a la materia gris, al ser el área donde se sitúan mayor número de biomarcadores y, en consecuencia, donde mayor probabilidad hay de encontrar diferencias significativas. El resultado que se obtiene puede ser interpretado como

una variación volumétrica localizada, ya sea atrófica o inflamatoria. Los parámetros modificados, al igual que en las secciones anteriores, siguen las pautas del tutorial de la página oficial de SPMOUSE. El proceso descrito a continuación se realiza tanto para imágenes *ex vivo* como *in vivo*. (ver anexo A.2.4 para consultar la guía práctica de uso de análisis estadístico de SPMOUSE)

Se emplea en primer lugar la opción *Basic Models* del panel de SPMOUSE⁷. A través de esta sección se seleccionan los parámetros de diseño del modelo lineal general que se calcula para cada vóxel. En la pestaña *Design* se selecciona el diseño t-test de dos muestras (*Two Sample t-test*), prestando especial atención al orden de elección de los grupos, pues condicionan significativamente los resultados posteriores a la hora de la aplicación del contraste.

Para el grupo uno, se eligen las imágenes suavizadas de la materia gris de extensión *smwc1*.nii* correspondientes a los ratones salvajes C57BL/6J, es decir, al grupo control. Paralelamente, en el segundo grupo se seleccionan las imágenes de misma extensión *smwc1*.nii* de ratones transgénicos enfermos FVB_Ncr1. Se preasume independencia entre ambos grupos y varianzas desiguales, por lo que las opciones *Independence* y *Variance* se conservan por defecto a *Yes* y *Unequal* respectivamente. Las opciones *Grand mean scaling* y *ANCOVA* únicamente se utilizan para análisis PET, no estudiado en este trabajo. Por tanto, se mantienen por defecto (*No* en ambos casos).

Referente a los demás parámetros, la opción *Covariates* permite evaluar otras variables como el sexo o la edad, aunque en este trabajo no se tiene en cuenta ninguna covariable. En el caso de *Masking* se establece un umbral de enmascaramiento relativo (opciones *Threshold masking - Relative - Threshold*) con valor 0.2, lo cual permite discriminar los vóxeles que se encuentren fuera del umbral, establecido como una proporción del valor global de intensidad. El resto de parámetros se conservan por defecto (*Global calculation: Omit, Global normalisation - Overall grand mean scaling: No*).

Es necesario seleccionar un directorio de extracción de resultados, donde se guarda el diseño del GLM. Por ello, se crean dos carpetas para cada bloque de estudio (*ex vivo* e *in vivo*). El archivo generado tiene la forma *SPM.mat* y ha de ser procesado para estimar los parámetros $\hat{\beta}$. Un resumen de las opciones y valores seleccionados se muestra en la tabla 4.2.

Finalizado el proceso previo, se selecciona la opción *Estimate* del panel principal de SPMOUSE. De esta forma, se obtienen los valores $\hat{\beta}$ y, con ellos, la matriz de diseño. Para este paso solo se precisa seleccionar el archivo *SPM.mat* contenido en el directorio seleccionado en el procesamiento anterior. Se repite el proceso en *ex vivo* e *in vivo*.

Contraste de hipótesis e inferencia en SPMOUSE

Para poder aplicar los contrastes y obtener los mapas paramétricos, así como los valores estadísticos F, T y p-valor para cada clúster, se marca la opción *Results* del

⁷Disponible en [/demos/mice/DEMO/VBM](#)

Opción/Parámetro	Valor
Design	Two-sample t-test
Group 1 scans <-X	Imágenes suavizadas grupo control
Group 2 scans <-X	Imágenes suavizadas grupo transgénico
Independence	Yes
Variance	Unequal
Grand mean scaling	No
ANCOVA	No
Covariates	-
Masking	Threshold Masking - Relative - 0.2
Global calculation	Omit
Global normalisation	Overall gran mean scaling - No

Tabla 4.2: Resumen de opciones y parámetros en la opción *Basic Models* de generación de modelo lineal que se emplean en SPMMOUSE para el presente proyecto.

panel de SPMMOUSE y se selecciona el archivo *SPM.mat* de la carpeta contenedora.

En función del tipo de contraste seleccionado, se evalúan los estadísticos T y F. De esta forma, se divide la toma de resultados en:

- **Estadístico F:** se selecciona la opción *F-contrast* y se aplica el contraste básico $C=[1,-1]$ definido en el tutorial mencionado anteriormente:
- **Estadístico T:** en este caso, se crean dos nuevos contrastes seleccionando la opción *t-contrasts*, para atrofia $C=[1,-1]$ y para inflamación $C=[-1,1]$, siguiendo lo descrito en el apartado 4.1.5.

Seleccionado el contraste, para ambos casos se omite enmascarar el resultado, lo cual permitiría filtrar las regiones que quieren ser visualizadas para acotar los clústeres, y se establece un p-valor con corrección del FWER de 0.05. El parámetro *Extent threshold* hace referencia al número mínimo de vóxeles contenidos en los clústeres. Se establece a un mínimo de 100 vóxeles.

Se extraen los resultados de los estadísticos arrojados por SPM, así como la imagen generada con valores de intensidad de t-valor y F-valor, en función del contraste seleccionado. Estas imágenes son de importante utilidad, puesto que se emplean para corroborar gráficamente el resultado mediante la evaluación con MATLAB.

Evaluación en MATLAB

Para corroborar los resultados obtenidos en el estudio inferencial de SPM, se desarrolla paralelamente un contraste de hipótesis similar en MATLAB a través de distintos algoritmos que se detallan a continuación. Las imágenes empleadas se corresponden con las segmentaciones suavizadas de materia gris ya mencionadas, procesadas en SPMMOUSE.

En primer lugar, se ejecuta una prueba t de dos muestras. Se configura para ello el t-test en MATLAB⁸ para varianzas desiguales, análogo a SPM, y se ejecutan tres pruebas: una de dos colas, obteniendo las diferencias volumétricas globales, y las dos restantes haciendo la diferenciación entre atrofia e inflamación seleccionando la cola derecha e izquierda de la prueba t respectivamente. Esta elección puede variar

⁸Disponible en /demos/mice/DEMO/VBM/check_VBM_pvalue_ttest.m

en función de cómo se introduzcan los grupos en la función t-test de MATLAB. Se emplea el algoritmo 1 para este proceso.

Algorithm 1 Prueba t-test de dos colas

Require: Imágenes suavizadas de materia gris, extensión *smwc1*.nii* de ratones control y transgénicos, *ex vivo* o *in vivo* en función del caso.

Ensure: imagen NIfTI de p-valores en valores de intensidad $-\log(p - valor)$.

```

1: for x=1:tamaño de imágenes en x do
2:   for y=1:tamaño de imágenes en y do
3:     for z=1:tamaño de imágenes en z do
4:       ttest2
5:       if pvalor existe then
6:         se guarda el valor  $-\log_{10}(p - valor)$  en la matriz de p-valores
7:       end if
8:     end for
9:   end for
10: end for
11: Se convierten a 0 todos los p-valores no existentes

```

Se obtienen tres imágenes NIfTI de extensión *.nii* en las cuales los valores de intensidad son los p-valores convertidos a sus correspondientes potencias de 10, calculadas como $-\log(p - valor)$.

A continuación, se realiza el *clustering* para hallar los clústeres más significativos de las imágenes referentes a atrofia e inflamación. Se aplica para este paso el algoritmo 2 mediante un script de MATLAB⁹. Se emplea el mismo número de vóxeles mínimo por clúster de SPM (100 vóxeles). El p-valor máximo se selecciona en base a los resultados obtenidos en SPM, referente al p-valor no corregido del clúster menos significativo.

Es necesario detallar el porqué se selecciona el p-valor no corregido, pese a que se realiza la corrección del FWER: cuando se selecciona corregir el FWER, se establece el p-valor máximo para esa corrección (en este caso, 0.05). Esto limita la muestra de resultados a únicamente los clústeres que cumplan el p-valor corregido. No obstante, los p-valores no corregidos siguen siendo los correspondientes a la prueba t. Dicho de otro modo, la aplicación de corrección del FWER únicamente limita los resultados para acotar falsos positivos, pero los estadísticos válidos para contraste siguen siendo los no corregidos. Al realizar el análisis en MATLAB, no se aplica corrección alguna, por lo que para limitar la muestra de resultados a los clústeres obtenidos en SPM, deben usarse p-valores no corregidos para mostrar la misma limitación. Teóricamente, ambos resultados deben ser muy similares. El umbral, al igual que en la prueba t de MATLAB, se obtiene aplicando $-\log(p - valor)$. Observando los resultados obtenidos en SPM en p-valor no corregido (Sec. E, tablas E.4, E.5, E.6, E.7), se tienen los valores mostrados en la tabla 4.3.

Imágenes	Afectación	Max. p-valor no corregido en VBM	$-\log(p\text{-valor})$
<i>Ex vivo</i>	Atrofia	$4,94349 \times 10^{-7}$	7
	Inflamación	$4,4762 \times 10^{-7}$	7
<i>In vivo</i>	Atrofia	0.00098306	$\sim 4^*$
	Inflamación	0.00037578	$\sim 4^*$

Tabla 4.3: Valores umbral $-\log(p\text{-valor})$ para la ejecución del algoritmo 2.

⁹Disponible en /demos/mice/DEMO/VBM/clustering_VBM.m

*El valor numérico que se obtiene se aproxima a 3, pero en la realización de ensayos se observa una fuerte limitación de muestra de resultados, por lo que se decide aumentar en un punto el umbral, con el fin de estudiar si la aproximación VBM es correcta. Se recuerda que en *in vivo* se parte de un análisis sin corrección del FWER, por lo que la amplificación del umbral, o lo que es lo mismo, la aceptación de p-valores más significativos en MATLAB, puede aproximarse más al resultado VBM.

Algorithm 2 Prueba t-test de dos colas

Require: Imágenes suavizadas de materia gris, extensión *smwc1*.nii* de ratones control y transgénicos, *ex vivo* o *in vivo* en función del caso, además de la imagen de p-valores obtenida en el algoritmo 1

Ensure: imagen NIfTI con los clústeres seleccionados

- 1: Definición del número mínimo de vóxeles por clúster (100)
 - 2: Definición del grado máximo del p-valor en $-\log_{10}(\text{p-valor})$ (e.g: p-valor 0.001 => 3).
 - 3: Aplicación de los límites mencionados a la imagen de p-valores
 - 4: Extracción de los clústeres independientes obtenidos a través de la limitación
 - 5: **for** i=1:número de imágenes totales (NeAt+FVB) **do**
 - 6: **for** i=2:número de clústeres **do**
 - 7: Cálculo de la media de p-valor para cada clúster de cada imagen
 - 8: **end for**
 - 9: **end for**
 - 10: Selección de los clústeres con media más elevada, es decir, más significativos a través de una máscara
 - 11: Aplicación de la máscara a la imagen de p-valores
 - 12: Generación de la imagen NIfTI con los clústeres seleccionados
-

En el primer ciclo del algoritmo, se obtienen los posibles clústeres coincidentes. Se ha de cribar el resultado hallando los más relevantes, los cuales tienen valores más grandes. Una vez seleccionados, se aplica una máscara que aisle los clústeres elegidos. El resultado son imágenes NIfTI que deben coincidir con precisión con las obtenidas en SPM en forma de mapas de t-valor, las cuales se obtienen salvando el *overlay* en el panel de operación del apartado *Results*. Este mapa es de extensión *.hdr* y sólo es posible visualizarlo si va acompañado del archivo con mismo nombre de extensión *.img*.

Localización neuroanatómica

La evaluación de las diferencias existentes entre los métodos VBM y ROIs se lleva a cabo comparando regiones afectadas, por lo que se hace preciso poner nombre a estas regiones en los clústeres obtenidos en SPM. Para ello, se emplea el software ITK-SNAP, mediante el cual se puede visualizar el atlas anatómico empleado y localizar mediante las coordenadas ofrecidas por SPM las regiones afectadas.

En primer lugar, es necesario registrar los atlas al mismo espacio estereotáctico que las imágenes procesadas, ya que las coordenadas que ofrece SPM están referenciadas sobre este. Para este proceso, se emplean las matrices de transformación obtenidas en el proceso de registro de las imágenes analizadas, para *ex vivo* e *in vivo*. Haciendo uso nuevamente del software ANTs, se desarrollan scripts de MATLAB¹⁰ con el uso del comando de ejecución análogo al descrito en la sección 4.1.2:

¹⁰Disponible en [/demos/mice/DEMO/ANTS/LABELS](#)


```
WarpImageMultiTransform 3 atlas atlasReg -R imgPlantilla matrizRegistro --use-NN
```

Se debe destacar que, durante este proceso, se obtienen errores de falta de memoria si las imágenes atlas tienen un tamaño excesivamente grande para ser procesadas por el software, como son el caso de los atlas para *ex vivo*, debido a su mayor resolución. Para solventar este problema, se emplea ITK-SNAP, donde el atlas es introducido y, mediante la opción de exportación de imagen, se selecciona generar un archivo NIFTI pero con un tamaño de 16 bits, en vez de los 32 originales. De esta forma, la resolución del atlas se ve reducida a la mitad, aunque por su propia naturaleza de atlas, no representa un problema significativo. El tamaño, por tanto, se ve reducido, pudiendo ejecutar sin problemas el registro.

Con el atlas registrado, se puede proceder a la localización neuroanatómica de los clústeres. Esto se realiza haciendo uso de las coordenadas asociadas a cada clúster que ofrece SPM. Originalmente, estas coordenadas son de referencia espacial, no útiles en ITK-SNAP, ya que este emplea coordenadas por vóxel. La transformación de las coordenadas se efectúa mediante la herramienta *Display* de SPMMOUSE, donde es posible introducir coordenadas espaciales y obtener sus equivalentes en coordenadas por vóxel, usando siempre una imagen plantilla registrada al espacio estereotáctico de trabajo.

Cada región se encuentra etiquetada en el atlas con un valor numérico asociado. Introduciendo las coordenadas por vóxel en ITK-SNAP con la imagen atlas incorporada, el valor de intensidad que hace referencia al valor numérico asociado da la región anatómica a la que corresponde dicha coordenada.

4.2. Análisis por ROIs

4.2.1. Introducción

La técnica basada en regiones de interés (ROIs) consiste en la búsqueda de diferencias en áreas o regiones anatómicas acotadas, focalizando así el análisis. En el caso de la morfometría neuroanatómica, este método presenta ventajas a la hora de examinar con profundidad biomarcadores, o lo que es lo mismo, áreas del cerebro en las que se espera obtener diferencias volumétricas. De esta forma, los resultados quedan aislados, reduciendo las probabilidades de obtener falsos positivos, a la vez que se obtiene una información mucho más precisa dependiendo del estudio que se esté realizando [63][64].

Tiene ciertas semejanzas con el método VBM, como son el registro o la segmentación de las imágenes, pero difieren en el objetivo analítico. En ROIs se busca segmentar las regiones neuroanatómicas aisladas, es decir, no se segmenta un bloque de regiones (e.g materia gris) sino cada una de las regiones que componen el cerebro (e.g neocórtex, amígdala...) (Fig. 4.13). Para ejecutar este proceso, se precisa de lo que se conoce como atlas anatómico, el cual indica al analista o al software de parcelación dónde se encuentra cada región. Este paso necesita, como es lógico, que las imágenes se encuentren alineadas con dicho atlas, pues no tendría sentido aplicar una parcelación a una imagen que no se corresponde en tamaño y alineación con el mapa de regiones.

Segmentadas las imágenes por regiones, se extrae el volumen de cada una de ellas para, posteriormente, efectuar un análisis estadístico. De esta forma, se comparan volúmenes de áreas específicas [5].

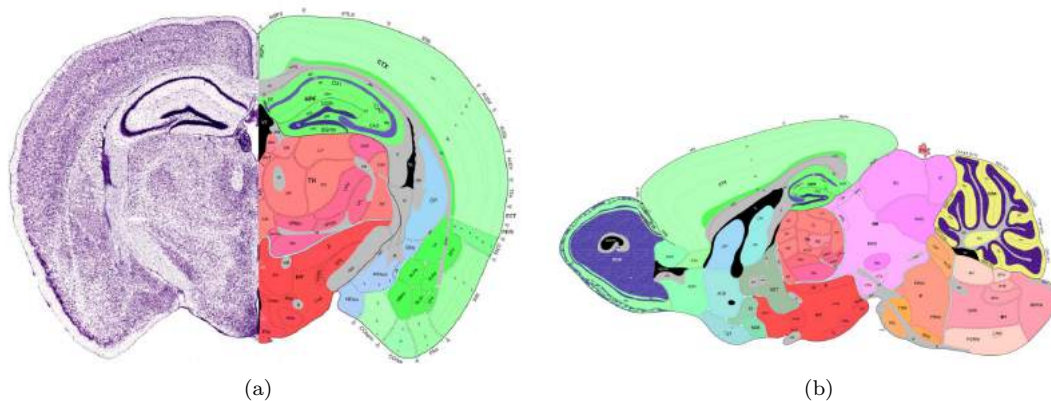


Figura 4.13: Ejemplo de atlas de parcelación.(a) Vista coronal, (b) Vista sagital.

4.2.2. Registro

El método ROIs precisa de un registro de las imágenes al mismo espacio estereotáctico que el atlas que vaya a ser empleado. El proceso de registro sigue los mismos principios técnicos que los descritos para el análisis VBM en la sección 4.1.2.

En el caso del presente estudio no es necesario efectuar registro a las imágenes,

pues ya se encuentran en el mismo espacio estereotáctico que el atlas empleado. En caso de ser necesario un registro, se llevaría a cabo de forma análoga al desarrollado en la sección 4.1.2, utilizando el atlas como imagen plantilla.

4.2.3. Segmentación

Para poder extraer los volúmenes de cada región cerebral, se realiza una parcelación automática de cada imagen aplicando un atlas y segmentando, atendiendo a los datos del mismo. El resultado es la imagen original y su parcelación por regiones, normalmente etiquetadas previamente en los atlas para ser identificadas.

A diferencia de la segmentación en VBM, en ROIs se aplica el software de segmentación automática específico: Multi-atlas Segmentation [5][6]. Su peculiaridad radica en la posibilidad de parcelar imágenes no solo de ratones, como se desarrolla en el presente proyecto, sino de múltiples especies y órganos ajustando los atlas proporcionados [65][66]. Además, no se emplean mapas de probabilidad de tejido, sino imágenes parceladas que se ajustan y aplican a la imagen procesada. La razón por la cual no es posible utilizar TMPs es simple: no existe una diferenciación a nivel de intensidad para cada región neuroanatómica. Pese a la existencia de este tipo de programas, para el desarrollo de los atlas sigue siendo necesaria la intervención manual de neuroanatomistas.

Este software, aun existiendo registro previo de las imágenes, ejecuta su propio registro para ajustar lo máximo posible el resultado. Aun con esto, es siempre recomendable ejecutar un registro externo para garantizar una mayor precisión.

Su funcionamiento es relativamente sencillo y consta de cuatro fases generales (Fig. 4.14) [6]:

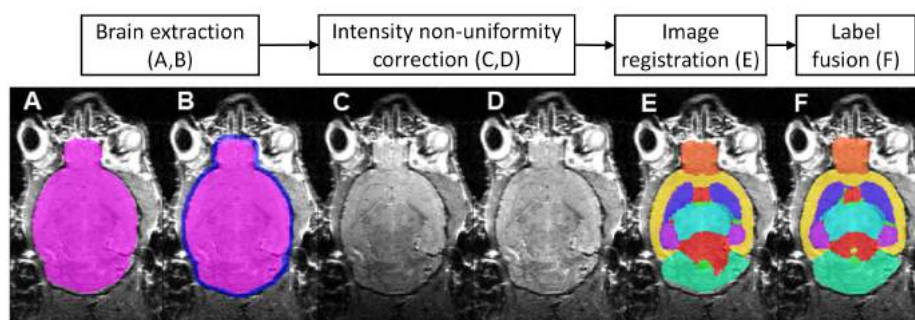


Figura 4.14: Diagrama de flujo de procesamiento de imágenes para parcelación de las mismas mediante el software Multi-atlas Segmentation [6].

1. **Eliminación del cráneo:** Se prescinde del cráneo, si lo hubiere, para ceñir el análisis ROIs únicamente a las regiones cerebrales. Para ello, el software crea una máscara donde se contenga solamente el contenido cerebral. Este proceso se consigue, primero, registrando la imagen a etiquetar al espacio del atlas mediante un método de coincidencia de bloques [67]. Las matrices de transformación generadas se invierten para aplicar el atlas sobre la imagen sin etiquetar. De esta forma, se fusiona el atlas con la imagen, empleando el algoritmo STAPLE [68]. Para finalizar esta etapa, la máscara generada en el paso de superposición, se expande, obteniendo así la máscara definitiva, la cual engloba las regiones

anatómicas cerebrales aptas para el método ROIs.

2. **Corrección de la intensidad:** Con el fin de afinar el registro posterior para la superposición definitiva de las parcelaciones, se corrige el sesgo de intensidad mediante el algoritmo N3 [69]. Dado que en VBM también existe esta problemática de intensidad, puede consultarse lo ya expuesto sobre este tema en la sección 4.1.3.
3. **Registro:** como se ha comentado, es preciso que el atlas esté perfectamente alineado con las imágenes, por lo que el algoritmo aplica un registro de precisión para afinar el resultado. Para ello, se emplea lo que se conoce como registro no-rígido, o lo que es lo mismo, un registro mediante deformación de la imagen, con el objetivo de maximizar la información semejante normalizada entre atlas e imagen. Este paso se lleva a cabo mediante una parametrización B-spline o línea polinómica cúbica suave básica para modelizar la transformación [70].
4. **Fusión de parcelaciones:** Para finalmente obtener cada región por separado, se aplica el algoritmo STEPS [71], el cual es una extensión de STAPLE.

Afortunadamente, en el desarrollo del trabajo no se necesita aplicar el software puesto que las imágenes que se emplean proceden del paquete de pruebas ofrecido por el propio creador del mismo. De este modo, las imágenes ya poseen las parcelaciones, por lo que el presente trabajo se limita únicamente al uso de estas.

4.2.4. Análisis estadístico

Obtenida la parcelación de cada una de las imágenes, es posible extraer el volumen de cada región y efectuar un análisis de varianza ANOVA para detectar diferencias volumétricas entre sujetos control y enfermos.

Extracción volumétrica

Para medir el volumen de cada región, se emplea el algoritmo 3 escrito en script de MATLAB¹¹, el cual realiza un barrio de las imágenes midiendo el número de vóxeles por región y multiplicando por su unidad volumétrica, dividiendo el resultado en una tabla por región y sujeto. Se aplica tanto en imágenes *ex vivo* como *in vivo*.

¹¹Disponibles en /demos/mice/DEMO/ROIS/getVolume_NeAt_FVB_*.m

Algorithm 3 Obtención de volúmenes por región.

Require: Grupo del cual se quieren extraer las imágenes, control (NeAt) o transgénico (FVB), e imágenes parceladas

Ensure: Tabla de volúmenes para cada región cerebral

- 1: **for** i=1:numero de imágenes etiquetadas **do**
 - 2: **for** j=1:tamaño de la lista de regiones cerebrales **do**
 - 3: Se obtienen el número de vóxeles del hemisferio izquierdo que corresponden a la región que ataque el bucle
 - 4: Se obtienen el número de vóxeles del hemisferio derecho que corresponden a la región que ataque el bucle
 - 5: **end for**
 - 6: Se obtiene el número total de vóxeles del cerebro del sujeto atacado por el bucle
 - 7: **end for**
 - 8: Se multiplican los vóxeles obtenidos por el valor cúbico del vóxel, obteniendo el volumen tanto regional como total en mm^3
 - 9: Se combinan volúmenes de hemisferio derecho e izquierdo para las regiones: ventrículos, tronco encefálico y cápsula externa
 - 10: **return** Tabla de volúmenes
-

ANOVA

Extraídos los volúmenes, se ejecuta el análisis de varianza (ANOVA) (ver Sec. C.1) para hallar las diferencias volumétricas entre sujetos control y transgénicos. Para ello se emplea un script de MATLAB¹² que compara cada región por separado, arrojando los p-valores asociados al grado de significancia de la diferencia encontrada de cada una de ellas, así como diagramas de cajas y bigotes mostrando el tipo de afectación (atrofia o inflamación) y la magnitud de esta. Los volúmenes que se manejan para cada región se normalizan respecto al volumen total del cerebro del sujeto, de forma que el volumen normalizado NV se define como:

$$NV_{region} = \frac{V_{region}}{V_{total}} \quad (4.30)$$

Se muestra en el algoritmo 4 el pseudocódigo de análisis ANOVA.

Algorithm 4 Análisis ANOVA.

Require: Tablas de volúmenes, tanto de sujetos control NeAt como sujetos transgénicos FVB.

Ensure: Tabla de p-valores por región.

- 1: **for** i=2:número de regiones **do**
 - 2: Normalización de los volúmenes de sujetos NeAt para la región atacada por el bucle
 - 3: Normalización de los volúmenes de sujetos FVB para la región atacada por el bucle
 - 4: pvalor=anova1
 - 5: **end for**
 - 6: **return** Tabla de p-valores
-

La muestra de resultados por región se divide entre hemisferio derecho e izquierdo puesto que, en análisis VBM, también se hace esta diferenciación, por lo que de esta forma es posible comparar ambos métodos con mayor precisión. No obstante, en ROIs se consideran como región única los ventrículos, el tronco encefálico y la cápsula externa. El p-valor máximo para la discriminación de resultados se selecciona a 0.01, dado que la limitación en el tamaño muestral implica riesgos de falsos positivos y/o

¹²Disponible en demos/mice/DEMO/ROIS/anova_*.m

negativos. Imponiendo un p-valor restrictivo se garantiza, al menos, una muestra de resultados con cierta seguridad estadística. La distinción de afectación, así como el grado de esta, se lleva a cabo generando diagramas de cajas y bigotes, de forma que sea posible apreciar gráficamente el desplazamiento de las medias volumétricas de cada grupo.

Capítulo 5

Resultados y discusión

A continuación se detallan los resultados y el análisis de estos, tanto los referentes al procesamiento de las imágenes como los obtenidos en los análisis estadísticos. Inicialmente, se divide la sección en los dos métodos empleados, VBM y ROIs, enfatizando las características de cada técnica. Posterior a esto, se exponen los resultados del contraste de ambos métodos.

5.1. Resultados por VBM

5.1.1. Registro

Del proceso de registro descrito en la sección 4.1.2 se obtienen el conjunto de imágenes a analizar trasladadas al mismo espacio estereotáctico, siendo este seleccionado previamente. Los resultados del procesamiento en ANTs son examinados mediante inspección visual. En la imagen 5.1 se aprecia una de las imágenes registradas con la imagen plantilla, correspondiente al TMP de materia gris, superpuesta en color verde. Se acepta como válido el ajuste espacial, prescindiendo de herramientas auxiliares de SPMMOUSE.

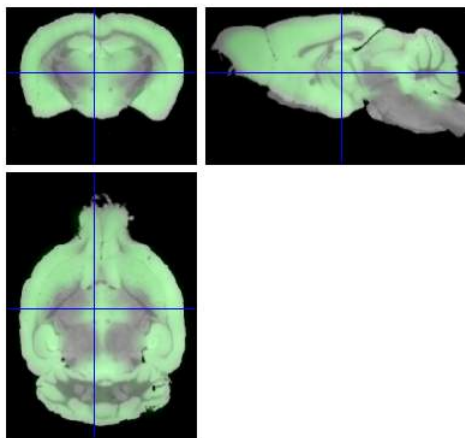


Figura 5.1: Imagen registrada con *overlay* de la imagen plantilla.

5.1.2. Segmentación

Del proceso de segmentado expuesto en la sección 4.1.3 se obtienen imágenes de la materia blanca, materia gris y líquido cerebrospinal, tanto para sujetos control como transgénicos, *ex vivo* e *in vivo*. Se pueden observar en las figuras 5.2 y 5.3 los resultados de una muestra para sujetos control y transgénicos *ex vivo* respectivamente. Las imágenes se contrastan con los resultados del estudio [4], pudiendo constatar una correcta segmentación.

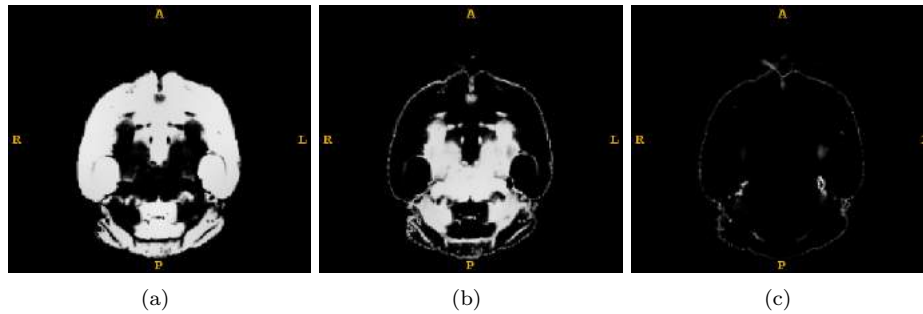


Figura 5.2: Segmentación de las imágenes de C57BL/6J, *ex vivo*. (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebrospinal.

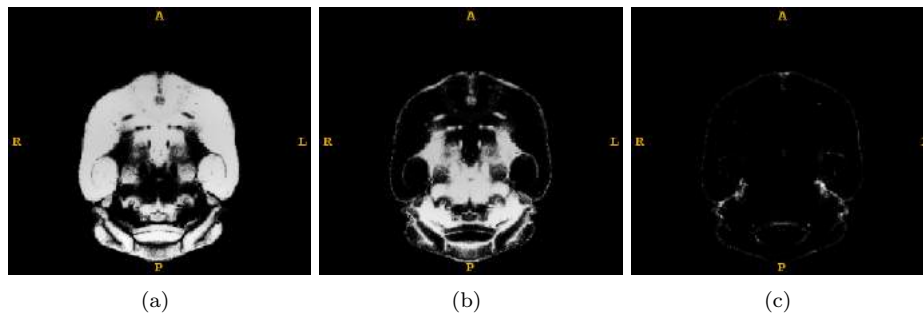


Figura 5.3: Segmentación de las imágenes de FVB_Ncr1, *ex vivo*. (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebrospinal.

5.1.3. Suavizado

La aplicación del kernel gaussiano a las imágenes segmentadas siguiendo las pautas mencionadas en la sección 4.1.4 proporciona resultados como los que se observan en las figuras 5.4 y 5.5. Estas representan el resultado del suavizado sobre las imágenes mostradas previamente en las figuras 5.2 y 5.3. La apariencia difuminada es una característica derivada del proceso de suavizado, la cual no implica necesariamente un resultado negativo. Tanto un exceso de difuminación como una falta notable de esta pueden ser señales de una mala selección del parámetro FWHM.

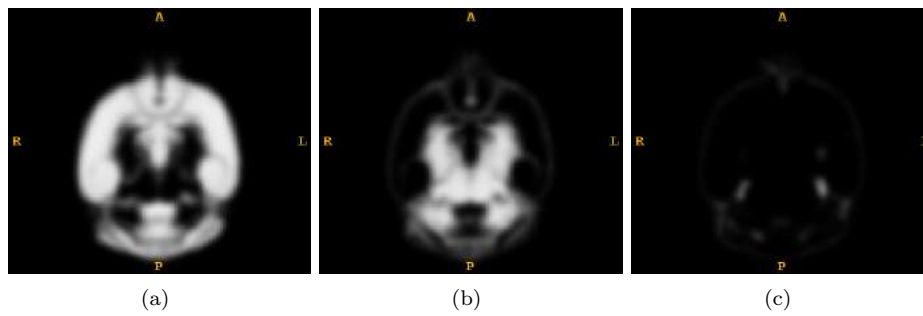


Figura 5.4: Suavizado de las imágenes de C57BL/6J, *ex vivo*. (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebrospinal.

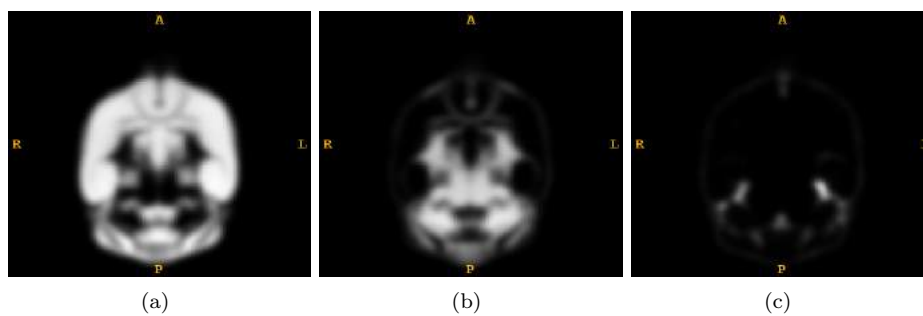


Figura 5.5: Suavizado de las imágenes de FVB.Ncr1, *ex vivo*. (a) Materia gris, (b) Materia blanca, (c) Líquido cerebrospinal.

El FWHM ha de ser calibrado en base a los resultados que se obtienen en los pasos estadísticos posteriores. Este proyecto no abarca este ajuste, por lo que los resultados obtenidos durante el suavizado se consideran aptos para el desarrollo del estudio estadístico.

5.1.4. Análisis estadístico

SPM arroja los resultados de las pruebas t y F por separado. A su vez, la prueba t se divide en las dos hipótesis estudiadas: atrofia e inflamación. A continuación, se detallan los resultados tanto para imágenes *ex vivo* como *in vivo*. En este último caso, se evalúan dos escenarios: uno con corrección del FWER y otro sin dicha corrección. La metodología seguida se puede consultar en la sección 4.1.5.

Todas las tablas que se muestran se han recortado, puesto que hay datos prescindibles para el análisis que se realiza. Pueden ser consultadas en su plenitud en el Anexo E. Dichas tablas están divididas en tres bloques: Clúster, Vóxel y Coordenadas espaciales. El bloque Clúster hace referencia a los valores estadísticos del clúster detectado, tales como los p -valores, corregidos y no corregidos, el número de vóxeles contenidos en cada clúster y el volumen de este, calculado a partir del número de vóxeles y el tamaño cúbico de estos ($0.07 \times 0.07 \times 0.07 \text{mm}^3$). Es importante destacar que, en el caso de la prueba F , no se muestran p -valores por clúster, pues no es necesaria distinción entre inflamación o atrofia. El bloque Vóxel recoge únicamente los vóxeles con valores estadísticos T o F más grandes dentro del clúster al

que van referidos. Las filas marcadas en negrita hacen referencia a los vóxeles más significativos. Las filas restantes sin negrita, si las hubiere, refieren a valores menos significativos pero representativos para el clúster, es decir, subclústeres. Los valores estadísticos mostrados son tanto el p-valor corregido como el no corregido, así como el estadístico empleado, T o F. El último bloque, Coordenadas espaciales, ubica en la imagen la posición de los vóxeles más significativos de cada clúster. Respecto a este aspecto se desarrolla más adelante en esta misma sección.

Prueba F: Se exponen los resultados globales de diferencias volumétricas detectadas sin distinción de tipo de afectación mediante la prueba F con corrección del FWER en las tablas 5.1 y 5.2.

Clúster		Vóxel			Coordenadas espaciales		
Nº Vox	Vol(mm3)	p(FWE-cor)	F	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
24200	8.301	<0.001	743.258	<0.001	-0.699	-0.630	-1.399
		<0.001	540.081	<0.001	0.490	-0.630	-1.539
		<0.001	340.335	<0.001	0.699	-0.420	-2.588
5771	1.979	<0.001	373.581	<0.001	1.819	-3.709	-3.008
		<0.001	229.589	<0.001	1.749	-3.219	-4.267
		<0.001	194.907	<0.001	1.609	-3.919	-4.057
8478	2.908	<0.001	346.341	<0.001	-1.959	-3.639	-2.868
		<0.001	226.417	<0.001	-2.029	-0.560	-3.987
		<0.001	216.283	<0.001	-1.329	-2.730	-3.148
1240	0.425	<0.001	233.772	<0.001	4.407	-1.960	-4.407
1631	0.559	<0.001	210.140	<0.001	1.189	-5.879	-2.169
		0.001	136.821	<0.001	1.119	-4.969	-2.588
823	0.282	<0.001	185.650	<0.001	2.658	-2.240	-4.267
352	0.121	<0.001	165.881	<0.001	-2.938	-2.170	-4.197
1365	0.468	<0.001	165.133	<0.001	-1.609	-5.669	-2.308
805	0.276	<0.001	152.983	<0.001	-4.687	-4.409	-2.728
674	0.231	0.001	124.881	<0.001	3.148	-6.369	-2.239
		0.007	93.848	<0.001	2.588	-7.069	-1.959
3244	1.113	0.002	113.813	<0.001	2.448	0.910	-2.308
		0.004	104.669	<0.001	3.148	0.070	-2.239
		0.010	86.699	<0.001	2.098	-1.120	-1.189
589	0.202	0.003	108.678	<0.001	-0.280	2.730	-2.588
		0.004	102.107	<0.001	-0.350	2.730	-3.218
755	0.259	0.004	103.683	<0.001	<0.001	-7.699	-1.539
		0.005	100.335	<0.001	1.119	-7.979	-1.749
		0.016	79.857	<0.001	0.490	-8.469	-2.169
3828	1.313	0.005	100.438	<0.001	-2.798	<0.001	-1.749
		0.005	99.366	<0.001	-2.728	0.910	-2.308
		0.014	81.409	<0.001	-2.029	-0.980	-1.259
177	0.061	0.008	91.475	<0.001	-2.308	2.590	-2.378
142	0.049	0.011	86.022	<0.001	3.497	0.070	-4.827

Tabla 5.1: Resultados de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes *ex vivo* con SPM.

Se aprecia en los resultados *in vivo* de la tabla 5.2 una limitación excesiva, por lo que se evalúa sin la corrección de FWER, estableciendo el p-valor máximo a 0.001 y el número mínimo de vóxeles por clúster a 0, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 5.3. Se asume el riesgo de falsos positivos, puesto que, de existir corrección conservadora del FWER, no se muestran diferencias volumétricas

Clúster		Vóxel			Coordenadas espaciales		
Nº Vox	Vol(mm3)	p(FWE-cor)	F	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
2411	0.826973	<0.001	29.001	<0.001	-1.119	-0.770	-1.959
		0.001	135.156	<0.001	-0.070	-1.120	-2.728
		0.001	119.701	<0.001	0.070	-2.170	-3.288
113	0.038759	0.002	105.121	<0.001	2.168	-2.730	-1.399
108	0.037044	0.004	95.515	<0.001	0.490	-0.420	-3.148
177	0.060711	0.010	80.396	<0.001	<0.001	-0.420	-3.847

Tabla 5.2: Resultados de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes *in vivo* con SPM.

con carácter atrofico.

Clúster		Vóxel			Coordenadas espaciales		
Nº Vox	Vol(mm3)	p(FWE-cor)	F	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
32910	11.288	<0.001	29.000	<0.001	-1.119	-0.770	-1.959
		0.001	135.156	<0.001	-0.070	-1.120	-2.728
		0.001	119.701	<0.001	0.070	-2.170	-3.288
2370	0.813	0.002	105.121	<0.001	2.168	-2.730	-1.399
		0.170	45.110	<0.001	2.098	-3.429	-2.099
		0.343	37.606	<0.001	2.798	-2.170	-2.378
3000	1.029	0.007	87.563	<0.001	-4.127	-2.730	-2.658
		0.112	49.654	<0.001	-3.218	-2.660	-3.078
		0.833	26.299	<0.001	-4.127	-4.339	-3.428
2512	0.862	0.122	48.759	<0.001	-3.148	-0.070	-1.679
		0.864	25.531	<0.001	-2.448	-0.420	-2.308
		0.994	19.502	<0.001	-2.938	0.770	-1.819
1725	0.592	0.128	48.173	<0.001	-0.699	-6.229	-3.358
		0.861	25.613	<0.001	<0.001	-5.179	-2.448
		0.959	22.371	<0.001	-1.469	2.730	-0.769
3274	1.123	0.146	46.724	<0.001	-2.378	2.450	-1.189
		0.972	21.700	<0.001	-0.630	0.700	-1.259
		0.972	21.700	<0.001	-0.630	0.700	-1.259
420	0.144	0.273	40.040	<0.001	-4.617	-2.030	-3.987
846	0.290	0.298	39.124	<0.001	-1.609	-1.050	-0.280
753	0.258	0.608	31.059	<0.001	3.218	-1.260	-1.189
		0.999	17.650	0.001	3.847	-0.140	-1.749
105	0.036	0.726	28.621	<0.001	-3.917	0.910	-3.358
169	0.058	0.906	24.388	<0.001	0.909	-3.989	-0.700
24	0.008	0.996	18.853	0.001	0.909	-7.139	-1.259
27	0.009	0.998	18.483	0.001	-3.567	-2.940	-1.119
8	0.003	0.999	17.231	0.001	-3.707	1.050	-1.469
2	0.001	1.000	16.219	0.001	-0.280	-5.179	-1.469

Tabla 5.3: Resultados de la prueba F sin corrección del FWER con p-valor máximo de 0.001 en imágenes *in vivo* con SPM.

En la figura 5.6 se muestran los mapas paramétricos obtenidos en la prueba F. En estos mapas vienen reflejados todos los clústeres con variaciones volumétricas de forma que, a mayor valor estadístico F tenga un vóxel, más oscuro aparece en la imagen. Así, los mapas quedan representados en escala de grises según el valor estadístico de la prueba.

Es posible apreciar la existencia de simetría, más notablemente en el caso *ex vivo*. Además, se observa cierta similitud entre los clústeres más significativos entre grupo

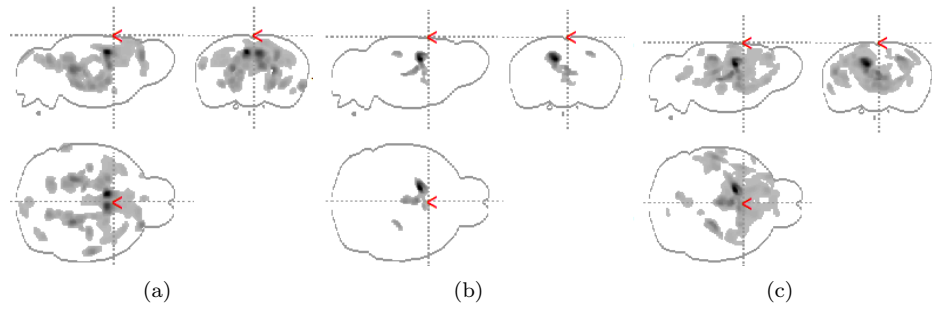


Figura 5.6: Mapas de clústeres, resultados de la prueba F. (a) Mapa para imágenes *ex vivo*, (b) Mapa para imágenes *in vivo* con corrección del FWER, (c) Mapa para imágenes *in vivo* sin corrección del FWER.

ex vivo e *in vivo*, este último sin corrección de FWER.

Prueba t: En las tablas 5.4 y 5.5 se aprecian los resultados obtenidos para atrofia e inflamación respectivamente para imágenes *ex vivo*. A su vez, se muestra en las tablas 5.7 y 5.6 los resultados en imágenes *in vivo*.

Clúster				Vóxel			Coordenadas espaciales		
p(cor)	Nº Vox	Vol(mm3)	p(unc)	p(FWE-cor)	T	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
<0.001	31868	10.931	<0.001	<0.001	27.263	<0.001	-0.699	-0.630	-1.399
				<0.001	23.240	<0.001	0.490	-0.630	-1.539
				<0.001	18.448	<0.001	0.699	-0.420	-2.588
<0.001	1557	0.534	<0.001	<0.001	15.290	<0.001	4.407	-1.960	-4.407
<0.001	1056	0.362	<0.001	<0.001	13.625	<0.001	2.658	-2.240	-4.267
				0.028	7.900	<0.001	3.567	-1.960	-3.358
<0.001	441	0.151	<0.001	<0.001	12.879	<0.001	-2.938	-2.170	-4.197
<0.001	5806	1.991	<0.001	0.001	10.668	<0.001	2.448	0.910	-2.308
				0.002	10.231	<0.001	3.148	0.070	-2.239
				0.005	9.311	<0.001	2.098	-1.120	-1.189
<0.001	941	0.323	<0.001	0.001	10.425	<0.001	-0.280	2.730	-2.588
				0.002	10.105	<0.001	-0.350	2.730	-3.218
				0.029	7.866	<0.001	-0.210	3.359	-1.959
<0.001	6466	2.218	<0.001	0.002	10.022	<0.001	-2.798	0.000	-1.749
				0.002	9.968	<0.001	-2.728	0.910	-2.308
				0.007	9.023	<0.001	-2.029	-0.980	-1.259
<0.001	336	0.115	<0.001	0.004	9.564	<0.001	-2.308	2.590	-2.378
<0.001	168	0.058	0.005	0.009	8.804	<0.001	1.959	3.639	-1.889
<0.001	139	0.048	0.009	0.015	8.379	<0.001	-4.827	-1.960	-4.197
0.001	124	0.043	0.013	0.033	7.758	<0.001	3.987	0.070	-1.959
				0.038	7.648	<0.001	4.127	-0.490	-1.959

Tabla 5.4: Resultados de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes *ex vivo* con SPM.

Clúster				Vóxel			Coordenadas espaciales		
p(cor)	Nº Vox	Vol(mm3)	p(unc)	p(FWE-cor)	T	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
<0.001	6893	2.364	<0.001	<0.001	19.328	<0.001	1.819	-3.709	-3.008
				<0.001	15.152	<0.001	1.749	-3.219	-4.267
				<0.001	13.961	<0.001	1.609	-3.919	-4.057
<0.001	9826	3.370	<0.001	<0.001	18.610	<0.001	-1.959	-3.639	-2.868
				<0.001	15.047	<0.001	-2.029	-0.560	-3.987
				<0.001	14.707	<0.001	-1.329	-2.730	-3.148
<0.001	2014	0.691	<0.001	<0.001	14.496	<0.001	1.189	-5.879	-2.169
				<0.001	11.697	<0.001	1.119	-4.969	-2.588
<0.001	1722	0.591	<0.001	<0.001	12.850	<0.001	-1.609	-5.669	-2.308
<0.001	1053	0.361	<0.001	<0.001	12.369	<0.001	-4.687	-4.409	-2.728
<0.001	988	0.339	<0.001	<0.001	11.175	<0.001	3.148	-6.369	-2.239
				0.003	9.688	<0.001	2.588	-7.069	-1.959
<0.001	1093	0.375	<0.001	0.002	10.183	<0.001	0.000	-7.699	-1.539
				0.002	10.017	<0.001	1.119	-7.979	-1.749
				0.008	8.936	<0.001	0.490	-8.469	-2.169
<0.001	230	0.079	0.001	0.005	9.275	<0.001	3.497	0.070	-4.827
<0.001	172	0.059	0.004	0.006	9.151	<0.001	-2.728	-6.089	-3.218
<0.001	195	0.067	0.003	0.009	8.789	<0.001	-2.728	-6.719	-1.959
<0.001	147	0.050	0.007	0.010	8.714	<0.001	4.617	-4.409	-2.029
0.001	102	0.035	0.022	0.012	8.594	<0.001	2.588	-6.439	-3.008
0.003	69	0.024	0.052	0.013	8.526	<0.001	-1.259	-0.280	-5.177
0.002	78	0.027	0.040	0.015	8.428	<0.001	-0.350	-2.660	-0.839
0.021	11	0.004	0.419	0.015	8.406	<0.001	1.959	-6.439	-4.547
<0.001	139	0.048	0.009	0.015	8.379	<0.001	-4.827	-1.960	-4.197
0.004	52	0.018	0.086	0.018	8.240	<0.001	1.329	2.660	-2.588
0.013	21	0.007	0.263	0.021	8.135	<0.001	3.358	-4.479	-2.518
0.005	47	0.016	0.101	0.021	8.126	<0.001	-0.140	-3.919	-4.267
0.005	47	0.016	0.101	0.024	8.018	<0.001	3.987	-2.660	-2.169
0.022	10	0.003	0.442	0.026	7.940	<0.001	1.049	-3.219	-1.049
0.025	8	0.003	0.495	0.033	7.769	<0.001	-2.098	-2.030	-5.037
0.001	124	0.043	0.013	0.033	7.758	<0.001	3.987	0.070	-1.959
				0.038	7.648	<0.001	4.127	-0.490	-1.959
0.025	8	0.003	0.495	0.035	7.708	<0.001	-0.630	-6.089	-3.288

Tabla 5.5: Resultados de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes *ex vivo* con SPM.

Clúster				Vóxel			Coordenadas espaciales		
p(cor)	NºVox	Vol(mm3)	p(unc)	p(FWE-cor)	T	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
0.794	167	0.057	0.221	0.477	5.350	<0.001	-3.917	0.910	-3.358
0.960	64	0.022	0.450	0.940	4.342	<0.001	0.909	-7.139	-1.259
0.981	41	0.014	0.553	0.976	4.151	<0.001	-3.707	1.050	-1.469

Tabla 5.6: Resultados de la prueba t sin corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes *in vivo* con SPM.

Clúster				Vóxel			Coordenadas espaciales		
p(cor)	N ^o Vox	Vol(mm ³)	p(unc)	p(FWE-cor)	T	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}
<0.001	61405	21.062	<0.001	<0.001	17.029	<0.001	-1.119	-0.770	-1.959
				<0.001	11.626	<0.001	-0.070	-1.120	-2.728
				0.001	10.941	<0.001	0.070	-2.170	-3.288
<0.001	4145	1.422	<0.001	0.001	10.253	<0.001	2.168	-2.730	-1.399
				0.089	6.716	<0.001	2.098	-3.429	-2.099
				0.190	6.132	<0.001	2.798	-2.170	-2.378
0.001	2386	0.818	<0.001	0.066	6.941	<0.001	-0.699	-6.229	-3.358
				0.627	5.061	<0.001	0.000	-5.179	-2.448
0.157	649	0.223	0.024	0.148	6.328	<0.001	-4.617	-2.030	-3.987
0.335	436	0.150	0.057	0.693	4.938	<0.001	0.909	-3.989	-0.700
0.907	104	0.036	0.332	0.950	4.299	<0.001	-3.567	-2.940	-1.119
0.986	33	0.011	0.599	0.988	4.027	<0.001	-0.280	-5.179	-1.469
0.862	131	0.045	0.276	0.997	3.840	0.001	-2.448	-2.450	-1.959
0.998	4	0.001	0.882	0.999	3.750	0.001	1.119	-5.249	-1.959
0.998	5	0.002	0.864	0.999	3.725	0.001	2.588	1.680	-1.329
0.997	9	0.003	0.806	0.999	3.694	0.001	0.350	1.120	-1.259

Tabla 5.7: Resultados de la prueba t sin corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes *in vivo* con SPM.

Los mapas de clústeres que se obtienen para el caso *ex vivo* se representan en la figura 5.7, los referentes al caso *in vivo* en la figura 5.8. Se muestran para este último caso únicamente los obtenidos sin corrección de FWER, puesto que con esta limitación solo se obtiene resultado atrófico sin inflamación, por lo que la figura 5.6 (b) es idéntica al mapa de t valor para atrofia, con mapa de inflamación nulo.

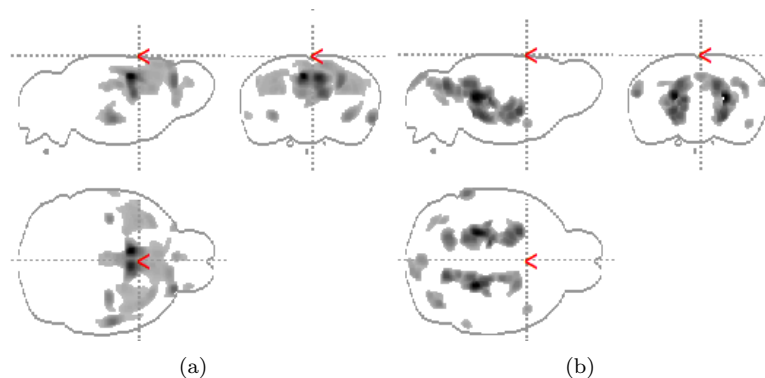


Figura 5.7: Mapas de clústeres, resultados de la prueba t en imágenes *ex vivo*. (a) Mapa de atrofia, (b) Mapa de inflamación.

Se realiza en primera instancia una comparativa de las diferencias globales detectadas entre imágenes *ex vivo* e *in vivo* mediante la prueba F, siendo el caso *in vivo* sin corrección del FWER, donde se obtiene (- *ex vivo*, - *in vivo*, diferencia %): número de clústeres (16, 15, 6 %), un número de vóxeles asociados a dichos clústeres (54074, 48145, 11 %) y volumen total detectado ($18.54mm^3$, $16.51mm^3$, 11 %). Nótese la diferencia existente entre volúmenes (*ex vivo* > *in vivo*), de la cual se expone un análisis más elaborado atendiendo a tipo de afectación más adelante.

Se aprecia que el nivel de significancia estadística varía ampliamente entre ambos análisis que, como se ha comentado, de aplicarse la corrección del FWER en *in vivo*, se limita de forma importante la muestra de resultados. Sin esta limitación, se observa que el p-valor corregido para el caso *in vivo* se sitúa en la unidad, con

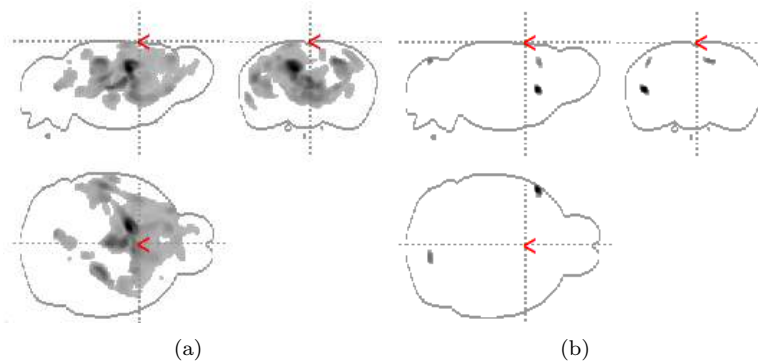


Figura 5.8: Mapas de clústeres, resultados de la prueba t en imágenes *in vivo* sin corrección del FWER. (a) Mapa de atrofia, (b) Mapa de inflamación.

un estadístico F relativamente bajo (16.219) y el p-valor máximo definido (0.001). Contrastan estos valores con los referentes a *ex vivo*, donde el p-valor máximo no corregido es especialmente bajo ($7,7472 \times 10^{-8}$) y en consecuencia, el valor F es mayor (86), con un p-valor corregido máximo en el establecido (0.05). Estas diferencias se presentan de forma aproximada en el estudio [1] (ver Sec. 2.1.1) y se comentan más adelante en esta sección.

Se observa un resultado más marcado en *ex vivo*, contrastando con *in vivo* en el análisis inflamatorio. No obstante, la atrofia es aparentemente similar para ambos casos. Centrando la atención en el análisis *ex vivo*, con resultados más abundantes, se observa una simetría ya destacada en los mapas de prueba F. Se diferencian de forma complementaria las regiones con atrofia e inflamación, sin aparentes superposiciones entre ambas.

5.1.5. Evaluación en MATLAB

Se muestran a continuación las imágenes NIfTI obtenidas tanto en VBM como en MATLAB (Sec. 4.1.5), visualizadas mediante el software MRICroGL. Se comparan valores t con p-valores ya que, al ser una comparativa visual, el resultado es el mismo a nivel de tamaño de clúster, aunque se ha de tener en cuenta que llevan una relación inversamente proporcional en la escala de valores, es decir, a mayor valor de t, menor es el p-valor, por lo que la interpretación de las imágenes mostradas debe ser cautelosa si se quiere atender a valores de intensidad.

Ex vivo: En las figuras 5.9 y 5.10 se representa la superposición para atrofia e inflamación respectivamente. Se aprecia una correlación directa y con marcada precisión entre ambos análisis. Se observan excepciones en algunos clústeres satelitales que se alejan de las regiones predominantes, resultado esperable debido a las diferencias que existen entre los procedimientos estadísticos de obtención. Además, el volumen detectado en VBM es mayor que el obtenido en MATLAB tanto en atrofia como en inflamación, cuya explicación puede deberse nuevamente a las diferencias procedimentales. Pese a esto, los clústeres que se obtienen en MATLAB, aunque de menor volumen, coinciden al menos visualmente con los centroides de los clústeres hallados mediante VBM.

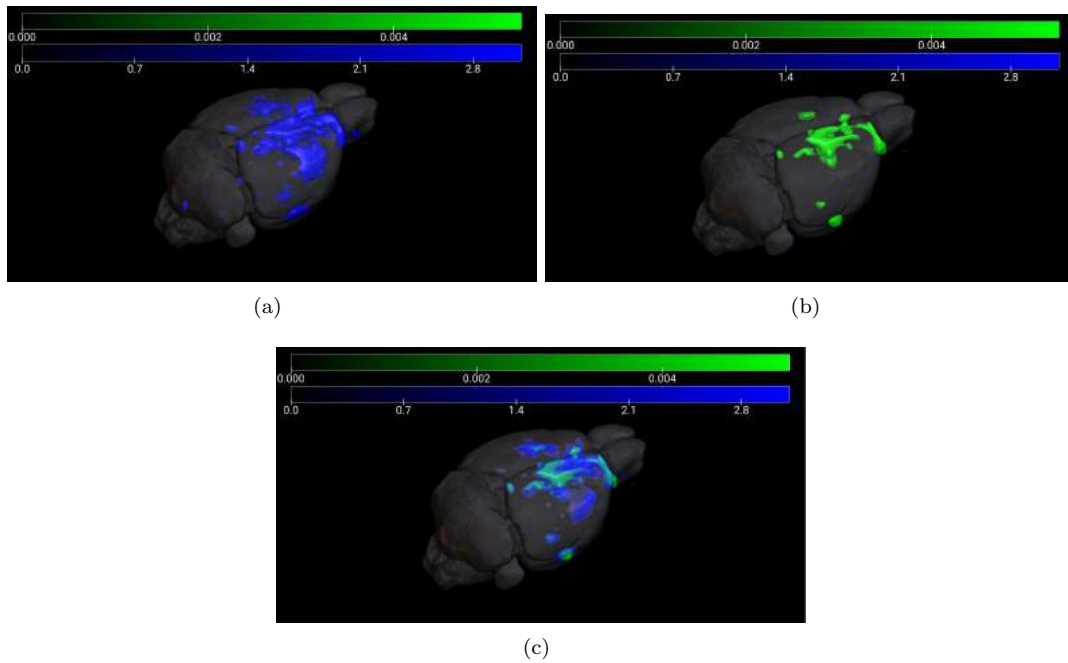


Figura 5.9: Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores $t/10$) como con MATLAB (escala verde de p-valores) para atrofia en imágenes *ex vivo*. (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos.

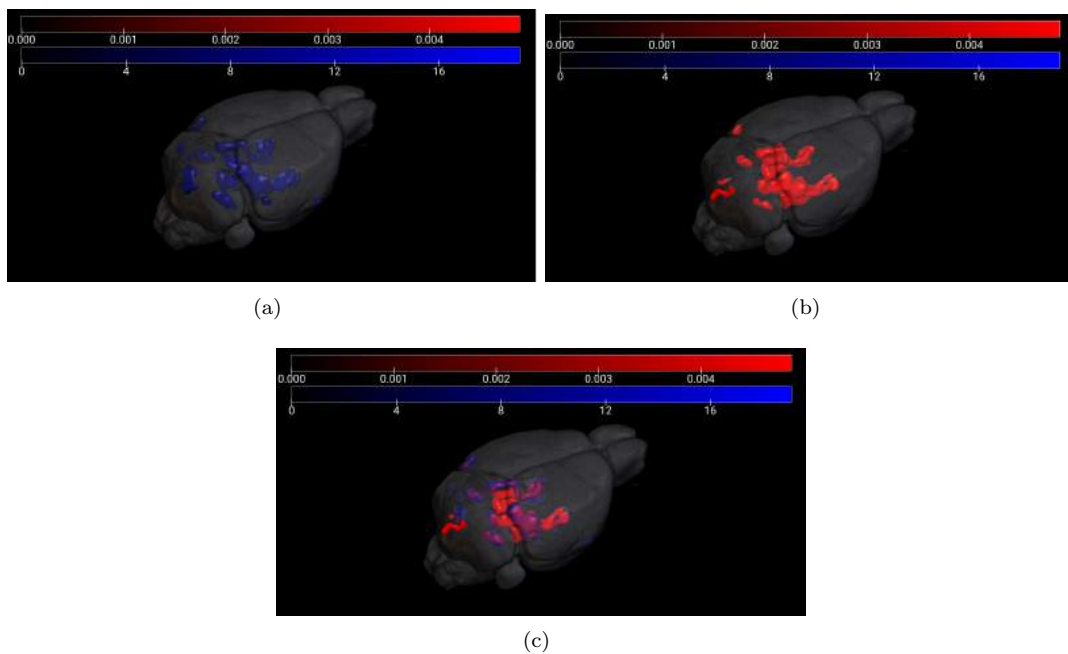


Figura 5.10: Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores t) como con MATLAB (escala roja de p-valores) para inflamación en imágenes *ex vivo*. (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos.

***In vivo*:** Al igual que en *ex vivo*, se muestra en las figuras 5.11 y 5.12 los resultados VBM y MATLAB por separado y superpuestos, en atrofia e inflamación.

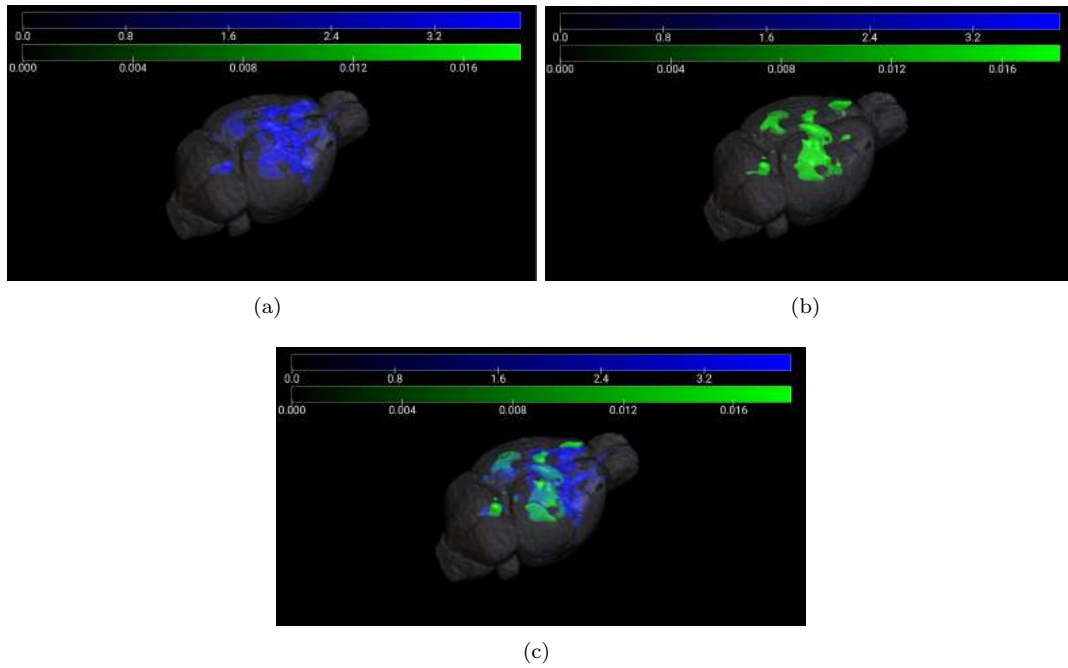


Figura 5.11: Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores $t/10$) como con MATLAB (escala verde de p-valores) para atrofia en imágenes *in vivo*. (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos.

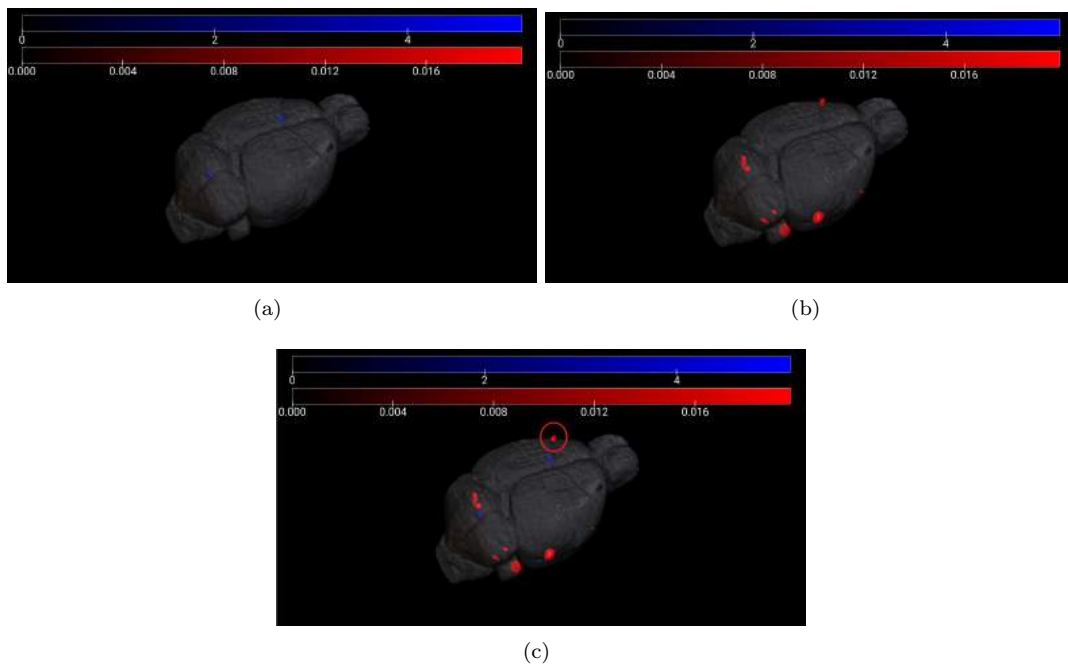


Figura 5.12: Visualización 3D de los clústeres obtenidos tanto en VBM (escala azul de valores t) como con MATLAB (escala roja de p-valores) para inflamación en imágenes *in vivo*. (a) Clústeres en VBM, (b) Clústeres en MATLAB, (c) Superposición de clústeres mediante ambos métodos.

Para el caso de atrofia, se observa una buena superposición de áreas entre ambos análisis, aunque con menor precisión que la observada en imágenes *ex vivo* (Fig. 5.9). Los resultados para inflamación, al existir un número muy limitado de clústeres y ser estos de pequeño tamaño, quedan más difusos. Se marca en la figura 5.12 (c) el clúster coincidente entre ambos análisis, no encontrando visualmente ninguna otra superposición.

Se hace llamativo que, mediante MATLAB, sea posible detectar un mayor número de clústeres que durante el análisis estadístico de SPM. La razón que puede estar detrás de este fenómeno es la diferencia de procesos matemáticos que realizan ambas pruebas, puesto que SPM elabora un modelo lineal para cada vóxel y MATLAB tan solo ejecuta una prueba t simple, sin modelización previa. Además, el tratamiento de algunos factores, como puede ser la varianza, se hacen de formas distintas. No obstante, se valida el resultado en VBM, principalmente gracias al resultado en atrofia y la similitud, al menos en limitaciones y clúster hallado, en inflamación.

5.1.6. Localización neuroanatómica y volumetría

Se presentan las regiones anatómicas referentes a los clústeres más significativos (marcados en **negrita**) representados en las tablas mostradas previamente en prueba t (5.4 y 5.5 *ex vivo*, 5.7 y 5.6 *in vivo*), haciendo uso de las coordenadas del vóxel más significativo, a diferencia de las tablas mencionadas, donde se hace referencia a las coordenadas espaciales (ver Sec. 4.1.5).

Ex vivo: En la tablas 5.8 y 5.9 se muestran los resultados para atrofia e inflamación respectivamente, ordenando las regiones de mayor a menor significancia.

x y z {vx}	Región	Hemisferio	Vol(mm3)	p-valor
75.7 127.6 105.0	Cápsula externa	D	10.931	<0.0001
148.7 108.6 62.0	Neocórtex	D	0.534	<0.0001
123.7 104.6 64.0	Amígdala	D	0.362	<0.0001
43.7 105.6 65.0	Amígdala	D	0.151	<0.0001
120.7 149.6 92.0	Cápsula externa	D	1.991	<0.0001
81.7 175.6 88.0	Bulbo olfatorio	I	0.323	<0.0001
45.7 136.6 100.0	Cápsula externa	D	2.218	<0.0001
52.7 173.6 91.0	-*	-	0.115	<0.0001
113.7 188.6 98.0	-*	-	0.058	<0.0001
16.7 108.6 65.0	Neocórtex	I	0.048	<0.0001
142.7 137.6 97.0	Neocórtex	D	0.043	<0.0001

Tabla 5.8: Regiones con atrofia en imágenes *ex vivo* detectadas mediante VBM.

*Se puede observar la ausencia de región localizable en dos de los clústeres hallados en atrofia (Fig. 5.8). La razón por la cual no se referencian a ningún área cerebral es porque las coordenadas de los clústeres se encuentran fuera de la estructura cerebral. Este problema puede estar debido a fallas en las imágenes, amplificadas durante el procesamiento de estas y posteriormente detectados en el análisis estadístico. Es común encontrar este tipo de irregularidades, aunque podrían ser limitadas en mayor medida.

x y z {vx}	Región	Hemisferio	Vol(mm3)	p-valor
111.7 83.6 82.0	Tálamo	D	2.364	<0.0001
57.7 84.6 84.0	Tálamo	I	3.370	<0.0001
102.7 52.6 94.0	Cerebelo	D	0.691	<0.0001
62.7 55.6 92.0	Colículo inferior	I	0.591	<0.0001
18.7 73.6 86.0	Neocórtex	I	0.361	<0.0001
130.7 45.6 93.0	Cerebelo	D	0.339	<0.0001
85.7 26.6 103.0	Cerebelo	D	0.375	<0.0001
135.7 137.6 56.0	Neocórtex	D	0.079	<0.0001
46.7 49.6 79.0	Cerebelo	I	0.059	<0.0001
46.7 40.6 97.0	Cerebelo	I	0.067	<0.0001
151.7 73.6 96.0	Neocórtex	D	0.050	<0.0001
122.7 44.6 82.0	Cerebelo	D	0.035	<0.0011
67.7 132.6 51.0	Hipotálamo	I	0.024	<0.0001
80.7 98.6 113.0	Cápsula externa	D	0.027	<0.0001
113.7 44.6 60.0	Tronco encefálico	D	0.004	<0.0001
16.7 108.6 65.0	Neocórtex	I	0.048	<0.0001
104.7 174.6 88.0	Neocórtex	D	0.018	<0.0001
133.7 72.6 89.0	Cápsula externa	D	0.007	<0.0001
83.7 80.6 64.0	Tronco encefálico	D	0.016	<0.0001
142.7 98.6 94.0	Cápsula externa	D	0.016	<0.0001
100.7 90.6 110.0	Cápsula externa	D	0.003	<0.0001
55.7 107.6 53.0	Amígdala	I	0.003	<0.0001
142.7 137.6 97.0	Neocórtex	D	0.043	<0.0001
76.7 49.6 78.0	Cerebelo	I	0.003	<0.0001

Tabla 5.9: Regiones con inflamación en imágenes *ex vivo* detectadas mediante VBM.

Con el fin de clarificar los resultados en la medida de lo posible, asumiendo una significancia elevada para todos los clústeres detectados (p-valor <0.0001), se presentan en la tabla 5.10 una suma de los volúmenes totales asociados a cada región y tipo de afectación.

Región	Vol(mm3)			
	Atrofia		Inflamación	
	D	I	D	I
Cápsula externa	15.140	-	0.054	-
Neocórtex	0.577	0.048	0.190	0.048
Amígdala	0.513	-	-	0.003
Bulbo olfatorio	-	0.323	-	-
Cerebelo	-	-	1.440	0.129
Tálamo	-	-	2.364	3.370
Hipotálamo	-	-	-	0.024
Tronco encefálico	-	-	0.020	-
Colículo inferior	-	-	-	0.591

Tabla 5.10: Suma de volúmenes por región y tipo de afectación en imágenes *ex vivo* mediante VBM.

A la vista de los resultados, especialmente los expuestos en la tabla 5.10, se aprecia la diferenciación de regiones por afectación. La cápsula externa, el neocórtex y la amígdala comparten atrofia e inflamación, aunque en este último caso en una proporción considerablemente menor. El bulbo olfatorio se ve afectado únicamente por la atrofia, mientras que el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, el tronco encefálico

y el colículo inferior solamente presentan inflamación (Fig. 5.13).

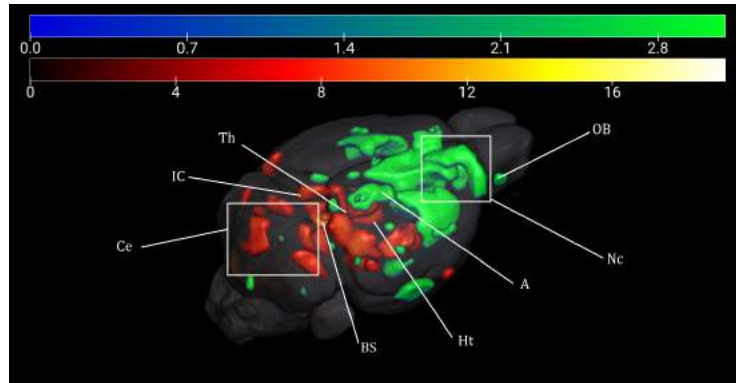


Figura 5.13: Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes *ex vivo*, representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t , y en escala de azul-verde los atróficos, en valores de $t/10$. Abreviaciones: Bulbo olfatorio (*Olfactory Bulb*, OB), Neocórtex (Nc), Amígdala (A), Colículo inferior (*Inferior Colliculi*, IC), Hipotálamo (Ht), Tálamo (*Thalamus*, Th), Cerebelo (Ce), Tronco encefálico (BS).

Los resultados concuerdan en gran parte con los hallados por los estudios [2], [4] y [5] (ver Sec. 2.1), donde localizan los clústeres más significativos en áreas del neocórtex, cerebelo, bulbo olfatorio, hipotálamo, amígdala y ganglios basales (región interconectada con el tálamo, tronco encefálico y corteza). Otras regiones como el hipocampo o el putamen caudado no son detectadas en el presente estudio con VBM, aunque sí son halladas en los estudios mencionados, siendo especialmente destacado el hipocampo, donde suele existir una importante afectación. Además, la cápsula externa no es mencionada explícitamente en ninguno de ellos, aunque sí se aprecia afectación en [4], por lo que se examina dónde puede estar la diferencia, puesto que es la región más significativa detectada en atrofia.

Se puede ver en la figura 5.14 la superposición de la imagen de valores t obtenida en *ex vivo* para atrofia, con su atlas correspondiente. Se observa que gran parte del clúster se encuentra sobre la región neocortical, aunque las coordenadas del vóxel más significativo arrojadas por VBM hacen referencia al área intermedia, es decir, a la cápsula externa. En el estudio [4] se observa el mismo fenómeno.

Se asume de este análisis que el volumen atribuido a la cápsula externa es, aparentemente, asociable en su mayoría al neocórtex puesto que, de momento, no es posible discernir el grado de pertenencia. El volumen del neocórtex queda en consecuencia en un total de $15.716mm^3$ en atrofia de hemisferio derecho y $0.242mm^3$ en inflamación de hemisferio derecho. Más adelante, en la comparativa con análisis por ROIs, se contrasta esta premisa.

In vivo: Se presentan en las tablas 5.11 y 5.12 los resultados de atrofia e inflamación respectivamente que, al igual que en *ex vivo*, se encuentran ordenados de mayor a menor significancia. Los resultados expuestos se condensan nuevamente en la tabla de volúmenes 5.13 para los clústeres detectados.

Se detectan un número limitado de regiones, especialmente en inflamación, apareciendo en atrofia el hipocampo, área esperable y no hallada mediante imágenes *ex vivo*. Destaca en volumen la fimbria con $21.061mm^3$, que va referenciado en gran

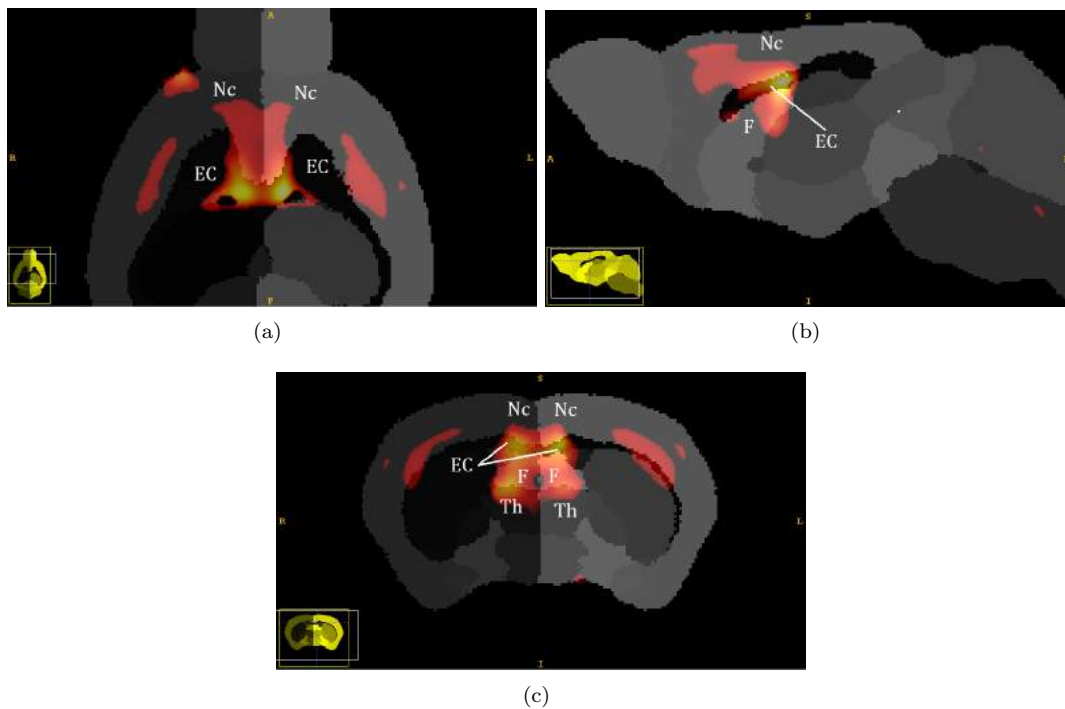


Figura 5.14: Visualización del solapamiento de regiones sobre el mismo clúster. Se aprecia que la cápsula externa (EC) presenta una mayor diferencia volumétrica, aunque se propaga a regiones colindantes, principalmente al neocórtex (Nc). Cápsula externa (*External capsule*, EC), Neocórtex (Nc), Fimbria (F), Tálamo (*Thalamus*, Th). (a) Vista axial, (b) Vista sagital, (c) Vista coronal.

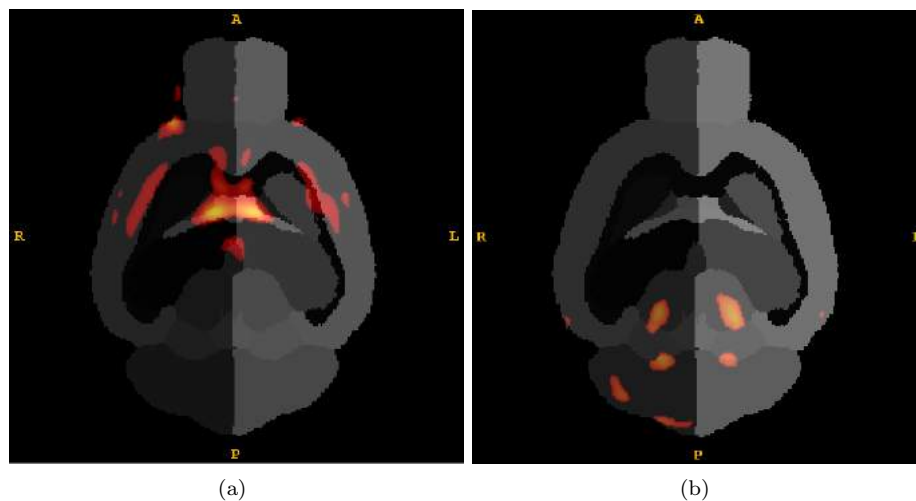


Figura 5.15: Clústeres en imágenes *ex vivo* en escala de calor t-valor sobre la imagen de etiquetas, vista axial. (a) Atrofia, (b) Inflamación.

medida al tálamo, pues sus dos subclústeres se encuentran ubicados en esta área (Fig. 5.16).

Contrastan estos resultados con los obtenidos en *ex vivo* a nivel de volumen detectado. Este resultado es esperable [1], pues la diferencia temporal existente entre la toma de imágenes *in vivo* y *ex vivo* lleva consigo una progresión en la neurodegeneración, produciendo que el volumen total detectado tanto para atrofia como para

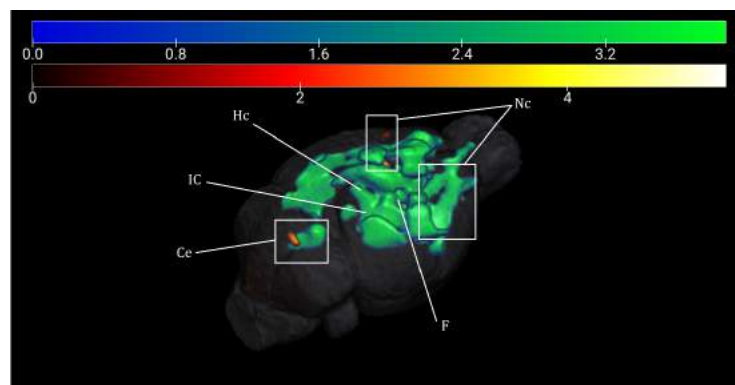
x y z {vx}	Región	Hemisferio	Vol (mm3)	p-valor
69.7 125.6 97.0	Fimbria	I	21.061	<0.0001
116.7 97.6 105.0	Hipocampo	D	1.421	<0.0001
75.7 47.6 77.0	Cerebelo	I	0.818	<0.0001
19.7 107.6 68.0	Neocórtex	I	0.222	<0.0001
98.7 79.6 115.0	Neocórtex	D	0.149	0.0001
34.7 94.6 109.0	Neocórtex	I	0.035	0.0003
81.7 62.6 104.0	Colículo inferior	I	0.011	0.0005
50.7 101.6 97.0	Hipocampo	I	0.044	0.0007
101.7 61.6 97.0	Colículo inferior	D	0.001	0.0009
122.7 160.6 106.0	Neocórtex	I	0.001	0.0009
90.7 152.6 107.0	Neocórtex	I	0.003	0.0010

Tabla 5.11: Regiones con atrofia en imágenes *in vivo* detectadas mediante VBM.

x y z {vx}	Región	Hemisferio	Vol (mm3)	p-valor
29.7 149.6 77.0	Neocórtex	I	2.364	<0.0001
98.7 34.6 107.0	Cerebelo	D	3.370	0.0003
32.7 151.6 104.0	Neocórtex	I	0.691	0.0004

Tabla 5.12: Regiones con inflamación en imágenes *in vivo* detectadas mediante VBM.

Región	Vol(mm3)			
	Atrofia		Inflamación	
	D	I	D	I
Fimbria	-	21.061	-	-
Neocórtex	0.149	0.261	-	3.055
Hipocampo	1.421	0.044	-	-
Colículo inferior	0.001	0.011	-	-
Cerebelo	-	0.818	3.370	-

Tabla 5.13: Suma de volúmenes por región y tipo de afectación en imágenes *in vivo* mediante VBM.Figura 5.16: Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes *in vivo*, representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t , y en escala de azul-verde los atróficos, en valores de $t/5$. Abreviaciones: Bulbo olfatorio (*Olfactory Bulb*, OB), Neocórtex (Nc), Colículo inferior (*Inferior Colliculi*, IC), Hipocampo (Hc), Cerebelo (Ce), Fimbria (F).

inflamación sea notablemente distinto, dando un carácter longitudinal al análisis. Además, las condiciones y protocolos de escaneo de las imágenes proporcionan una calidad especialmente superior a las imágenes *ex vivo* puesto que, frente a *in vivo*, pueden ser obtenidas con mayores cantidades de contraste, mayores tiempos de

escaneado y sin distorsiones debidas a movimientos vitales del propio animal. Buscando el efecto de la decapitación en *ex vivo*, se ve una ligera detección de variación volumétrica en el tronco encefálico, respecto a *in vivo*.

No obstante, llama la atención que existan regiones que sí se detectan en *in vivo* y no en *ex vivo*, como pueden ser la atrofia de la fimbria o el hipocampo, aunque se mantiene como factor común la alta afectación atrófica del neocórtex y el cerebelo, lo cual lleva a pensar que la ausencia de presencia de otras regiones, o la falta de precisión en alguna de ellas, puede estar debido a los limitados procesamientos de las imágenes, ya que la metodología seguida corresponde a parámetros todavía no ajustados para esta clase de imágenes y, en consecuencia, solo las regiones con mayor afectación y significancia pueden verse menos afectadas por un tratamiento no ajustado. El pequeño tamaño muestral también juega un papel importante en la limitación de resultados.

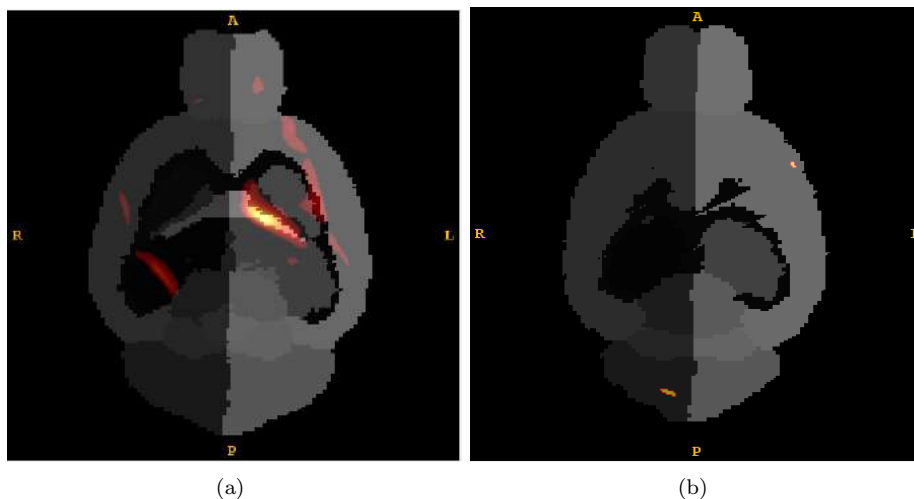


Figura 5.17: Clústeres en imágenes *in vivo* en escala de calor t-valor sobre la imagen de etiquetas, vista axial. (a) Atrofia, (b) Inflamación.

5.2. Resultados por ROIs

5.2.1. Registro y segmentación

La propia fuente de la que se extraen las imágenes proporciona las parcelaciones asociadas a cada una de ellas, por lo que los procesos de registro y parcelación no son necesarios en el presente proyecto y, por tanto, se exponen a continuación únicamente los puntos de partida para el análisis estadístico. En la figura 5.18 se aprecian dos ejemplos de las imágenes originales pareadas con su correspondiente parcelación anatómica, en la cual se pueden observar distintas tonalidades de color, cada una de ellas referente a una región cerebral distinta. Esta opción coloreada corresponde con la superposición en modo de segmentación de ITK-SNAP, que permite traducir los vóxeles de una intensidad concreta a un color (ver Sec. 4.1.5).

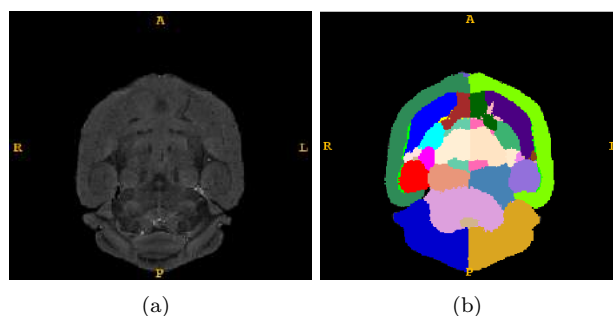


Figura 5.18: Parcelación de una imagen de sujeto transgénico FVB_Ncrl. (a) Imagen original, (b) Imagen parcelada.

5.2.2. Extracción volumétrica y análisis estadístico

Debido al volumen de datos, los resultados volumétricos se pueden consultar por sujeto y tipo de imagen en el anexo E, tablas E.8, E.9, E.10 y E.11.

Se muestran en la tabla 5.14 los resultados de p-valores para imágenes *ex vivo* e *in vivo*, obtenidos mediante análisis ANOVA (ver Sec. 4.2.4).

En primera instancia, sin aplicar una limitación de p-valor, se aprecian regiones con especial significancia como son el neocórtex (Dcho e Izdo, *ex vivo* e *in vivo*), el cerebelo (Dcho e Izdo, *ex vivo* e *in vivo*), el globo pálido (Dcho e Izdo, *ex vivo*), el colículo inferior (Dcho e Izdo, *ex vivo*) y el resto del mesencéfalo (Dcho e Izdo, *in vivo*). El resto de regiones pueden discriminarse en función del p-valor máximo que se seleccione. Para el caso de estudio, se establece un p-valor de 0.01 (ver Sec. 4.2.4). De esta forma, se obtienen como regiones significativas dentro del umbral el globo pálido (Dcho e Izdo, *ex vivo*), el hipotálamo (Izdo, *in vivo*), el hipocampo (Dcho, *in vivo*), el cerebelo (Dcho e Izdo, *ex vivo* e *in vivo*), el colículo inferior (Dcho e Izdo, *ex vivo*), el neocórtex (Dcho e Izdo, *ex vivo* e *in vivo*), el resto del mesencéfalo (Dcho e Izdo, *ex vivo*), el prosencéfalo basal (Izdo, *in vivo*), la cápsula externa (*in vivo*), los ventrículos (*in vivo*) y el tronco encefálico (*in vivo*).

5.3. Comparativa entre VBM y ROIs

Se exponen a continuación los resultados comparativos entre ambos métodos. Se divide este desarrollo en imágenes *ex vivo* e *in vivo*.

5.3.1. *Ex vivo*

Se encuentra concordancia entre el análisis VBM y ROIs en las regiones del neocórtex (Dcho e Izdo), colículo inferior (Izdo) y cerebelo (Dcho e Izdo). En cambio, mediante análisis ROIs se detecta una afectación muy significativa en el globo pálido, región que no aparece en VBM. A su vez, mediante VBM se obtienen diferencias en el hipotálamo, tálamo y bulbo olfatorio, dando estas en análisis ROIs p-valores no significativos (Tabla 5.15).

	p-valores	
	<i>Ex vivo</i>	<i>In vivo</i>
Hipocampo Dcho	0.27219	0.00335
Hipocampo Izdo	0.05461	0.20450
Putamen caudado Dcho	0.01411	0.24123
Putamen caudado Izdo	0.04190	0.64399
Comisura anterior Dcha	0.03584	0.01552
Comisura anterior Izda	0.05276	0.04439
Globo Pálido Dcho	< 0.00001	0.76493
Globo pálido Izdo	0.00004	0.40800
Cápsula interna Dcha	0.04058	0.21213
Cápsula interna Izda	0.15989	0.87153
Tálamo Dcho	0.14720	0.01456
Tálamo Izdo	0.03203	0.08059
Cerebelo Dcho	< 0.00001	< 0.00001
Cerebelo Izdo	< 0.00001	< 0.00001
Colículo Superior Dcho	0.27961	0.01285
Colículo Superior Izdo	0.84193	0.01359
Hipotálamo Dcho	0.13646	0.10528
Hipotálamo Izdo	0.01953	0.00589
Colículo inferior Dcho	< 0.00001	0.40497
Colículo inferior Izdo	0.00002	0.08409
Gris Periacueductal Dcho	0.19902	0.88068
Gris Periacueductal Izdo	0.87709	0.76168
Neocórtex Dcho	< 0.00001	< 0.00001
Neocórtex Izdo	< 0.00001	0.00029
Amígdala Dcha	0.14445	0.04559
Amígdala Izda	0.48068	0.13210
Bulbo olfatorio Dcho	0.10594	0.10063
Bulbo olfatorio Izdo	0.16853	0.17780
Resto del mesencéfalo Dcho	0.03061	0.00012
Resto del mesencéfalo Izdo	0.70648	0.00012
Prosencéfalo basal Dcho	0.22756	0.07494
Prosencéfalo basal Izdo	0.01072	0.00069
Fimbria Dcha	0.15950	0.18225
Fimbria Izda	0.40375	0.98596
Ventrículos	0.87694	< 0.00001
Tronco encefálico	0.05248	0.00026
Cápsula externa	0.05631	0.00002

Tabla 5.14: P-valores obtenidos mediante análisis de varianza (ANOVA) para cada región anatómica en imágenes *ex vivo* e *in vivo*.

Atendiendo a los resultados analizados en VBM referentes a la cápsula externa (Fig. 5.14), se observa que la premisa que se asume de pertenencia volumétrica mayoritaria al neocórtex se cumple en ROIs, aunque se aprecia un p-valor próximo a significativo en la cápsula externa (0.05631). Esto indica, como se planteó anteriormente, que los volúmenes están repartidos entre neocórtex, donde es mayoritario, y la cápsula externa.

Respecto a la correlación entre tipo de afectación, se hace uso de diagramas de cajas y bigotes para representar la diferencia volumétrica en el análisis por ROIs para las regiones coincidentes entre ambas técnicas. El grupo NeAt corresponde a los sujetos control y el FVB a los sujetos transgénicos. Los volúmenes normalizados

	Región		VBM	ROIs	Afectación
Coincidentes	Neocórtex	D	<0.0001	<0.0001	Atrofia
		I	<0.0001	<0.0001	
	Cerebelo	D	<0.0001	<0.0001	Inflamación
		I	<0.0001	<0.0001	
	Colículo inferior	I	<0.0001	<0.0001	Inflamación
	No coincidentes	Bulbo olfatorio	I	<0.0001	0.16853
Amígdala		D	<0.0001	0.14445	Atrofia
Amígdala		D	<0.0001	0.1444	Inflamación
Tálamo		D	<0.0001	0.1472	Inflamación
		I	<0.0001	0.03203	
Hipotálamo		I	<0.0001	0.01953	Inflamación
Tronco encefálico		D	<0.0001	0.05248	Inflamación
Globo pálido		D	-*	<0.0001	Atrofia
	I	-*	<0.0001		

Tabla 5.15: Comparativa de regiones detectadas y sus p-valores asociados, así como el tipo de afectación, entre los métodos VBM y ROIs para imágenes *ex vivo*. *Las regiones detectadas únicamente en ROIs no pueden ser buscadas en VBM, puesto que esta última solo arroja datos de los clústeres significativos, impidiendo ver los valores estadísticos de otras regiones.

quedan representados en eje de ordenadas en mm^3 .

En la figura 5.19 se aprecia afectación de tipo atrófico en la región del neocórtex, con una marcada diferencia volumétrica entre ambos grupos. Este resultado contrasta positivamente con el obtenido en VBM, pues en ambos métodos se detecta una pérdida de volumen significativa en este área.

La figura 5.20 muestra la afectación del colículo inferior izquierdo, mostrándose un aumento de volumen en el grupo transgénico frente al control, es decir, inflamación. El resultado coincide nuevamente con VBM.

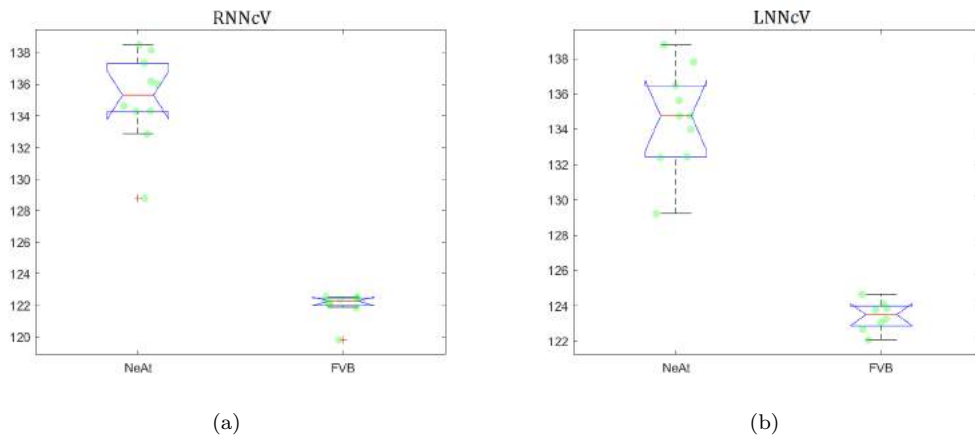


Figura 5.19: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del neocórtex (NNcV) en análisis ROIs, *ex vivo*. (a) Dcho (RNNcV), (b) Izdo (LNNcV)

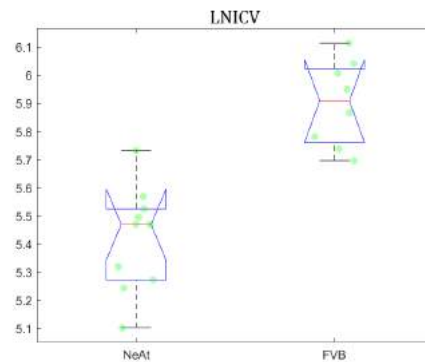


Figura 5.20: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del colículo inferior izquierdo (LNICV) en análisis ROIs *ex vivo*.

Por último, en la figura 5.21 se observa inflamación en el cerebelo bilateralmente, al igual que en VBM.

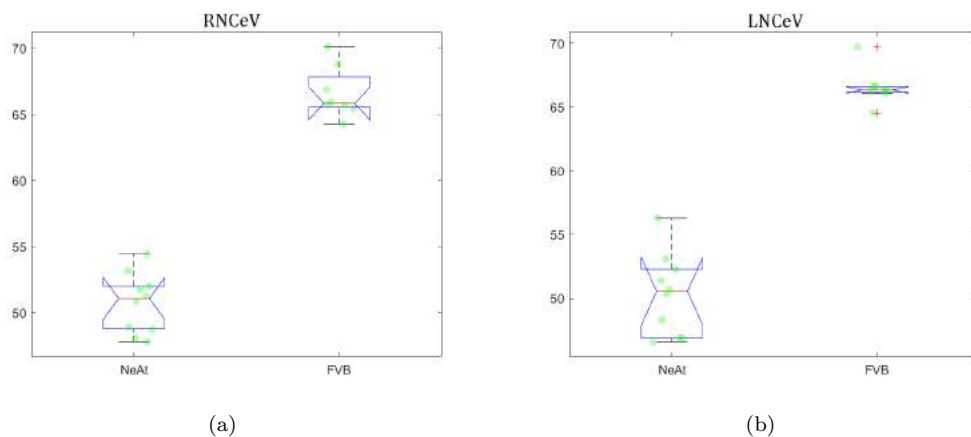


Figura 5.21: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del cerebelo (NCeV) en análisis ROIs, *ex vivo*. (a) Dcho (RNCeV), (b) Izdo (LNCeV)

Con el fin de precisar lo máximo posible en las posibles diferencias entre ambos métodos, se analizan a continuación regiones detectadas en VBM pero con valores no significativos en ROIs, y viceversa.

El área del tálamo, detectada en VBM como la región con mayor inflamación (Vol. $2.364mm^3$ Dcho, $3.370mm^3$ Izdo, p-valores <0.0001) presenta en ROIs un p-valor para el hemisferio izquierdo próximo a ser significativo, aunque se aleja en el derecho (0.14720 Dcho, 0.03203 Izdo), lo cual puede indicar que, a nivel regional, el análisis ROIs no detecta una diferencia notable, aunque por VBM se sabe que existe en el entorno de la región. Esta característica es esperable como diferencia entre métodos: ROIs focaliza la diferenciación a volúmenes regionales, por lo que si existe una variación interregional, puede determinar que, en las n regiones afectadas no exista diferencia, pero que halla una variación ubicada entre ellas. Acudiendo a la visualización del tálamo mediante el mapa de t-valor obtenido en VBM, superponiendo la parcelación etiquetada, se observa esta interregionalidad del clúster entre áreas cerebrales (Fig. 5.22).

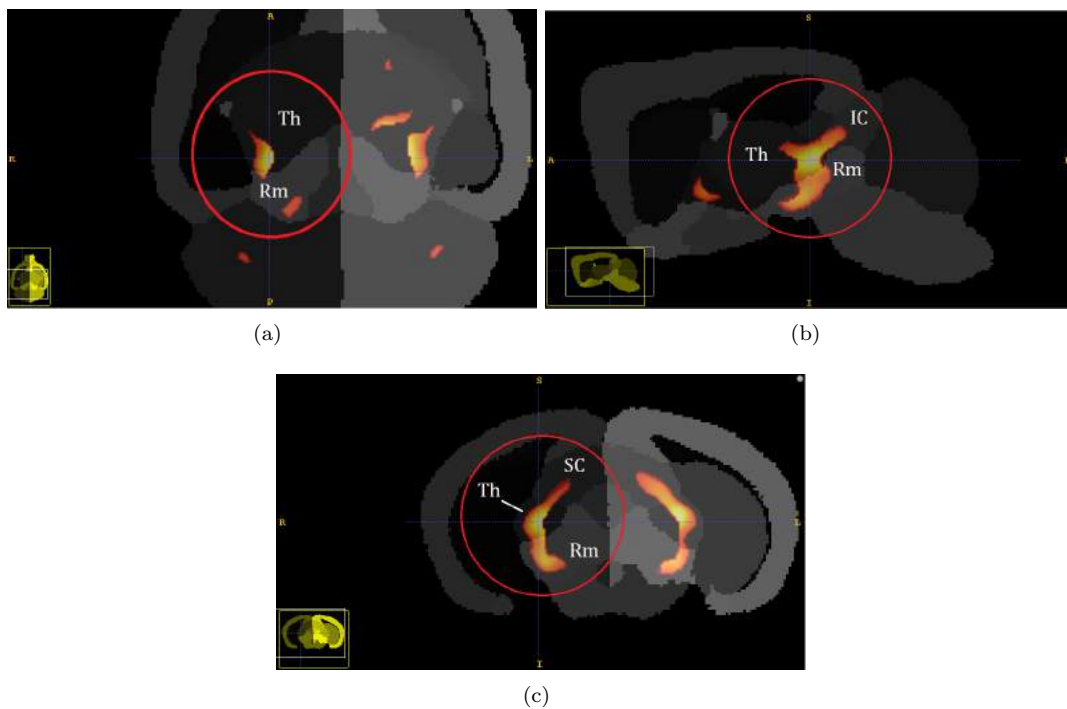


Figura 5.22: Interregionalidad del clúster detectado en VBM a través de las áreas del tálamo (*Thalamus*, Th), colículo inferior (IC), colículo superior (SC) y resto del mesencéfalo (Rm). (a) Axial, (b) Sagital, (c) Coronal.

Las regiones que atraviesa el clúster tienen p-valores significativos en ROIs en el colículo inferior (<0.00001 Dcho, 0.00002 Izdo) y próximos a significativos en el resto del mesencéfalo (0.03 Dcho). El colículo superior queda fuera de una significancia cercana (0.279621 Dcho, 0.84193 Izdo).

No obstante, si se atiende al diagrama de cajas y bigotes de la región talámica (Fig. 5.23), se observa información especialmente interesante, puesto que se ve afectación atrófica leve, y no inflamatoria significativa como en VBM.

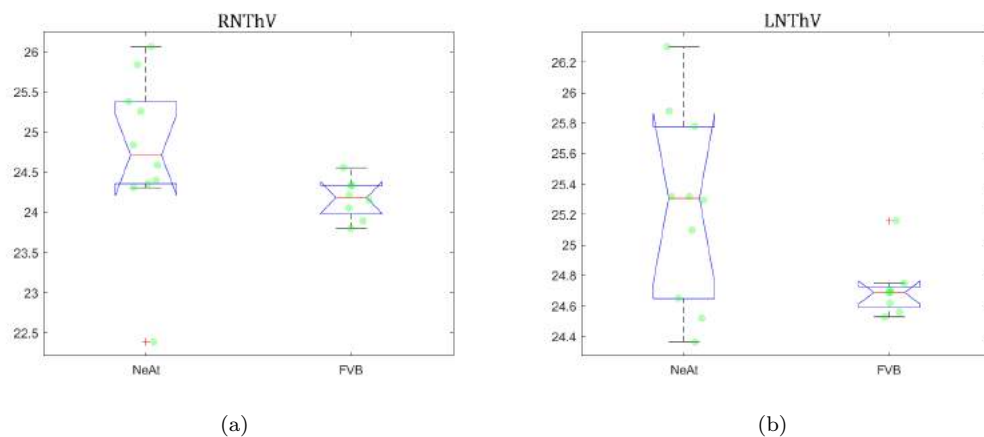


Figura 5.23: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del tálamo (NThV) en análisis ROIs *ex vivo*. (a) Dcho (RNThV), (b) Izdo (LNThV)

Para las demás áreas se observa que en VBM el volumen detectado es especial-

mente pequeño (hipotálamo Izdo: $0.024mm^3$, tronco encefálico Dcho: $0.020mm^3$, bulbo olfatorio Izdo: $0.323mm^3$). Se aprecia que los p-valores asociados a dichas regiones en ROIs (0.01953, 0.05248, 0.16853) presentan cierta significancia en el hipotálamo y tronco encefálico, aunque contrasta el bulbo olfatorio, siendo la región con más volumen detectado en VBM y con p-valor más elevado en ROIs, sin aparente cruzamiento del clúster entre regiones.

5.3.2. *In vivo*

En este caso, las regiones correladas entre ambos métodos son el neocórtex (Dcho e Izdo), el cerebelo (Dcho e Izdo) y el hipocampo (Dcho). La fimbria (Izda), detectada en VBM, no aparece como significativa en ROIs, mientras que en este último existen un mayor número de regiones con variaciones significativas, como son el hipotálamo (Izdo), el resto del mesencéfalo (Dcho e Izdo), el prosencéfalo basal (Izdo), los ventrículos, el tronco encefálico y la cápsula externa (Tabla 5.16)

	Región		VBM	ROIs	Afectación
Coincidentes	Neocórtex	D	<0.0001	<0.0001	Atrofia
		I	<0.0001	0.00029	
	Cerebelo	D	<0.0001	<0.0001	Inflamación
		Izdo	<0.0001	0.00335	
No coincidentes	Fimbria	I	<0.0001	0.98596	Atrofia
		Izdo	-*	0.00335	
	Hipotálamo	I	-*	0.00026	Atrofia
		Izdo	-*	0.00012	
	Tronco encefálico	D	-*	0.00012	Atrofia
		I	-*	<0.0001	
	Resto del mesencéfalo	-	-*	<0.0001	Atrofia
		-	-*	<0.0001	
Ventrículos	-	-*	0.00069	Atrofia	
	-	-*			
Cápsula externa	I	-*		Atrofia	
	Izdo	-*			
Prosencéfalo basal	I	-*		Atrofia	
	Izdo	-*			

Tabla 5.16: Comparativa de regiones detectadas y sus p-valores asociados, así como el tipo de afectación, entre los métodos VBM y ROIs para imágenes *in vivo*. *Las regiones detectadas únicamente en ROIs no pueden ser buscadas en VBM, puesto que esta última solo arroja datos de los clústeres significativos, impidiendo ver los valores estadísticos de otras regiones.

Para las regiones coincidentes se muestra el tipo de afectación al igual que en el caso *ex vivo* mediante los diagramas de cajas y bigotes. En el neocórtex (Fig. 5.24) se muestra atrofia especialmente significativa, algo esperable a la vista de los resultados ya expuestos para VBM debido a las grandes cantidades de volumen afectado.

El cerebelo (Fig. 5.25), a diferencia del análisis *ex vivo*, muestra en este caso carácter inflamatorio para ambos hemisferios en ROIs, contrastando con VBM, donde se detecta atrofia en el hemisferio izquierdo e inflamación en el hemisferio derecho.

El hipocampo, región con marcada importancia, pues se considera biomarcador, aparece en este caso en ambos métodos con carácter atrófico muy leve, aunque solo en hemisferio derecho (Fig. 5.26)

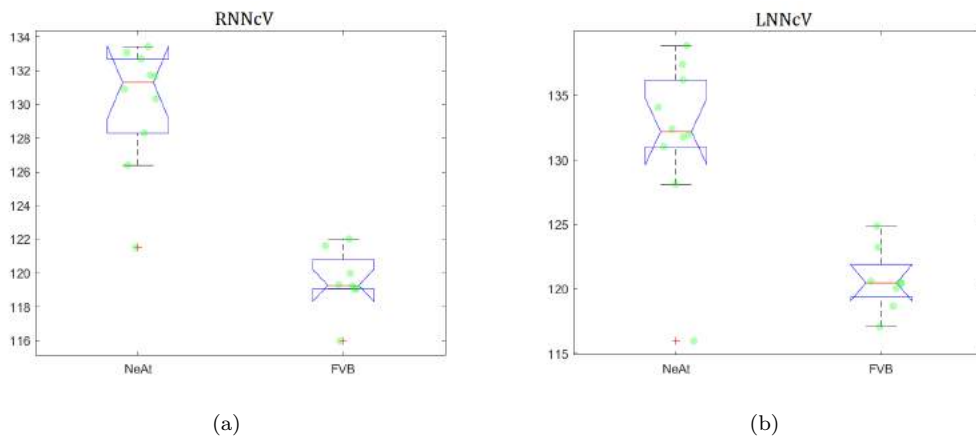


Figura 5.24: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del neocórtex (NNcV) en análisis ROIs *in vivo*. (a) Dcho (RNNcV), (b) Izdo (LNNcV)

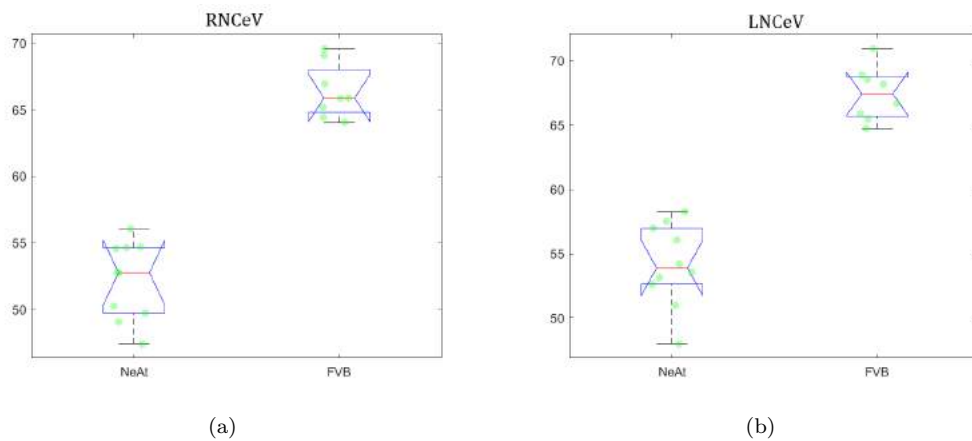


Figura 5.25: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del cerebelo (NCeV) en análisis ROIs *in vivo*. (a) Dcho (RNCeV), (b) Izdo (LNCeV)

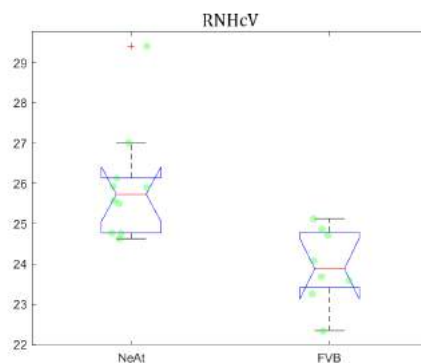


Figura 5.26: Volúmenes normalizados por sujeto y grupo en la región del hipocampo derecho (RNHcV) en análisis ROIs *ex vivo*.

El caso de la fimbria merece especial atención, pues como ya se indicaba en el análisis de resultados de VBM, esta región está fuertemente relacionada con el

tálamo al mostrar que sus subclústeres se ubican en este área. Atendiendo a la anatomía cerebral, la fimbria se encuentra en lo que se conoce como fórnix, una conexión entre el hipotálamo, el hipocampo, el tálamo, ambos hemisferios y otras áreas. Además, su ubicación se halla colindante con el sistema ventricular.

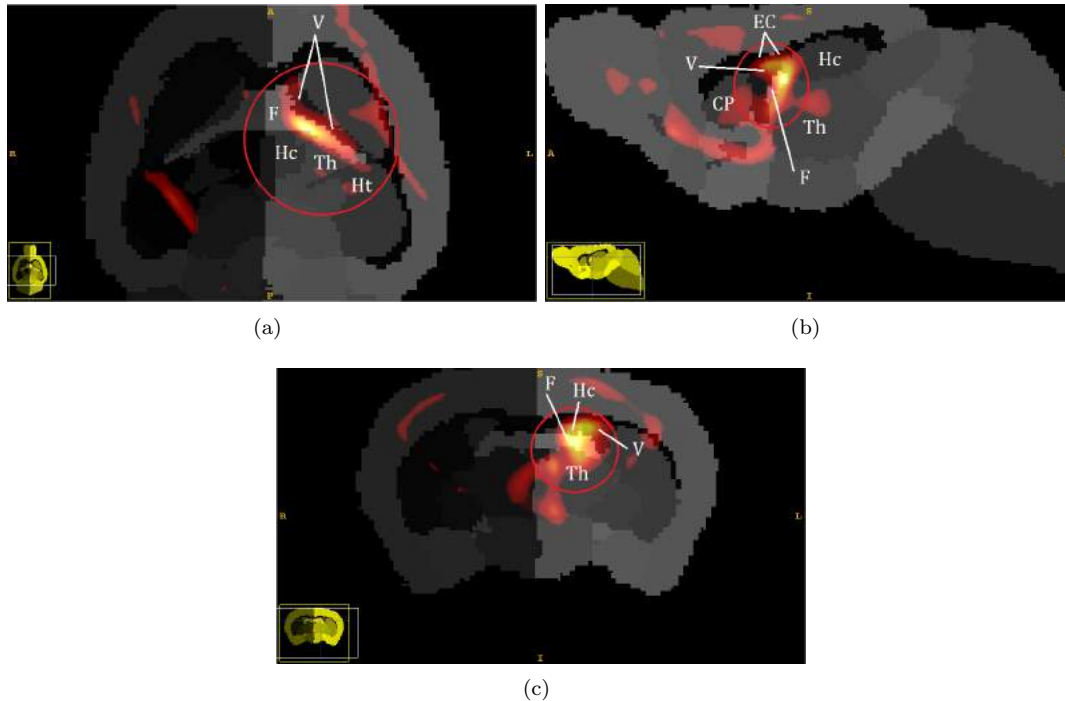


Figura 5.27: Interregionalidad del clúster detectado en VBM a través de las áreas del fórnix e inmediaciones. Fimbria (F), Tálamo (*Thalamus*, Th), Hipocampo (Hc), Hipotálamo (Ht), Ventriculos (V), Putamen Caudado (*Caudate putamen*, CP), Cápsula externa (*External capsule*, EC). (a) Axial, (b) Sagital, (c) Coronal.

Esto explica que, en ROIs, aparezcan regiones que aparentemente no son reflejadas en VBM, como son el hipotálamo y los ventrículos, mostrando de nuevo el mismo fenómeno que el descrito en *ex vivo*: los clústeres hallados en VBM sitúan sus centroides en las zonas más significativas, aunque esto no excluye que ese mismo clúster no esté sobre otras áreas, como es el caso, donde abarca el sistema límbico (o el referente al fórnix) y el sistema ventricular (Fig. 5.27). Tanto el hipotálamo como los ventrículos y el hipocampo son regiones halladas por otros estudios [2][4][5].

Capítulo 6

Conclusiones

6.1. Conclusión

La técnica VBM se presenta como un método de análisis mediante el cual se buscan diferencias locales comparando unidades volumétricas mínimas o vóxeles. La metodología que sigue pasa por un procesamiento previo de las imágenes, el cual precisa de un registro de las mismas a un mismo espacio estereotáctico, permitiendo así su comparación y el uso de mapas de probabilidad de tejido (TMPs) que, posteriormente, permitan segmentar las imágenes en tres grandes grupos de regiones (materia gris, materia blanca y fluido cerebroespinal). Estas segmentaciones son suavizadas, reduciendo errores y sesgos producto de los procesos previos y del propio escaneado, garantizando así un análisis estadístico preciso. Finalmente, el estudio estadístico se ejecuta en base a la comparación vóxel a vóxel de los valores de intensidad de los grupos de imágenes a analizar. Todo esto se consigue fundamentalmente mediante el uso de dos herramientas: ANTs para el registro y SPMOUSE para el resto de pasos.

Por otro lado, el método ROIs consiste en el análisis volumétrico de regiones concretas, especialmente las consideradas biomarcadores, aunque pueden ser analizadas otras muchas, tal y como se lleva a cabo en este trabajo. La técnica precisa de un registro de las imágenes al espacio de un atlas anatómico, empleado a continuación de este paso para segmentar por regiones. De esta forma se obtiene cada área cerebral por separado, pudiendo ejecutar pruebas estadísticas por región en busca de diferencias. Únicamente se necesita del software de segmentación, en este caso Multi-atlas Segmentation, y MATLAB.

De la comparación entre ambos métodos puede concluirse:

- Atendiendo a los resultados obtenidos en relación a la coincidencia de regiones entre ambos métodos (Tabla 6.1), teniendo en cuenta el carácter todavía conservador de estos datos, VBM y ROIs parecen coincidir principalmente en la detección de diferencias de alta significancia y que abarcan proporciones considerables de volumen (Fig. 6.1). El tipo de afectación no parece influir en la detección. Por contra, se observan incoherencias importantes en algunos de los análisis desarrollados, como en los resultados referentes a la afectación a nivel del cerebelo en imágenes *in vivo* (ver Sec. 5.3.2), poniendo de manifiesto problemas principalmente en el tamaño muestral y, en una medida aun desconocida,

en la falta de precisión metodológica.

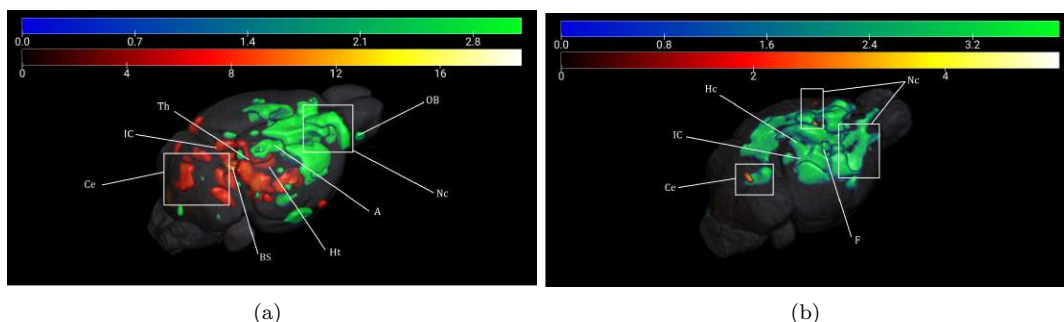


Figura 6.1: Visualización 3D de los clústeres detectados en imágenes (a) *ex vivo* y (b) *in vivo*, representando en escala de calor los referentes a inflamación, en valores t , y en escala de azul-verde los atroficos, en valores de $t/10$. Se observan los tamaños de los clústeres coincidentes entre VBM y ROIs (Nc, Ce, IC, Hc). Abreviaciones: Bulbo olfatorio (*Olfactory Bulb*, OB), Neocórtex (Nc), Amígdala (A), Colículo inferior (*Inferior Colliculi*, IC), Hipotálamo (Ht), Tálamo (*Thalamus*, Th), Cerebelo (Ce), Tronco encefálico (BS), Hipocampo (Hc), Fimbria (F).

- Siguiendo lo expuesto y discutido en la sección 5.3, donde se analiza la naturaleza interregional de los clústeres hallados en VBM, tanto en *ex vivo* como en *in vivo*, la precisión de VBM para la detección de áreas afectadas independientemente de la región cerebral parece notablemente superior a la de ROIs. Asimismo, ROIs muestra ser más concluyente en la extracción de regiones con mayor volumen afectado aun cuando el nivel de significancia es menor.

	Región		VBM	ROIs	Afectación
<i>Ex vivo</i>	Neocórtex	D	<0.0001	<0.0001	Atrofia
		I	<0.0001	<0.0001	
	Cerebelo	D	<0.0001	<0.0001	Inflamación
		I	<0.0001	<0.0001	
	Colículo inferior	I	<0.0001	<0.0001	Inflamación
<i>In vivo</i>	Neocórtex	D	<0.0001	<0.0001	Atrofia
		I	<0.0001	0.00029	
	Cerebelo	D	<0.0001	<0.0001	Inflamación
		Hipocampo	D	<0.0001	

Tabla 6.1: Regiones concordantes entre los métodos VBM y ROIs para imágenes *ex vivo* e *in vivo* con sus p -valores asociados.

Referente al empleo de imágenes *ex vivo* e *in vivo*:

- Para el caso VBM, las imágenes *ex vivo* parecen arrojar mejores resultados que con imágenes *in vivo* (Fig. 6.2) que, tal y como se ha comentado, es un dato esperable gracias a la alta calidad en *ex vivo*, aunque no es posible afirmar si esta diferencia es maximizada debido al tamaño muestral, a la metodología, al carácter longitudinal del análisis o a una combinación de estos factores.
- En ROIs existen notables diferencias entre ambos tipos de imágenes, aunque no se encuentran razones para esta disparidad más allá de lo ya expuesto en relación al tamaño muestral o el método, aunque en este caso la problemática

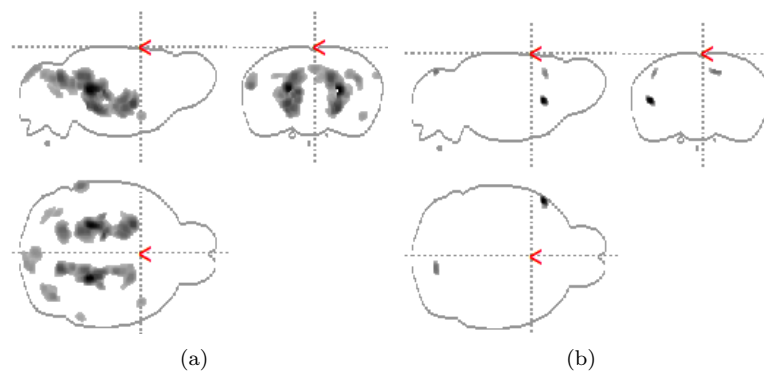


Figura 6.2: Comparativa de mapas de clústeres obtenidos en VBM para el caso inflamatorio, escala en F valores. (a) *Ex vivo*, (b) *In vivo*.

metodológica se ve reducida debido a la sencillez de la técnica. No obstante, el nivel de información estadística extraída de los análisis no permite estudiar en profundidad estas diferencias.

- El carácter longitudinal que puede poseer el análisis mediante imágenes *in vivo* y *ex vivo* queda relativamente expuesto, pudiéndose observar ciertos rasgos característicos de una evolución neurodegenerativa. Nuevamente, el tamaño muestral y el desarrollo de los métodos condicionan estas observaciones.

En líneas generales, la técnica VBM se muestra más precisa en la detección local de diferencias, de forma que es posible analizar regiones afectadas y conexiones con áreas colindantes mediante la visualización de los clústeres hallados. Los riesgos de falsos positivos y/o negativos son considerablemente altos al depender en gran medida del procesamiento de imágenes previo, lo cual aumenta de forma importante la complejidad del método para obtener resultados seguros. El software de procesamiento que se emplea para su aplicación, SPMMOUSE, se confirma como una herramienta muy útil aunque limitada debido mayoritariamente a la versión no actualizada debidamente.

Por su parte, ROIs tiene una mayor facilidad para hallar biomarcadores de especial significancia a nivel regional, acotando el resultado a un área específica dado que este es, al fin y al cabo, su uso habitual. Pese a esto, se muestra una especial dependencia de los criterios estadísticos que se tomen, pudiendo correr el riesgo de pasar por alto resultados válidos que, en un análisis por clúster son fácilmente detectables. El proceso de obtención de volumetría y de resultados es notablemente más simple que el seguido en VBM, reduciendo riesgo de errores y agilizando los procesos, pues no necesita de un tratamiento de imágenes previo más allá del registro y correcciones menores, empleando un software más simple y manejable.

6.2. Limitaciones

Ser el primer proyecto de fin de grado que aborda el análisis de imágenes de resonancia magnética del cerebro de ratones implica una serie de importantes limitaciones tanto en materia de recursos como metodológicas que deben ser expuestas. Esta sección tiene por consiguiente un importante cometido: focalizar los puntos a

mejorar en futuros proyectos que partan de este.

6.2.1. Sujetos

La muestra que se estudia en el presente trabajo tiene un tamaño considerablemente pequeño, si se quieren obtener resultados fehacientes y útiles para un estudio y desarrollo en profundidad. Así queda reflejado tanto en los resultados como en las conclusiones de los mismos, donde se observan claros problemas.

La obtención de un mayor tamaño muestral se ve muy limitada debido a diversos factores como la falta de bases de datos con imágenes MRI de las cepas de ratones estudiadas. Al ser un campo todavía en desarrollo, no existen repositorios comparables a los de imágenes y datos de personas enfermas con enfermedades neurodegenerativas, como es ADNI. La oportunidad de tomar imágenes directamente se ve descartada debido a que las cepas de ratones deseadas se encuentran infectadas y, por consiguiente, no aptas para ser escaneadas por el riesgo de propagación de la enfermedad.

6.2.2. Herramientas software

SPMMOUSE, la extensión de MATLAB que se emplea para el análisis VBM se ejecuta en una versión que no oficial desactualizada, debido a la dificultad para obtener el software original. Esto lleva a utilizar una de las versiones más antiguas de SPM (SPM5) y modificada por la comunidad para ser funcional en SPMMOUSE. Al ser versiones no mantenidas, su estabilidad se ve comprometida, limitando de forma importante el progreso del trabajo y haciendo necesarias versiones de MATLAB antiguas.

6.2.3. Metodología

La herramienta SPMMOUSE se utiliza por primera vez, careciendo en consecuencia de parámetros adecuados tanto para el tipo de imágenes como para las cepas empleadas. Todos los parámetros seguidos se obtienen de la página oficial del software que ofrece una primera aproximación al análisis VBM, por lo que no se encuentran suficientemente ajustados para la obtención de resultados afinados.

6.3. Desarrollos futuros

De cara a futuros trabajos, el aumento del tamaño muestral, a través de la búsqueda y/u obtención de nuevas imágenes supone una prioridad para garantizar mejores y más precisos resultados, independientemente de los objetivos que se persigan, así como la obtención de datos referentes a los sujetos, como pueden ser edad y sexo, conduciendo a estudios con covariables que pueden arrojar evidencia de mayor calidad.

Metodológicamente, VBM debe todavía ajustarse para un procesamiento adecuado y limpio que proporcione una base segura para el análisis estadístico. Los parámetros de SPMMOUSE pueden afinarse mayoritariamente mediante la realización de ensayos y ciclos de prueba-error, aunque existe ya evidencia que puede

facilitar la tarea. Se destaca del proceso el paso de suavizado, el cual hasta que existan ajustes precisos en segmentación, puede tener una función reguladora en futuros estudios. Se recomienda para su mejora la revisión y estudio de [72], donde hacen uso de SPM y detallan criterios de ajuste de suavizado.

En análisis por ROIs sería deseable una revisión y ajuste del código fuente empleado, con el fin de maximizar la toma de resultados en estudios más elaborados, con la adquisición de parámetros estadísticos más abundantes, como valores F o varianzas inter e intra grupo.

En líneas generales, la práctica totalidad de los apartados seguidos en el presente trabajo son revisables y mejorables, por lo que cualquier futuro desarrollo debe focalizar su línea de acción en el perfeccionamiento del mayor número de pasos del proceso, con el fin de que tan pronto como sea posible se puedan obtener resultados de calidad mediante el empleo de imágenes de ratones, abriendo un gran abanico de posibilidades.

Apéndice A

Anexo A

A.1. Puesta a punto

La mayoría de los materiales empleados en el presente proyecto son software específico en la materia tratada. Su instalación y puesta a punto es el primer paso seguido para su utilización. A continuación, se expone el proceso llevado a cabo para cada una de las herramientas más significativas:

A.1.1. En análisis por VBM

- **Instalación de SPMMOUSE:** el software SPMMOUSE, como se ha comentado en la sección 3, depende directamente de la extensión SPM para MATLAB. Debido a las dificultades para contactar con el organismo oficial creador del software (www.spmmouse.org) se ha hecho necesaria la búsqueda de esta herramienta en la red, obteniendo una versión de dominio público. Sin embargo, esta no funciona en versiones presentes de SPM (SPM12). Por suerte, la comunidad ha desarrollado en paralelo una versión de SPM5 apta.
- **MATLAB:** dado que el montado de la versión SPMMOUSE pública requiere de SPM5, la versión de MATLAB se ve afectada, pues SPM5 solo funciona sin errores en MATLAB R2010b, requiriendo su instalación.
- **Carga de ANTs:** el software de registro ANTs se ejecuta en SO Linux. En el desarrollo del proyecto, se corrige una problemática de carga relacionada con MATLAB y el propio SO, puesto que presenta problemas debido a la diferencia de versiones (MATLAB R2017b frente a una versión moderna de Linux). Para solventarlo, se precarga la librería conflictiva a la hora de ejecutar los scripts de registro, mediante el siguiente comando:

```
LD_PRELOAD="/usr/lib/x86_64-linux-gnu/libstdc++.so.6"
```

A.1.2. En análisis por ROIs

- **Multi-Atlas Segmentation:** El software de segmentación ya descrito anteriormente para el análisis por ROIs se instala en SO Linux, sin mayor problema para su ejecución.
- **MATLAB:** la versión empleada de MATLAB es la más actualizada, puesto que no existen problemas de compatibilidad.

A.2. Uso de SPMMOUSE

Siguiendo el objetivo de introducción a la implementación y uso de SPMMOUSE en análisis VBM de imágenes de ratones, se detalla a continuación el proceso de obtención de resultados de forma genérica, constituyendo la base para el correcto manejo del software en futuros desarrollos. Además de esta guía, se encuentran disponibles en la plataforma YouTube distintos videotutoriales de uso de las funcionalidades de SPMMOUSE empleadas en el trabajo, así como de la gestión y muestra de resultados:

- **Segmentación en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/gd1b0Z4t3kA>
- **Suavizado en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/4gq00RRJ9JQ>
- **Análisis estadístico en SPMMOUSE:** <https://youtu.be/4ynf9XZ3zeY>
- **Gestión y muestra de resultados:** <https://youtu.be/6Ttg9o8YGFw>

Se recomienda encarecidamente hacer uso tanto de esta guía como de los vídeos mencionados, pues son recursos complementarios.

A.2.1. Ejecución

En primer lugar, es preciso tener instalado SPMMOUSE, tal y como se detalla en la sección previa A.1.1. Para poder cargar SPMMOUSE en MATLAB, se ha de introducir en el mismo fichero las carpetas correspondientes a SPM5 y SPMMOUSE. Sobre este mismo fichero, se selecciona el directorio de trabajo de MATLAB.

A continuación, a través de la línea de comandos de MATLAB se lanza SPM5 introduciendo "spm", apareciendo la ventana de carga mostrada en la figura A.1.

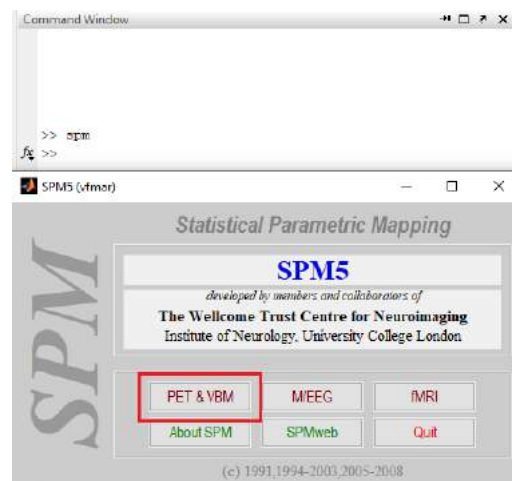


Figura A.1: Pantalla de carga de SPM, generada mediante el comando *spm*.

Se selecciona la opción **PET & VBM** marcada con el recuadro rojo. Este paso ejecuta SPM5. Nuevamente, sobre la línea de comandos de MATLAB, se introduce "spmmouse". Esto inicia la ventana de carga de SPMMOUSE (Fig. A.2).

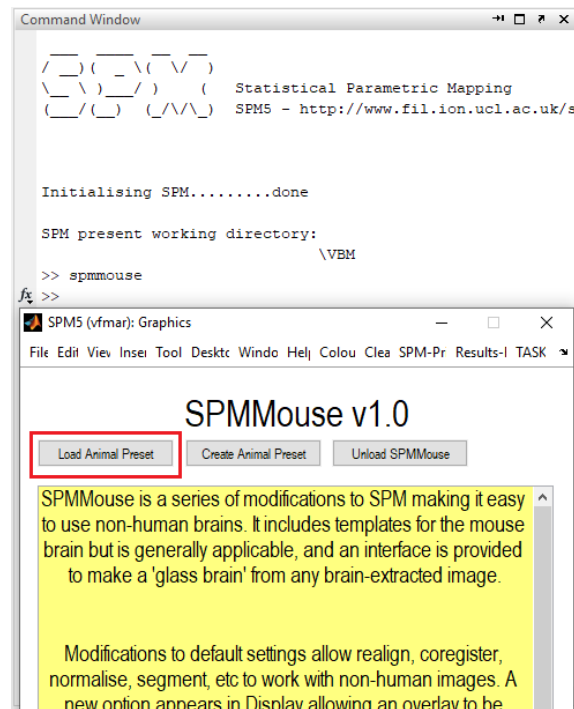


Figura A.2: Pantalla de carga de SPMMOUSE, generada mediante el comando *spmmouse*.

Se ha de seleccionar la configuración para los ratones empleados. SPMMOUSE proporciona la referente a los ratones de la cepa C57. Esta puede seleccionarse marcando la opción **Load Animal Preset** y dentro de la misma carpeta de SPMMOUSE, el archivo **mouse-C57.mat** (Fig. A.3).

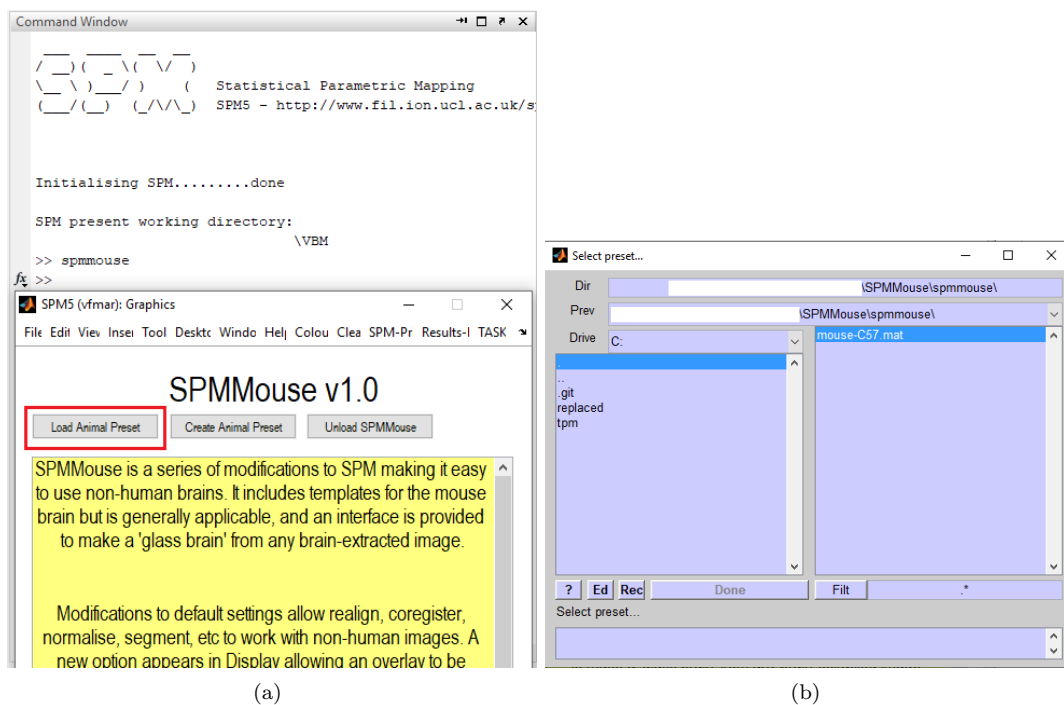


Figura A.3: Selección de la configuración previa por cepa de ratón.

Completada la carga de la configuración, debe aparecer la pantalla de bienvenida de SPMMOUSE (Fig. A.4).

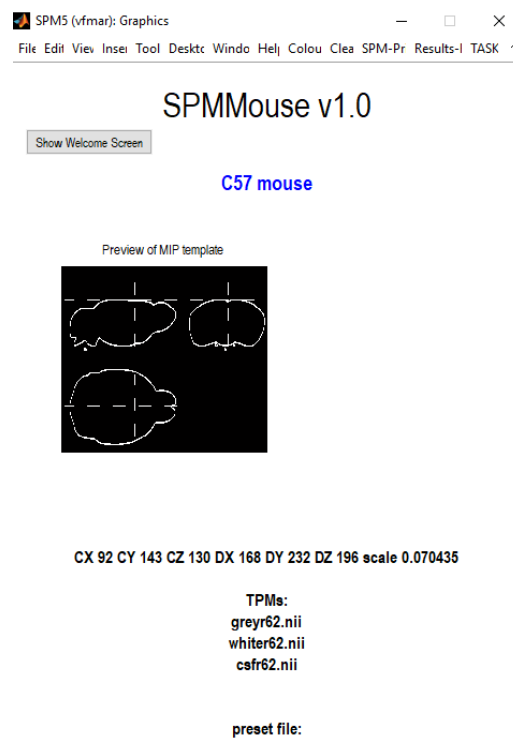


Figura A.4: Pantalla de bienvenida de SPMMOUSE.

El panel de opciones que se muestra en la figura A.5 está dividido en tres bloques de funciones. El bloque marcado con el recuadro rojo corresponde al procesamiento de imágenes, el marcado en azul con la etapa de análisis estadístico y finalmente, el verde, con las opciones de visualización.

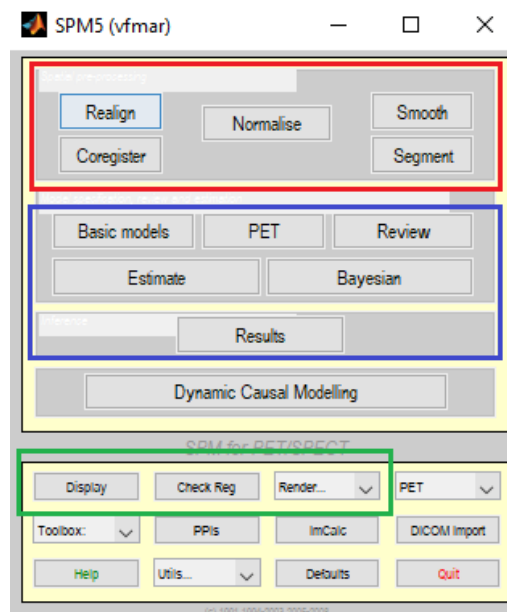


Figura A.5: Ventana de opciones de SPMMOUSE.

A.2.2. Uso en segmentación

Asumiendo un registro previo de las imágenes, el proceso de segmentación es el siguiente:

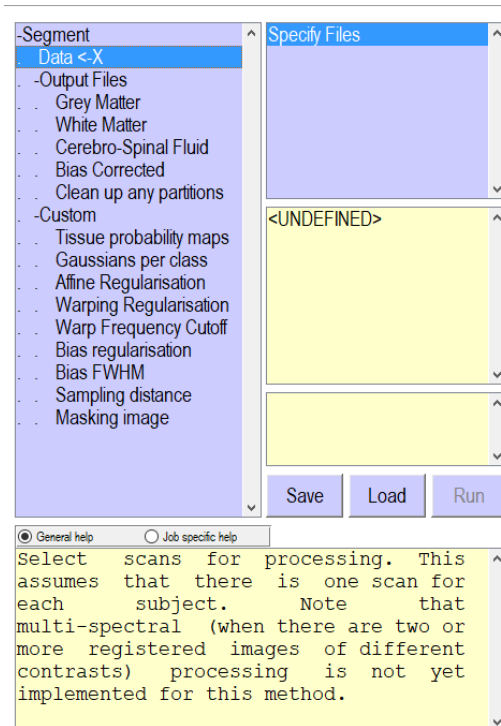


Figura A.6: Ventana de opciones de segmentación de SPMMOUSE.

1. Se selecciona **Segment** en el panel de opciones de procesado de imágenes, marcado en rojo en la figura A.5. Este paso muestra la ventana de parámetros de la figura A.6. En esta pantalla se han de introducir los parámetros para realizar la segmentación.
2. Se seleccionan las imágenes a segmentar en el apartado **Data <-X**.
3. En **Output Files**, se eligen las regiones a segmentar (materia gris, materia blanca y/o fluido cerebroespinal) en función del tipo de segmentación deseada para cada región.
4. En **Tissue probability maps** se han de seleccionar los TMPs referentes a las regiones a segmentar. La selección de estos se realiza en el fichero *tmps* de la carpeta de SPMMOUSE y debe guardar el mismo orden que el mostrado en la figura A.7. De otro modo, se pueden dar errores.
5. El resto de opciones y parámetros mostrados pueden ser ajustadas según necesidad. Un análisis más detallado de estos puede ser consultado en la sección 4.1.3, así como los valores empleados en el desarrollo del presente proyecto, concretamente en la tabla 4.1.
6. Para ejecutar la segmentación, se selecciona **Run**.
7. Las imágenes segmentadas se guardan en el mismo fichero que las originales, con el nombre referente al tipo de segmentación. (e.g: *mwc*.nii* para imágenes

obtenidas mediante segmentación modulada normalizada) y con un número seguido de este nombre, haciendo referencia a la región segmentada (1: materia gris, 2: materia blanca, 3: fluido cerebroespinal. e.g: *mwc1*.nii*).

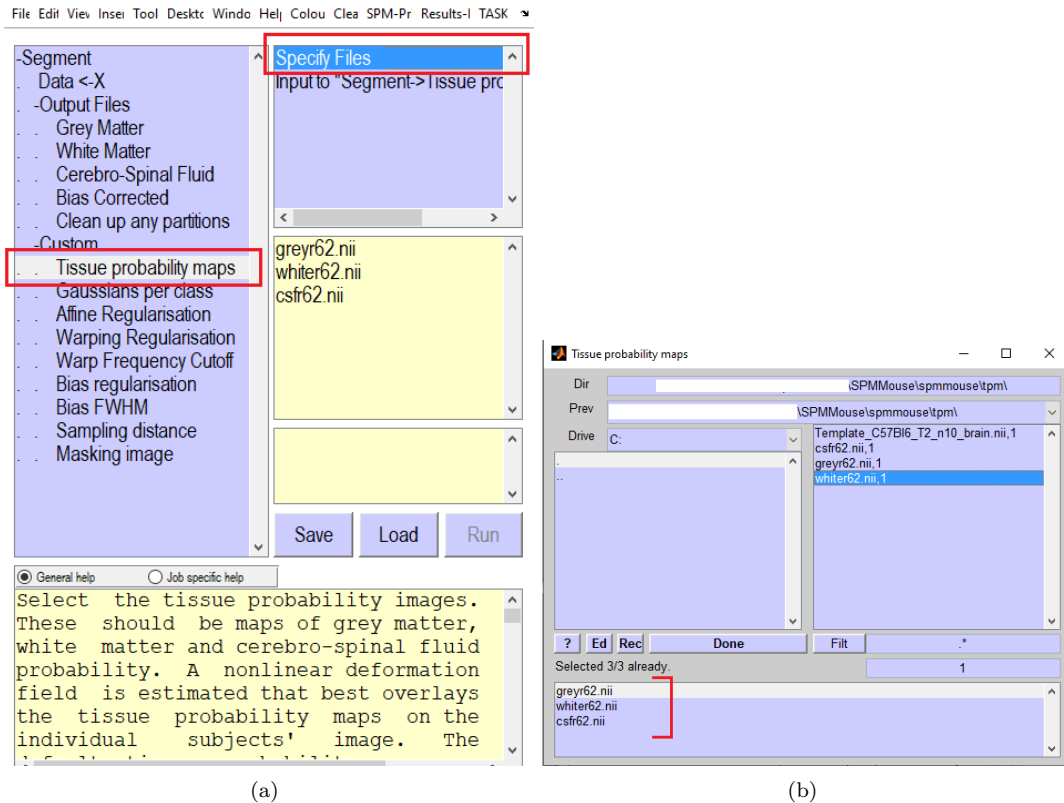


Figura A.7: Selección de TMPs y orden de los mismos.

A.2.3. Uso en suavizado

Habiendo realizado el proceso de segmentación previo, el suavizado sigue:

1. Partiendo del panel mostrado en la figura A.5, se selecciona la opción **Smooth** dentro del recuadro rojo, mostrando la ventana de la figura A.8.
2. Se seleccionan las imágenes a suavizar, introduciéndolas en el apartado **Images to Smooth <-X**.
3. Se configura el parámetro FWHM según necesidad. Puede consultarse con mayor detalle acerca de este parámetro en la sección 4.1.4, así como el valor empleado en el presente trabajo.
4. El apartado **Data type** puede ser ajustado en función del tipo de imágenes que quieren ser generadas en el proceso de suavizado. Por norma general, se conserva el tipo de datos de las imágenes originales, por lo que esta opción se mantiene en **SAME**.
5. Para iniciar el proceso de suavizado, se selecciona **Run**.

- Las imágenes generadas se guardan en la misma carpeta que las originales y tienen la misma extensión que estas, añadiendo una *s* al inicio del nombre (e.g: *smwc1*.nii*)

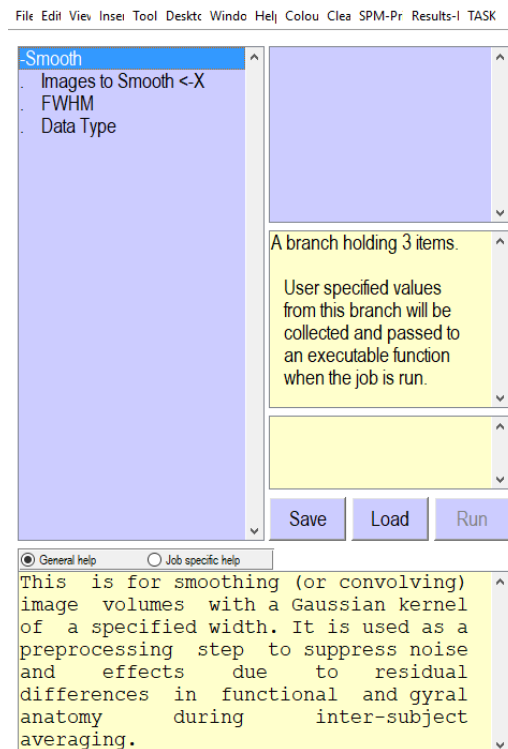


Figura A.8: Ventana de opciones de suavizado de SPMMOUSE.

A.2.4. Uso en análisis estadístico

Con las imágenes apropiadamente procesadas, es posible comenzar el análisis estadístico de estas. Este proceso puede hacerse de diversas formas, pues SPMMOUSE posee distintas herramientas de análisis. Siguiendo la línea del presente trabajo, se muestra a continuación el proceso genérico de obtención de clústeres mediante prueba *t* de dos muestras.

- Del apartado referente a análisis estadístico, marcado con recuadro azul de la figura A.5, se selecciona la opción **Basic Models**, abriendo con ello la ventana mostrada en la figura A.9.

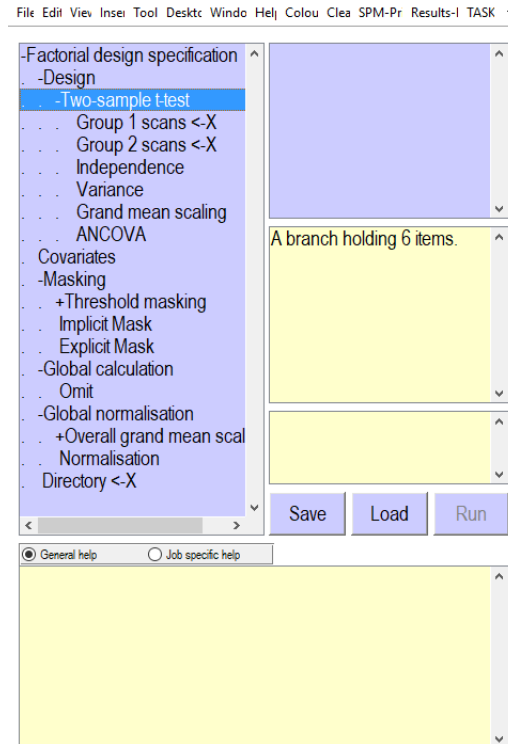


Figura A.9: Ventana de opciones de análisis estadístico en **Basic Models** de SPMMOUSE.

2. En el apartado **Design**, se selecciona **Two-sample t-test**, correspondiente a la prueba t de dos muestras.
3. En el grupo 1 **Group 1 scans <-X** se introducen las imágenes suavizadas del **grupo control** de extensión *smwc*.nii*, eligiendo la numeración según región a analizar (e.g: *smwc1*.nii* para materia gris, la más habitual). En el grupo 2 **Group 2 scans <-X** se introducen las imágenes de misma extensión que las previas, correspondientes al **grupo transgénico o enfermo**. El orden de selección de grupos es de suma importancia para una correcta aplicación del contraste de hipótesis posterior (ver Sec. 4.1.5).
4. Los demás parámetros pueden ser ajustados según necesidad. Un análisis detallado de estos y los valores empleados en el presente trabajo pueden consultarse en la sección 4.1.5 y tabla 4.2.
5. En el apartado **Directory <-X** se selecciona la carpeta donde quiere guardarse el resultado de la generación de los modelos sin estimar.
6. Para finalizar esta etapa, se selecciona **Run**, generando en la carpeta seleccionada en el paso previo un archivo *SPM.mat*.
7. El archivo *SPM.mat* contiene los modelos lineales de cada vóxel pero sin estimar. Para completar el proceso, se selecciona del panel de opciones, dentro del recuadro azul de la figura A.5, la opción **Estimate**.
8. Únicamente es necesario seleccionar el archivo *SPM.mat* en la carpeta elegida como contenedora y el proceso comenzará. Cuando este proceso finalice, debería aparecer una imagen como la mostrada en la figura A.10.

9. Finalizada la estimación, ya es posible visualizar los resultados, previa selección del estadístico y aplicación del contraste. Para ello, en el mismo apartado marcado con recuadro azul de la figura A.5, se selecciona **Results**. Esto abre la ventana mostrada en la figura A.11 (a).

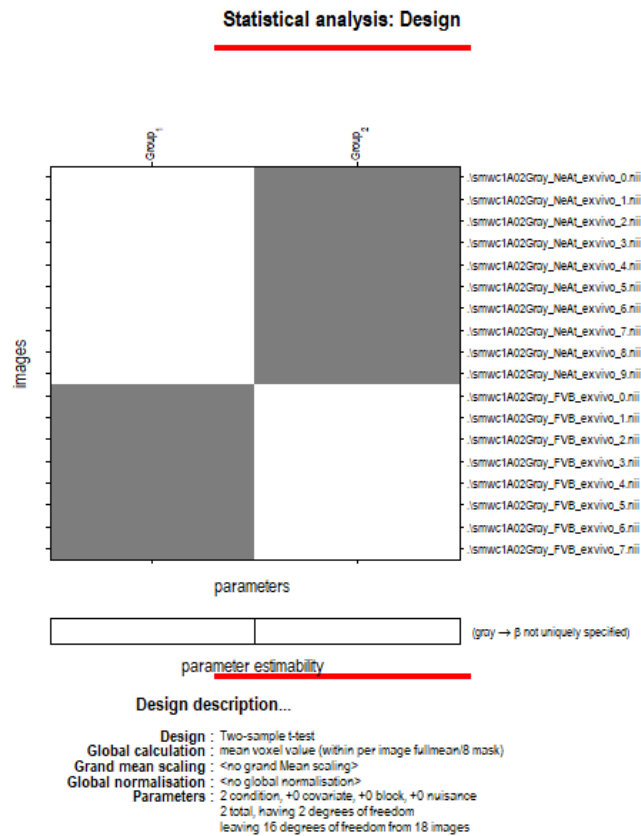
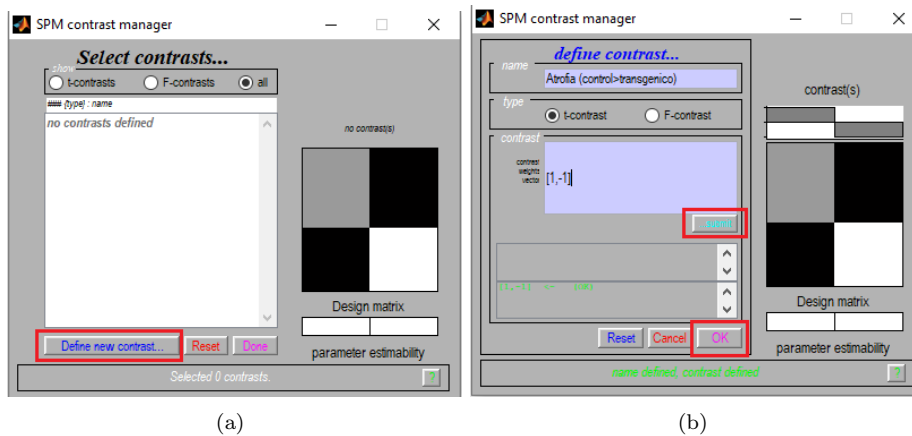


Figura A.10: Ventana de resultado de la generación de los modelos lineales en SPMMOUSE.

10. Sobre la ventana de la figura A.11 (a) puede seleccionarse estadístico F o t. De seleccionar F, el contraste aplicado es indiferente, pues este valor muestra todas las diferencias detectadas. Para el caso de t, es necesario introducir un contraste en función de si se busca atrofia o inflamación, o lo que es lo mismo, valores medios mayores en el grupo control que en el transgénico o viceversa. Puede leerse acerca de los contrastes para cada situación en la sección 4.1.5. Para un ejemplo de detección de atrofia, se selecciona **Define new contrast** en la ventana de la figura A.11 (a). A continuación, se introduce el contraste entre corchetes y separado por comas, tal y como se muestra en la figura A.11 (b), se marca **Submit**, apareciendo la matriz de contraste arriba a la derecha de la pantalla y finalmente **OK**.



(a)

(b)

Figura A.11: Selección de contraste en SPMMOUSE.

11. Añadido el nuevo contraste, se selecciona este con doble clic y se abre la ventana de opciones de resultados. La primera opción **mask with other** se marca habitualmente en **no**, se añade un título a la muestra de resultados y se selecciona si se quiere algún tipo de corrección. En este caso de ejemplo se marca **none** y se conserva un p-valor de 0.001. La última opción se mantiene a 0. Puede leerse en detalle sobre estas opciones, así como los valores empleados en el trabajo, en la sección 4.1.5. El aspecto final es el mostrado en la figura A.12. Para generar los resultados, se pulsa intro.

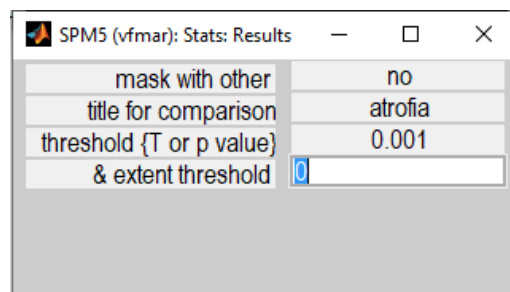


Figura A.12: Ventana de opciones de resultados de SPMMOUSE.

12. A continuación, aparecen la pantalla mostrada en la figura A.13 (a). Si se selecciona la opción **whole brain**, se muestran los valores estadísticos de la ventana de resultados, tal y como se ve en la figura A.13 (b).
13. Si se desea extraer la imagen 3D de extensión *.hdr* correspondiente a los valores estadísticos generados (t o F), se debe seleccionar la opción **Save** del panel de la figura A.13 (a). Esta imagen se guarda en el mismo fichero que contiene el archivo *SPM.mat*. Es importante destacar que esta imagen solo puede ser visualizada si se traslada tanto el archivo *.hdr* como su asociado *.img*.

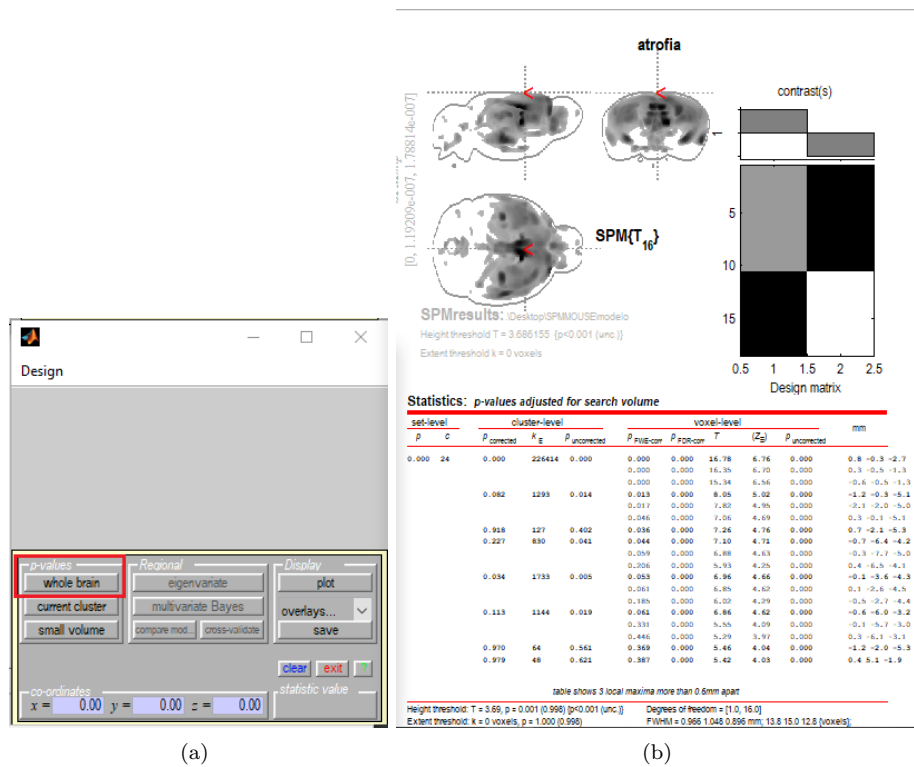


Figura A.13: Ventana de resultados en SPMMOUSE.

A.2.5. Uso para visualización de imágenes y cambio de coordenadas

Mediante la opción **Display**, dentro del recuadro verde de la figura A.5, correspondiente al panel de opciones de SPMMOUSE, es posible visualizar imágenes superpuestas o hacer conversiones de coordenadas. El panel que se genera es el mostrado en la figura A.14, previa selección de la imagen principal o plantilla.

La superposición de imágenes se realiza seleccionando la opción **Add overlay**, marcada en rojo en la figura A.14. Para la conversión de coordenadas, tan solo deben ser introducidas en el apartado **Crosshair Position**, en función de la necesidad. Se destaca que las coordenadas generadas por SPMMOUSE en la muestra de resultados son referidas en **mm**, por lo que es importante hacer la conversión si quieren ser trasladadas a otros espacios de visualización, como puede ser ITK-SNAP, el cual trabaja con coordenadas por vóxel o **vx**, ubicadas justo debajo de las coordenadas **mm**, marcadas en azul en la figura A.14.

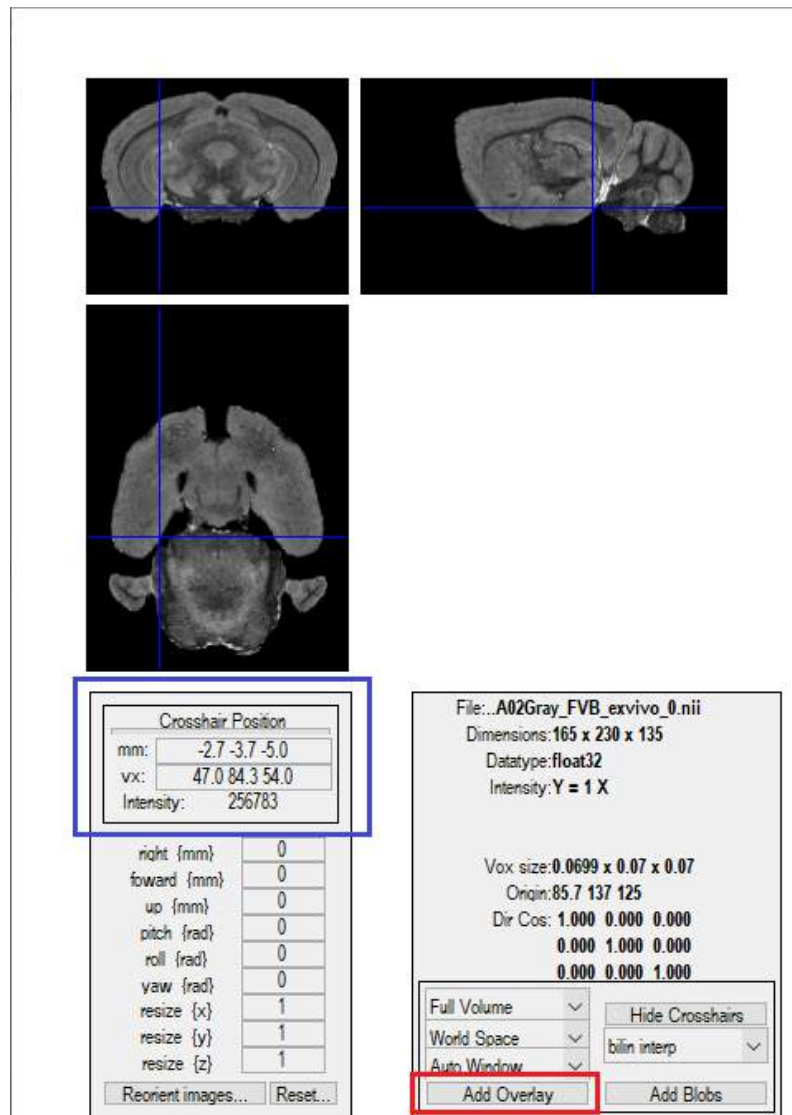


Figura A.14: Ventana de visualización de imágenes de SPM MOUSE.

Apéndice B

Anexo B

B.1. Imágenes de resonancia magnética

Enfermedades como las de tipo neurodegenerativo suponen un reto a la hora de ser diagnosticadas o estudiadas *in vivo*, dado que su afectación es a nivel cerebral, lo que supone que cualquier prueba que se quiera realizar directamente sobre el cuerpo del paciente entraña riesgos sobre este. A raíz de esta problemática, surgen alternativas como las imágenes por resonancia magnética (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI). Esta técnica permite analizar la anatomía y la fisiología del cerebro de forma no invasiva.

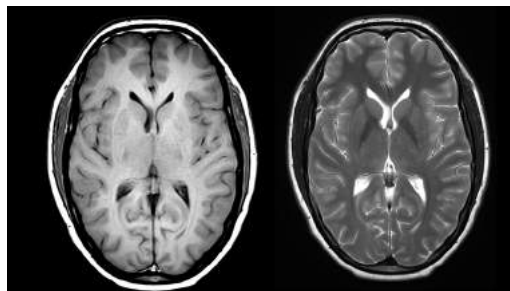


Figura B.1: Imagen MRI de la cabeza.

Su principio de funcionamiento se basa en el fenómeno físico de resonancia magnética nuclear. Aplicando un campo magnético sobre la cabeza del paciente, los átomos de hidrógeno que componen sus estructuras se alinean con el campo. A continuación, se aplican señales de radiofrecuencia que desestabilizan los átomos (resonancia). Al cesar estas señales, los átomos regresan a su posición previa, devolviendo energía de radiofrecuencia (relajación). Esta energía se puede medir mediante receptores, obteniendo así una imagen [73].

Esta imagen está compuesta de elementos de volumen del paciente o vóxeles. Al estudiar las señales recibidas durante la relajación se puede obtener información sobre la densidad de núcleos de hidrógeno existentes en los vóxeles e información relacionada con el medio mediante parámetros T1, T2 y T2* [7]:

- **Imágenes potenciadas en densidad:**

Dado que la magnetización del vóxel es proporcional a la densidad de sus núcleos de hidrógeno, al enviar pulsos de radiofrecuencia a dos vóxeles con



Figura B.2: Proceso de obtención de imágenes MRI. Fuente: [7]

distintas densidad, se obtiene una señal proporcional a sus densidades. Esta imagen tendrá una intensidad directamente proporcional a la densidad de los núcleos de hidrógeno.

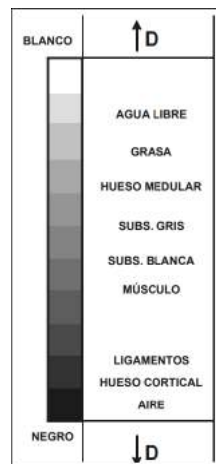


Figura B.3: Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en densidad. Fuente: [7]

■ Imágenes potenciadas en T1:

Este tipo de imágenes se basan en el proceso de relajación de los átomos de hidrógeno. En este caso se estudia la relajación longitudinal (medida sobre el eje longitudinal del vector magnetización), observando su progresión hasta la finalización de la relajación. La progresión sigue una tendencia exponencial, lo que proporciona una constante de tiempo expresada en mili-segundos denominada T1. Cuanto menor sea el valor de T1, más rápidamente se realiza la relajación. Este valor permite conocer el tipo de tejido, puesto que según el entorno en el que se encuentren los núcleos de hidrógeno, esta liberación de energía será más rápida o más lenta.

■ Imágenes potenciadas en T2 y T2*:

En este caso, el estudio se basa en las variaciones en la relajación transversal (ejes restantes). Durante una relajación, los núcleos liberan energía a una frecuencia que depende del campo magnético que cada núcleo percibe localmente, lo cual implica que dependa directamente del entorno bioquímico en el que se encuentre ubicado dicho núcleo. Si todos los núcleos dentro de un vóxel estuviesen aislados (sin interacción bioquímica con el medio) su relajación sería

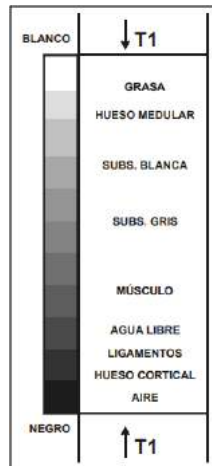


Figura B.4: Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en T1. Fuente: [7]

sincrónica. Sin embargo, en un entorno con interacción, se vuelve asincrónica. La relajación transversal mide precisamente este sincronismo, permitiendo obtener una imagen en base a las frecuencias que emiten los núcleos en función de esta relajación.

La relajación transversal se decreta de forma exponencial. Dicha exponencial está regulada por el parámetro $T2^*$ o $T2$. En el caso de $T2^*$ se consideran todos los factores que influyen sobre el sincronismo de los núcleos, en $T2$ no se consideran estos factores ni la influencia de las heterogeneidades del campo magnético inducido u otras variaciones locales. En $T2$ medimos asincronismo de núcleos del vóxel debido únicamente a interacciones bioquímicas que dependen de la composición y estructuración del tejido.

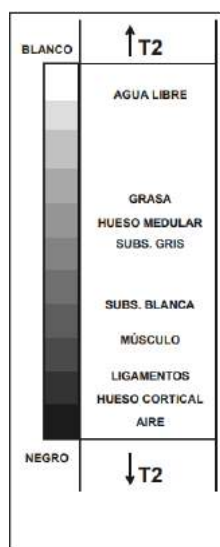


Figura B.5: Escala de color según tejido en imágenes ponderadas en T2. Fuente: [7]

B.2. Biomarcadores

El uso de las MRI en el estudio y diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas es debido a que permite la medición de los llamados biomarcadores. Los biomarcadores son características somáticas específicas o cambios biológicos medibles relacionados con la enfermedad que se esté estudiando. En función de la patología neurológica que se dé, estos biomarcadores cambian, pudiéndose observar y medir a través de las MRI. Ejemplificando, los biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer que pueden ser estudiados en MRI son el córtex, los ventrículos o el hipocampo, analizando el nivel de atrofia o inflamación en estas regiones midiendo su volumen [74].

El proceso para poder definir un biomarcador precisa de un estudio en profundidad de distintas características candidatas al mismo, de entre las cuales se seleccionan las más discriminantes a la hora de identificar la patología a la que están asociadas.

B.3. Análisis de imágenes: técnicas de morfometría

El estudio volumétrico del cerebro proporciona información muy valiosa para el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas, pudiendo también ser aplicado a otras muchas prácticas médicas. Inicialmente, la medida de volúmenes cerebrales solo era posible post-mortem, a través de muestras del propio tejido. Hoy en día, el avance tecnológico en materia de computación e inteligencia artificial ha posibilitado el análisis anatómico no invasivo a través de la toma de imágenes cerebrales y el análisis de estas.

La técnica computarizada que tradicionalmente se usa en el campo de la morfometría cerebral es la basada en regiones de interés o ROIs (ver Sec. 4.2), en la cual se segmentan las imágenes por regiones mediante atlas, pudiendo analizar el volumen de cada una de ellas por separado. Debido a sus limitaciones en cuanto a precisión espacial y tiempo de análisis, surgen otras técnicas [29]:

- **Morfometría basada en tensor [75]:** estudia los gradientes de deformación que surgen al alinear las imágenes estudiadas, de forma que pueden encontrarse diferencias locales en las estructuras cerebrales.
- **Morfometría basada en deformación:** analiza los campos de deformación para identificar diferencias en las posiciones relativas de las estructuras cerebrales.
- **Morfometría basada en vóxel:** técnica protagonista del presente trabajo, analiza las imágenes vóxel a vóxel, comparando los volúmenes de cada uno de ellos a través de las imágenes, dando resultados muy precisos. Se puede consultar más información sobre este método en la sección 4.1.

Apéndice C

Anexo C

C.1. Análisis de varianza ANOVA

El análisis de varianza permite comparar medias poblacionales de K grupos o muestras haciendo uso de las varianzas de dichas medias. De esta forma, se pueden comparar el efecto de diversos factores sobre un grupo de estudio. Las hipótesis que se plantean son, para el caso nulo, que las K medias poblacionales sean iguales, frente al caso alternativo, en el que al menos una de ellas difiere de las demás [76][77]:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K = \mu$$
$$H_1 = \exists \mu_j \neq \mu \quad j = 1, 2, \dots, K$$

Para poder realizar un análisis ANOVA, se han de cumplir los siguientes requisitos:

- **Normalidad:** Las poblaciones deben tener una distribución normal.
- **Independencia:** Las K muestras deben ser independientes.
- **Homocedasticidad:** Las varianzas de las K muestras deben ser iguales.

Las varianzas empleadas para el análisis son las que se dan tanto intragrupos (varianzas dentro de los grupos o SCD) como intergrupos (varianzas entre grupos o SCE). Ambas se definen:

$$SCD = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{X}_j)^2 \quad (C.1)$$

$$SCE = \sum_{j=1}^k (\bar{X}_j - \bar{X})^2 n_j \quad (C.2)$$

siendo x_{ij} el i -ésimo valor de la muestra j -ésima, n_j el tamaño de la muestra, \bar{X}_j su media y k el número de grupos.

La composición de ambas varianzas se conoce como varianza total SCT que se formula:

$$SCT = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{X})^2 \quad (C.3)$$

donde \bar{X} es la media total:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}}{n} \quad (\text{C.4})$$

La comparativa entre varianzas puede ejecutarse mediante el conocido como test F de Fisher, el cual compara la igualdad e varianzas basándose en el cociente corregido de las varianzas muestrales. De esta forma, el valor F se calcula:

$$F = \frac{\frac{SCD}{k-1}}{\frac{SCE}{n-k}} \quad (\text{C.5})$$

teniendo $k - 1$ grados de libertad en el numerador y $n - k$ grados de libertad en el denominador.

Atendiendo a la función F de Snedecor, se infiere que, a valores cercanos a 1 del estadístico F, la hipótesis nula es cierta. Por tanto, cuanto más se aleje el valor F de 1, más seguridad existe para descartar la hipótesis nula.

Apéndice D

Protocolos bioéticos

Dada la naturaleza del trabajo, donde se emplean imágenes de ratones de diversas cepas, es de especial importancia la revisión de los protocolos seguidos para el tratamiento de los animales. Las imágenes empleadas en el presente trabajo son tomadas de las fuentes mencionadas en la sección 3.1. Estos trabajos siguen los protocolos dictados por el *United Kingdom's Animals (Scientific Procedures) Act of 1986* [78] y el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC). A continuación, se cita de forma literal las condiciones dictadas por el IACUC en el manejo de animales:

- El proyecto tiene el valor apropiado.
- La investigación propuesta cumple con todas las leyes, regulaciones y pautas federales, estatales y universitarias.
- Se siguen las pautas de uso humanitario y todos los animales involucrados reciben el mejor tratamiento posible y atención veterinaria profesional.
- Se justifica un número suficiente, pero no excesivo, de animales utilizados.
- Aquellos que trabajan con los animales han recibido la formación adecuada.
- Existen prácticas y procedimientos adecuados para reducir tanto el dolor y/o la angustia de los animales como sea posible.

Además, el IACUC sigue los estándares de bienestar animal [79][80][81].

Apéndice E

Tablas de resultados

Tabla E.1: Resultados completos de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes *ex vivo* con SPM.

Clúster	Vóxel		Coordenadas espaciales									
	NºVox	Vol(mm ³)	p(FWE-cor)	p(FDR-cor)	F	equivZ	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}		
24200	8.3006	9.197E-09	2.477E-09	743.25824	7.67795737	8.1046E-15	-0.69949627	-0.62989749	-1.39907253			
		1.1223E-07	2.7783E-09	540.081482	7.35713882	9.3925E-14	0.48964739	-0.62989749	-1.5389798			
		3.3894E-06	8.1975E-09	340.334839	6.86553907	3.312E-12	0.69949627	-0.41993162	-2.58828433			
5771	1.979453	1.9012E-06	5.9273E-09	373.58078	6.96691632	1.6198E-12	1.8186903	-3.70939691	-3.00800614			
		3.7704E-05	3.9307E-08	229.588776	6.42561634	6.5668E-11	1.74874067	-3.21947655	-4.26717158			
		0.00010078	8.3883E-08	194.906616	6.23694139	2.231E-10	1.60884142	-3.91936278	-4.05731067			
8478	2.907954	3.0415E-06	7.796E-09	346.341309	6.8846454	2.8966E-12	-1.95858955	-3.63940829	-2.86809887			
		4.1008E-05	4.2297E-08	226.417389	6.40972071	7.2893E-11	-2.02853918	-0.55990887	-3.98735704			
		5.4037E-05	5.2638E-08	216.283295	6.3572218	1.0272E-10	-1.32904291	-2.72955619	-3.14791341			
1240	0.42532	3.3804E-05	3.6181E-08	233.772293	6.44621663	5.7338E-11	1.18914366	-5.87904423	-2.16856252			
		0.00080216	4.0554E-07	136.821259	5.8180283	2.9773E-09	1.11919403	-4.96919213	-2.58828433			
		0.00013463	1.044E-07	185.650467	6.18024719	3.2001E-10	2.65808582	-2.23963583	-4.26717158			
352	0.120736	0.0002618	1.7142E-07	165.880875	6.04792923	7.336E-10	-2.93788433	-2.1696472	-4.19721794			
		0.00026885	1.7481E-07	165.132507	6.0425831	7.5833E-10	-1.60884142	-5.66907836	-2.30846979			
		0.00042035	2.4497E-07	152.982849	5.95185017	1.3256E-09	-4.686625	-4.40928315	-2.7281916			
674	0.231182	0.00135202	6.2082E-07	124.88105	5.70748562	5.7329E-09	3.14773321	-6.3689646	-2.23851615			
		0.00662653	2.4883E-06	93.8477097	5.35555758	4.2646E-08	2.5881362	-7.06885083	-1.95870161			
		0.00228331	9.7183E-07	113.813362	5.59415594	1.1085E-08	2.44823694	0.90985222	-2.30846979			
3244	1.112692	0.00364161	1.4682E-06	104.669373	5.49104723	1.9978E-08	3.14773321	0.06998874	-2.23851615			
		0.01015736	3.6126E-06	86.6991882	5.25642422	7.3442E-08	2.09848881	-1.11981785	-1.18921162			
		0.00295569	1.2176E-06	108.677589	5.53740638	1.5349E-08	-0.27979851	2.72955643	-2.58828433			
589	0.202027	0.00417616	1.6551E-06	102.106705	5.46038354	2.3755E-08	-0.34974813	2.72955643	-3.21786705			
		0.00383736	1.535E-06	103.683434	5.47934755	2.1345E-08	0	-7.69874844	-1.5389798			
		0.00459878	1.8042E-06	100.334549	5.43868552	2.6838E-08	1.11919403	-7.97870293	-1.7488407			
3828	1.313004	0.01570455	5.1958E-06	79.8571167	5.1529173	1.2823E-07	0.48964739	-8.4686233	-2.16856252			
		0.00457278	1.7968E-06	100.438065	5.43996436	2.6646E-08	-2.79798508	1.1921E-07	-1.7488407			
		0.00485045	1.8904E-06	99.3660583	5.42665089	2.8711E-08	-2.72803545	0.90985222	-2.30846979			
177	0.060711	0.01419167	4.7848E-06	81.4088516	5.1720652	1.1262E-07	-2.02853918	-0.97984061	-1.25916526			
		0.007613	2.8136E-06	91.474908	5.32358525	5.0871E-08	-2.30833769	2.58957918	-2.37842342			
		0.01059173	3.7449E-06	86.0224533	5.24658546	7.7472E-08	3.49748135	0.06998874	-4.82680066			

Tabla E.2: Resultados completos de la prueba F con corrección del FWER (0.05) en imágenes *in vivo* con SPM.

Clúster	Vóxel		Coordenadas espaciales									
	NºVox	Vol(mm ³)	p(FWE-cor)	p(FDR-cor)	F	equivZ	p(unc)	x{mm}	y{mm}	z{mm}		
2411	0.826973	6.1546E-06	1.31539E-06	290.000305	6.68897666	1.12368E-11	-1.11919403	-0.76987474	-1.95870161			
		0.00058669	5.5327E-06	135.155884	5.80325955	3.2519E-09	-0.06994963	-1.11981785	-2.7281916			
113	0.038759	0.00117341	9.8215E-06	119.701218	5.65587361	7.75278E-09	0.06994963	-2.1696472	-3.28782068			
		0.00243172	1.65779E-05	105.121002	5.49636654	1.93848E-08	2.16843843	-2.72955619	-1.39907253			
108	0.037044	0.00412412	2.55517E-05	95.5145645	5.3774994	3.77637E-08	0.48964739	-0.41993162	-3.14791341			
		0.01042109	5.66461E-05	80.3960876	5.16141078	1.22548E-07	0	-0.41993162	-3.84744976			

Tabla E-3: Resultados completos de la prueba F sin corrección del FWER en imágenes *in vivo* con SPM.

Clúster	Vóxel			Coordenadas espaciales							
	NºVox	Vol(mm ³)	F	p(FWE-cor)	p(FDR-cor)	equivZ	p(unc)	x[mm]	y[mm]	z[mm]	
32910	11.28813		6.1546E-06	1.3154E-06	1.3154E-06	290.000305	6.68897666	1.1237E-11	-1.11919403	-0.76987474	-1.95870161
			0.00058669	5.5327E-06	5.5327E-06	135.155884	5.80325955	3.2519E-09	-0.06994963	-1.11981785	-2.7281916
			0.00117341	9.8215E-06	9.8215E-06	119.701218	5.65587361	7.7528E-09	0.06994963	-2.1696472	-3.28782068
2370	0.81291		0.00243172	1.6578E-05	1.6578E-05	105.121002	5.49636654	1.9385E-08	2.16843843	-2.72955619	-1.39907253
			0.16996604	0.0063349	0.0063349	45.1096611	4.41920655	4.9532E-06	2.09848881	-3.42944242	-2.09860888
			0.34327218	0.00127429	0.00127429	37.6057587	4.18212318	1.444E-05	2.79798508	-2.1696472	-2.37842342
3000	1.029		0.00660831	3.8119E-05	3.8119E-05	87.5634613	5.2688698	6.8633E-08	-4.12702799	-2.72955619	-2.65823796
			0.11212801	0.00043299	0.00043299	49.6541901	4.54388327	2.7614E-06	-3.21768284	-2.65956756	-3.07795978
			0.83282302	0.00413974	0.00413974	26.2987137	3.71616295	0.00010114	-4.12702799	-4.33929452	-3.42727295
2512	0.861616		0.12156419	0.00046816	0.00046816	48.7590866	4.52028411	3.0878E-06	-3.14773321	-0.0699885	-1.67888707
			0.86427244	0.0045013	0.0045013	25.5313663	3.67775914	0.00011765	-2.44823694	-0.41993162	-2.30846979
			0.99369367	0.00900617	0.00900617	19.5016651	3.33112604	0.00043248	-2.93788433	0.76987498	-1.81879434
1725	0.591675		0.12821002	0.00049249	0.00049249	48.173008	4.50458832	3.3251E-06	-0.69949627	-6.22898735	-3.35777432
			0.86106635	0.00446117	0.00446117	25.612669	3.68188021	0.00011576	0	-5.1179158	-2.44837706
3274	1.122982		0.14639803	0.00055419	0.00055419	46.7236252	4.46490996	4.0051E-06	-2.37828732	2.44960193	-1.18921162
			0.95943461	0.00645411	0.00645411	22.3707199	3.50701498	0.00022658	-1.46894217	2.72955643	-0.76948981
			0.971503	0.00698822	0.00698822	21.6999397	3.4678594	0.00026231	-0.62954664	0.69988635	-1.25916526
420	0.14406		0.27338992	0.00101729	0.00101729	40.0400162	4.26393196	1.0043E-05	-4.61667538	-2.029666996	-3.98735704
846	0.290178		0.29793928	0.00110373	0.00110373	39.1238403	4.233747	1.1491E-05	-1.60884142	-1.04982923	-0.27981436
753	0.258279		0.60794074	0.0024725	0.0024725	31.0594215	3.93261935	4.2013E-05	3.21768284	-1.2597951	-1.18921162
			0.99900749	0.01114334	0.01114334	17.6503258	3.20448375	0.00067652	3.84722948	-0.13997713	-1.7488407
105	0.036015		0.72599025	0.00321694	0.00321694	28.6209106	3.8261256	6.5088E-05	-3.91717911	0.90985222	-3.35777432
169	0.057967		0.90569902	0.00511961	0.00511961	24.3879013	3.61843067	0.0001482	0.90934515	-3.98935141	-0.69953617
24	0.008232		0.99645194	0.0096992	0.0096992	18.8532524	3.28807075	0.00050438	0.90934515	-7.13883945	-1.25916526
27	0.009261		0.99752823	0.01012887	0.01012887	18.4829369	3.26286918	0.00055145	-3.56743097	-2.93952206	-1.11925799
8	0.002744		0.9994088	0.01171048	0.01171048	17.2310543	3.17413182	0.00075143	-3.70733023	1.04982947	-1.46902616
2	0.000686		0.99986007	0.01323219	0.01323219	16.2187805	3.09801895	0.00097409	-0.27979851	-5.1179158	-1.46902616

Tabla E.4: Resultados completos de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para atrofia en imágenes *ex vivo* con SPM.

p (cor)	Clúster			Vóxel										Coordenadas espaciales		
	Nº vóxeles	Vol (mm ³)	p (unc)	p(FWE-cor)	p(FDR-cor)	T	equivZ	p (unc)	x {mm}	y {mm}	z {mm}					
0	31868	10.930724	1.9635E-77	4.66516E-09	1.23293E-09	27.2627621	7.75790584	4.32987E-15	-0.69949627	-0.62989749	-1.39907253					
				5.61152E-08	1.38913E-09	23.2396526	7.44854641	4.71845E-14	0.48964739	-0.62989749	-1.5389798					
				1.69472E-06	4.21163E-09	18.4481659	6.96378592	1.65623E-12	0.69949627	-0.41993162	-2.58828433					
2.87392E-12	1557	0.534051	5.60303E-11	1.69024E-05	2.16472E-08	15.2896137	6.55051568	2.86694E-11	4.4068265	-1.95968133	-4.40707885					
6.25833E-10	1056	0.362208	1.22011E-08	6.73169E-05	6.68855E-08	13.6253605	6.28876212	1.60004E-10	2.65808582	-2.23963583	-4.26717158					
				0.027833489	1.07227E-05	7.90022039	4.97503466	3.2618E-07	3.56743097	-1.95968133	-3.35777432					
1.94395E-06	441	0.151263	3.78988E-05	0.000130909	1.19828E-07	12.8794756	6.15866727	3.66798E-10	-2.93788433	-2.1696472	-4.19721794					
0	5806	1.991458	2.22917E-25	0.001142307	8.71525E-07	10.668335	5.7132345	5.54244E-09	2.44823694	0.909852222	-2.30846979					
				0.001822464	1.34868E-06	10.2308054	5.6121928	9.98893E-09	3.14773321	0.069988742	-2.23851615					
				0.00509164	3.37716E-06	9.3112402	5.3825411	3.67208E-08	2.09848881	-1.11981785	-1.18921162					
2.40969E-09	941	0.322763	4.69786E-08	0.001478937	1.10717E-06	10.4248543	5.65761399	7.67459E-09	-0.27979851	2.729556426	-2.58828433					
				0.002090261	1.53004E-06	10.1047869	5.58215733	1.18777E-08	-0.34974813	2.729556426	-3.21786705					
				0.029067149	1.10775E-05	7.86562681	4.96405591	3.4518E-07	-0.20984888	3.359454036	-1.95870161					
0	6466	2.217838	3.26326E-27	0.002289008	1.66719E-06	10.0218792	5.56215975	1.33228E-08	-2.79798508	1.19209E-07	-1.7488407					
				0.002428172	1.75845E-06	9.96825218	5.54912275	1.43553E-08	-2.72803545	0.909852222	-2.30846979					
				0.007121195	4.40239E-06	9.02268505	5.30509151	5.63082E-08	-2.02853918	-0.97984061	-1.25916526					
1.05141E-05	336	0.115248	0.000204982	0.003813773	2.63409E-06	9.56425476	5.44823937	2.54354E-08	-2.30833769	2.58957918	-2.37842342					
0.00024352	168	0.057624	0.004748168	0.009215725	5.21373E-06	8.80449677	5.24464771	7.82906E-07	1.95858955	3.639408529	-1.88874798					
0.000459432	139	0.047677	0.008959009	0.015398798	6.98932E-06	8.37866306	5.12169803	1.51398E-08	-4.82652426	-1.95968133	-4.19721794					
0.000649059	124	0.042532	0.01265799	0.033293646	1.23195E-05	7.75769281	4.92946197	4.12282E-07	3.98712873	0.069988742	-1.95870161					
				0.038228168	1.3762E-05	7.64832783	4.89387473	4.94349E-07	4.12702799	-0.48992024	-1.95870161					

Tabla E.5: Resultados completos de la prueba t con corrección del FWER (0.05) para inflamación en imágenes *ex vivo* con SPM.

p(cor)	Nº vóxeles	Clúster		Vóxel										Coordenadas espaciales					
		Vol (mm ³)	p(unc)	p(FWE-cor)	p(FDR-cor)	T	equivZ	p(unc)	x {mm}	y {mm}	z {mm}								
0	6893	2.364299	2.2912E-28	9.5059E-07	6.3597E-08	19.3282375	7.06378666	8.1013E-13	1.8186903	-3.70939691	-3.00800614	1.8852E-05	1.1917E-07	15.1521864	6.53023047	3.2834E-11	1.74874067	-3.21947655	-4.26717158
0	9826	3.370318	9.7893E-36	5.0394E-05	2.0491E-07	13.9608946	6.34453015	1.1155E-10	1.60884142	-3.91936278	-4.05731067	1.5207E-06	6.3597E-08	18.6102486	6.98263103	1.4485E-12	-1.95858955	-3.63940829	-2.86809887
3.4639E-14	2014	0.690802	6.7547E-13	2.0504E-05	1.261E-07	15.0471716	6.51457934	3.6447E-11	-2.02853918	-0.55990887	-3.98735704	2.7019E-05	1.4859E-07	14.7065735	6.46289567	5.1359E-11	-1.32904291	-2.72955619	-3.14791341
5.5778E-13	1722	0.590646	1.0874E-11	3.2125E-05	1.6254E-07	14.4962215	6.43024991	6.3697E-11	1.18914366	-5.87904423	-2.16856252	0.00040116	5.2851E-07	11.6970615	5.93284532	1.4886E-09	1.11919403	-4.96919213	-2.58828433
6.4782E-10	1053	0.361179	1.263E-08	0.0002102	3.7029E-07	12.8503895	6.15341267	3.7917E-10	-1.60884142	-5.66907836	-2.30846979	0.0002102	3.7029E-07	12.8503895	6.06425804	6.6282E-10	-4.686625	-4.40928315	-2.7281916
1.3802E-09	988	0.338884	2.6908E-08	0.00067624	7.4299E-07	11.1750193	5.82436943	2.8664E-09	3.14773321	-6.3689646	-2.23851615	0.00331877	2.6725E-06	9.68750286	5.47952681	2.1323E-08	2.5881362	-7.06885083	-1.95870161
4.0989E-10	1093	0.374899	7.9912E-09	0.00192053	1.6804E-06	10.1825066	5.60073205	1.0672E-08	0	-7.69874844	-1.5389798	0.00230204	1.9542E-06	10.0167131	5.56090737	1.3419E-08	1.11919403	-7.97870293	-1.7488407
7.0035E-05	230	0.07889	0.00136544	0.00788334	5.7531E-06	8.9362812	5.28135422	6.4116E-08	0.48964739	-8.4686233	-2.16856252	0.00530996	4.0297E-06	9.27482891	5.37291929	3.8736E-08	3.49748135	0.06998874	-4.82680066
0.0002377	172	0.058996	0.00436305	0.00613251	4.5812E-06	9.15058327	5.33976122	4.6535E-08	-2.72803545	-6.0890101	-3.21786705	0.00613251	4.5812E-06	9.15058327	5.33976122	4.6535E-08	-2.72803545	-6.0890101	-3.21786705
0.00013927	195	0.066885	0.00271528	0.00938321	6.7608E-06	8.78936768	5.24039429	8.0117E-08	-2.72803545	-6.71890771	-1.95870161	0.00938321	6.7608E-06	8.78936768	5.24039429	8.0117E-08	-2.72803545	-6.71890771	-1.95870161
0.00038406	147	0.050421	0.00748901	0.01026953	7.3354E-06	8.71376324	5.21901504	8.9939E-08	4.61667538	-4.40928315	-2.02865525	0.01026953	7.3354E-06	8.71376324	5.21901504	8.9939E-08	4.61667538	-4.40928315	-2.02865525
0.00110626	102	0.034986	0.02157934	0.01186064	8.3773E-06	8.59383392	5.18467253	1.082E-07	2.5881362	-6.43895322	-3.00800614	0.01186064	8.3773E-06	8.59383392	5.18467253	1.082E-07	2.5881362	-6.43895322	-3.00800614
0.0026649	69	0.023667	0.05202344	0.0128765	6.27E-06	8.52580357	5.16495316	1.2025E-07	-1.25909328	-0.27995437	-5.17656884	0.0128765	6.27E-06	8.52580357	5.16495316	1.2025E-07	-1.25909328	-0.27995437	-5.17656884
0.00207239	78	0.026754	0.04044457	0.01450807	6.7343E-06	8.4275322	5.13615701	1.4021E-07	-0.34974813	-2.65956756	-0.83944345	0.01450807	6.7343E-06	8.4275322	5.13615701	1.4021E-07	-0.34974813	-2.65956756	-0.83944345
0.02127884	11	0.003773	0.41932373	0.01489318	6.8436E-06	8.40602779	5.12980595	1.4502E-07	1.95858955	-6.43895322	-4.54698612	0.01489318	6.8436E-06	8.40602779	5.12980595	1.4502E-07	1.95858955	-6.43895322	-4.54698612
0.00045943	139	0.047677	0.00895901	0.0153988	6.9893E-06	8.37866306	5.12169803	1.514E-07	-4.82652426	-1.95968133	-4.19721794	0.0153988	6.9893E-06	8.37866306	5.12169803	1.514E-07	-4.82652426	-1.95968133	-4.19721794
0.0044252	52	0.017836	0.08646401	0.01825731	7.8684E-06	8.2397604	5.08008595	1.8663E-07	1.32904291	-2.6595678	-2.58828433	0.01825731	7.8684E-06	8.2397604	5.08008595	1.8663E-07	1.32904291	-2.6595678	-2.58828433
0.01337432	21	0.007203	0.26250134	0.02078566	8.6248E-06	8.13467789	5.04808868	2.2313E-07	3.35758209	-4.47927177	-2.51833069	0.02078566	8.6248E-06	8.13467789	5.04808868	2.2313E-07	3.35758209	-4.47927177	-2.51833069
0.00518872	47	0.016121	0.10142117	0.02100824	8.6878E-06	8.12607479	5.04544898	2.2623E-07	-0.13989925	-3.91936278	-4.26717158	0.02100824	8.6878E-06	8.12607479	5.04544898	2.2623E-07	-0.13989925	-3.91936278	-4.26717158
0.02243517	10	0.00343	0.44237098	0.02648847	9.5809E-05	8.01755714	5.01188704	2.6949E-07	3.98712873	-2.65956756	-2.16856252	0.02648847	9.5809E-05	8.01755714	5.01188704	2.6949E-07	3.98712873	-2.65956756	-2.16856252
0.02507871	8	0.002744	0.49516299	0.03282716	1.218E-05	7.93979931	4.98753163	3.0578E-07	-2.0984444	-3.21947655	-1.04930435	0.03282716	1.218E-05	7.93979931	4.98753163	3.0578E-07	-2.0984444	-3.21947655	-1.04930435
0.00064906	124	0.042532	0.01265799	0.03329365	1.232E-05	7.75769281	4.92946197	4.1228E-07	3.98712873	0.06998874	-1.95870161	0.03329365	1.232E-05	7.75769281	4.92946197	4.1228E-07	3.98712873	0.06998874	-1.95870161
0.02507871	8	0.002744	0.49516299	0.03822817	1.3762E-05	7.64832783	4.89387473	4.9435E-07	4.12702799	-0.48992024	-1.95870161	0.03822817	1.3762E-05	7.64832783	4.89387473	4.9435E-07	4.12702799	-0.48992024	-1.95870161
				0.03544713	1.2961E-05	7.70803499	4.91337087	4.4762E-07	-0.62954664	-6.0890101	-3.28782068	0.03544713	1.2961E-05	7.70803499	4.91337087	4.4762E-07	-0.62954664	-6.0890101	-3.28782068

Tabla E.6: Resultados completos de la prueba t sin corrección del FWER para atrofia en imágenes *in vivo* con SPM.

p{cor}	Clúster			Vóxel			Coordenadas espaciales				
	N ^o Vox	Vol{mm ³ }	p{unc}	F	equivZ	p{unc}	x{mm}	y{mm}	z{mm}		
0	61405	21.061915	2.0428E-34	3.0773E-06	6.577E-07	17.0293961	6.78969292	5.6186E-12	-1.11919403	-0.76987474	-1.95870161
				0.00029339	2.7664E-06	11.6256561	5.91834863	1.626E-09	-0.06994963	-1.11981785	-2.7281916
				0.00058688	4.9108E-06	10.9408054	5.77374715	3.8764E-09	0.06994963	-2.1696472	-3.28782068
1.8615E-05	4145	1.421735	2.5985E-06	0.0012166	8.2889E-06	10.2528534	5.61740372	9.6924E-09	2.16843843	-2.72955619	-1.39907253
				0.08893802	0.00031675	6.71637249	4.56676007	2.4766E-06	2.09848881	-3.42944242	-2.09860888
				0.18961246	0.00063715	6.13235378	4.33706164	7.22E-06	2.79798508	-2.1696472	-2.37842342
0.00097726	2386	0.818398	0.00013648	0.06630307	0.0024624	6.94067764	4.64964365	1.6625E-06	-0.69949627	-6.22898735	-3.35777432
				0.62726203	0.00223192	5.06089592	3.85492844	5.7882E-05	0	-5.179158	-2.44837706
				0.1475857	0.00050864	6.32771826	4.41624438	5.0215E-06	-4.61667538	-2.02966996	-3.98735704
0.15705843	649	0.222607	0.02384914	0.69291537	0.00256186	4.93841076	3.7940615	7.4101E-05	0.90934515	-3.98935141	-0.69953617
0.33497738	436	0.149548	0.05694143	0.90739786	0.00507412	4.2991786	3.45439538	0.00027576	-3.56743097	-2.93952206	-1.11925799
0.90739786	104	0.035672	0.33213417	0.95028312	0.00507412	4.2991786	3.45439538	0.00027576	-3.56743097	-2.93952206	-1.11925799
0.98629675	33	0.011319	0.59883597	0.98817097	0.00663468	4.02725458	3.29783536	0.00048717	-0.27979851	-5.179158	-1.46902616
0.86204735	131	0.044933	0.27649589	0.99692132	0.00797207	3.83999896	3.18551528	0.00072248	-2.44823694	-2.44960169	-1.95870161
0.99819749	4	0.001372	0.88197736	0.99858053	0.0087364	3.75004339	3.13020603	0.00087342	1.11919403	-5.24914663	-1.95870161
0.99795543	5	0.001715	0.86438846	0.99887218	0.00895508	3.72520757	3.11477845	0.00092042	2.5881362	1.67972708	-1.32911889
0.996894	9	0.003087	0.80602131	0.99916396	0.00923588	3.69401145	3.09530279	0.00098306	0.34974813	1.11981809	-1.25916526

Tabla E.7: Resultados completos de la prueba t sin corrección del FWER para inflamación en imágenes *in vivo* con SPM.

p{cor}	Clúster			Vóxel			Coordenadas espaciales				
	N ^o Vox	Vol{mm ³ }	p{unc}	F	equivZ	p{unc}	x{mm}	y{mm}	z{mm}		
0.79409808	167	0.057281	0.22059364	0.47654052	1	5.34985161	3.99355859	3.2544E-05	-3.91717911	0.90985222	-3.35777432
0.96033517	64	0.021952	0.45048081	0.94043446	1	4.34203291	3.47838419	0.00025222	0.90934515	-7.13883945	-1.25916526
0.98095433	41	0.014063	0.55288375	0.97568535	1	4.15103054	3.37004163	0.00037578	-3.70733023	1.04982947	-1.46902616

Tabla E.8: Resultados volumétricos de imágenes *ex vivo* de ratones transgénicos FVB_Ncr1 en mm^3

	Hipocampo Dcho	Cápsula externa	Putamen caudado Dcho	Comisura anterior Dcha	Globo Pálido Dcho	Cápsula interna Dcha	Tálamo Dcho	Cerebelo Dcho
img1	14.27071904	16.86131087	13.61894309	0.72751951	1.554687896	1.451903903	14.02924706	38.17170044
img2	12.68441515	14.68243102	12.92537513	0.656767956	1.516031898	1.427199904	12.88927914	34.66092568
img3	13.4698871	15.83916694	12.94333913	0.733439951	1.540479897	1.429119904	13.23071911	36.52383755
img4	13.33855911	15.25113498	12.59756716	0.661951956	1.4879999	1.412351905	12.94316713	35.46463762
img5	14.80243101	16.51660689	13.91507107	0.732927951	1.628351891	1.513535899	14.34835104	40.74205327
img6	12.45068717	14.970303	10.5019513	0.621887958	1.425151904	1.34924791	13.3589111	38.13017344
img7	13.56012709	15.82335894	13.05695912	0.689535954	1.460863902	1.310911912	13.4786551	36.24806157
img8	13.80006307	16.15142292	13.58668709	0.723775951	1.567743895	1.409855905	13.950783906	38.32358143
Colículo Superior Dcho								
	Ventriculos	Hipotalámico Dcho	Colículo inferior Dcho	Gris Periacuductal Dcho	Neocórtex Dcho	Amígdala Dcha	Bulbo olfatorio Dcho	
img1	4.498047698	1.989375867	5.947071601	3.349311775	2.298879846	6.535615562	13.11225512	
img2	4.212607718	1.770559881	5.684287619	3.049279796	2.165567855	6.046463595	11.8693752	
img3	4.500095698	1.981567867	5.9610876	3.208127785	2.191551853	6.221759583	12.47212716	
img4	4.349375708	1.974207868	5.723007616	3.13510379	2.186751956	6.317375576	12.01452719	
img5	4.812863677	2.042943863	6.213119583	3.401087772	2.337663843	6.71379155	13.4152951	
img6	4.549311695	1.776575881	5.930239602	3.292671779	2.294463846	5.893567605	11.64556722	
img7	4.422911703	1.949695869	5.921087603	3.144831789	2.23327985	6.136319589	12.27545518	
img8	4.575935693	1.870975875	6.279615579	3.272895781	2.310975845	6.306943577	13.05177512	
Tronco encefálico								
	Demás mesencefalo Dcho	Prosencefalo basal Dcho	Fimbria Dcha	Hipocampo Izdo	Putamen caudado Izdo	Comisura anterior Izda	Globo pálido Izdo	
img1	64.36741968	6.902271537	7.119231523	1.387199907	14.25254304	0.676159955	1.615231892	
img2	61.24466789	6.527467562	6.576639559	1.243519917	13.31679911	0.623039958	1.479359901	
img3	60.39749995	6.57727559	6.569727559	1.413567905	14.35571104	0.678335955	1.4849919	
img4	56.19602823	6.352127574	6.499775564	1.285055914	13.92486307	0.711999952	1.477247901	
img5	64.89996365	6.925823536	7.105983524	1.384767907	15.14367898	1.016575932	1.601983893	
img6	64.56377167	6.619327556	6.022783596	1.214463919	12.49855916	0.575871961	1.397375906	
img7	62.87980378	6.510783563	6.70956755	1.295039913	13.3832951	0.618111959	1.50847896	
img8	64.24549969	6.789439545	7.069439526	1.301375913	14.42963103	0.670527955	1.577599894	
Cápsula interna Izda								
	Tálamo Izdo	Cerebelo Izdo	Colículo inferior Izdo	Hipotalámico Izdo	Colículo inferior Izdo	Gris Periacuductal Izdo	Neocórtex Izdo	
img1	1.290431913	14.34956704	38.53996542	4.899263671	5.780031612	2.299199846	72.08991517	
img2	1.167039922	13.31775911	34.81740567	4.287295713	5.67327962	2.069695861	66.80626752	
img3	1.171391921	13.75724708	36.87103753	4.520831697	5.845247608	2.130687857	69.29026335	
img4	1.148671923	13.28012711	35.54700562	4.461823701	5.651455621	2.133951857	66.30578755	
img5	1.289663914	14.53126303	39.47468535	4.944959668	6.10745559	2.295615846	73.32255508	
img6	1.066879928	13.68505508	37.92927746	4.573887693	5.796991611	2.258239849	66.71826753	
img7	1.19116792	13.60607909	36.72742154	4.448447702	5.806591611	2.155263855	68.16645943	
img8	1.243647917	14.10796705	38.17964544	4.710207684	6.054527594	2.247103849	69.95679531	
Amígdala Izda								
	Bulbo olfatorio Izdo	Resto del mesencefalo Izdo	Prosencefalo basal Izdo	Fimbria Izda	Vol. Total			
img1	5.825727609	13.4832631	7.375487505	7.261375513	580.8544891			
img2	5.425919636	12.35679917	6.900031537	6.838719541	539.3900438			
img3	5.450687635	13.11622312	7.130111522	7.079167525	555.8607627			
img4	5.298495645	12.32972717	6.851583541	6.590911558	537.9756439			
img5	5.885036005	14.03027106	7.4570875	7.384639505	592.4336883			
img6	5.004735664	12.19129518	7.170239519	6.128639589	543.9275155			
img7	5.506239631	12.86028714	7.140735521	6.723519549	553.9809549			
img8	5.765567613	13.86739107	7.328575509	7.125183522	573.0573696			

Tabla E.9: Resultados volumétricos de imágenes *in vivo* de ratones transgénicos FVB_Ncr1 en *mm³*

Imagen	Hipopocampo Dcho	Cápsula externa	Putamen caudado Dcho	Comisura anterior Dcha	Globo Pálido Dcho	Cápsula interna Dcha	Tálamo Dcho	Cerebelo Dcho
img1	18.8459985	17.24624863	17.94487357	0.658124948	1.788749858	0.948374925	17.85374858	49.42349607
img2	17.44199861	15.91649874	16.91549866	0.573749954	1.474874883	0.911249928	15.71399875	46.19362133
img3	18.36674854	16.74674867	16.90199866	0.607499952	1.714499864	0.965249923	16.63874868	47.4743712
img4	17.6174986	16.11899872	16.48012389	0.566999955	1.694249865	1.123874911	16.93574865	46.84837128
img5	18.09674856	17.117537964	18.60299852	0.667249942	1.667249867	0.971999923	17.28674863	52.99087079
img6	16.15949872	16.15612372	14.07037388	0.50624996	1.457999884	0.917999927	17.19562363	50.324621
img7	17.03024865	15.86924874	16.61174868	0.664874947	1.711124864	0.850499932	16.3012487	46.85174628
img8	18.01912357	16.87837366	17.5702486	0.732374942	1.663874868	0.934874926	17.75924859	51.85349588
Colículo Superior Dcho								
Ventrículos								
img1	5.693624548	8.413874331	8.413874331	4.360499653	2.001374841	91.23299275	7.664624391	20.24662339
img2	5.636249552	5.477624565	8.022374362	3.931874688	2.591999794	83.53799836	7.131374433	18.49499853
img3	6.010874522	5.818499538	8.369999335	4.02637468	2.345624814	89.17086791	7.316999418	20.68537336
img4	5.977124525	5.585624556	8.214749347	4.110749673	1.987874842	87.22349307	8.066249359	20.31749839
img5	6.004124523	5.923124529	8.673749311	4.323374656	2.811374777	93.61236756	7.792874381	22.04887325
img6	5.933249528	5.872499533	8.002124364	4.137749671	2.369249812	83.89374333	6.780374461	18.30262355
img7	5.55249529	5.315624578	8.228249346	3.786749699	2.531249799	85.78574318	7.286624421	17.50612361
img8	6.250499503	5.997374523	8.670374311	4.249124662	2.089124834	92.22861767	7.526249402	20.70637335
Tronco encefálico								
Resto del mesencéfalo Dcho								
img1	86.42024313	8.120249355	10.0574992	0.998999921	20.37487338	17.41499862	0.732374942	1.862999852
img2	88.68486795	7.259624423	9.588374238	0.914624927	17.86387358	15.47099877	0.661499947	1.609874872
img3	94.79361747	7.570124398	9.692999923	0.944999925	19.43999846	16.24387371	0.742499941	1.812374856
img4	98.62424216	7.529624402	9.129374274	0.890999929	18.33299854	15.21787379	0.63112495	1.775249859
img5	88.79961794	8.278874342	10.24312419	0.985499922	19.40962346	17.04037365	0.75262494	1.994624841
img6	100.568242	7.93124937	9.109124276	0.857249932	17.5601236	12.538124	0.63112495	1.525499879
img7	97.80749223	7.306874419	9.240749266	0.890999929	18.8932485	15.44062377	1.792124858	1.792124858
img8	104.0816167	8.312624339	9.736874226	0.928124926	19.43324846	16.13924872	0.766124939	1.964249844
Cápsula interna Izda								
Tálamo Izdo								
img1	1.474874883	18.80549851	49.43362107	6.010874822	8.265374343	4.100624674	2.251124821	92.43449265
img2	1.113749911	16.12912372	46.77749628	5.197499587	8.572499319	4.073624676	2.821499776	84.52011828
img3	1.292624897	17.77274859	50.68574597	5.423624569	9.119249275	3.931874688	2.450249805	89.51849289
img4	1.191374905	16.99312365	47.36137124	6.017624522	9.142874273	3.955499686	2.119499832	87.84449302
img5	1.140749909	18.66374852	54.43537067	5.53162456	9.510749244	4.52874638	2.467124804	95.80274239
img6	1.157624908	17.23949863	49.83862104	5.639624552	8.737874306	4.046624678	2.443499806	84.68886827
img7	1.208249904	17.26649863	47.10149626	5.329124576	8.56237432	3.742874703	2.494124802	86.72399311
img8	1.343249893	18.47137353	53.12924578	6.03449952	8.690624309	4.596749635	2.433374807	91.93499269
Amígdala Izda								
Bulbo olfatorio Izdo								
img1	7.30012442	21.16462332	9.136124274	9.574874239	1.147499909	750.1341904	Vol. Total	
img2	6.743249464	19.88887342	7.981874366	9.325124259	0.904499928	701.4734443		
img3	7.252874424	21.65399828	8.474624326	9.618749236	1.069874915	743.1513159		
img4	8.18099935	21.08699832	8.535374322	9.240749266	1.046249917	731.5649419		
img5	8.616374315	23.48999813	8.734499306	10.1114992	0.978749922	767.215064		
img6	6.490124484	19.12949848	8.825624299	8.700749309	0.955124924	723.3569425		
img7	7.364249415	19.05187349	8.218124347	9.30824926	1.052999916	719.0268179		
img8	7.894124373	21.71137327	9.476999247	10.0777492	0.995624921	774.6771884		

Tabla E.10: Resultados volumétricos de imágenes *ex vivo* de ratones control C57BL/6J (NeAt) en mm^3

Imagen	Hipocampo Decho	Cápsula externa	Putamen caudado Decho	Comisura anterior Decha	Globo Pálido Decho	Cápsula interna Decha	Tálamo Decho	Cerebelo Decho
img1	12.61252057	14.81097237	12.78351703	0.480388972	1.533880844	1.361742328	13.01379642	29.10770947
img2	12.84404583	14.38664781	12.90073319	0.506656188	1.682347719	1.483422872	13.48795601	26.7657743
img3	12.59694712	14.35311298	12.56351612	0.501049747	1.572087705	1.312634054	12.91464547	27.38777783
img4	12.9608467	15.56659608	13.60340718	0.751159428	1.742668876	1.460477991	13.51619587	27.1889368
img5	12.97423986	15.55029587	13.41932902	0.680455872	1.690342089	1.554645442	12.78299792	27.2896651
img6	13.16631239	15.40504751	13.62936292	0.716378626	1.681517135	1.355097657	13.38485979	25.89490706
img7	12.79306875	14.32778017	13.34281147	0.4432212082	1.635212082	1.364617165	13.36617165	28.12004137
img8	13.29827141	15.39975254	13.99339173	0.601965692	1.69833646	1.454456258	14.07528266	26.33376684
img9	13.35007908	15.38293321	13.98184197	0.53105459	1.755335281	1.545301373	14.09615109	29.80643819
img10	11.43672521	12.562997	11.8584542	0.596255428	1.469199122	1.26352578	12.201693	24.45166369
Colículo Superior Decho	Ventrículos	Hipotálamo Decho	Colículo inferior Decho	Gris Periaqueductal Decho	Neocórtex Decho	Amígdala Decha	Bulbo olfatorio Decho	
img1	4.158422192	1.537929941	6.298940763	2.898634039	2.019045674	6.330191483	13.62375648	
img2	4.057194777	2.050918331	5.974078629	2.796783687	2.087880316	6.295099312	9.976973983	
img3	3.94683094	1.444385428	6.421659536	2.741653679	1.991636404	6.275061475	11.64374825	
img4	4.312806977	1.921763533	6.455055831	2.225134307	2.910054568	74.84599301	11.43174171	
img5	4.247398494	2.160037293	4.876669632	2.984184182	1.979096761	5.914276587	8.721754042	
img6	4.111078909	1.414692053	5.987160326	2.7625221	2.051749915	74.62495387	10.01694583	
img7	4.229229471	2.99383972	6.001280253	2.779445247	2.130551564	71.95826039	9.408335471	
img8	4.542878721	1.722631039	6.249209551	2.863541869	2.308400345	6.266651813	11.31089175	
img9	4.56437008	1.996827554	6.515307873	2.96570369	2.238735119	76.98412365	13.16029066	
img10	4.070899412	1.472832927	5.36422239	2.6527812	1.973467381	64.54218426	10.68805764	
Tronco encefálico	Resto del mesencéfalo Decho	Prosencefalo basal Decho	Fimbria Decha	Hipocampo Izdo	Putamen anterior Izdo	Comisura anterior Izdo	Globo pálido Izdo	
img1	57.22494762	6.656195669	6.549880928	1.172576842	12.85660842	12.84321525	0.457859383	
img2	49.33159721	6.880660972	6.616119995	1.291765633	12.93800564	13.02739723	0.459624374	
img3	54.68865581	6.769258905	6.644878963	1.130113239	13.12114939	13.68584263	0.509044117	
img4	63.97313045	6.63470431	7.221408023	1.228848902	13.32017806	13.87604635	0.732782659	
img5	61.39551171	6.644463671	5.943035556	1.277334238	12.82151624	13.45784735	0.682532332	
img6	61.0843596	6.521329606	6.765209808	1.125441204	12.8741545	13.24885167	0.690734348	
img7	55.35229236	6.830099176	6.392173807	1.080589673	12.38753615	13.20057398	0.453187348	
img8	52.55498596	6.905682313	6.989259819	1.295503261	13.53602606	14.00727861	0.564797062	
img9	64.53657782	6.881906848	7.123918236	1.420194671	13.73463944	14.3857134	0.4105161	
img10	48.2386526	5.6528503	6.044055324	1.115785666	11.89624576	12.69163369	0.587119005	
Cápsula interna Izda	Tálamo Izdo	Cerebelo Izdo	Colículo Inferior Izdo	Hipotálamo Izdo	Colículo inferior Izdo	Gris Periaqueductal Izdo	Neocórtex Izdo	
img1	1.138730547	13.16901179	28.35270869	4.567900062	5.886763495	2.97577452	70.75412136	
img2	1.18399737	13.4540059	29.38066011	4.391608626	5.719919951	2.992282376	70.33093885	
img3	1.132397345	13.40053706	27.66913813	4.162055996	5.682855144	2.776122912	72.94312526	
img4	1.226980088	13.54588924	26.84945563	4.497715721	5.843365486	3.041702119	75.4068448	
img5	1.276399831	14.000011	26.60214927	4.386728945	6.496308266	2.914103665	73.78263795	
img6	1.17548385	13.62873999	25.23739607	4.351532952	5.989755901	2.866656559	71.33376511	
img7	1.062005358	13.39607267	27.19144855	4.410296764	5.712963811	2.894273474	70.89199829	
img8	1.25968433	13.97540495	27.39141163	4.357762331	5.663647891	2.968195442	73.6884705	
img9	1.315021983	14.38612869	26.87634578	4.573610326	5.800071299	3.02301398	77.24731493	
img10	1.0430005751	12.64345982	24.21982695	4.288823866	5.451018409	2.656518828	66.71208474	
Amígdala Izda	Bulbo olfatorio Izdo	Resto del mesencéfalo Izdo	Prosencefalo basal Izdo	Fimbria Izda	Vol. Total			
img1	5.580278031	10.19842842	7.16191745	6.58642662	534.2574258			
img2	5.414057425	11.55269549	7.25951106	6.577186374	521.92014			
img3	5.579551127	12.39324641	7.217151281	6.681131387	529.2516004			
img4	5.421325034	12.07295249	6.972025203	7.07544369	555.9711735			
img5	5.283136635	12.26699766	7.155272779	7.25847283	570.9838739			
img6	4.7956877	12.76721682	6.748494307	7.140322269	538.8051842			
img7	5.127090682	13.7096181	6.867163984	7.35326322	529.0808116			
img8	5.456001913	11.78806221	7.190468772	6.962577311	539.9892854			
img9	5.687008064	13.11606207	7.262210458	7.516057667	573.1930195			
img10	5.637380675	9.970433135	5.562109008	6.319082423	480.7073968			

Tabla E.1.1: Resultados volumétricos de imágenes *in vivo* de ratones control C57BL/6J (NeAt) en mm^3

Imagen	Hipocampo Decho	Cápsula externa	Putamen caudado Decho	Comisura anterior Decho	Globo Pálido Decho	Cápsula interna Decha	Tálamo Decho	Cerebelo Decho
img1	14.62500065	15.6530007	12.84200057	0.373000017	0.995000044	0.705000032	14.33800064	30.52600136
img2	13.89100062	15.02400067	12.60500056	0.333000015	1.107000049	0.89300004	13.19300059	30.81000138
img3	14.76700066	16.71000075	13.14800059	0.545000024	1.137000051	1.099000049	12.99100058	28.34000127
img4	14.51700065	17.37700078	12.88600058	0.399000018	1.693000076	0.739000033	13.61000061	26.9040012
img5	14.09900063	13.23300059	12.38100055	0.392000018	0.89800004	0.764000034	13.3460006	27.96600125
img6	15.28100068	15.90000071	13.08100058	0.401000018	1.295000058	0.768000034	13.66400061	31.06600139
img7	14.39800062	13.88100062	13.66000056	0.360000016	1.248000056	0.656000029	13.77000062	28.13000136
img8	13.67600061	15.6350007	12.09300054	0.503000022	1.266000057	1.088000049	13.54600061	27.73500124
img9	15.5590007	13.05600058	11.66300052	0.269000012	1.217000054	0.523000023	14.93800067	29.64800133
img10	14.90800067	15.06500067	12.18300054	0.280000013	1.412000063	0.877000039	14.93300067	31.95800143
Colículo Superior Decho								
img1	5.333000238	7.358000329	6.632000296	3.012000135	1.649000074	71.79900321	4.997000223	13.3600006
img2	5.045000226	7.847000351	7.458000333	3.101000139	1.501000067	73.50400329	6.027000269	14.00400063
img3	4.146000185	6.758000302	6.384000285	3.80100017	1.404000063	74.65000334	5.515000247	13.64200061
img4	4.69100021	7.179000321	7.538000337	4.128000185	2.763000124	74.75800334	5.082000227	15.29000068
img5	4.721000211	8.374000374	7.583000339	2.80000125	1.79500008	74.94600335	4.865000217	14.61000065
img6	4.868000218	7.323000327	6.448000288	4.135000185	1.998000089	78.1980035	5.400000241	15.15000068
img7	5.069000227	7.697000344	6.370000285	2.718000122	1.658000074	64.7800029	5.897000264	12.82500057
img8	4.862000217	7.106000318	6.068000271	2.847000127	1.642000073	69.78600312	4.970000222	15.16300068
img9	4.594000205	5.298000237	5.303000237	2.998000134	0.89100004	70.58600316	4.528000202	13.4440006
img10	5.600000225	6.139000274	7.928000354	3.290000147	2.327000104	77.80100348	5.051000226	16.29100073
Tronco encefálico								
img1	78.73600352	6.305000282	7.681000343	0.644000029	14.44700065	12.38400055	0.435000019	0.995000044
img2	82.88600371	6.416000287	7.911000354	0.826000037	14.31700064	11.60700052	0.422000019	1.282000057
img3	81.70200365	6.803000304	6.803000304	0.731000033	15.7240007	12.17200054	0.569000025	1.196000053
img4	78.72100352	6.894000306	8.190000366	0.768000034	14.61500065	12.26100055	0.505000023	1.728000077
img5	87.25400039	7.274000325	7.591000339	1.11300005	14.28500064	13.24300059	0.510000023	0.825000037
img6	87.37600391	6.578000294	7.543000337	0.789000035	15.26400068	12.06700054	0.522000023	1.419000063
img7	81.63400365	6.121000274	7.072000316	0.685000031	15.6530007	12.37700055	0.359000016	1.450000065
img8	81.28000363	6.330000283	7.842000351	0.871000039	14.14000063	11.33800051	0.593000027	1.510000068
img9	71.70500321	6.620000296	7.498000335	0.616000028	14.87100066	12.11300054	0.293000013	1.051000047
img10	84.58100378	6.7030003	8.113000363	0.699000031	14.70200066	11.43000051	0.306000014	1.303000058
Cápsula interna Izda								
img1	1.059000047	14.42100064	31.88500143	4.852000217	7.773000347	3.198000143	1.546000069	73.7400033
img2	0.959000043	13.82700062	30.21500135	5.477000245	7.362000329	3.284000147	2.017000009	73.9060033
img3	0.907000041	14.39500064	30.30700135	4.758000213	7.544000337	4.188000187	2.474000111	78.3490035
img4	0.738000033	13.4470006	27.23900122	4.215000188	7.140000319	4.509000202	2.776000124	76.1170034
img5	1.056000047	13.14900059	29.0160013	4.24300019	7.709000345	3.269000146	1.498000067	75.33100337
img6	0.937000042	14.14500063	31.94500143	4.780000214	7.409000331	4.148000185	2.065000092	80.27200359
img7	0.822000037	14.90000067	30.65500137	5.191000232	6.747000302	3.022000134	2.217000099	61.82400276
img8	1.321000059	14.37200064	30.95000138	5.206000233	7.036000315	3.296000144	2.067000092	72.87700326
img9	0.581000026	16.31700073	30.83100138	5.482000245	6.585000294	2.672000119	1.185000053	67.76700303
img10	0.935000042	13.97800062	30.76700138	4.620000207	6.830000305	3.434000154	1.308000058	81.17700363
Amígdala Izda								
img1	5.066000226	14.62000065	7.352000329	8.159000365	0.734000033	559.591025	Vol. Total	
img2	5.438000243	14.89900067	7.052000315	7.817000349	0.774000035	564.0310252		
img3	6.246000279	15.33200069	7.507000336	7.819000035	0.728000033	570.2230255		
img4	5.226000234	18.59600083	7.60000034	8.852000351	0.645000029	567.6720254		
img5	5.980000267	16.49500074	7.334000328	8.193000366	1.244000056	568.9210254		
img6	4.974000222	14.87800067	7.310000327	7.493000335	1.129000005	589.3380263		
img7	5.451000244	14.18700063	7.097000317	7.983000357	0.576000026	533.0460238		
img8	5.36300024	13.4250006	7.16300032	7.757000347	0.66400003	552.1290247		
img9	4.148000185	13.16200059	6.385000285	7.712000345	0.530000024	529.0050236		
img10	5.223000233	15.6700007	7.110000318	7.723000345	0.751000034	584.6270261		
Bulbo olfatorio Izdo								
img1	5.066000226	14.62000065	7.352000329	8.159000365	0.734000033	559.591025	Vol. Total	
img2	5.438000243	14.89900067	7.052000315	7.817000349	0.774000035	564.0310252		
img3	6.246000279	15.33200069	7.507000336	7.819000035	0.728000033	570.2230255		
img4	5.226000234	18.59600083	7.60000034	8.852000351	0.645000029	567.6720254		
img5	5.980000267	16.49500074	7.334000328	8.193000366	1.244000056	568.9210254		
img6	4.974000222	14.87800067	7.310000327	7.493000335	1.129000005	589.3380263		
img7	5.451000244	14.18700063	7.097000317	7.983000357	0.576000026	533.0460238		
img8	5.36300024	13.4250006	7.16300032	7.757000347	0.66400003	552.1290247		
img9	4.148000185	13.16200059	6.385000285	7.712000345	0.530000024	529.0050236		
img10	5.223000233	15.6700007	7.110000318	7.723000345	0.751000034	584.6270261		
Bulbo olfatorio Decho								
img1	5.333000238	7.358000329	6.632000296	3.012000135	1.649000074	71.79900321	4.997000223	13.3600006
img2	5.045000226	7.847000351	7.458000333	3.101000139	1.501000067	73.50400329	6.027000269	14.00400063
img3	4.146000185	6.758000302	6.384000285	3.80100017	1.404000063	74.65000334	5.515000247	13.64200061
img4	4.69100021	7.179000321	7.538000337	4.128000185	2.763000124	74.75800334	5.082000227	15.29000068
img5	4.721000211	8.374000374	7.583000339	2.80000125	1.79500008	74.94600335	4.865000217	14.61000065
img6	4.868000218	7.323000327	6.448000288	4.135000185	1.998000089	78.1980035	5.400000241	15.15000068
img7	5.069000227	7.697000344	6.370000285	2.718000122	1.658000074	64.7800029	5.897000264	12.82500057
img8	4.862000217	7.106000318	6.068000271	2.847000127	1.642000073	69.78600312	4.970000222	15.16300068
img9	4.594000205	5.298000237	5.303000237	2.998000134	0.89100004	70.58600316	4.528000202	13.4440006
img10	5.600000225	6.139000274	7.928000354	3.290000147	2.327000104	77.80100348	5.051000226	16.29100073
Globo pálido Izdo								
img1	78.73600352	6.305000282	7.681000343	0.644000029	14.44700065	12.38400055	0.435000019	0.995000044
img2	82.88600371	6.416000287	7.911000354	0.826000037	14.31700064	11.60700052	0.422000019	1.282000057
img3	81.70200365	6.803000304	6.803000304	0.731000033	15.7240007	12.17200054	0.569000025	1.196000053
img4	78.72100352	6.894000306	8.190000366	0.768000034	14.61500065	12.26100055	0.505000023	1.728000077
img5	87.25400039	7.274000325	7.591000339	1.11300005	14.28500064	13.24300059	0.510000023	0.825000037
img6	87.37600391	6.578000294	7.543000337	0.789000035	15.26400068	12.06700054	0.522000023	1.419000063
img7	81.63400365	6.121000274	7.072000316	0.685000031	15.6530007	12.37700055	0.359000016	1.450000065
img8	81.28000363	6.330000283	7.842000351	0.871000039	14.14000063	11.33800051	0.593000027	1.510000068
img9	71.70500321	6.620000296	7.498000335	0.616000028	14.87100066	12.11300054	0.293000013	1.051000047
img10	84.58100378	6.7030003	8.113000363	0.699000031	14.70200066	11.43000051	0.306000014	1.303000058
Comisura anterior Izda								
img1	1.059000047	14.42100064	31.88500143	4.852000217	7.773000347	3.198000143	1.546000069	73.7400033
img2	0.959000043	13.82700062	30.21500135	5.477000245	7.362000329	3.284000147	2.017000009	73.9060033
img3	0.907000041	14.39500064	30.30700135	4.758000213	7.544000337	4.188000187	2.474000111	78.3490035
img4	0.738000033	13.4470006	27.23900122	4.215000188	7.140000319	4.509000202	2.776000124	76.1170034
img5	1.056000047	13.14900059	29.0160013	4.24300019	7.709000345	3.269000146	1.498000067	75.33100337
img6	0.937000042	14.14500063	31.94500143	4.780000214	7.409000331	4.148000185	2.065000092	80.27200359
img7	0.822000037	14.90000067	30.65500137	5.191000232	6.747000302	3.022000134	2.217000099	61.82400276
img8	1.321000059	14.37200064	30.95000138	5.206000233	7.036000315	3.296000144	2.067000092	72.87700326
img9	0.581000026	16.31700073	30.83100138	5.482000245	6.585000294	2.672000119	1.1	

Glosario de acrónimos

CNR	Contrast-to-Noise Ratio	Relación contraste-ruido
FDR	False Discovery Rate	Tasa de falso descubrimiento
FTP	File Transfer Protocol	Protocolo de transferencia de archivos
FWER	Family-Wise Error Ratio	Tasa de error familiar
FWHM	Full Width at Half Maximum	Anchura a media altura
GLM	General Linear Model	Modelo lineal general altura
GM	Grey Matter	Materia gris
GMM	Gaussian Mixture Model	Modelo de mezcla gaussiana
IIH	Intensitiy Inhomogeneity	Intensidad no homogénea
IMT	Institute of High Energy Physics Mouse Template	Plantilla de ratón del Instituto de Física de Altas Energías
MEMRI	Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging	Imágenes de resonancia magnética mejoradas con manganeso
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Imagen de resonancia magnética
NFT	Neurofibrillary Tangle	Nudo neurofibrilar
ROI	Region Of Interest	Región de interés
SD	Standard Difference	Diferencia estándar
SNR	Signal Noise Ratio	Relación señal-ruido
SPM	Statistical Parametric Mapping	Mapeo paramétrico estadístico
TBM	Tensor-based Morphometry	Morfometría basada en tensor
TBV	Total Brain Volume	Volumen cerebral total
VBM	Voxel-based Morphometry	Morfometría basada en vóxel
WM	White Matter	Materia blanca

Bibliografía

- [1] H. E. Holmes, N. M. Powell, D. Ma, O. Ismail, I. F. Harrison, J. A. Wells, N. Colgan, J. M. O’Callaghan, R. A. Johnson, T. K. Murray, Z. Ahmed, M. Heggenes, A. Fisher, M. J. Cardoso, M. Modat, M. J. O’Neill, E. C. Collins, E. M. C. Fisher, S. Ourselin, and M. F. Lythgoe, “Comparison of in vivo and ex vivo mri for the detection of structural abnormalities in a mouse model of tauopathy,” *Frontiers in Neuroinformatics*, vol. 11, p. 20, 2017. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2017.00020>
- [2] K. Hikishima, Y. Komaki, F. Seki, Y. Ohnishi, H. J. Okano, and H. Okano, “In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strain-specific structures in the mouse brain,” *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [3] B. Nie, D. Wu, S. Liang, H. Liu, X. Sun, P. Li, Q. Huang, T. Zhang, T. Feng, S. Ye *et al.*, “A stereotaxic mri template set of mouse brain with fine sub-anatomical delineations: Application to memri studies of 5xfad mice,” *Magnetic resonance imaging*, vol. 57, pp. 83–94, 2019.
- [4] S. Sawiak, N. Wood, G. Williams, A. Morton, and T. Carpenter, “Voxel-based morphometry in the r6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2d morphometry,” *Neurobiology of disease*, vol. 33, no. 1, pp. 20–27, 2009.
- [5] D. Ma, H. E. Holmes, M. J. Cardoso, M. Modat, I. F. Harrison, N. M. Powell, J. M. O’Callaghan, O. Ismail, R. A. Johnson, M. J. O’Neill *et al.*, “Study the longitudinal in vivo and cross-sectional ex vivo brain volume difference for disease progression and treatment effect on mouse model of tauopathy using automated mri structural parcellation,” *Frontiers in neuroscience*, vol. 13, p. 11, 2019.
- [6] D. Ma, M. J. Cardoso, M. Modat, N. Powell, J. Wells, H. Holmes, F. Wiseman, V. Tybulewicz, E. Fisher, M. F. Lythgoe *et al.*, “Automatic structural parcellation of mouse brain mri using multi-atlas label fusion,” *PloS one*, vol. 9, no. 1, 2014.
- [7] J. Gili, “Introducción biofísica a la resonancia magnética,” *Centre Diagnòstic Pedralbes*, 1993.
- [8] M. Garcés, M. d. C. Crespo Puras, L. Finkel Morgenstern, and M. Arroyo Menéndez, “Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en españa y su impacto económico y social,” 2016.

- [9] M. Prince, R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, and C. P. Ferri, “The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis,” *Alzheimer’s & dementia*, vol. 9, no. 1, pp. 63–75, 2013.
- [10] T. Pringsheim, N. Jette, A. Frolkis, and T. D. Steeves, “The prevalence of parkinson’s disease: a systematic review and meta-analysis,” *Movement disorders*, vol. 29, no. 13, pp. 1583–1590, 2014.
- [11] M. A. Alrubaie, “Satisfaction with health information communication to multiple sclerosis patients,” 2016.
- [12] J. Olesen, A. Gustavsson, M. Svensson, H.-U. Wittchen, B. Jönsson, C. S. Group, and E. B. Council, “The economic cost of brain disorders in europe,” *European journal of neurology*, vol. 19, no. 1, pp. 155–162, 2012.
- [13] J. L. Molinuevo, “La enfermedad de alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas,” *Libro de la salud del Hospital Clinic de Barcelona y la fundación BBVA. 1^a ed. Bilbao. Fundación BBVA*, pp. 497–500, 2007.
- [14] C. D. Martínez, C. R. Vargas, and S. R. Arancibia, “Estrés oxidativo y neurodegeneración,” *Rev. la Fac. Med.*, vol. 46, no. 6, pp. 229–235, 2003.
- [15] S. Gra Menéndez, N. Padrón Pérez, and J. d. J. Llibre Rodríguez, “Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de alzheimer,” *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 21, no. 4, pp. 253–261, 2002.
- [16] S. S. Dominy, C. Lynch, F. Ermini, M. Benedyk, A. Marczyk, A. Konradi, M. Nguyen, U. Haditsch, D. Raha, C. Griffin *et al.*, “Porphyromonas gingivalis in alzheimer’s disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors,” *Science advances*, vol. 5, no. 1, p. eaau3333, 2019.
- [17] M. D. Sevillano, J. I. Cuadrado, and J. de Pedro Cuesta, “Enfermedad de parkinson en españa: evidencias de infradiagnóstico y puntos de partida para su reducción,” *Rev Neurol*, vol. 29, pp. 881–883, 1999.
- [18] I. S. de Pipaón and R. Larumbe, “Programa de enfermedades neurodegenerativas,” in *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol. 24, 2001, pp. 49–76.
- [19] “Estrategia en enfermedades neurodegenerativas del sistema nacional de salud,” p. 152, 2016.
- [20] C. Valls-Pedret, J. L. Molinuevo, and L. Rami, “Diagnóstico precoz de la enfermedad de alzheimer: fase prodrómica y preclínica,” *Rev Neurol*, vol. 51, no. 8, pp. 471–480, 2010.
- [21] E. Rodríguez Yunta, “Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas,” *Acta bioethica*, vol. 13, no. 1, pp. 25–40, 2007.
- [22] Y. Ma, D. Smith, P. R. Hof, B. Foerster, S. Hamilton, S. J. Blackband, M. Yu, and H. Benveniste, “In vivo 3d digital atlas database of the adult c57bl/6j mouse brain by magnetic resonance microscopy,” *Frontiers in neuroanatomy*, vol. 2, p. 1, 2008.

- [23] Y. Ma, P. Hof, S. Grant, S. Blackband, R. Bennett, L. Slate, M. McGuigan, and H. Benveniste, “A three-dimensional digital atlas database of the adult c57bl/6j mouse brain by magnetic resonance microscopy,” *Neuroscience*, vol. 135, no. 4, pp. 1203–1215, 2005.
- [24] H. E. Holmes, N. Colgan, O. Ismail, D. Ma, N. M. Powell, J. M. O’Callaghan, I. F. Harrison, R. A. Johnson, T. K. Murray, Z. Ahmed *et al.*, “Imaging the accumulation and suppression of tau pathology using multiparametric mri,” *Neurobiology of aging*, vol. 39, pp. 184–194, 2016.
- [25] H. E. Holmes, N. M. Powell, D. Ma, O. Ismail, I. F. Harrison, J. A. Wells, N. Colgan, J. M. O’Callaghan, R. A. Johnson, T. K. Murray *et al.*, “Comparison of in vivo and ex vivo mri for the detection of structural abnormalities in a mouse model of tauopathy,” *Frontiers in neuroinformatics*, vol. 11, p. 20, 2017.
- [26] J. A. Wells, J. M. O’Callaghan, H. E. Holmes, N. M. Powell, R. A. Johnson, B. Siow, F. Torrealdea, O. Ismail, S. Walker-Samuel, X. Golay *et al.*, “In vivo imaging of tau pathology using multi-parametric quantitative mri,” *Neuroimage*, vol. 111, pp. 369–378, 2015.
- [27] B. B. Avants, N. Tustison, and G. Song, “Advanced normalization tools (ants),” *Insight j*, vol. 2, no. 365, pp. 1–35, 2009.
- [28] A. Mechelli, C. J. Price, K. J. Friston, and J. Ashburner, “Voxel-based morphometry of the human brain: methods and applications,” *Current Medical Imaging*, vol. 1, no. 2, pp. 105–113, 2005.
- [29] J. Ashburner and K. J. Friston, “Voxel-based morphometry: the methods,” *Neuroimage*, vol. 11, no. 6, pp. 805–821, 2000.
- [30] S. B. Melo, “Transformaciones geométricas sobre imágenes digitales,” *Facultad de Ciencias-Carrera de Matemáticas. Universidad Distrital Francisco José de Caldas*, 2009.
- [31] J. Pérez and C. Steegmann, “Transformaciones geométricas,” *Universitat Obrerta de Catalunya*.
- [32] N. IMAQ, “Imaq vision concepts manual,” *National Instruments*, 2000.
- [33] J. C. García Pérez, “Detección y segmentación automática de lesiones en pacientes con esclerosis múltiple en imágenes de resonancia magnética.”
- [34] E. Marinetto, M. Desco, P. Montesinos, and J. Pascau, “Corrección de artefacto de inhomogeneidad en imágenes de resonancia magnética de pequeños animales,” in *XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB)*, Madrid, 2010.
- [35] N. J. Tustison, B. B. Avants, P. A. Cook, Y. Zheng, A. Egan, P. A. Yushkevich, and J. C. Gee, “N4itk: improved n3 bias correction,” *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 29, no. 6, pp. 1310–1320, 2010.
- [36] J. Ashburner and K. J. Friston, “Unified segmentation,” *Neuroimage*, vol. 26, no. 3, pp. 839–851, 2005.

- [37] A. Peñalver Benavent, *Clustering EBEM: modelos de mezclas gaussianas basados en maximización de entropía*. Universidad de Alicante, 2007.
- [38] R. FARNOUSH and P. B. ZAR, “Image segmentation using gaussian mixture model,” 2008.
- [39] D. Reynolds, *Gaussian Mixture Models*. Boston, MA: Springer US, 2009, pp. 659–663. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-0-387-73003-5_196
- [40] A. Agostini and E. Celaya, “Reinforcement learning with a gaussian mixture model,” in *The 2010 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*. IEEE, 2010, pp. 1–8.
- [41] J. McGonagle, G. Pilling, V. Tembo, A. Chumbley, E. Ross, and J. Khim, “Gaussian mixture model,” 2017.
- [42] K. Pyun, J. Lim, C. S. Won, and R. M. Gray, “Image segmentation using hidden markov gauss mixture models,” *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 16, no. 7, pp. 1902–1911, 2007.
- [43] A. Sarmiento, I. Fondón, M. Velasco, A. Qaisar, and P. Aguilera, “Modelo de mezcla de gaussianas generalizadas para segmentación de melanomas,” 2014.
- [44] J. Ashburner, G. Flandin, R. Henson, S. Kiebel, J. Kilner, J. Mattout, W. Penny, K. Stephan, D. Gitelman, and C. Hutton, “Spm5 manual the fil methods group,” 2009.
- [45] W.-H. Chen, C. Smith, and S. Fralick, “A fast computational algorithm for the discrete cosine transform,” *IEEE Transactions on communications*, vol. 25, no. 9, pp. 1004–1009, 1977.
- [46] K. J. Worsley, S. Marrett, P. Neelin, and A. Evans, “Searching scale space for activation in pet images,” *Human brain mapping*, vol. 4, no. 1, pp. 74–90, 1996.
- [47] K. J. Friston, C. Frith, P. Liddle, and R. Frackowiak, “Comparing functional (pet) images: the assessment of significant change,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 11, no. 4, pp. 690–699, 1991.
- [48] Á. Pardo, “Filtrado de imágenes.”
- [49] N. J. L. Pérez and C. R. Doñate, “Optimización de una arquitectura en fpga para filtros gaussianos en imágenes,” *JÓVENES EN LA CIENCIA*, vol. 2, no. 1, pp. 1344–1348, 2017.
- [50] J. Urban, N. K. Afseth, and D. Štys, “Fundamental definitions and confusions in mass spectrometry about mass assignment, centroiding and resolution,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 53, pp. 126–136, 2014.
- [51] E. W. Weisstein, “Gaussian function,” <https://mathworld.wolfram.com/>, 2002.
- [52] M. Jenkinson and M. Chappell, *Introduction to neuroimaging analysis*. Oxford University Press, 2018.
- [53] K. J. Friston, A. P. Holmes, K. J. Worsley, J.-P. Poline, C. D. Frith, and R. S. Frackowiak, “Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach,” *Human brain mapping*, vol. 2, no. 4, pp. 189–210, 1994.

- [54] K. J. Friston, A. P. Holmes, J. Poline, P. Grasby, S. Williams, R. S. Frackowiak, and R. Turner, “Analysis of fmri time-series revisited,” *Neuroimage*, vol. 2, no. 1, pp. 45–53, 1995.
- [55] J.-B. Poline and M. Brett, “The general linear model and fmri: does love last forever?” *Neuroimage*, vol. 62, no. 2, pp. 871–880, 2012.
- [56] J. Arnau, R. Bendayan, M. J. Blanca, and R. Bono, “Efecto de la violación de la normalidad y esfericidad en el modelo lineal mixto en diseños split-plot,” *Psicothema*, vol. 24, no. 3, pp. 449–454, 2012.
- [57] R. Christensen, *Plane answers to complex questions*. Springer, 2002, vol. 35, no. 1.
- [58] A. Andrade, A.-L. Paradis, S. Rouquette, and J.-B. Poline, “Ambiguous results in functional neuroimaging data analysis due to covariate correlation,” *Neuroimage*, vol. 10, no. 4, pp. 483–486, 1999.
- [59] A. Mechelli, C. J. Price, R. N. Henson, and K. J. Friston, “Estimating efficiency a priori: a comparison of blocked and randomized designs,” *Neuroimage*, vol. 18, no. 3, pp. 798–805, 2003.
- [60] W. D. Penny, K. J. Friston, J. T. Ashburner, S. J. Kiebel, and T. E. Nichols, *Statistical parametric mapping: the analysis of functional brain images*. Elsevier, 2011.
- [61] G. M. Boynton, S. A. Engel, and D. J. Heeger, “Linear systems analysis of the fmri signal,” *Neuroimage*, vol. 62, no. 2, pp. 975–984, 2012.
- [62] G. Rupert Jr *et al.*, *Simultaneous statistical inference*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [63] M. Brett, J.-L. Anton, R. Valabregue, J.-B. Poline *et al.*, “Region of interest analysis using an spm toolbox,” in *8th international conference on functional mapping of the human brain*, vol. 16, no. 2. Sendai, Japan, 2002, p. 497.
- [64] R. A. Poldrack, “Region of interest analysis for fmri,” *Social cognitive and affective neuroscience*, vol. 2, no. 1, pp. 67–70, 2007.
- [65] D. Ma, M. J. Cardoso, M. A. Zuluaga, M. Modat, N. M. Powell, F. K. Wiseman, J. O. Cleary, B. Sinclair, I. F. Harrison, B. Siow *et al.*, “Substantially thinner internal granular layer and reduced molecular layer surface in the cerebellar cortex of the tc1 mouse model of down syndrome—a comprehensive morphometric analysis with active staining contrast-enhanced mri,” *NeuroImage*, vol. 223, p. 117271, 2020.
- [66] D. Ma, M. J. Cardoso, M. A. Zuluaga, M. Modat, N. Powell, F. Wiseman, V. Tybulewicz, E. Fisher, M. F. Lythgoe, and S. Ourselin, “Grey matter sublayer thickness estimation in the mouse cerebellum,” in *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Springer, 2015, pp. 644–651.

- [67] S. Ourselin, A. Roche, S. Prima, and N. Ayache, “Block matching: A general framework to improve robustness of rigid registration of medical images,” in *International Conference on Medical Image Computing And Computer-Assisted Intervention*. Springer, 2000, pp. 557–566.
- [68] S. K. Warfield, K. H. Zou, and W. M. Wells, “Simultaneous truth and performance level estimation (staple): an algorithm for the validation of image segmentation,” *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 23, no. 7, pp. 903–921, 2004.
- [69] J. G. Sled, A. P. Zijdenbos, and A. C. Evans, “A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in mri data,” *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 17, no. 1, pp. 87–97, 1998.
- [70] M. Modat, G. R. Ridgway, Z. A. Taylor, M. Lehmann, J. Barnes, D. J. Hawkes, N. C. Fox, and S. Ourselin, “Fast free-form deformation using graphics processing units,” *Computer methods and programs in biomedicine*, vol. 98, no. 3, pp. 278–284, 2010.
- [71] M. J. Cardoso, K. Leung, M. Modat, S. Keihaninejad, D. Cash, J. Barnes, N. C. Fox, S. Ourselin, A. D. N. Initiative *et al.*, “Steps: Similarity and truth estimation for propagated segmentations and its application to hippocampal segmentation and brain parcelation,” *Medical image analysis*, vol. 17, no. 6, pp. 671–684, 2013.
- [72] L. Farràs-Permanyer, J. Guàrdia-Olmos, and M. Però-Cebollero, “Efecto del tamaño kernel en el suavizado de señal bold en paradigmas funcionales (rmf),” *Escritos de Psicología (Internet)*, vol. 8, no. 1, pp. 21–29, 2015.
- [73] F. Fanjul-Vélez, R. Pérez-Raba, I. Salas-García, and J. Arce-Diego, “Diagnóstico de patologías neurodegenerativas mediante procesado de imágenes de resonancia magnética: aplicación a la enfermedad de alzheimer,” *LIBRO DE ACTAS*, p. 387, 2015.
- [74] M. Martín-Carrasco, “Biomarcadores en la enfermedad de alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica,” *Psicogeriatría*, vol. 1, no. 2, pp. 101–114, 2009.
- [75] M. Chung, K. Worsley, T. Paus, C. Cherif, D. Collins, J. Giedd, J. Rapoport, and A. Evans, “A unified statistical approach to deformation-based morphometry,” *NeuroImage*, vol. 14, no. 3, pp. 595–606, 2001.
- [76] [Online]. Available: http://www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap4-7.htm
- [77] W. Mendehall and R. Beaver, *Introducción a la probabilidad y la estadística*. Herrero Hermanos Sucesores, 1972.
- [78] C. Hollands, “The animals (scientific procedures) act 1986.” *Lancet (London, England)*, vol. 2, no. 8497, p. 32, 1986.
- [79] A. W. Act, “Animal welfare act,” *Public Law*, pp. 89–544, 1966.
- [80] N. I. of Health *et al.*, “Phs policy on humane care and use of laboratory animals,” 2002.

- [81] N. R. Council *et al.*, *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press, 2010.