

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN**



GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

TRABAJO FIN DE GRADO

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE
ANÁLISIS AUTOMÁTICO Y OBJETIVO DE LA
PRUEBA LEDGED BEAM WALKING TEST EN
MODELOS ANIMALES DE ICTUS.**

AINHOA RUIZ VITTE

2022

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN**



GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

TRABAJO FIN DE GRADO

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE
ANÁLISIS AUTOMÁTICO Y OBJETIVO DE LA
PRUEBA LEDGED BEAM WALKING TEST EN
MODELOS ANIMALES DE ICTUS.**

Autora

AINHOA RUIZ VITTE

Tutores

**ÁLVARO GUTIÉRREZ MARTÍN
MARÍA GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ**

2022

Resumen

Este Trabajo de Fin de Grado aporta un sistema de análisis automático y objetivo de la prueba Ledge Beam Walking test, unas de las pruebas de evaluación de la capacidad motora más utilizadas en los modelos murinos de ictus.

La enfermedad cerebrovascular o ictus es la segunda causa de muerte en España y la primera de discapacidad en adultos, por lo tanto, es una prioridad para la comunidad científica desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que potencien la reparación cerebral. Para ello, se utilizan modelos de ictus en roedores como paso previo a la traslación al paciente. Para analizar los resultados de estas terapias experimentales se utilizan pruebas funcionales y de comportamiento que permiten analizar del déficit provocado por el ictus. Sin embargo, estas pruebas están sujetas a la subjetividad del evaluador, lo que supone una gran limitación en el avance de las investigaciones hacia el desarrollo de terapias protectoras y reparadoras, ya que complica la colaboración entre la comunidad científica.

Para eliminar este componente subjetivo, se diseña y construye una plataforma que permite parametrizar el Ledge Beam Walking test, y se incorpora un sistema de cámaras *GoPro* que graban la prueba. La prueba se realiza a 10 ratas antes del ictus y en distintas etapas después, que reflejan los grados del déficit neurológico a lo largo del estudio. Una vez obtenidos los vídeos, se utiliza un sistema de estimación postural basado en el aprendizaje de transferencia con redes neuronales profundas (*DeepLabCut*) para obtener las coordenadas de las extremidades contralaterales al ictus del animal, y que permiten analizar los vídeos de forma objetiva.

Una vez procesados los datos de posición, se desarrolla un programa en *Python* que permite generar una medida del deterioro neurológico del animal a partir de la aplicación de umbrales de detección y del análisis de la señal. Teniendo en cuenta estos datos, se estudia la relación entre la medida del déficit obtenida y el grado de la enfermedad y se observa que existe una correspondencia clara entre ambas. Por otra parte, se contrastan las medidas obtenidas mediante el programa desarrollado con las obtenidas por un investigador mediante el método tradicional de evaluación, y se comprueba que además de existir una buena correlación entre ambas, la medida obtenida proporciona un resultado más preciso y objetivo.

Palabras clave: DeepLabCut; Déficit neurológico; Ictus; Ledge Beam Walking test; Medida objetiva; Redes Neuronales Profundas.

Abstract

This BSc Thesis provides a system for the objective and automatic analysis of the Ledge Beam Walking test, one of the most used tests for the evaluation of functional motor ability in murine models of brain stroke.

The cerebrovascular disease or brain stroke is the second cause of death in Spain and the first one of disability affecting adult. Therefore, it is high priority for the scientific community to develop new therapeutic strategies which increase brain repair. To that end, rodent models of brain stroke are used as a preliminary step towards the treatment of patients. In order to analyze the results of these experimental therapies, the study subjects go through a battery of functional tests that allow the analysis of the deficit caused by the brain stroke. However, these tests are restricted by the evaluator's subjectivity, which constraints the progress towards the development of therapeutic approach for brain protection and recovery by complicating the collaboration within the scientific community.

To remove this subjectivity component, a platform is designed and constructed to parametrize the Ledge Beam Walking test by adding a *GoPro* camera system to record the test. The experiment is carried out with 10 rats during different phases: before the stroke and at different moments after the stroke. Once the videos are recorded, a pose estimation system based on transfer learning and deep neural networks (*DeepLabCut*) is used to obtain the coordinates of the animal's contralateral limbs' trajectory, which allows the objective analysis of the videos.

Once the spatial data is processed, a *Python* program is developed to generate a measure of the neurological deficit by applying detection thresholds and signal analysis algorithms. In this context, the relationship between the measure provided by the program and the degree of the disease is studied, and it is observed a clear correspondence between them. Finally, the measure obtained was compared to the one provided by a professional researcher through the traditional evaluation method. These results prove that, not only it exists a strong correlation between both, but also the measure provided by the system is more precise and objective.

Keywords: Brain stroke; DeepLabCut; Deep Neural Networks; Ledge Beam Walking test; Neurological deficit; Objective measurement.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Álvaro Gutiérrez y a María Gutiérrez, por darme la oportunidad de participar en este proyecto y por toda la colaboración, la ayuda y la orientación recibidos durante estos meses para que el resultado del TFG fuera lo mejor posible.

Asimismo, agradecer al Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del IdiPAZ, en especial a Fernando y a Lola, por toda su atención y sus aportaciones. Ha sido muy gratificante comprobar de primera mano que mis conocimientos pueden servir para contribuir a la evaluación de nuevas terapias experimentales para el ictus.

Finalmente, me gustaría también agradecer a mi familia y mis amigos, en especial a mis compañeros de piso y sobre todo a Pablo. Me han escuchado y apoyado siempre, especialmente cuando las cosas no funcionaban, y su ayuda ha sido muy importante para haber podido conseguir la finalización de este trabajo.

Índice general

Resumen	V
Abstract	VII
Agradecimientos	IX
Índice General	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tablas	XV
Lista de Acrónimos	XVII
1. Introducción y objetivos	1
1.1. El ictus. Amenaza social, sanitaria y económica	1
1.2. Modelos animales. El papel de la investigación traslacional	3
1.3. Objetivos	4
1.4. Organización del documento	5
2. Estado del Arte	7
2.1. Pruebas de Evaluación Neurológica	7
2.1.1. <i>Rotarod test</i> (Prueba de rodillos rotatorios)	7
2.1.2. <i>Staircase test</i> (Prueba de la escalera)	8
2.1.3. <i>Beam Walking test</i> (Prueba de equilibrio en barra)	9
2.1.4. <i>Ledged Beam Walking test</i> (Prueba de equilibrio en barra escalonada)	10
2.2. Estimación Postural y Análisis Cinemático del Movimiento	11
3. Metodología	15
3.1. Materiales y Métodos	15
3.2. Diseño y construcción del LBWT parametrizado	16
3.3. Desarrollo del sistema de cámaras	19
3.4. Ensayos con animales	21
3.5. Adquisición de vídeos	22
3.6. Entrenamiento de la red	23
3.6.1. Instalación de DLC	24
3.6.2. Creación y configuración del proyecto	25

3.6.3. Selección de datos	26
3.6.4. Etiquetado de datos	27
3.6.5. Creación de datos de entrenamiento	27
3.6.6. Entrenamiento y evaluación de la red	28
3.6.7. Análisis de resultados	29
3.7. Desarrollo del software de análisis del déficit	29
4. Resultados y Discusión	33
4.1. Entrenamiento de las redes y obtención de las posiciones	33
4.2. Procesamiento de las coordenadas de las posiciones	35
4.3. Estudio de la relación entre los parámetros y el déficit	37
4.4. Comparativa con los resultados obtenidos en el laboratorio	40
5. Conclusiones y Líneas Futuras	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Líneas futuras	44
Referencias	47
A. Aspectos éticos, económicos, sociales y ambientales	51
A.1. Introducción	51
A.2. Descripción de impactos relevantes relacionados con el proyecto	51
A.3. Conclusiones	52
B. Presupuesto económico	53

Índice de figuras

1.1. Secuelas más comunes del ictus	2
1.2. Distribución de las horas de cuidado semanales prestadas a personas diagnosticadas de ictus que padecen uno o varios tipos de discapacidad	3
2.1. Instrumentación para el <i>Rotarod test</i> en rata.	8
2.2. Instrumentación para el <i>Staircase test</i> en rata.	9
2.3. Instrumentación para el <i>Beam Walking test</i> en rata.	9
2.4. Instrumentación para el <i>LBWT</i> en rata.	10
2.5. Estimación postural usando DLC	13
2.6. Estimación postural usando <i>Anipose</i>	14
3.1. Plano de la estructura para LBWT parametrizado	16
3.2. Dimensiones de la barra utilizada en el LBWT.	17
3.3. Estructura final del LBWT parametrizado.	18
3.4. Sujeciones de las cámaras	19
3.5. Fotogramas de los vídeos obtenidos con el montaje de 2 cámaras.	20
3.6. Fotograma del vídeo obtenido con el montaje de 1 sola cámara.	21
3.7. Proceso de adquisición de vídeos.	23
3.8. Flujograma de trabajo con DLC	24
3.9. Fotograma antes y después del recorte.	26
3.10. Etiquetas seleccionadas.	27
3.11. Comparación entre la trayectoria filtrada y sin filtrar.	30
3.12. Proceso de segmentación de la barra, interpolación de las rectas y aplicación a la imagen original.	31
4.1. Gráfica que representa el índice de fotograma versus la probabilidad.	34
4.2. Histograma que refleja el desplazamiento en la detección consecutiva de etiquetas.	35
4.3. Trayectoria del extremo de la pata trasera izquierda del animal que ha sufrido un ictus frente a los umbrales de detección (92h).	36
4.4. Trayectoria del extremo de la pata trasera izquierda del animal sano frente a los umbrales de detección (basal).	36
4.5. Variación de los parámetros objetivos respecto al tiempo.	38
4.6. Variación del parámetro Ratio D respecto al tiempo.	39
4.7. Variación del parámetro Steps respecto al tiempo	40
4.8. Comparación de la variación de los parámetros Ratio D y Slip ratio frente al tiempo.	41

Índice de tablas

2.1. Extracto de la escala mNSS para el <i>Beam Walking test</i> en rata	11
3.1. Tabla de piezas de la estructura.	17
4.1. Resultados de evaluación de la red.	33
4.2. Tabla que contiene el valor medio y la desviación estándar de los parámetros objetivos.	38
4.3. Tabla que contiene los valores del parámetro Slip ratio obtenido por los profesionales del IdiPAZ.	41
4.4. Valores de los coeficientes de correlación de Spearman y de la signifi- cancia bilateral.	42
B.1. Costes de personal.	53
B.2. Costes de recursos materiales.	54
B.3. Coste del soporte.	54
B.4. Costes totales.	54

Lista de Acrónimos

CNNs: *Convolutional Neural Network* (Red neuronal convolucional).

CPU: *Central Processing Unit* (Unidad Central de Procesamiento).

DNN: *Deep Neural Network* (Red Neuronal Profunda).

GPU: *Graphics Processing Unit* (Unidad de Procesamiento Gráfico).

GUI: *Graphical User Interface* (Interfaz gráfica de usuario).

HIC: Hemorragia Intracraneal.

IdiPAZ: Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz.

LBWT: *Ledged Beam Walking test* (Prueba de equilibrio en barra escalonada).

MCAO: *Middle Cerebral Artery Occlusion* (Oclusión de arteria cerebral media).

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible.

TFG: Trabajo de Fin de Grado.

UPM: Universidad Politécnica de Madrid.

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1. El ictus. Amenaza social, sanitaria y económica

Cada 6 minutos se produce en España un nuevo caso de ictus. Con una incidencia de 200 casos por cada 100.000 habitantes, esta enfermedad provoca 40.000 muertes anuales, siendo la primera causa de mortalidad en mujeres y la segunda en hombres [1]. La enfermedad cerebrovascular o ictus está causada por un trastorno circulatorio que ocurre cuando, a causa de una isquemia o hemorragia, se interrumpe el flujo sanguíneo a un área del cerebro alterando de manera transitoria o definitiva el funcionamiento de una o varias partes del encéfalo. Según la naturaleza de la lesión, se clasifica en ictus isquémico (infarto cerebral) o ictus hemorrágico [2]. El ictus de tipo isquémico constituye entre el 80 % y el 85 % de las enfermedades cerebrovasculares [1]. Se origina ante la obstrucción aguda de una arteria por un trombo o coágulo de sangre que limita la perfusión e impide el transporte de oxígeno al cerebro, ya sea de forma transitoria, en el caso en el que haya una recanalización espontánea, o permanente. Dependiendo de dónde se forme el coágulo, y por lo tanto de la etiología de la enfermedad, existen distintos tipos de ictus isquémico, con distintos niveles de gravedad. El ictus hemorrágico constituye el 20 % de los casos restantes. Se produce ante la rotura de un vaso sanguíneo que desencadena una hemorragia cerebral. Podemos distinguir entre hemorragia intracraneal (HIC), si la rotura se produce en el parénquima o hemorragia subaracnoidea, si se produce en la superficie cerebral. Este tipo de afectación suele ser causa secundaria a factores como la hipertensión arterial, anticoagulantes o malformaciones congénitas [2].

Dependiendo del tipo de ictus y la zona cerebral afectada se producen distintos síntomas. Los más comunes son: debilidad muscular, dificultad para hablar, dolor de cabeza, pérdida de visión y hormigueo lateralizado. Estos síntomas pueden ser transitorios o permanentes dependiendo de la gravedad de la lesión producida [2].

Los pacientes que sobreviven a un primer ictus cuentan con un alto riesgo de sufrir un segundo en el intervalo de seis meses posteriores al primero [1]. De estos supervivientes, uno de cada tres queda completamente incapacitado [3]. En las siguientes dos semanas, de cada 10 pacientes; al menos 6 necesitan ayuda para

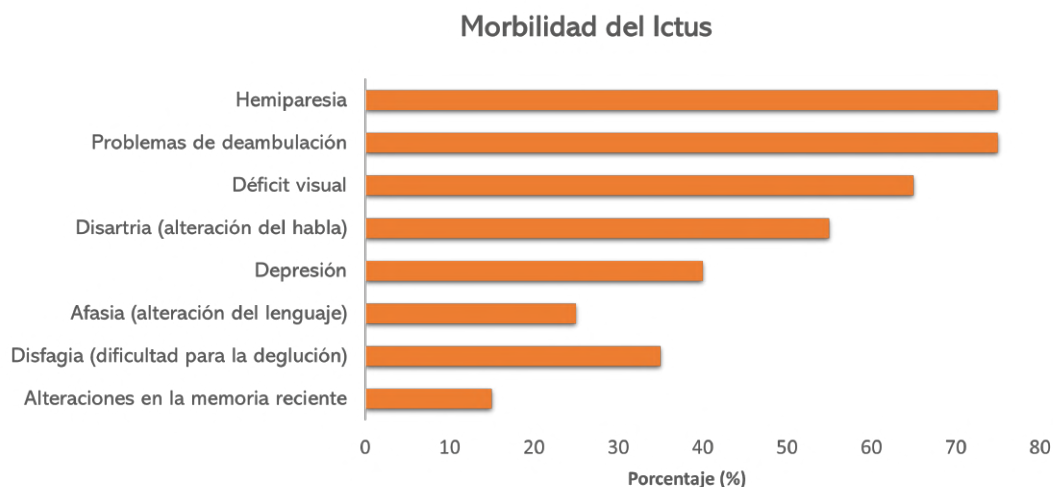


Figura 1.1: Secuelas más comunes del ictus [1].

la realización de actividades cotidianas, 8 presentan hemiparesia (disminución de la fuerza motora lateralizada), 7 presentan algún tipo de déficit visual y 2 alteraciones en la memoria reciente [1] (ver Figura 1.1). Actualmente, se estima que en España la cifra de incapacitados a causa de un ictus sea de aproximadamente 150.000 [3].

En vista de estos datos podemos afirmar que el ictus es la primera causa más común de discapacidad grave e invalidez en adultos, al ser responsable de más del 25 % de muertes documentadas a nivel mundial. Por ser una enfermedad que se desarrolla extremadamente rápido, ya que provoca graves lesiones cerebrales en cuestión de minutos [4], es la causa más frecuente de demanda asistencial de los servicios de urgencias y de ingresos hospitalarios por enfermedad neurológica. Como refleja la Figura 1.2, esto conlleva cargas socio-económicas importantes que hacen que el ictus sea uno de los principales focos de atención sanitaria [2]. En el ictus, el tiempo es cerebro, debido a que es una enfermedad en la que actuar rápidamente es crucial para salvar la mayor cantidad de tejido cerebral y limitar el daño.

Debido al creciente envejecimiento de la población europea, especialmente en España, la incidencia y carga provocadas por el ictus aumenta rápidamente. Según las estimaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se prevé que en 2050 el 46 % de la población esté constituido por mayores de 65 años, de los cuales aproximadamente un 25 % podrían sufrir un ictus [4]. Por ello, reducir la carga socio-económica que presenta esta enfermedad supone un reto prioritario tanto para los profesionales sanitarios como para la comunidad de neurocientíficos.

Pese a que el avance de la investigación y la medicina permiten un mejor control de los factores de riesgo vascular, actualmente en la práctica clínica los tratamientos son muy limitados. En el caso del ictus isquémico existen dos vías de tratamiento: la trombolisis intravenosa, que se debe aplicar dentro de las 4 horas y media desde

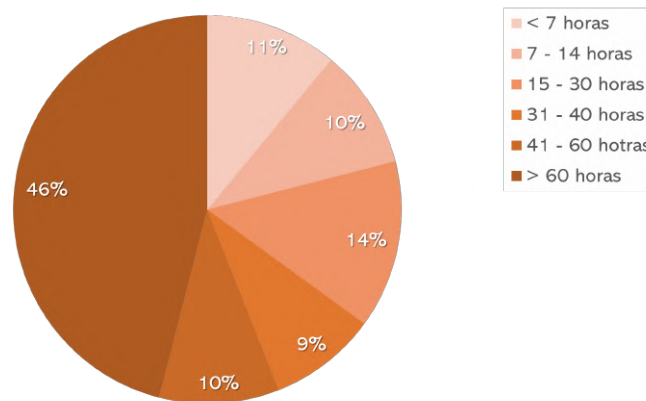


Figura 1.2: Distribución de las horas de cuidado semanales prestadas a personas diagnosticadas de ictus que padecen uno o varios tipos de discapacidad [5].

que se produce el ictus, y la trombectomía mecánica, que debe aplicarse dentro de las primeras 24 horas y únicamente a pacientes seleccionados. La trombolisis intravenosa consiste en la administración de un fármaco que disuelve el coágulo que obstaculiza la circulación sanguínea [6], mientras que la trombectomía mecánica consiste en la extracción mecánica del coágulo mediante el uso de catéteres endovasculares [7], lo que implica un riesgo en la salud del paciente. Es por ello que la trombectomía mecánica solo se aplica en casos agudos y en pacientes seleccionados. En el caso del ictus hemorrágico, la única estrategia terapéutica consiste en efectuar una craneotomía que permita liberar el sangrado y el edema dentro de lo posible.

Como vemos, la ventana terapéutica de las técnicas actuales es muy pequeña, y no todos los pacientes son subsidiarios de estas terapias de reperusión por presentar contraindicaciones o encontrarse fuera de esta ventana [2]. Por ello, es fundamental desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que potencien los procesos endógenos de reparación cerebral. De este problema nace el deseo urgente, tanto por parte de pacientes como de doctores y neurocientíficos, de identificar nuevos fármacos neurorreparadores que hagan posible el tratamiento del ictus y la limitación de sus consecuencias.

1.2. Modelos animales. El papel de la investigación traslacional

Con el fin de alcanzar este objetivo, en las últimas décadas se han realizado numerosos estudios para comprender los mecanismos implicados en el daño cerebral postisquémico [8]. Para ello, el papel de los modelos animales es crucial, ya que permiten probar distintas estrategias terapéuticas como paso previo a la traslación al paciente. Los modelos experimentales permiten llevar a cabo el estudio del daño del ictus en condiciones fisiológicas controladas y reproducibles, lo cual es imprescindible para comprender estos mecanismos y probar nuevas vías de tratamientos. Concretamente, los principales modelos animales de enfermedad cerebrovascular son

los modelos murinos (roedores). La elección de llevar a cabo los experimentos en roedores frente a otros animales viene justificada por los siguientes motivos: no solo presentan una mayor facilidad de manejo, monitorización fisiológica, y aceptación ética, sino que además cuentan con anatomía, fisiología y reactividad vascular similar a la humana. Estos factores, junto a su bajo coste económico, hacen de estos modelos los más adecuados para probar las diversas estrategias terapéuticas [3].

Según el mecanismo que se pretenda estudiar, existen distintos modelos de ictus. Uno de ellos es el modelo de HIC, que es el empleado para el desarrollo de este proyecto. Este modelo se basa en la inyección de colagenasa en el estriado mediante guía estereotáxica. Con esta metodología se obtienen hemorragias cerebrales con escasa variabilidad. Los animales son anestesiados con sevoflurano. Posteriormente se fijan a un sistema estereotáxico, y son sometidos a una craneotomía sobre el hueso parietal a la derecha de la sutura bregmática. Tras la exposición de la duramadre, se administra una inyección de 1 μ L de salino que contiene 0.5 U de colagenasa tipo IV [9]. La inyección se realiza tomando como referencia el bregma y estableciendo unas coordenadas (+0.4mm posterior, +3.5mm lateral, + 6mm ventral) lo que permite la inducción de la hemorragia intracerebral de localización constante. Siguiendo este procedimiento, se induce un ictus de HIC en el hemisferio derecho del animal.

Como se ha visto a lo largo de este Capítulo, el ictus causa secuelas neurológicas que van desde la hemiparesia hasta la disartria. Para pacientes en la clínica existen distintas escalas de evaluación neurológica, objetivas y fáciles de aplicar, que permiten estudiar la extensión del daño. De la misma manera, en animales se requieren escalas de evaluación funcional que, mediante el análisis de una serie de variables, permitan evaluar y ensayar las distintas estrategias terapéuticas. Para ello se emplean diferentes pruebas de evaluación neurológica, que varían según la variable que se pretenda estudiar. En el Capítulo 2 se realiza una revisión sobre las pruebas de evaluación neurológica más utilizadas en modelos murinos de ictus, analizando sus principales ventajas y desventajas. De manera introductoria, una de las pruebas más utilizadas es el LBWT (*Ledged Beam Walking test*, Prueba de equilibrio en barra escalonada) que permite evaluar, aunque de manera subjetiva, la capacidad motora del animal, que está directamente relacionada con el déficit neurológico.

1.3. Objetivos

En vista de la información presentada, este Trabajo de Fin de Grado (TFG) tiene como objetivo principal el desarrollo e implementación de un sistema de evaluación automático aplicado a la prueba de LBWT que proporcione una medida objetiva del déficit neurológico y motriz causado por el ictus. Este objetivo principal se divide en los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un entorno de evaluación que mejore el estándar y permita la parametrización de la prueba.

- Desarrollo del *software* de análisis de resultados y generación de la medida objetiva del déficit neurológico y motor.

Mediante estos objetivos se pretende parametrizar la prueba de LBWT con un sistema basado en cámaras que permita evaluar la capacidad motora del animal y por lo tanto el grado de deterioro cerebral. Este proyecto pretende solucionar uno de los principales problemas a los que se encuentran sujetas las pruebas de comportamiento y evaluación funcional actualmente: la subjetividad del observador, que ralentiza el avance de la investigación en tratamientos terapéuticos del ictus. Además, el uso de esta herramienta reduciría significativamente la curva de aprendizaje de los investigadores a la hora de realizar las evaluaciones experimentales de modelos animales por observación. Por lo tanto, aportará a los neurocientíficos una nueva herramienta para la evaluación del déficit y la sintomática ocasionados por el ictus, y que permitirá obtener datos objetivos complementarios a los obtenidos por los experimentadores en el laboratorio.

Este Trabajo de Fin de Grado se enmarca en un proyecto de colaboración entre el Laboratorio de Robótica y Control del Departamento de Tecnología Fotónica y Bioingeniería de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) con el Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ).

1.4. Organización del documento

El documento cuenta con la siguiente organización:

- Capítulo 2: Exposición del estado del arte. En el primer apartado se hace una revisión de las pruebas de evaluación neurológica de modelos animales de ictus más relevantes, y en el segundo se comentan las herramientas actuales para la estimación postural y el análisis cinemático del movimiento.
- Capítulo 3: Se detalla la metodología del TFG. Se explican los *softwares* utilizados, el proceso de diseño de la estructura, la implementación del sistema de cámaras al entorno y el proceso de toma y análisis de los datos.
- Capítulo 4: Se exponen y analizan los resultados obtenidos
- Capítulo 5: Se plantean las conclusiones extraídas del proyecto y se proponen líneas futuras.
- Anexo A: Se valora el impacto social, económico, ético y medioambiental.
- Anexo B: Se estima el presupuesto económico.

Capítulo 2

Estado del Arte

2.1. Pruebas de Evaluación Neurológica

Para analizar los mecanismos implicados en el ictus y poder desarrollar nuevas terapias clínicas, es crucial el papel que desempeñan los estudios en modelos murinos. Para evaluar estas terapias experimentales, que tienen como objetivo minimizar o revertir el daño cerebral, es necesario utilizar pruebas de evaluación neurológica que proporcionen información sobre la recuperación del animal después del ictus. Para ello, se han desarrollado distintas pruebas de comportamiento que permiten llevar a cabo una evaluación funcional del animal mediante el análisis de los síntomas provocados por el daño isquémico: el deterioro sensorial, motor y cognitivo en distintos grados. Mediante el análisis de estos, es posible estimar el grado de recuperación en los modelos animales y evaluar el pronóstico neurológico final, lo que permite valorar terapias reparadoras experimentales a largo plazo [10].

La selección de la prueba adecuada es extremadamente importante para evaluar correctamente el tratamiento experimental y depende del tipo de modelo y de la función que se desee evaluar. Por el objetivo de este TFG, nos centraremos en las pruebas principales de evaluación de la función sensorimotora en ratas de modelo MCAO (*Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion*, Oclusión intraluminal de la arteria cerebral media) y modelo de HIC.

2.1.1. *Rotarod test* (Prueba de rodillos rotatorios)

Esta prueba permite evaluar la coordinación motora y el balance del animal. Consiste en colocar al animal sobre unos rodillos rotatorios (Ver Figura 2.1) cuya velocidad aumenta gradualmente en intervalos [11], lo que hace que se vuelva cada vez más difícil para el roedor permanecer en los rodillos y mantener el ritmo. Para evaluar los síntomas, se mide o bien la velocidad máxima a la que el animal logra mantenerse en los rodillos durante un cierto intervalo de tiempo, o bien el tiempo que tarda en caerse en función de las distintas velocidades.

A pesar de que se ha demostrado que esta prueba proporciona una alta sensibilidad en modelos en ratas, también presenta limitaciones que afectan a la calidad de los

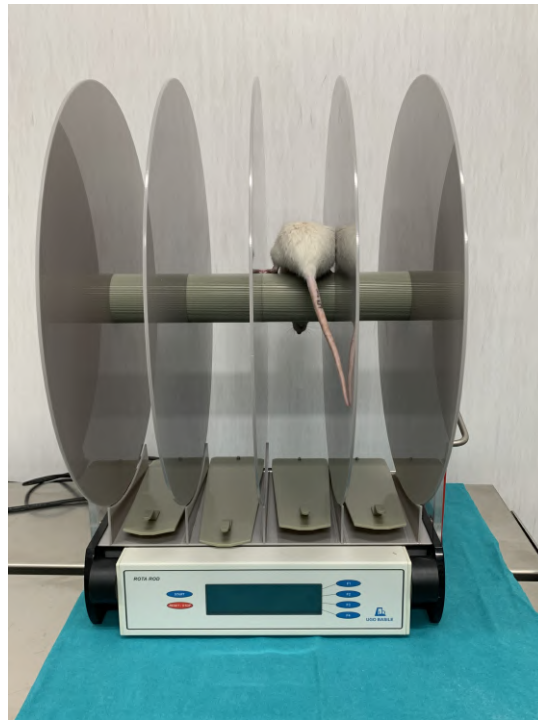


Figura 2.1: Instrumentación para el *Rotarod test* en rata.

resultados. En primer lugar, el roedor desarrolla una tendencia a agarrarse a la barra cuando pierde el equilibrio, lo que hace que gire de forma pasiva junto a los rodillos y dificulta la evaluación. En segundo lugar, como comportamiento derivado del aprendizaje, el animal adopta la costumbre de dejarse caer voluntariamente como actitud negativa a realizar la prueba, impidiendo obtener medidas. En tercer lugar, la ejecución de la prueba se ve afectada por el peso del roedor, de manera que los más ligeros obtienen mejor resultado, lo que añade un sesgo a los resultados que es importante tener en cuenta [10].

2.1.2. *Staircase test* (Prueba de la escalera)

Este experimento permite evaluar la función motora y uso de las extremidades en modelos experimentales de MCAO a largo plazo para rata y ratón [12]. El sistema está compuesto por una cámara, un pasillo estrecho y unas pequeñas escaleras a ambos lados del pasillo. Sobre cada peldaño de estas escaleras se colocan gránulos de comida, de manera que el roedor caminará por el pasillo y tratará de agarrar estos gránulos [12]. Así, la prueba permite evaluar tanto la coordinación motora del animal como el uso independiente de las extremidades. De la misma manera que la prueba anterior, esta requiere un entrenamiento previo intensivo del animal.

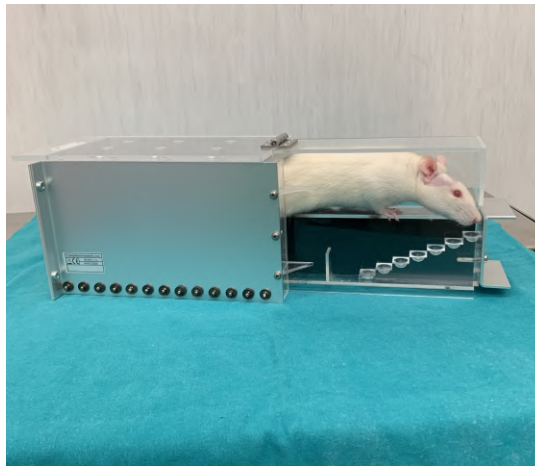


Figura 2.2: Instrumentación para el *Staircase test* en rata.

2.1.3. *Beam Walking test* (Prueba de equilibrio en barra)

La prueba del *Beam Walking test* permite evaluar la coordinación motora del animal, y proporciona una alta sensibilidad a largo plazo en modelos de ictus [11]. Consiste en hacer que el animal atraviese unas barras estrechas para llegar a una plataforma, y medir tanto los resbalones del roedor como el tiempo requerido para cruzarlas. Esta prueba requiere un entrenamiento previo para motivar al animal a cruzar la barra y obtener valores de referencia que puedan servir para comparar con los resultados postisquémicos [11].

Esta prueba se puede aplicar a distintos modelos, tanto transitorios como permanentes MCAO, y ha demostrado proporcionar resultados fiables de correlación entre protección y mecanismos de migración neuronal [10]. Sin embargo, debido a que es una prueba utilizada para la evaluación a largo plazo, derivadas del aprendizaje, el animal puede desarrollar estrategias compensatorias difíciles de detectar que hacen que sea difícil discernir de manera fiable los síntomas de reparación cerebral.



Figura 2.3: Instrumentación para el *Beam Walking test* en rata.

2.1.4. *Ledged Beam Walking test* (Prueba de equilibrio en barra escalonada)

La prueba es muy similar a la anterior, pero con una reciente y pequeña modificación que mejora la fiabilidad de los resultados. El mecanismo es el mismo, pero a la barra se le introduce una cornisa o escalón que evita que el animal se resbale por completo. De esta manera, se reduce la posibilidad de que el roedor elabore las estrategias compensatorias que desarrolla en el *Beam Walking test*.



Figura 2.4: Instrumentación para el *LBWT* en rata.

De la misma manera, el roedor atraviesa la barra para llegar a una plataforma o caja aislante mientras que uno o dos observadores evalúan los resbalones del animal. Es decir, se miden las veces que la pata trasera del animal desciende del nivel superior al inferior. La barra es más ancha en el extremo inicial y se estrecha gradualmente, poniendo a prueba la coordinación motora del animal. Los síntomas de déficit motor serán visibles en la extremidad contralateral al hemisferio en el que se realice el ictus. Por lo tanto, esta prueba permite evaluar déficit en las extremidades anteriores y posteriores contralaterales causado por la lesión e inferir el grado de neuroreparación, para así poder evaluar la efectividad del tratamiento experimental [13].

Para medir el déficit neurológico a partir de los síntomas sensorimotores se utilizan distintos tipos de escalas que evalúan los efectos motores del ictus y que, dependiendo de la gravedad de los síntomas, asignan una puntuación. A continuación, en la Tabla 2.1 se muestra un extracto de la escala convencional utilizada, la mNSS (*Modified Neurological Severity Scale*, Escala Modificada de Severidad Neurológica) para el Beam Walking Test en ratas [10].

Test de equilibrio en barra (normal = 0; máximo = 6)	0-6 ^a
Equilibrio con una postura estable	0
Agarra un lado de la barra	1
Abraza la barra y una extremidad cae por debajo de la barra	2
Abraza la barra y dos extremidades caen/giran la barra (> 60s)	3
Intentos de equilibrio en la barra, pero se cae (> 40s)	4
Intentos de equilibrio en la barra, pero se cae (> 20s)	5
Se cae: ningún intento de equilibrio o agarre a la barra (< 20s)	6

Tabla 2.1: Extracto de la escala mNSS para el *Beam Walking test* en rata [10].

A pesar de contar con escalas neurológicas y protocolos detallados, estas pruebas cuentan con una gran desventaja al estar sujetas a la subjetividad del evaluador, así como al estar expuestas a múltiples variables que hace que exista una gran variabilidad en los resultados. Aunque los observadores estén entrenados para reconocer ciertos patrones de movimiento, hacer una evaluación visual del desarrollo de la prueba es un proceso laborioso que conlleva una gran curva de aprendizaje y que puede conducir a fallos que restan fiabilidad a los resultados.

Esto tiene un enorme impacto en el avance de las investigaciones en el desarrollo de terapias protectoras y reparadoras, puesto que la subjetividad de los resultados complican la colaboración entre la comunidad científica y el avance uniforme hacia resultados fiables y consistentes. Por ello, todavía no se puede afirmar que el objetivo de lograr que estas pruebas proporcionen información suficiente para facilitar el salto traslacional a la práctica clínica, se haya logrado con totalidad.

2.2. Estimación Postural y Análisis Cinemático del Movimiento

La cuantificación del movimiento es crucial para el estudio y comprensión del comportamiento animal. Gracias a los avances en algoritmos de visión artificial, procesamiento de imágenes e inteligencia artificial, se han desarrollado distintas herramientas que permiten capturar el movimiento y proporcionar un seguimiento de la marcha automático y preciso sin necesidad de emplear marcadores sobre el animal. Esta es una de las grandes ventajas que estos nuevos sistemas de seguimiento aportan frente a los anteriores, puesto que el uso de marcadores a la hora de trabajar con modelos animales no resulta práctico, particularmente al trabajar con animales pequeños o al estudiar un número alto de etiquetas corporales [14].

Los modelos de *Deep Learning* (Aprendizaje Profundo) han evolucionado rápidamente en los últimos años hacia el desempeño de tareas discriminatorias como las tareas de seguimiento y de estimación postural. Esto ha sido posible gracias tanto al desarrollo de nuevas arquitecturas de DNNs (*Deep Neural Networks*, Redes Neuronales Profundas), como a la mejora en elementos de computación como unidades de procesamiento gráfico (GPU), y paquetes de código como *TensorFlow* y *PyTorch* [15, 16]. Las DNNs son un conjunto de algoritmos computacionales organizados en

capas, con un gran número de capas ocultas entre las de entrada y salida. Las conexiones entre estas están definidas por pesos que se entrenan a partir de los datos de entrada y aprenden a extraer información y resolver tareas [17].

Este desarrollo computacional y tecnológico supone la apertura de una nueva vía en la experimentación neurocientífica mediante el estudio de métodos de comportamiento y estimación postural. Los autores *Mackenzie Weygandt Mathis* y *Alexander Mathis* identifican los principales requisitos que debe cumplir una buena herramienta de estimación basada en DNNs [14]:

Tamaño de la muestra: Uno de los principales retos consiste en desarrollar una estructura que sea funcional y proporcione una buena generalización a partir de un conjunto de datos pequeño, a escala del trabajo experimental que se puede realizar en el laboratorio. Para ello se emplea el concepto de aprendizaje de transferencia; una metodología de *Deep Learning* (Aprendizaje Profundo) en la que, para el desarrollo de una cierta tarea, se emplea un modelo pre-entrenado para una tarea similar como punto de partida [18]. De esta manera, se usan redes que han sido pre-entrenadas para reconocimiento y clasificación de imágenes con conjuntos de datos de mayor tamaño, como *ImageNet*, *ResNet* o *MobileNet*. Asimismo, se consigue reducir tanto el coste temporal como computacional del proceso.

Obtención de resultados rápidos y precisos: Para la traslación de estos algoritmos a la experimentación neurocientífica, es importante que el algoritmo proporcione resultados de al menos la misma precisión que la que proporcionaría experimentalmente un evaluador en un laboratorio. No solo esto, sino que además el proceso de entrenamiento y análisis debe ser rápido para poder obtener resultados de manera eficiente. Esto se consigue variando la profundidad de la red, es decir, el número de capas, orientando la estructura a una *Convolutional Stacked-Hourglass Network* (Red convolucional de reloj de arena apilada) como *MobileNet* [19]. Este tipo de arquitectura es la que emplea la herramienta *DeepPose* desarrollada por *Toshev et al.* [20], que permite extraer información acerca de la imagen a distintas escalas e integrarla para proporcionar predicciones píxel a píxel. Sin embargo, aunque reducir la profundidad de la red proporciona mayor velocidad, implica una peor generalización en los resultados. Por esto, es importante buscar un equilibrio entre estos parámetros. Por ejemplo, *DeepLabCut* (DLC), es una herramienta de estimación postural desarrollada por el grupo de *Mathis et al.* [21], en la que profundizaremos en el Capítulo 3, que utiliza *ResNets*; redes más profundas que a pesar de ser más lentas que las *Convolutional Stacked-Hourglass Network*, proporcionan una predicción más precisa.

Robustez de los resultados: Un conjunto de datos obtenido a partir de ensayos experimentales suele consistir en grabaciones de vídeo que tienden a contener variaciones debido a que se toma una gran cantidad de información a lo largo de un amplio periodo de tiempo, por lo que puede presentar pequeñas diferencias tanto en el montaje experimental (fondo, luces, tipo de cámara) como en el animal que realiza la prueba. Por lo tanto, es importante que la red proporcione resultados

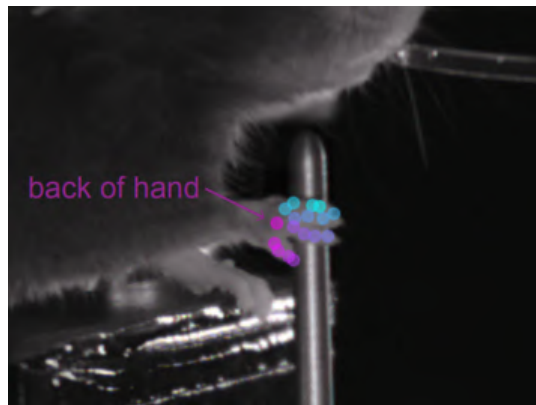


Figura 2.5: Estimación postural usando DLC [21]

consistentes a pesar de estas perturbaciones. Para lograr este objetivo, de nuevo la respuesta es aplicar el concepto de aprendizaje de transferencia junto al uso de técnicas de *data augmentation* (aumento de datos) [15]. Al contar con un conjunto de datos reducido, el concepto de *data augmentation* adopta el enfoque de generar más datos de entrenamiento a partir de la aplicación de transformaciones aleatorias sobre los datos disponibles [22]. Otra de las maneras de lograr mejorar la robustez del algoritmo consiste en conseguir que el conjunto de datos sea completo y contenga un conjunto de datos que reflejen el mayor número de variaciones posible.

Flexibilidad: Los experimentos de comportamiento neurocientíficos pueden contener más de un animal y suele existir una interacción entre el animal y un cierto elemento que sea objeto de estudio (por ejemplo, la capacidad de un roedor de agarrar un objeto (ver Figura 2.5)) [21]. Para ello, muchas de las herramientas basadas en CNNs (*Convolutional Neural Networks*, Redes Neuronales Convolucionales) toman de partida redes pre-entrenadas, ya que, como se ha mencionado anteriormente, proporcionan mejores resultados. Un ejemplo de herramienta que emplea esta técnica es *Tracktor* desarrollado por V. Sridhar *et al.* [23]. Este algoritmo permite realizar un seguimiento de un animal en un entorno ruidoso o incluso etiquetar varios objetos distintos en un entorno uniforme, manteniendo la individualidad entre cada uno de los sujetos. Es decir, es capaz de etiquetar distintos animales en distintos entornos sin empeorar el resultado.

Por ser eficaz y preciso en todos estos aspectos, utilizamos DLC como herramienta de estimación postural ya que permite evaluar la posición del sujeto sin necesidad de utilizar marcadores físicos sobre el animal (ver Figura 2.5). Entre las ventajas que presenta este programa, una de las más destacadas es que permite obtener muy buenos resultados a partir de un conjunto de datos pequeño (entre 50 y 200 imágenes) y variado [15].

Contar con un buen algoritmo de estimación postural y seguimiento es imprescindible para proporcionar una buena base para el posterior análisis cinemático. Este análisis completaría la cuantificación del movimiento, tan importante en el estudio

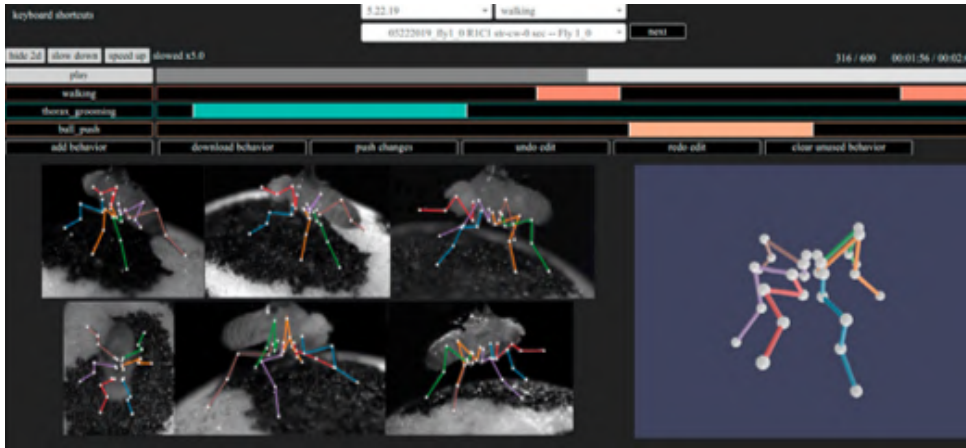


Figura 2.6: Estimación postural usando *Anipose* [14]

de la locomoción en neurociencia. Como se ha comentado a lo largo de esta sección, gracias al importante avance en *Machine Learning* (Aprendizaje Automático) y *Deep Learning*, se han desarrollado distintas herramientas que permiten el análisis de parámetros cinemáticos tanto angulares como lineales. Un ejemplo claro de este desarrollo es ALMA (*Automated Limb Motion Analysis*, Análisis Automático del Movimiento de las Extremidades), una herramienta que mediante el análisis de la marcha del roedor, permite extraer parámetros cinemáticos en modelos animales de esclerosis múltiple. Sin embargo, esta herramienta de post-procesamiento de datos continúa en fase de desarrollo. A partir de una estimación postural obtenida del programa DLC, extrae 44 parámetros que permiten relacionar el posicionamiento de la para con el nivel de deterioro en la espina dorsal [24]. Para ello, emplea algoritmos de *Machine Learning* como RF (*Random Forest Classification*) y PCA (*Principal-Component Analysis*).

Anipose es otra de las herramientas que permite cuantificar el movimiento del animal a partir de la integración de los parámetros de estimación postural obtenidos de DLC. Más allá de los modelos en roedores, también encontramos programas como *DeeplFly3D*, basado en modelos de *Drosophila*, permite obtener los ángulos articulares y los parámetros derivados de estos (ver Figura 2.6). Otra de las herramientas más destacadas que se suma al análisis del movimiento y comportamiento es *DANNCE*, desarrollada por *T. Dunn et al.* [25], que mediante geometría proyectiva permite realizar un seguimiento anatómico tridimensional e inferir los parámetros cinemáticos de interés.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Materiales y Métodos

El primer paso en el desarrollo del LBWT parametrizado es la elección de las tecnologías que se van a utilizar. En primer lugar, se deciden utilizar perfiles de aluminio para crear la estructura de soporte de la prueba, por su facilidad de uso entre otros motivos. La siguiente tecnología que se decide utilizar es el programa DLC [21], que permite entrenar redes neuronales y obtener buenos resultados a partir de un conjunto de datos reducido de manera fácil e intuitiva. Por último, se utilizará el lenguaje de programación *Python* para realizar el procesamiento de los datos obtenidos por la red y el posterior estudio y análisis de estos, con el fin de generar una medida del déficit neurológico del animal.

Este capítulo tiene como objetivo explicar las fases seguidas para el desarrollo del proyecto. Para ello, se divide la metodología en las siguientes etapas:

1. Diseño y construcción de una estructura que permita parametrizar el LBWT, basado en un diseño inicial.
2. Implementación de un sistema de cámaras *GoPro Hero 8* que permita capturar el movimiento del animal.
3. Ensayos en el IdiPAZ con los animales.
4. Adquisición del conjunto vídeos para el entrenamiento y análisis de la red en el IdiPAZ.
5. Entrenamiento de la red neuronal para la estimación de la posición de las extremidades izquierdas del animal en los vídeos.
6. Desarrollo de un programa en *Python* que permita procesar los datos obtenidos, analizar los parámetros de interés y generar la medida objetiva.

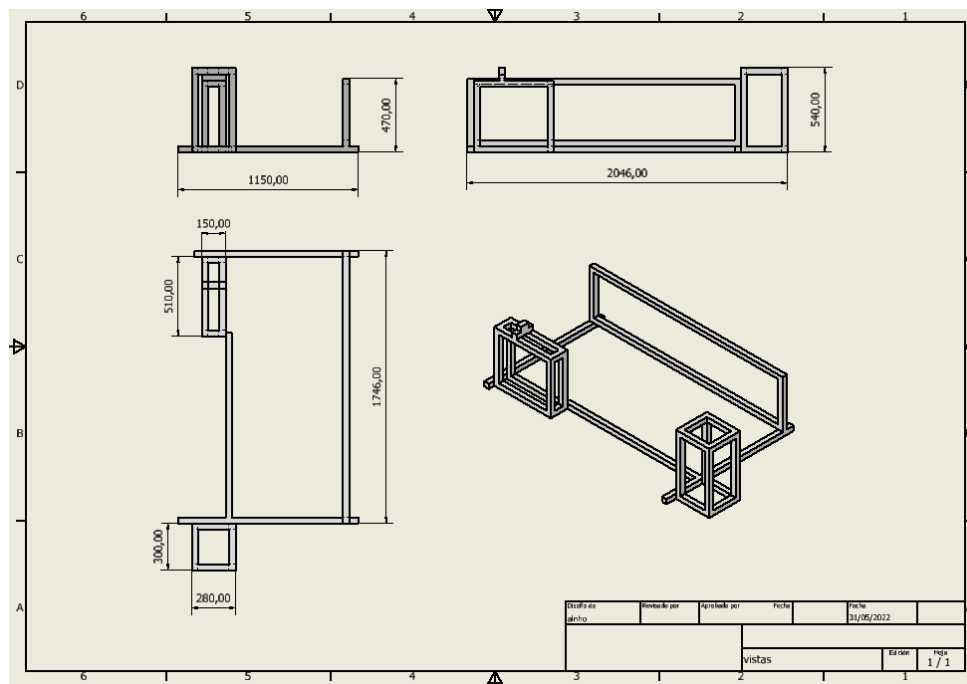


Figura 3.1: Plano de la estructura para LBWT parametrizado.

3.2. Diseño y construcción del LBWT parametrizado

Comenzamos el proyecto con el diseño de un sistema de medida objetiva para la automatización de la prueba LBWT de evaluación funcional en modelos murinos. Como se introdujo en el Capítulo 1, estos modelos se refieren al uso de cepas especiales de roedores para el estudio de enfermedades. En concreto, en este proyecto utilizamos modelos de rata con HIC, que permiten estudiar los mecanismos cerebrales que envuelven el ictus así como probar y evaluar nuevas terapias experimentales neurorregadoras. En la Sección 3.4 se explica más detalladamente el procedimiento seguido para el trabajo con estos animales.

Para el desarrollo del LBWT parametrizado partimos de un diseño inicial que incluía un soporte para los elementos de la prueba: una caja aislante y una viga de madera escalonada estandarizada [11]. Para ajustar este diseño a las necesidades del proyecto se realizaron una serie de modificaciones. La estructura, además de soportar los elementos de la prueba, debía a la vez ser estable y desmontable de manera que ocupara el menor espacio posible en las instalaciones. Además, era importante que permitiera una cierta flexibilidad respecto al número de cámaras y distancia entre la cámara y el animal. En base a esto, se desarrolló el diseño final de la estructura utilizando el programa *Autodesk*, que se muestra en la Figura 3.1.

Para construir este diseño se utilizaron los siguientes materiales:

- Perfiles Bosch de aluminio anodizado de 40x40 cm de los siguientes tamaños (Tabla 3.1):

Módulo	Longitud (cm)	nº piezas
Soporte de la caja	8	3
	26	4
	46	4
Soporte de la barra	7	5
	15	1
	43	4
	42	4
Unión de ambos módulos de soporte	56	1
Guías deslizamiento del módulo de cámaras	115	2
Soporte de cámaras	59	2
	43	2

Tabla 3.1: Tabla de piezas de la estructura.

- 24 escuadras regulares y 4 escuadras interiores.
- 48 tornillos para escuadra regular y 8 tornillos para escuadra interior.
- Una viga madera escalonada de las dimensiones mostradas en la Figura 3.2 (en milímetros):

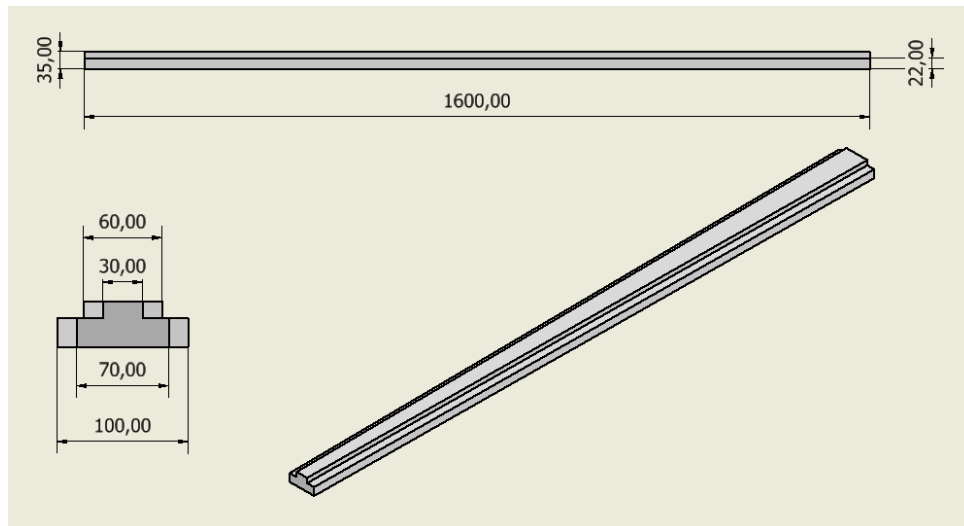


Figura 3.2: Dimensiones de la barra utilizada en el LBWT.

- Una caja aislante de 24cm de alto y 26cm de largo y de ancho.

El presupuesto de construcción de esta estructura se encuentra detallado en el Apéndice B.

Se decidió utilizar perfiles de aluminio por distintos motivos. En primer lugar, son muy sencillos de trabajar, almacenar y transportar, ya que debido a su forma es

sencillo emparejarlos. Además, son ligeros y a la vez permiten un soporte robusto y resistente para los elementos de la prueba. En la Figura 3.3 se muestra el resultado de la construcción de la estructura:



Figura 3.3: Estructura final del LBWT parametrizado.

El objetivo era construir una estructura que soportara los elementos del LBWT de manera que se mantuvieran en una posición fija y que permitiera parametrizar la prueba. A su vez, esta estructura debía ser desmontable en módulos para que los profesionales del centro fueran capaces de desmontarla fácilmente para almacenarla y volverla a montar rápidamente cuando fuera necesario.

La estructura está compuesta principalmente por dos módulos: el módulo de soporte de los elementos (soporte de la caja y soporte de la barra), y el módulo de soporte del sistema de cámaras. Ambos módulos están conectados por dos perfiles que actúan como carriles, de manera que permiten variar la distancia a la que la prueba sea grabada. Esto aporta una gran flexibilidad ya que permite que, en el caso en el que hubiera que cambiar de modelo o de número de cámaras, la estructura continúe siendo funcional.

Para facilitar y agilizar el montaje y desmontaje de la estructura, se incluyó un código de colores que se acordó con los investigadores del centro para hacer este proceso lo más sencillo e intuitivo posible. Se marcaron con distintos colores (azul, negro y rojo) los perfiles pertenecientes a los distintos módulos. Además, para las uniones que fueran desmontables se utilizaron escuadras interiores y tornillos que pueden apretarse o aflojarse fácilmente utilizando una llave Allen. Para mayor claridad, se marcaron los 5 tornillos que deben ser aflojados o apretados para desacoplar o acoplar la estructura respectivamente.

Por otro lado, para asegurar que la estructura se monta siempre de la misma manera y los elementos se fijan en la misma posición se marcaron las uniones entre los módulos y las distancias a las que hay que colocar la estructura para los distintos montajes (1 o 2 cámaras), que se explican en más detalle en la Sección 3.3. Esto

es importante porque, para la parametrización de la prueba, es conveniente que los elementos se mantengan siempre en la misma posición ya que facilitará el posterior procesamiento de los datos obtenidos de los vídeos.

Por último, para poder añadir el sistema de cámaras a la estructura, fue necesario diseñar y construir unos soportes que pudieran conectarse a los perfiles y soportar las cámaras. Para ello se utilizó la herramienta *TinkerCAD* para diseñar una pieza que incluye unas ranuras que facilitan la sujeción de la cámara, y un orificio que permite la unión al perfil utilizando una escuadra interior como elemento intermediario. La pieza se fabricó mediante impresión 3D como se muestra en la Figura 3.4.

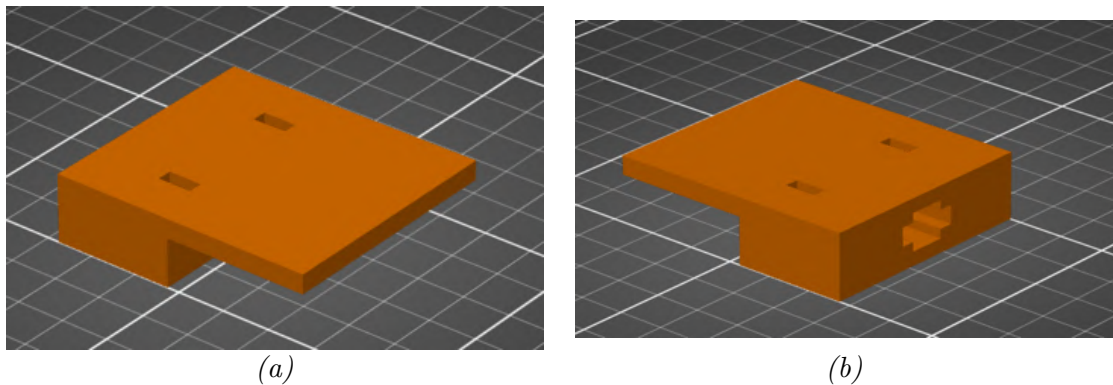


Figura 3.4: Sujeciones de las cámaras.

3.3. Desarrollo del sistema de cámaras

El LBWT parametrizado se realiza mediante la colocación de un sistema de cámaras que capturan el movimiento de la rata desde el lado contralateral al ictus, en este caso, acorde con el modelo de HIC especificado en el Capítulo 2, el izquierdo. De esta manera es posible parametrizar su movimiento y obtener una medida del número de resbalones que representan el grado de daño neurológico causado por el ictus. Se consideraron dos enfoques distintos:

- Colocación de una única cámara a 65 cm, con un objetivo lineal que graba toda la extensión de la barra.
- Colocación de dos cámaras a 40 cm de la barra y con una separación de 65cm entre ellas, con un objetivo lineal que graba la mitad de la barra de manera que entre 2 cámaras se captura la barra completa.

Cada una de estas dos disposiciones contaban con sus propias ventajas y desventajas. Por un lado, el hecho de utilizar una única cámara y obtener un único vídeo facilitaba el posterior procesamiento del mismo. Sin embargo, los puntos de interés (las extremidades anteriores y posteriores izquierda de la rata) son muy pequeños y por lo tanto difíciles de observar con suficiente resolución espacial a gran distancia (ver Figura 3.6).

Por otro lado, utilizar dos cámaras solventaría este problema, ya que al estar colocadas mucho más cerca del animal proporciona una mejor resolución en el vídeo. Pero, volvemos a la primera cuestión, utilizar dos cámaras implicaría la obtención de dos vídeos distintos del mismo experimento, lo que complicaría el procesado de las imágenes (ver Figura 3.5).

Por consiguiente, previo al desarrollo del modelos de HIC sobre los animales, se tomaron algunos vídeos de prueba empleando ambos montajes. Estos vídeos fueron utilizados para entrenar dos modelos diferentes de redes neuronales, empleando DLC y siguiendo el procedimiento detallado posteriormente en la Sección 3.6. Estos modelos de prueba provisionales permitieron comprobar que ambos montajes proporcionaban buenos resultados, y confirmaron que el montaje de 2 cámaras proporcionaba una mejor resolución espacial a la hora de etiquetar las extremidades del animal, mientras que el montaje de 1 cámara facilitaba el posterior procesamiento de datos a la vez que proporcionaba buenos resultados. Por ello y por la limitación temporal de este TFG, se decidió trabajar únicamente con el montaje de 1 cámara, y dejar abierta como línea futura del proyecto la obtención de la medida del déficit implementando el segundo montaje.

El modelo de cámara utilizado para este proyecto es la *GoPro HERO 8 Black*. Esta permite grabar vídeos en 4K a 60 fps bajo distintos ángulos de visión. En este proyecto, se utilizó el foco lineal, ya que permite grabar la extensión completa de la barra y por lo tanto, la trayectoria del animal durante la prueba, sin distorsionar la imagen. Para encender y apagar la cámara se utilizó el mando a distancia *Wi-Fi Remote* de *GoPro*. De esta manera, se posibilita que el evaluador pueda colocar al animal en la prueba y encender la cámara simultáneamente. Además, el mando permite sincronizar varias cámaras, lo que resulta de gran utilidad a la hora de grabar adquirir los vídeos con más de una cámara.

Debido a que el ictus se realiza en el hemisferio derecho, los síntomas de déficit motor serán visibles en la extremidad contralateral al hemisferio en el que se realice el ictus, es decir, en las extremidades izquierdas. Por ello, se coloca la cámara de manera que permita grabar el perfil izquierdo del animal.

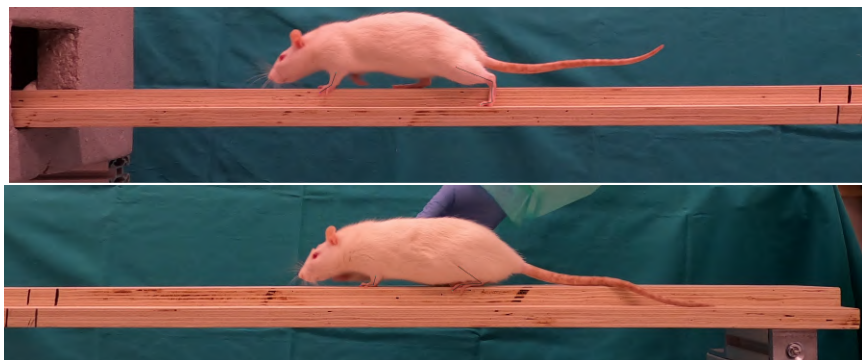


Figura 3.5: Fotogramas de los vídeos obtenidos con el montaje de 2 cámaras.



Figura 3.6: Fotograma del vídeo obtenido con el montaje de 1 sola cámara.

3.4. Ensayos con animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones STAIRS (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) [26], RIGOR (Improving the quality of NINDS-supported preclinical and clinical research through rigorous study design and transparent reporting) [27], HEADS (Hemorrhagic Stroke Academia Industry) y ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments guidelines) [28] en el laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del IdiPAZ, Madrid.

En el estudio se realizó el LBWT parametrizado a una serie de ratas control y de modelo de HIC. Se utilizaron un total de 15 ratas *Sprague-Dawley* machos y hembras (8 machos y 7 hembras) de 8-9 semanas de vida y 225-275 g de peso. Los animales se distribuyeron en:

1. Grupo de ratas sanas (n=5; 3 machos y 2 hembras). Estas fueron empleadas para la realización de las primeras pruebas y calibración de la estructura
2. Grupo de HIC: ratas sometidas a la hemorragia cerebral (n= 10; 5 machos y 5 hembras). Estas fueron empleadas para la obtención de la medida del daño neurológico y el análisis de los parámetros calculados.

Con el fin de unificar las condiciones del ensayo, se generalizó el modelo de HIC a modelo de ictus, puesto que es el más utilizado y produce la misma sintomatología. Además, se tuvo en cuenta que el conjunto de datos estuviera compuesto por el mismo número de machos y hembras, y que fueran de un tamaño similar.

A la hora de realizar los estudios, se siguió el mismo procedimiento y protocolo seguido por los investigadores del centro IdiPAZ para el desarrollo del LBWT:

1. Se coloca al animal en el extremo de la barra en el que la viga es más ancha.
2. El animal recorre la viga hasta su extremo más estrecho y entra en la caja aislada.
3. El animal permanece 60 segundos en la caja.
4. Se repite este procedimiento 3 veces.

Este procedimiento se suele grabar para facilitar el trabajo del evaluador. Este, a partir del experimento, asigna el grado del déficit motor aplicando la Ecuación 3.1:

$$Slip\ ratio(\%) = \frac{0,5 \cdot half + full}{total} \cdot 100 \quad (3.1)$$

Donde *full* representa el número de pasos sobre el escalón, *half* representa el número de pasos intermedios, es decir, apoyos sobre el lateral entre la parte superior de la barra y el escalón, y *total* representa el número total de pasos que el animal realiza a lo largo de la barra. Así, para cada realización de la prueba se calcula este parámetro, y finalmente se toma como medida el valor medio de las 3 repeticiones por cada animal.

Como se menciona a lo largo del proyecto, este método de medida tiene la principal desventaja de estar sujeto a la subjetividad del evaluador, ya que se ve afectado por la experiencia del experimentador, y de requerir una gran curva de aprendizaje.

Cabe mencionar que antes de poder realizar los ensayos finales y tomar medidas, se tuvo que realizar un proceso de pre-entrenamiento de los roedores, que es imprescindible para poder llevar a cabo la prueba (como se menciona en el Capítulo 1) ya que este entrenamiento enseña y motiva a los animales a cruzar la barra. Esta fase de aprendizaje se descompone en 3 partes que se realizan cada una en 3 días consecutivos:

- Primer día: Se realiza la prueba colocando al animal a aproximadamente a 30 cm de la caja (es decir, a tres cuartos de la barra).
- Segundo día: Se realiza la prueba colocando al animal a 60 cm de la caja (es decir, a la mitad de la barra).
- Tercer día: Se realiza la prueba colocando al animal a aproximadamente a 100 cm de la caja (es decir, en el extremo ancho de la barra).

Esta fase de pre-entrenamiento es importante para que el animal desempeñe la prueba de manera correcta y para poder así obtener resultados fiables en el análisis de la capacidad motora del animal.

3.5. Adquisición de vídeos

Para la adquisición de vídeos, y por lo tanto de los datos de entrenamiento y análisis de la red, se operaron 10 ratas bajo el modelo de HIC. Estas ratas fueron grabadas a lo largo del periodo de 28 días en distintos momentos que reflejan la evolución del daño causado por el ictus. Siguiendo el protocolo habitual seguido por los profesionales del IdiPAZ, grabamos la ejecución del LBWT de las ratas en condiciones basales (sanas, antes del ictus) y transcurridos 92 horas, 7 días, 14 días y 28 días después de la inducción del ictus (ver Figura 3.7). En total, se obtuvieron 150 vídeos, 30 vídeos por cada una de las fases y 3 repeticiones para cada una de las 10 ratas.

Con estos vídeos construimos un conjunto de datos que permitiría entrenar la red y analizar sus resultados.

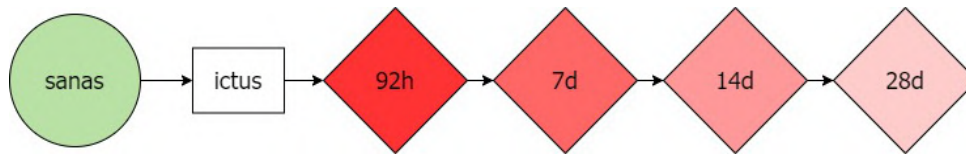


Figura 3.7: Proceso de adquisición de vídeos.

3.6. Entrenamiento de la red

Para el procesamiento de vídeos fue necesario emplear una herramienta que permitiera una estimación postural del animal sin necesidad de emplear marcadores, por los motivos expuestos en el Capítulo 2. Para ello, la herramienta seleccionada fue DLC, una herramienta de código abierto y gratuita que permite evaluar la pose del sujeto y parametrizar su movimiento. Esta permite al usuario entrenar DNNs a partir de un conjunto de datos limitado, de entre 50 y 200 fotogramas, mediante un método basado en aprendizaje de transferencia, lo que abre la posibilidad de ser aplicado a experimentos en laboratorio, que suelen contar con una cantidad más reducida de datos. Concretamente, DLC utiliza redes residuales profundas con 50 o 101 capas (*ResNets*) y capas deconvolucionales que han sido entrenadas para adaptar sus pesos para predecir una cierta característica. En este caso, esa característica es el seguimiento de las partes corporales de interés.

DLC proporciona resultados que igualan o superan la precisión del etiquetado humano, permitiendo estimar la pose del sujeto y cuantificar su comportamiento de manera eficaz y robusta. Esta herramienta supone una ventaja frente a otras de estimación postural, no solo por permitir un conjunto de datos limitado (que lo hace adecuado para la aplicación en experimentación en neurociencia), sino porque también resuelve el problema de la detección de partes corporales en entornos visualmente dinámicos. Además, cuenta con una interfaz gráfica (GUI) y herramientas interactivas que facilitan su uso, especialmente el etiquetado y selección de los fotogramas. DLC consigue resultados con errores menores que 5 píxeles a partir de 100 fotogramas etiquetados de imágenes de tamaño 800x800 píxeles. En vista a que se ha comprobado que DLC proporciona mejores resultados ante un mayor contraste entre el sujeto y el fondo [21], decidimos utilizar una tela de color verde oscuro como fondo para la imagen, ya que proporciona un buen contraste frente a los roedores y la barra.

En la Figura 3.8. queda resumido en un diagrama de flujo el proceso de trabajo con DLC. Las etapas principales del proceso son abrir una sesión en *Python* e importar DLC, crear un nuevo proyecto o abrir uno existente, seleccionar los fotogramas de interés para etiquetarlos y entrenar la red. Una vez finalizado el entrenamiento, la

red puede ser utilizada para analizar nuevos archivos y generar vídeos etiquetados. También es posible refinar la red en el caso en el que el resultado no sea lo suficientemente preciso. Este procedimiento se puede llevar a cabo a través de la GUI interactiva o introduciendo las líneas de comando en la terminal.

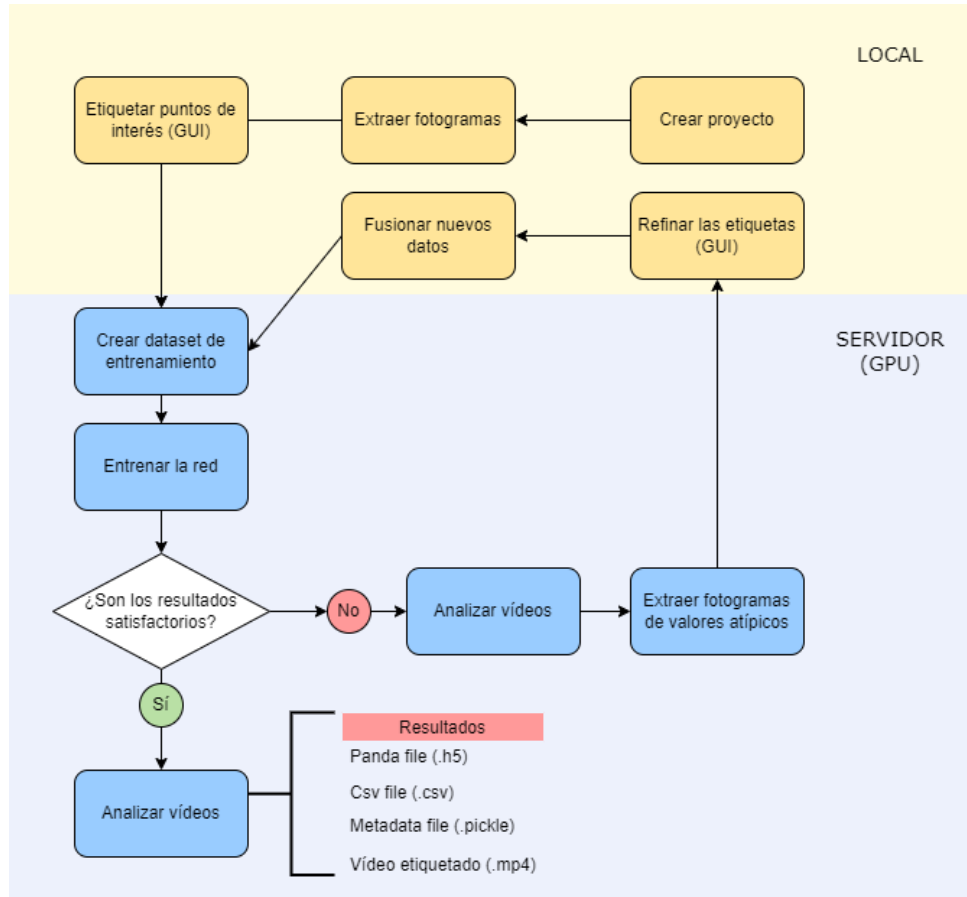


Figura 3.8: Flujograma de trabajo con DLC [21].

3.6.1. Instalación de DLC

Es recomendable instalar DLC en un entorno de Anaconda ya que permite acceder a todos los pasos en una CPU (*Central Processing Unit*, Unidad Central de Procesamiento). Además, se aconseja utilizar GPUs (*Graphics Processing Unit*, Unidad de Procesamiento Gráfico) con el fin de agilizar la producción de resultados, puesto que permite una mayor velocidad de análisis y entrenamiento de la red. Para la compatibilidad con GPU, se puede configurar *TensorFlow*, *Compute Unified Architecture* (CUDA) y el controlador de la tarjeta NVIDIA en el contenedor. Para este proyecto, utilizamos las máquinas Linux con GPUs del servidor del laboratorio, al que tuvimos acceso a través de comunicación SSH. La GPU utilizada es la GeForce RTX 2080 Ti. Para instalar el paquete de *Python* de DLC debemos ejecutar el comando “pip install deeplabcut”, que instala las distribuciones necesarias

exceptuando *wxPython* y *TensorFlow*.

Con el fin de agilizar el procedimiento, los procesos de trabajo de DLC se llevaron a cabo por una parte en local y por otra en remoto. Es decir, los procesos que implican el uso de la GUI se llevaron a cabo en un portátil, mientras que los que requieren el uso de GPU para mejor funcionamiento se llevaron a cabo en servidores con GPU. Esto es porque el etiquetado de los fotogramas se realizaba de manera muy lenta en las máquinas del servidor, por lo que se decidió que la creación del proyecto y etiquetado de fotogramas se realizaría en local, mientras que el resto de procesos, que requieren de GPU, se realizaron en el servidor. Esta distribución se muestra en la Figura 3.8. Para automatizar este procedimiento de creación, entrenamiento y análisis, se crearon dos *scripts* de *Python*: uno para ejecutar en el portátil de forma local y otro para ejecutar en remoto en la GPU del servidor.

3.6.2. Creación y configuración del proyecto

Como se ha mencionado anteriormente, esta primera etapa se llevó a cabo en la máquina local, utilizando un entorno Anaconda y la versión de DLC 2.2.0.6. Primero, se creó un nuevo proyecto con vídeos iniciales que permitirán entrenar la red. Para ello, se seleccionó una fracción de los 150 vídeos tomados y que se emplearon para entrenar la red. El resto de vídeos fueron utilizados para el análisis y refinamiento de los resultados.

En esta fase de creación del proyecto se especificaron distintos parámetros en el fichero de configuración, como el nombre del proyecto, los vídeos para el entrenamiento o las partes del cuerpo de las que se quiere hacer el seguimiento. Se recuerda que el objetivo de este TFG es la parametrización de la prueba LBWT para la determinación objetiva y cuantitativa del grado del déficit neurológico causado por el ictus. Por ello, teniendo en cuenta que el hemisferio afectado a nivel motor será el derecho, interesa analizar la posición y trayectoria de las extremidades izquierdas (anteriores y posteriores). Se definieron los siguientes parámetros en el fichero de configuración del proyecto:

- **bodyparts:** Se define una lista que contiene los nombres de los puntos que se deseen identificar. En este caso, se seleccionaron 7 partes distintas para caracterizar las extremidades izquierdas: *toe1*, *ankle1*, *leg1*, *toe2*, *mtp2*, *ankle2*, *leg2*, como se muestra en la Figura 3.10. Donde estas etiquetas hacen referencia al extremo de las falanges, carpo y húmero anteriores, y extremo de las falanges, metatarso, tarso y húmero posteriores (respectivamente).
- **numframes2pick:** Se define el número de fotogramas que serán extraídos de cada vídeo para ser etiquetados. Para este proyecto se fijó este parámetro a 10, buscando un equilibrio entre construir un conjunto de datos completo y variado, y minimizar el coste tanto computacional como temporal.
- **cropping:** Se define el tamaño de recorte del vídeo. Para mejorar el rendimiento de la red, se recortan verticalmente las imágenes de 3840x2160 px (4K) a las

siguientes dimensiones (ver Figura 3.9):

x1: 0 px, **x2:** 3840 px, **y1:** 750 px, **y2:** 1250 px

De esta manera, se consiguió reducir el ruido de fondo, ya que la imagen se recortó tal que únicamente se mostraran la barra y el animal. Esto tiene dos ventajas principales; mejorar la calidad del resultado proporcionado y a su vez reducir también el coste computacional y el temporal [21]. El resto de parámetros se mantuvieron con los valores predeterminados.

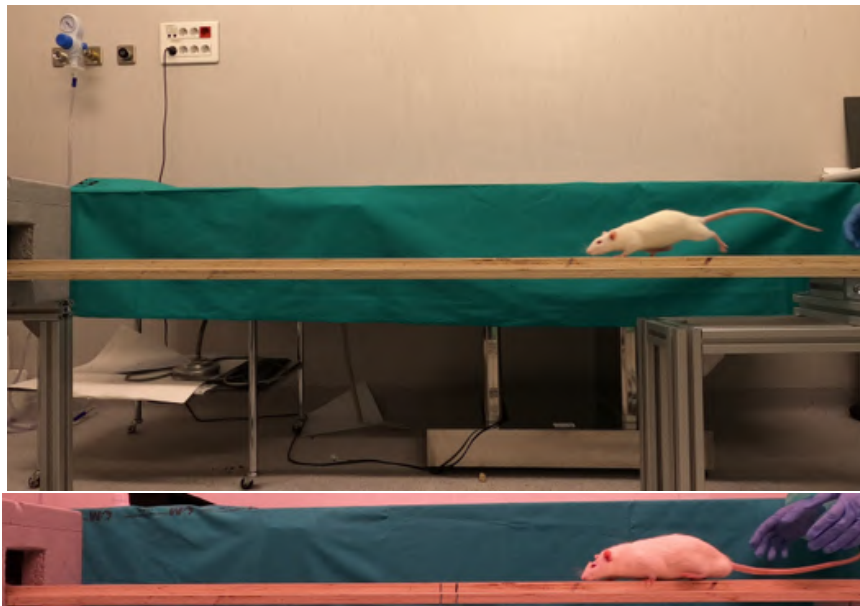


Figura 3.9: Fotograma antes y después del recorte.

Con la creación del proyecto, se generaron distintos directorios y subdirectorios que contienen los datos necesarios para el entrenamiento y la evaluación de la red.

3.6.3. Selección de datos

Después de crear el proyecto e indicar los vídeos que se desean utilizar, se extrajeron el número de fotogramas indicados en el fichero de configuración (en nuestro caso, 10). Estos fotogramas deben reflejar la diversidad del comportamiento a lo largo de la prueba, por lo tanto, fue importante contar con un buen número de ellos. Para que los datos reflejasen la mayor variabilidad y diversidad posible, se seleccionaron vídeos de distintas fases del proceso, de manera que se mostraran los efectos de distintos grados de déficit neurológico y motor. Se entrenó la red a partir de los vídeos de las fases ‘basal’, ‘92h’ y ‘7d’, que presentaban una mayor variabilidad debido a que el ictus era muy reciente y por lo tanto sus efectos eran más pronunciados. Se recomienda un número de entre 100 y 200 fotogramas totales para obtener buenos resultados [29]. En nuestro caso, seleccionamos 6 vídeos de cada

fase para el entrenamiento, es decir, un total de 18 vídeos que proporcionan 180 fotogramas. Más adelante, durante el análisis y refinamiento de la red se añadieron más fotogramas de distintas fases.

Para la extracción de estos fotogramas, se utilizó el método k-means [29], un procedimiento de agrupación de fotogramas mediante el cual se submuestra el vídeo y se agrupan los fotogramas tratando cada uno de ellos como un vector. Este método proporciona una buena variabilidad en los fotogramas obtenidos, lo que proporciona una mejor calidad en los resultados de la red [21]. Una vez finalizada la extracción, las imágenes se almacenaron en el subdirectorio *labeled-data*.

3.6.4. Etiquetado de datos

Una vez extraídos los fotogramas de los vídeos, procede etiquetarlos con los nombres de los puntos que se deseen identificar (especificados en el parámetro *bodyparts*). Este proceso se hizo a través de la GUI. Cargamos los fotogramas y seleccionamos el directorio que contiene los fotogramas dentro de *labeled-data*. Utilizando el ratón, con el *click* derecho colocamos las etiquetas, mientras que con el izquierdo las desplazamos. Pulsando la rueda central, eliminamos las etiquetas no deseadas. Cada *bodypart* se representa con un punto de un cierto color (ver Figura 3.10). Así, consecutivamente, se etiquetaron los fotogramas extraídos por cada vídeo. En el caso en el que en un fotograma algún punto no fuera visible, simplemente no se coloca etiqueta y se pasa a la siguiente. Cuando se ha terminado de etiquetar un vídeo, se guardan las etiquetas y se continúa con el siguiente vídeo.

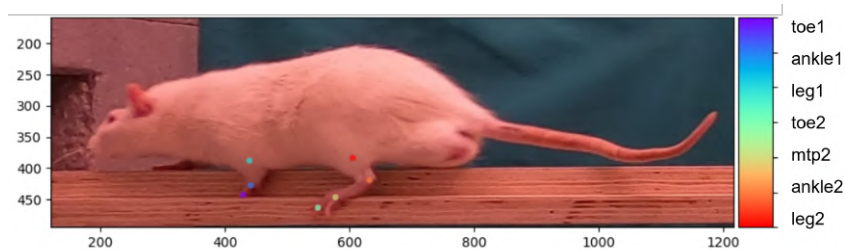


Figura 3.10: Etiquetas seleccionadas.

3.6.5. Creación de datos de entrenamiento

Finalmente, se crearon los datos de entrenamiento a partir del conjunto de fotogramas etiquetados, que se divide en subconjuntos de imágenes de prueba y de entrenamiento que permiten evaluar y entrenar la red respectivamente. Para este proyecto, por las características de las imágenes utilizadas y con el objetivo de optimizar el entrenamiento, se modificaron los siguientes parámetros dentro del fichero de configuración *'pose_cfg.yaml'*:

- *global_scale*: Indica el factor de escala para el que se submuestran las imágenes. Por defecto, este parámetro se fija a 0.8, pero por el gran tamaño de los fotogramas utilizados redujimos el parámetro a 0.4, buscando un equilibrio entre la capacidad de generalización de los resultados y el tamaño requerido por la dimensión de los vídeos. [21].
- *max_input_size*: Se define el umbral de tamaño máximo de las imágenes usadas para el entrenamiento, para evitar la sobrecarga de la CPU. En este caso, se fija a 2500 por el tamaño de las imágenes utilizadas para el entrenamiento después del recorte de fotogramas (3840x500 px).
- *batch_size*: Este término se refiere al número de muestras que se toman en una iteración para el entrenamiento de la red. Se fijó a 3, buscando un equilibrio entre aumentar la velocidad de inferencia y así optimizar el procesamiento, y lograr una buena generalización. [21].

Como se comentó anteriormente, es a partir de esta etapa que se pasa de trabajar de local a remoto, utilizando las máquinas GPU del servidor. Para ello, es importante utilizar el comando ‘`windows2linux=True`’, ya que facilitará la conversión de las rutas especificadas en el fichero de configuración al cambiar de sistema operativo.

3.6.6. Entrenamiento y evaluación de la red

Como se ha explicado a lo largo de este Capítulo, se parte de una red previamente entrenada (*ResNet*) de extremo a extremo para adaptar sus pesos con el objetivo de predecir las coordenadas de las etiquetas especificadas. El tiempo necesario para entrenar la red depende principalmente del tamaño del conjunto de datos de entrenamiento y el hardware de la computadora. Con una GPU, tiempo para realizar unas 200.000 iteraciones aproximadamente es 6 horas, mientras que con CPU podría alargarse a días. Para este proyecto se realizaron hasta 500.000 iteraciones en total con las GPUs del servidor.

Una vez finalizado el entrenamiento, se evaluó la red. El rendimiento se midió calculando el error euclidiano promedio (proporcional al error cuadrático medio) entre las etiquetas asignadas manualmente y las asignadas por DLC. Estos datos se almacenaron en un archivo en el subdirectorio *evaluation-results*. Inspeccionando estos datos, se puede examinar la calidad de los resultados y si son satisfactorios o no. Después de una primera iteración de entrenamiento, se observó que era necesario refinar la red para reducir el valor del error y mejorar los resultados.

Para ello, se analizaron una serie de vídeos, y se extrajeron los fotogramas que contuvieran valores atípicos. Estos nuevos fotogramas pasaron a ser etiquetados de nuevo. Se cargaron los fotogramas en la GUI, y se corrigieron manualmente las etiquetas que estuvieran mal posicionadas. Uno de los errores más frecuentes era la confusión entre la punta de la pata trasera y la delantera (‘toe1’ y ‘toe2’ respectivamente). En algunos casos, también existía una confusión entre las extremidades

derechas e izquierdas del animal. Una vez finalizado, se fusionaron estos nuevos datos con los demás, y se almacenaron en nuevos subdirectorios dentro de *labeled-data*. A partir de este paso, con el nuevo conjunto de datos, se volvió al paso de creación de datos de entrenamiento y se comenzó una nueva iteración de entrenamiento. Este procedimiento de refinamiento se repitió una segunda vez, hasta alcanzar resultados satisfactorios en la obtención de las coordenadas de las etiquetas. El proceso iterativo de refinamiento y re-entrenamiento de la red permitió minimizar estos errores y mejorar así la calidad del resultado.

3.6.7. Análisis de resultados

Una vez entrenada la red, y habiendo comprobado mediante la evaluación que los resultados eran satisfactorios como para continuar con la siguiente fase del proyecto, se utilizó el modelo para analizar nuevos vídeos. Para ello, se escogió el punto de control que contuviera los mejores resultados de evaluación, y se especificó este índice en el fichero de configuración ‘config.yaml’. Como resultado del análisis, por cada vídeo analizado se obtuvo tanto un fichero ‘.csv’ como un fichero HDF (Hierarchical Data Format, Formato de Datos Jerárquicos) (‘.h5’), que contienen por cada fotograma las coordenadas de la posición de las partes del cuerpo junto a su probabilidad. Además, para comprobar la precisión de la generalización de la red, se utilizó la función de generar vídeos etiquetados a partir del análisis de nuevos vídeos, en los que se muestran las etiquetas estimadas por la red por cada fotograma.

Estas trayectorias fueron importadas para hacer un análisis del comportamiento y una detección de la marcha del animal sobre el escalón, que representa el déficit funcional neurológico.

3.7. Desarrollo del software de análisis del déficit

El objetivo de la parametrización del LBWT consiste en identificar de manera automática los resbalones y las pisadas sobre el escalón de la barra, que indican el déficit motor del animal. Para ello, se desarrolló un programa que permite obtener el ratio entre el porcentaje de la marcha en el nivel inferior frente al superior, así como un número estimado de pisadas sobre el escalón. Para llegar a estas medidas, se siguió el siguiente procedimiento:

En primer lugar, se importaron los ficheros que contienen la información espacial de los puntos etiquetados, ya sea el fichero ‘csv’ o ‘h5’. A continuación, se filtraron las gráficas de las trayectorias, eliminando cualquier etiqueta que pudiera ser errónea. Para ello, se aplicó un filtro de mediana que suaviza la señal y se eliminaron aquellos puntos cuyas coordenadas fueran imposibles, ya sea porque no se encontraban sobre la barra o porque la relación de distancia entre puntos no era coherente. Además, se incluyó también la opción de recortar temporalmente los vídeos a la hora de procesar los datos. Idealmente, los vídeos deberían mostrar siempre al animal completo, y no entrando y saliendo de la imagen ya que, debido a la oclusión de etiquetas, esta es una

de las mayores fuentes de error del proceso de estimación postural. Por ello, fue de gran utilidad poder recortar temporalmente los vídeos de manera automática, porque permitió obviar aquellos fotogramas con mayor probabilidad de error en el etiquetado. En la Figura 3.11 se muestra un extracto del resultado de aplicar el filtro sobre la señal de la trayectoria.

Como la extremidad posterior del animal es mayor que la anterior, se observa con mayor resolución en el vídeo. Además, la parte más susceptible a los cambios de nivel en la barra es el extremo de la pata izquierda. Por estos motivos, se decidió continuar el procesamiento centrándonos en la señal de la trayectoria del marcador 'toe2', aunque el resto de señales fueron igualmente adquiridas y filtradas para su posterior análisis en fases futuras del proyecto.

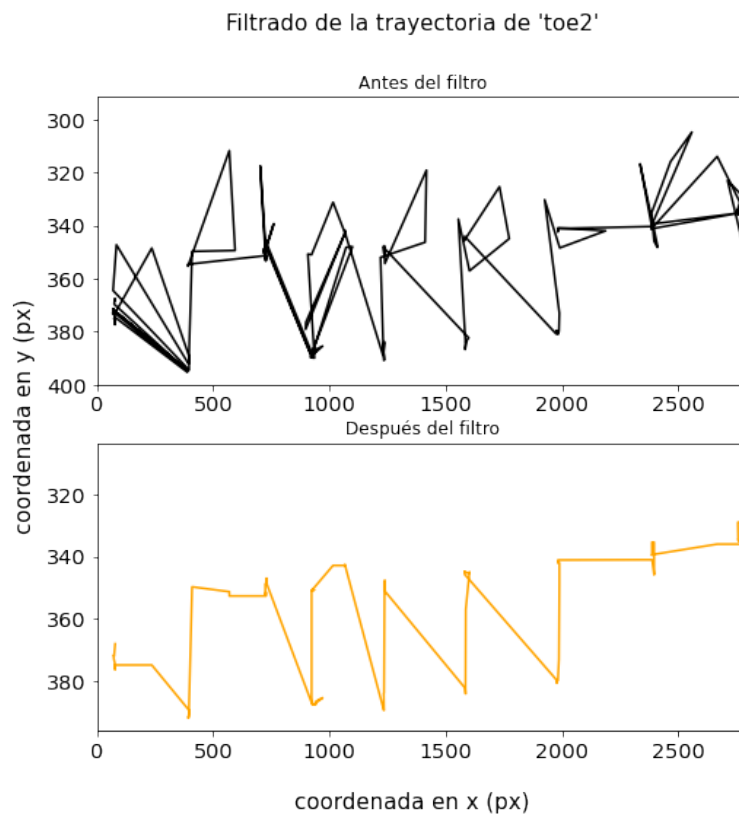


Figura 3.11: Comparación entre la trayectoria filtrada y sin filtrar.

Luego, se obtuvieron las ecuaciones de los umbrales. Es decir, las ecuaciones de la recta de los perfiles del nivel superior y el inferior (escalón) de la barra. Esto permitió determinar si la posición de la pata, en un cierto instante, se encontraba en la parte superior de la barra, o en la zona inferior sobre el escalón, lo que indica el grado del déficit. Estos umbrales se pueden observar de forma más clara en la Figura 3.12: si la pata del animal se mantiene sobre la línea azul (umbral superior), no se indica déficit. Sin embargo, si la pata del animal baja de este umbral, se considera ese punto como

indicador de déficit, mientras que si la posición del extremo de la pata se encuentra sobre la línea roja (umbral inferior) se cuenta como una pisada.

Para obtener estas ecuaciones, se tomó uno de los fotogramas del vídeo para segmentar la imagen. Debido al alto contraste entre el fondo y la barra, al hacer la segmentación de la imagen se obtuvieron las posiciones de los puntos a lo largo del perfil superior. Para realizar la segmentación, utilizamos el módulo ‘segmentation’ del paquete de ‘scikit-image’ de *Python*, que permite emplear algoritmos para la segmentación de imágenes.

Interpolando estos puntos, se obtuvo la ecuación de la recta. Asumiendo que ambas rectas (superior e inferior) son paralelas, se calculó la recta del umbral inferior añadiendo un desplazamiento vertical de magnitud la mitad de la altura de la barra.

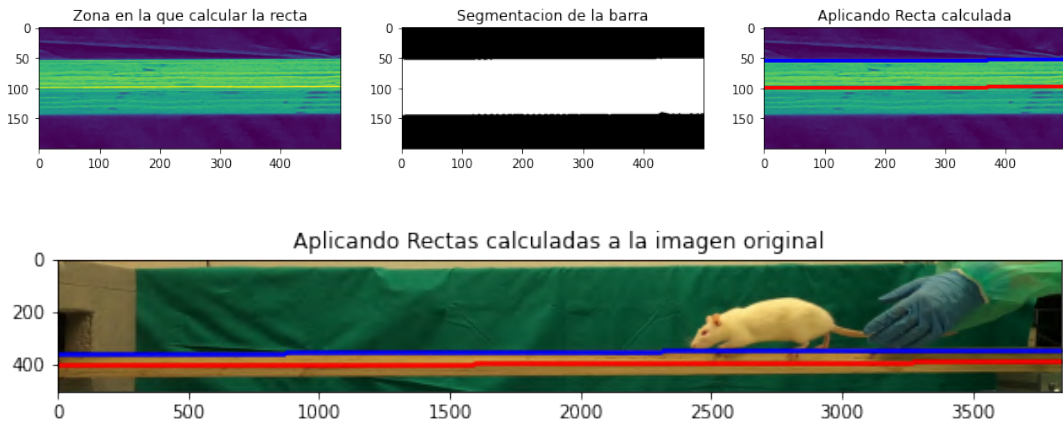


Figura 3.12: Proceso de segmentación de la barra, interpolación de las rectas y aplicación a la imagen original.

Como resultado de este procedimiento, obtuvimos dos ecuaciones de la siguiente forma:

$$y_{superior} = m \cdot x_{superior} + n \quad (3.2)$$

$$y_{inferior} = m \cdot x_{inferior} + (n + 0,5 \cdot anchura) \quad (3.3)$$

Gracias al uso de la estructura que permite parametrizar la prueba, como los elementos se mantienen siempre en la misma posición, las rectas deberían ser aproximadamente iguales para todos los vídeos. Sin embargo, por asegurar una mayor precisión, se calcularon individualmente por cada uno de ellos a partir de uno de sus fotogramas.

Estas ecuaciones permitieron clasificar las posiciones del extremo de la pata del animal en grupos de valores normales y anormales o indicadores de déficit. Cabe destacar que en la representación de las señales, el eje de ordenadas está invertido, por

lo tanto, para que un valor esté visualmente sobre el umbral superior, la coordenada 'y' debe ser menor y viceversa.

Para realizar esta clasificación, se recorren los archivos que contienen las coordenadas filtradas del punto de interés ('toe2'). Por cada fotograma, se toma la coordenada x del punto y se le aplica la ecuación del umbral superior. Esto nos da el valor de 'y' que corresponde al punto correspondiente del umbral superior (y_{umbral}). De manera que si la coordenada 'y' del punto (y_{toe2}) es igual o menor que la obtenida por la ecuación, se indica que la pata está sobre el umbral superior, mientras que si es mayor indica que la pata está bajando al escalón, acercándose al umbral inferior que indica el déficit. Con este mecanismo, podemos clasificar todos los puntos según los umbrales superior e inferior:

- Si $y_{\text{toe2}} > y_{\text{umbral}} \rightarrow$ Posición indicadora de déficit neurológico
- Si $y_{\text{toe2}} \leq y_{\text{umbral}} \rightarrow$ Posición normal

A partir de estas medidas, obtenemos los parámetros de interés, que permiten realizar la medida objetiva del grado de déficit motor y neurológico.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

En este Capítulo, se analizan los resultados obtenidos en función de los objetivos planteados.

4.1. Entrenamiento de las redes y obtención de las posiciones

La parametrización de la prueba se realiza a través del procesamiento y análisis de las coordenadas de posición de las extremidades del animal. Estas fueron obtenidas a través de la herramienta DLC que utiliza DNNs y el concepto de aprendizaje de transferencia. El modelo final fue resultado de 50.000 iteraciones y 2 etapas de refinamiento. Como se ha explicado en Capítulo 3, este refinamiento permitió mejorar la calidad de los resultados proporcionados por la red. En la Tabla 4.1 se muestran los datos obtenidos de la evaluación de la red, donde el término *p-cutoff* se refiere al umbral de probabilidad utilizado en el entrenamiento y evaluación de la red. En la tabla se observa que el error que comete en el análisis del vídeo (de tamaño 3840x500) es de 29.13 píxeles, esto es, que la posición de la etiqueta se puede encontrar a esta distancia (en píxeles) en cualquier dirección. Este error se obtiene como la distancia euclidiana media, que es proporcional al error cuadrático medio. Considerando los factores que envuelven este ensayo: el tamaño de las imágenes, el tamaño de los puntos a etiquetar y la variabilidad de los movimientos del animal, se puede afirmar que este error es razonable y cabe dentro de lo esperado, teniendo en cuenta que para imágenes de 800x800px el error cometido por DLC se encuentra en torno a 5 píxeles [21].

%Training dataset	Train error with p-cutoff	Test error with p-cutoff
95	47.95	24.33

Tabla 4.1: Resultados de evaluación de la red.

Otra manera de evaluar la calidad de los resultados proporcionados por la red, es utilizando la función *plot_trajectories* de la caja de herramientas de DLC, que utiliza *matplotlib* para representar distintas gráficas estadísticas. En la Figura 4.1 se muestra la probabilidad de que el punto sea etiquetado correctamente frente al índice de fotogramas. En un caso ideal, la gráfica debería mostrar una probabilidad de 1 en todos los fotogramas. Sin embargo, esto no es posible debido a que a veces se producen oclusiones de unas partes corporales por otras, o problemas de definición en un cierto fotograma debido a la rapidez del movimiento del animal. Analizando nuevamente la Figura 4.1 se puede observar que los últimos fotogramas son los que presentan menor probabilidad de acierto, lo que se justifica por la entrada del animal en la caja y la consiguiente oclusión de las etiquetas.

Por otra parte, también es posible representar en un histograma las diferencias entre coordenadas consecutivas (ver Figura 4.2). Idealmente, este histograma debería mostrar un único pico cercano a 0, ya que no deberían producirse saltos entre la detección consecutiva de etiquetas corporales. Por lo tanto, puesto que los histogramas generados por cada vídeo analizado suelen presentar un pico pronunciado en 0, podemos concluir que los resultados de la red entrenada son satisfactorios.

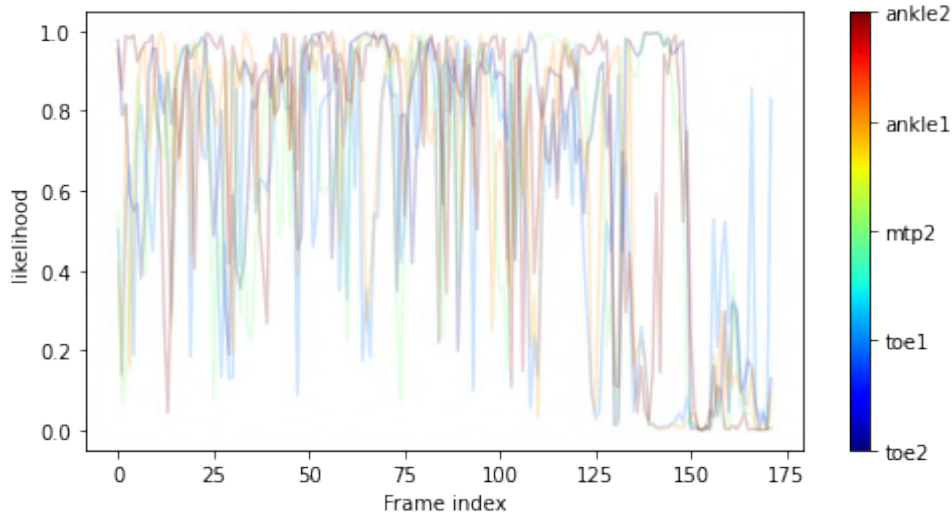


Figura 4.1: Gráfica Índice de fotograma versus la probabilidad.

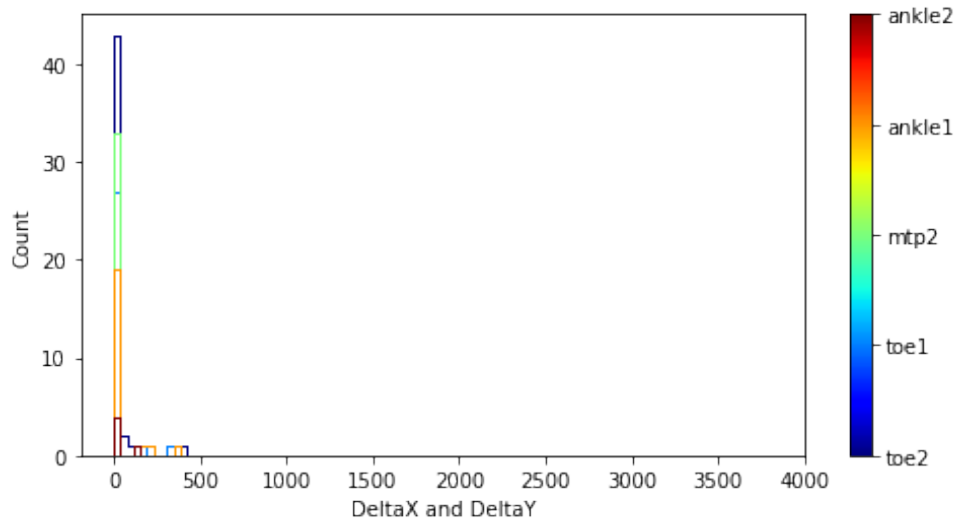


Figura 4.2: Histograma que refleja el desplazamiento en la detección consecutiva de etiquetas.

4.2. Procesamiento de las coordenadas de las posiciones

Una vez obtenidas las trayectorias de las extremidades del animal, se procesan estos datos, como se indica en el Capítulo 3, con el fin de hallar una estimación del déficit motor producido por el ictus. Como se ha explicado a lo largo del trabajo, se decide continuar el análisis seleccionando únicamente la etiqueta del extremo de la pata trasera ('toe2'), ya que proporciona una mejor representación del deterioro motor. La Figura 4.3 muestra el resultado de la superposición de los umbrales de detección sobre la trayectoria del extremo de la pata trasera izquierda de una rata 92 horas después de haberle inducido el ictus. De esta manera, se consigue discernir de manera automática entre la marcha del animal sobre la parte superior de la barra y la marcha sobre el escalón, que es el factor indicador del déficit motor. En la imagen se aprecia claramente el descenso de la pata del animal al nivel bajo de la barra, es decir, los resbalones que pretende medir la prueba de LBWT, como se explica en el Capítulo 2. Se estima el número de pisadas sobre el escalón hallando el número de máximos de la función. De nuevo, se recuerda que el eje de ordenadas está invertido, por lo que aquello que visualmente se perciben como mínimos son en realidad máximos de la función.

Paralelamente, en la Figura 4.4 se observa la gráfica que se obtiene de una rata en estado basal (sana, antes de la inducción del ictus). Comparando ambas, se muestra claramente la diferencia entre la capacidad motora de ambas, y el predominio de las pisadas sobre el escalón de la rata con ictus.

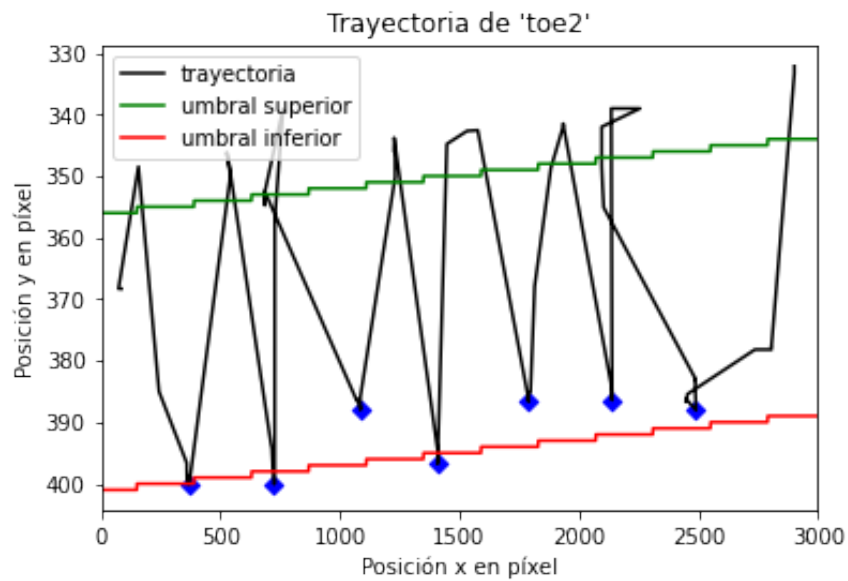


Figura 4.3: Trayectoria del extremo de la pata trasera izquierda del animal que ha sufrido un ictus frente a los umbrales de detección (92h).

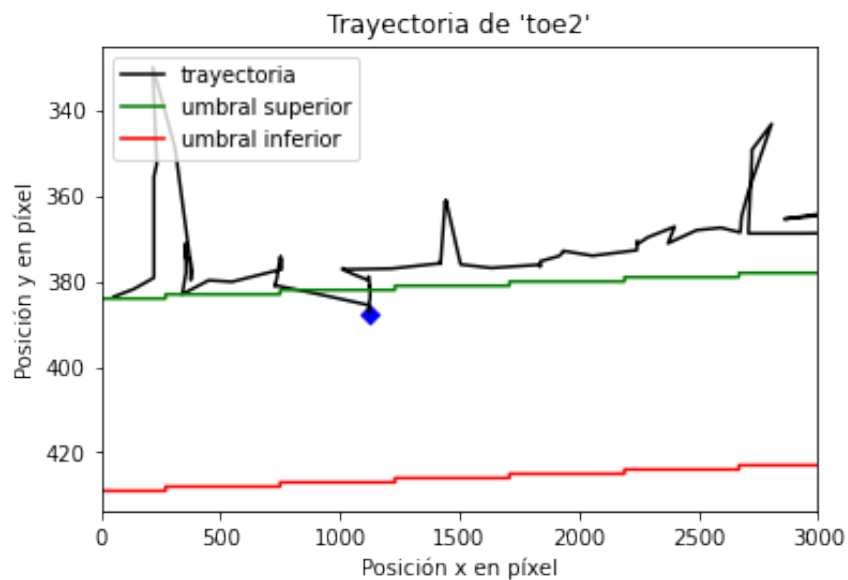


Figura 4.4: Trayectoria del extremo de la pata trasera izquierda del animal sano frente a los umbrales de detección (basal).

A partir de estas gráficas, siguiendo el procedimiento indicado en el Capítulo 3, se obtienen los siguientes parámetros, que permiten medir de manera cuantitativa y objetiva el déficit neurológico:

- **Top:** Proporción que representan los pasos sobre la parte superior de la barra (umbral superior) respecto a la marcha total del animal. Se expresa en porcentaje.
- **Bottom:** Proporción que representan los pasos bajo el umbral superior y sobre el escalón respecto a la marcha total del animal. Se expresa en porcentaje.
- **D:** Cociente entre los parámetros 'Bottom' y 'Top'.
- **Steps:** Número de resbalones o pisadas sobre el escalón.

4.3. Estudio de la relación entre los parámetros y el déficit

Se calculan estos parámetros para las 10 ratas en cada una de las fases:

- **Basal:** Es la primera fase de adquisición de vídeos, en la que todavía no se les ha inducido el ictus.
- **92h:** Se repite la prueba y la adquisición de vídeos 92 horas después de la inducción del ictus.
- **7d:** Se repite la prueba y la adquisición de vídeos 7 días después de la inducción del ictus.
- **14d:** Se repite la prueba y la adquisición de vídeos 14 días después de la inducción del ictus.
- **28d:** Se repite la prueba y la adquisición de vídeos 28 días después de la inducción del ictus.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores medios y de desviación estándar de los parámetros objetivos para cada una de las fases temporales. En la Figura 4.5 se representan estos datos en un diagrama de barras, que permiten analizar de forma más clara la evolución de estos valores respecto a los distintos grados del déficit.

A partir de estos resultados, se observa que el valor del parámetro **Top** es máximo para las ratas que todavía no habían sufrido el ictus (estado basal), y alcanza su valor mínimo a las 92 horas de la inducción del ictus. Por el contrario valor del parámetro **Bottom** es mínimo en estado basal y máximo a las 92 horas. Esto se corresponde con lo esperado, puesto que, como se explica en el Capítulo 2, al inducir el ictus en el animal, su capacidad motora se ve gravemente afectada. Esto lleva al animal a caminar con una cierta hemiparesia que provoca que las extremidades izquierdas descendan del nivel superior de la barra al escalón. A medida que pasa más tiempo, de manera espontánea, comienzan a ponerse en marcha los mecanismos endógenos de

		SANAS	92h	7d	14d	28d
TOP	Media	93 %	34 %	52 %	75 %	47 %
	SD	0,08	0,12	0,12	0,11	0,24
BOTTOM	Media	7 %	66 %	48 %	25 %	53 %
	SD	0,08	0,12	0,12	0,11	0,24
RATIO D	Media	0.08	2.49	1,01	0,36	1,77
	SD	0,10	1,93	0,47	0,22	1,81
STEPS	Media	0	6	2	1	4
	SD	0	2,30	1,42	1,42	2,88

Tabla 4.2: Tabla que contiene el valor medio y la desviación estándar de los parámetros objetivos.

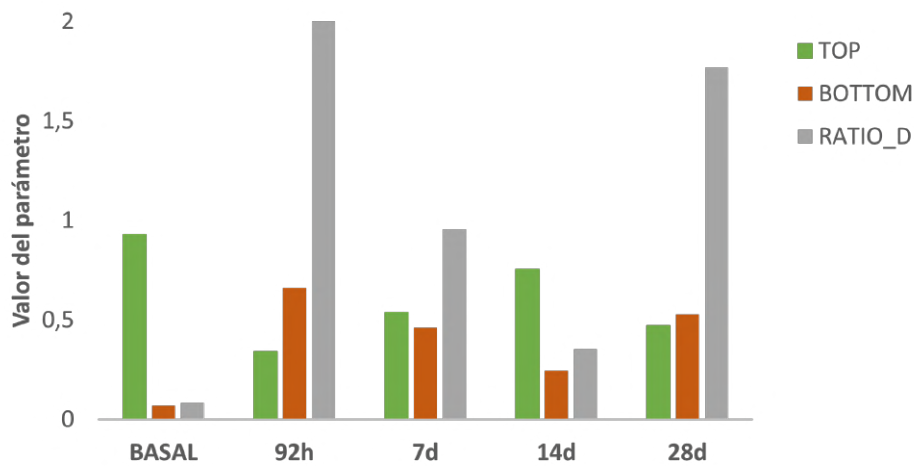


Figura 4.5: Variación de los parámetros objetivos respecto al tiempo.

reparación cerebral, llevando a una reducción en las secuelas, aunque los animales no llegan a recuperar completamente la coordinación motora.

En vista de estos resultados, se decide tomar el **Ratio D**, cociente entre los parámetros **Top** y **Bottom**, como magnitud de medida del déficit neurológico. En la Figura 4.6 se muestra la evolución del valor medio de este parámetro con respecto al tiempo. De nuevo, se observa que el valor es mínimo en condiciones basales, indicando que no existe déficit neurológico, y aumenta en gran medida después de inducir el ictus. El valor es máximo a las 92 horas, y decrece a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la inducción. Idealmente, este valor debería disminuir hasta alcanzar su límite entre los 14 y 28 días, en el que el animal se recupera parcialmente.

Sin embargo, en la gráfica se observa que el valor aumenta a los 28 días. Esto se debe al dimorfismo sexual. Es decir, la curva de crecimiento en machos es mucho mayor que en hembras, por lo que, a los 28 días el tamaño y peso de los machos aumentó a 650g aproximadamente. Aunque se observa una evolución de peso en todos los animales, es cierto que en el caso de los machos este crecimiento es mucho

más pronunciado. Esto implica que, por su gran tamaño, el animal no es capaz de mantenerse en la parte superior de la barra y se ve obligado a apoyarse sobre el escalón. Por lo tanto, este mecanismo de apoyo que utilizamos como indicador del déficit neurológico, se ve afectado también por el aumento de tamaño. Este efecto se manifiesta también en un aumento de la desviación estándar de las medidas en esta fase (ver Tabla 4.3). Esto se podría haber evitado si se hubieran utilizado animales más jóvenes para el ensayo, de manera que el tamaño a los 28 días no fuera tan grande y así no interfiriera con la medida del déficit neurológico.

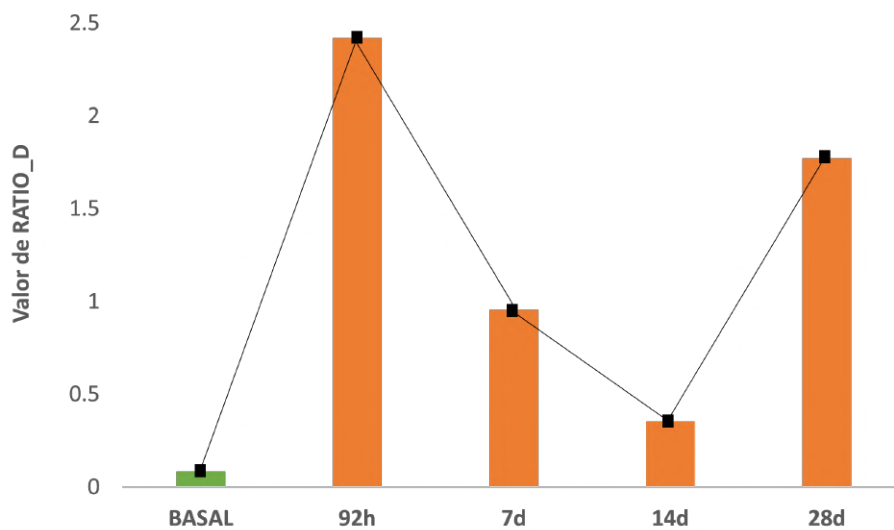


Figura 4.6: Variación del parámetro Ratio D respecto al tiempo.

Finalmente, en la Figura 4.7 se muestra la evolución del parámetro **Steps**. De manera análoga al **Ratio D**, el número de resbalones y apoyos sobre el escalón es prácticamente nulo en condiciones basales, y alcanza un valor medio máximo a las 92 horas de la inducción del ictus. El número medio de pasos tiende a disminuir a medida que transcurre el tiempo. De nuevo, se observa que el parámetro aumenta a los 28 días, especialmente en los machos, debido a este aumento de tamaño (valores de la derecha en la Figura 4.7). Por otra parte, tras analizar ambas gráficas (Figura 4.6 y Figura 4.7), se podría decir que la información que aportan los parámetros **Top**, **Bottom** y **Ratio D** son más precisos a la hora de cuantificar el grado del déficit, puesto que no se ven tan afectados por la gran variabilidad de número de **Steps**, que dependen de factores independientes al déficit como el propio comportamiento del animal; por ejemplo, que en ocasiones el animal se dé la vuelta.

		SANAS	92h	7d	14d	28d
HEMBRAS	1	7 %	100 %	81 %	89 %	21 %
	2	0 %	100 %	100 %	44 %	22 %
	3	0 %	90 %	83 %	17 %	85 %
	4	0 %	72 %	75 %	13 %	0 %
	5	29 %	38 %	89 %	29 %	93 %
MACHOS	1	6 %	70 %	100 %	38 %	100 %
	2	0 %	64 %	57 %	63 %	88 %
	3	13 %	65 %	57 %	75 %	79 %
	4	14 %	100 %	89 %	69 %	100 %
	5	0 %	85 %	94 %	63 %	100 %

Tabla 4.3: Tabla que contiene los valores del parámetro Slip ratio obtenido por los profesionales del IdiPAZ.

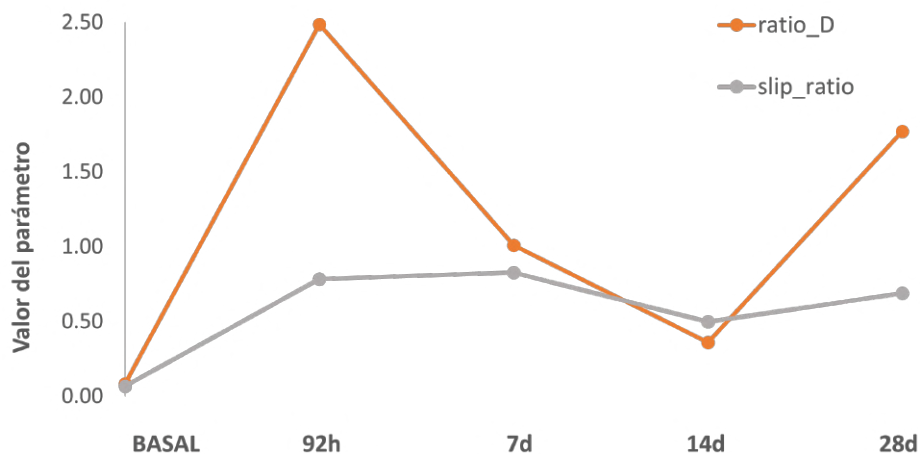


Figura 4.8: Comparación de la variación de los parámetros Ratio D y Slip ratio frente al tiempo.

el lateral (entre la parte superior y el escalón). En la Ecuación 3.1 se ponderan estas últimas a la mitad, mientras que en el caso del parámetro **Ratio D** se consideran ambos tipos de pisada con el mismo peso. Esta diferencia es especialmente notoria en la fase de 92h (ver Figura 4.8), puesto que es en la que el animal tiene un mayor grado de hemiparesia y se apoya más sobre el escalón. Por lo tanto, para lograr asemejar la medida a la utilizada por los investigadores, futuros trabajos deberán ser diseñados para poder discernir entre ambos tipos de pisada.

		SANAS	92h	7d	14d	28d
MUESTRA COMPLETA	ρ de Spearman	0,117	0,215	0,177	0,437	0,546
	significancia	0,747	0,551	0,624	0,207	0,102
HEMBRAS	ρ de Spearman	0,395	0,205	0,900	0,667	0,600
	significancia	0,510	0,741	0,037	0,219	0,285
MACHOS	ρ de Spearman	0,221	0,200	0,051	0,462	0,671
	significancia	0,089	0,747	0,935	0,434	0,215

Tabla 4.4: Valores de los coeficientes de correlación de Spearman y de la significancia bilateral.

Para comprobar si existe una correlación entre los dos parámetros de medida del déficit, **Ratio D** y **Slip ratio**, se calcula el coeficiente de correlación bilateral de Spearman, una prueba no paramétrica que permite estudiar la correlación entre dos variables que no siguen una distribución normal [30]. Para ello se utiliza el programa *SPSS Statistics*, y se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 4.4.

Se realiza la correlación con un nivel de confianza del 95 %, por lo que el valor de significancia debe ser menor que 0,05 y el coeficiente de correlación (ρ) mayor que 0,750 en valor absoluto. Además, para estudiar el efecto de la variabilidad entre sexos sobre la medida, se calcula la correlación entre los dos grupos (machos y hembras) por separado. A partir de la tabla se observa que únicamente se obtiene una correlación significativa en el nivel 0,05 en la fase de 7 días después del ictus. Sin embargo, para el resto de casos, la significancia no es pequeña suficiente como para afirmar que existe una correlación clara entre ambas magnitudes. Esto se debe principalmente a los siguientes motivos:

Número de muestras reducido: Al contar únicamente con 10 ratas, el número de muestras de la distribución demasiado pequeño como para poder generalizar y abstraer si existe un alto nivel de significancia entre ambos ratios mediante el cálculo del coeficiente de Spearman. Para obtener resultados representativos de esta correlación, se debe ampliar la muestra del estudio.

Variabilidad entre machos y hembras en las últimas fases: Como se ha mencionado, en las últimas fases del proceso de adquisición de vídeos, los machos adquirieron un tamaño demasiado grande para la correcta realización de la prueba. Esto, introdujo un error en la obtención de la medida del déficit, generando una gran variabilidad entre los resultados de machos y hembras que se puede observar en la Figura 4.7.

Sobrestimación del valor de las pisadas: Otro de los factores importantes que afectan a la correlación entre ambos tipos de medida es la diferencia en el discernimiento entre los tipos de pisada *full* y *half*. El parámetro **Ratio D** hace una sobrestimación de las pisadas de tipo *half* en comparación con **Slip ratio**, al no ponderarlas a la mitad.

Capítulo 5

Conclusiones y Líneas Futuras

5.1. Conclusiones

En relación a los objetivos presentados al inicio del trabajo, se extraen las siguientes conclusiones generales.

En primer lugar, mediante el estudio de la clínica de la enfermedad y el análisis del estado del arte, se comprueba que este proyecto es de carácter innovador, puesto que no existe a día de hoy un mecanismo de evaluación objetivo para la prueba LBWT. La estructura de soporte para el LBWT parametrizado es de fácil uso para los investigadores, que han afirmado que supone una mejora en cuanto a comodidad y utilidad en el desempeño de la prueba y la han incorporado a su método de trabajo. El diseño de la estructura de LBWT parametrizado ha demostrado su eficiencia en las pruebas que se han realizado para la evaluación funcional de modelos de ictus en ratas, ya que proporciona una manera estable de sostener los elementos y reduce la variabilidad en la colocación de estos, lo que facilita la parametrización y permite obtener resultados más precisos.

Por otro lado, esta estructura permite grabar fácilmente la prueba con una o más cámaras a distintas distancias y de manera estática, lo que supone una mejora frente al método de evaluación anterior. Este consistía en grabar con una cámara *GoPro Hero Black 4*, a mano alzada, el seguimiento del movimiento del animal, lo que proporcionaba vídeos de baja calidad que dificultaban la medida del déficit. Con este proyecto, se implementa un nuevo sistema de cámaras de alta calidad que permite evaluar el déficit con mayor efectividad.

Respecto a la obtención de datos, DLC ha resultado un modelo innovador para la obtención de coordenadas de posición que permiten analizar el comportamiento y movimiento del animal de manera precisa. Se han obtenido resultados satisfactorios en el análisis de los vídeos, que pueden ser mejorados y refinados con el procesamiento de nuevos vídeos.

En cuanto al desarrollo del programa de procesamiento y adquisición de la medida del déficit, se ha conseguido con éxito obtener y filtrar las coordenadas de posición de las extremidades izquierdas del animal. Además, se obtuvieron los umbrales de detección mediante métodos de segmentación de imagen e interpolación, a partir de fotogramas del vídeo a analizar, que permiten extraer la medida del déficit neurológico

del animal. En base a estos umbrales y las coordenadas de la trayectoria del extremo de la pata izquierda del animal ('toe2'), se obtuvieron 4 parámetros que permiten evaluar el grado del déficit causado por el ictus: **Top**, **Bottom**, **Ratio D** y **Steps**, de los cuales se selecciona el tercero como parámetro de medida objetiva.

Por último, se realizó el análisis de la evolución de los parámetros frente a la fase anterior a la inducción del ictus y las distintas fases posteriores. También se compararon, gráficamente y mediante un estudio de correlación de Spearman, con la medida obtenida por los investigadores del IdiPAZ. En el análisis se muestra una clara proporcionalidad entre el valor del ratio y la magnitud del déficit neurológico y una simetría entre los parámetros. En la Figura 4.8 se muestra una alta similitud en los valores obtenidos en las fases 'Basal', '7d' y '14d', mientras que en las fases '92h' y '28d' se muestra una mayor variación entre los parámetros que se justifica por la sobrestimación de pasos discutida en el Capítulo 4.

En vista de los resultados expuestos a lo largo de este TFG, se concluye que el entorno de medida desarrollado del LBWT parametrizado permite la obtención de la medida del déficit de manera objetiva y rápida, cumpliendo los objetivos planteados al inicio del proyecto. Además, mediante el **Ratio D**, se propone una nueva forma de medir el déficit motor basada en la proporción de coordenadas de posición de la pata trasera contralateral al ictus, en lugar de en el conteo directo de pisadas del animal, que puede resultar ambiguo y menos preciso en ciertos casos debido al comportamiento del animal. En definitiva, se espera que el desarrollo de este TFG llegue a tener utilidad real en el campo de la neurociencia y sirva de apoyo para la evaluación y el estudio de nuevas estrategias terapéuticas para el ictus. Sin embargo, cabe mencionar que para que este instrumento sirva como diagnóstico final del grado del déficit motor y neurológico en roedores de manera fiable, se requiere una ampliación y continuación del estudio que confirmen los buenos resultados expuestos.

5.2. Líneas futuras

El TFG se enmarca en un proyecto más grande que a su vez contiene distintas fases. Este proyecto supone la fase inicial, en la que se ha conseguido con éxito el diseño e implementación de la estructura, el sistema de grabación y se ha desarrollado el software de procesado y de extracción de datos para la medición del déficit neurológico, que han sido estudiados y contrastados con los obtenidos por los investigadores siguiendo el método tradicional. Para mejorar la calidad del sistema de análisis y evaluación, para futuras fases se propone:

- Agregar un panel a la estructura detrás de la barra escalonada, de manera que se cuente con un contraste uniforme y constante entre la rata y el fondo de la imagen. Para este proyecto, se empleó de una tela verde que fue colocada detrás de la barra, pero de cara a unificar los vídeos y facilitar aún más el uso del entorno y el desarrollo de la prueba, se propone agregar una pantalla de color uniforme.

- Implementar sensores de manera que el proceso de adquisición de vídeos quede automatizado. Es decir, que se detecte cuando el animal empieza de recorrer la barra y entra en la caja para iniciar y detener la grabación respectivamente. De esta manera, seleccionando correctamente los puntos de inicio y final del vídeo se evita la oclusión de etiquetas por la entrada y salida del animal. Esto no solo facilitaría la labor del investigador, sino que además unificaría el tipo de vídeos del estudio, lo que a su vez conduciría a mejores resultados en el análisis de estos vídeos por el modelo de DLC.
- Estudiar el procesamiento de datos y los resultados obtenidos a partir de la disposición de uso de 2 cámaras. Al estar colocadas a menor distancia del animal, estos vídeos proporcionarían una mejor resolución, que podría derivar en la obtención de resultados más precisos.
- Cuantificar los pasos ‘half’ y los pasos totales, se podría obtener una medida análoga a la proporcionada manualmente por los experimentadores, lo que podría ser de gran utilidad a la hora de estudiar la relación entre los distintos parámetros, y obtener valores de correlación representativos entre estos.
- Amplificar el número de animales del estudio, y que estos sean más jóvenes. Al comenzar con animales de menor edad y tamaño, se evitaría el aumento excesivo de peso en las últimas fases del proceso, que, como se ha visto en el Capítulo 4, interfiere con la medida del déficit. Además, contar con un número mayor de muestras posibilitaría la realización de un estudio de correlación más interesante entre las medidas obtenidas por el programa desarrollado y las obtenidas por los profesionales del centro.
- Estudiar la posibilidad de obtención de nuevos parámetros a partir de la pata anterior izquierda del animal, así como de parámetros cinemáticos y angulares de las partes corporales etiquetadas, y su relación con el déficit neurológico.

Referencias

References

- [1] N. Vila R. Forés M. Vicheto A. Heras M. Sorribes, M.T. Alzamora. Abordaje de los ictus: colaboración entre atención primaria y especializada. *SMERGEN - Medicina de Familia*, 31(8):314–318, 2005.
- [2] I. Jericó R. Muñoz N. Aymerich E. Martínez-Vila J. Gállego, M. Herrera. El ictus en el siglo xxi: Tratamiento de urgencia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(1):15–30, 2008.
- [3] F. Pérez. *Isquemia cerebral focal transitoria en rata: Caracterización y utilidad del modelo de la sutura intraluminal en el estudio de estrategias neuroprotectoras*. PhD thesis, Universidad de Valencia, 2005.
- [4] J. Lozano. ¿qué es un ictus? <https://rithmi.com/que-es-un-ictus/>, 2018. [En línea; Fecha de consulta: 15 de mayo de 2022].
- [5] Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia en ictus del sistema nacional de salud. In *Sanidad*, pages 43–44. Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009.
- [6] V. d’Hebron. Trombólisis intravenosa. <https://hospital.vallhebron.com/es/asistencia/tratamientos/trombolisis-intravenosa>, 2021. [En línea; Fecha de consulta: 15 de mayo de 2022].
- [7] A. Musacchio. Trombectomía mecánica y stent retrievers. <https://fucac.org/trombectomia-mecanica-y-stent-retrievers/#:~:text=La%20trombectom%C3%ADa%20mec%C3%A1nica%20es%20un,para%20su%20disrupci%C3%B3n%20o%20extracci%C3%B3n>, 2015. [En línea; Fecha de consulta: 15 de mayo de 2022].
- [8] R. Prieto-Arribas, J.M. Pascual-Garvi, F. González-Llanos, and J.M. Roda. ¿cómo reparar el daño cerebral isquémico? utilidad de los modelos experimentales en la búsqueda de respuestas. *Neurología*, 26(2):65–73, 2011.
- [9] Sigma-aldrich. Madrid, España.
- [10] V. González I. Ballesteros A. Moraga M. Cuartero-O. Hurtado M. Sobrado J. Pradillo D. Fernández J. Serena M. Castillo M. Moro e I. Lizasoain J. Serrano, I. Yébenes. Tests neurológicos para la evaluación del pronóstico funcional en

- modelos de ictus isquémico en roedores. *Revista de Neurología*, 53(10):550–607, 2011.
- [11] S. Dunnett R. Carter, J. Morton. Motor coordination and balance in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 15(1), 2001.
- [12] S. Dunnett. Staircase (skilled reaching) test. In *Encyclopedia of Movement Disorders*, pages 156–158. Elsevier, 2010.
- [13] M. Fleming T. Schallert, W. Schallert. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, enero 2002.
- [14] E. S. Dickinson S. Walling-Bell E. Sanders E. Azim B. W. Brunton J. Tuthill P. Karashchuk, K. L. Rupp. Anipose: A toolkit for robust markerless 3d pose estimation. *Cell Reports*, 36(13):109–730, 2021.
- [15] A. Mathis M. W. Mathis. Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*, 60:1–11, 2020.
- [16] T. M. Khoshgoftaar C. Shorten. A survey on image data augmentation for deep learning. *Journal of Big Data*, 6(1), 2019.
- [17] T. Serre. Deep learning: The good, the bad, and the ugly. *Annual Review of Vision Science*, 5(1):399–426, 2019.
- [18] N. J. Cronin. Using deep neural networks for kinematic analysis: Challenges and opportunities. *Journal of Biomechanics*, 123:110460, 2021.
- [19] M. Campoverde-Molina J. Aguilar-Alvarado. Clasificación de frutas basadas en redes neuronales convolucionales. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 5(1):3–22, 2020.
- [20] J. Deng A. Newell, K. Yang. Stacked hourglass networks for human pose estimation, 2016.
- [21] A. Chi Chen A. Patel M. Bethge M. W. Mathis T. Nath, A. Mathis. Using deeplabcut for 3d markerless pose estimation across species and behaviors. 2018.
- [22] Jordi Torres. *Deep Learning. Introducción práctica con Keras*. Watch This Space, Universitat Politècnica de Catalunya - UPC Barcelona Tech, 2019.
- [23] S. Gingins V. H. Sridhar, D. Roche. Tracktor: Image-based automated tracking of animal movement and behaviour. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(6):815–820, 2019.
- [24] M. Chahin C. de la Rosa V. Van Steenbergen M. Kerschensteiner F. M. Bareyre A. Aljovic, S. Zhao. A deep learning-based toolbox for automated limb motion analysis (alma) in murine models of neurological disorders. *Communications Biology*, 5(1), 2022.

- [25] K. S. Severson et al. T. W. Dunn, J. D. Marshall. Geometric deep learning enables 3d kinematic profiling across species and environments. *Nature Methods*, 18(5):564–573, 2021.
- [26] J. Broderick et al. M. Selim, D. Hanley. Basic and translational research in intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 49(5):1308–1314, 2018.
- [27] L. J. Noble-Haeusslein P. A. Lapchak, J. H. Zhang. Rigor guidelines: Escalating STAIR and STEPS for effective translational research. *Translational Stroke Research*, 4(3):279–285, 2012.
- [28] I. C. Cuthill M. Emerson D. G. Altman C. Kilkenny, W. J. Browne. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 8(6):100–412, 2010.
- [29] K. M. Cury T. Abe V. Murthy M. W. Mathis M. Bethge A. Mathis, P. Mamidanna. Deeplabcut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, 21(9):1281–1289, 2018.
- [30] M. Ortega. El coeficiente de correlación de los rangos de spearman. *Revista Habanera de Ciencias*, 8, junio 2009.
- [31] T. Meléndez P. Aparicio P. Hernández, J. M. Guiu-Guía. Logros y retos en la atención del ictus en españa: Desde la estrategia del sistema nacional de salud al plan de acción europeo 2018-2030. *Revista Española de Salud Pública*, 95(1):1–5, 2021.
- [32] C. Llorens. El impacto socio-económico del ictus. <https://rithmi.com/el-impacto-socioeconomico-del-ictus/>, year = 2021, note = [En línea; Fecha de consulta: 18 de junio de 2022].

Apéndice A

Aspectos éticos, económicos, sociales y ambientales

A.1. Introducción

En España, el ictus es la segunda causa de fallecimiento (primera en las mujeres), la primera causa de discapacidad adquirida en el adulto y la segunda causa de demencia. A pesar de que el establecimiento e implantación de nuevos objetivos del Sistema Nacional de Salud han propiciado una disminución de la mortalidad, nos enfrentamos a un gran reto en los próximos años. Se espera un envejecimiento de la población europea y un crecimiento del 35 % entre 2017 y 2050, lo que conlleva a un incremento en la incidencia del ictus [31]. Ante estos estudios epidemiológicos, los expertos estiman que 1 de cada 6 españoles sufrirá un ictus a lo largo de su vida. Frente a esta situación, este TFG busca crear una herramienta que permita evaluar de manera objetiva el déficit motor que se produce tras un ictus, con el fin facilitar y mejorar la calidad de la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas que puedan ser trasladadas a la clínica. En este apéndice se detallan los impactos éticos, económicos, sociales y ambientales derivados del desarrollo de este proyecto.

A.2. Descripción de impactos relevantes relacionados con el proyecto

- **Impacto ético:** El desarrollo de este TFG, así como el cuidado de los animales y los procedimientos experimentales, se diseñaron de acuerdo con el Comité Ético para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación (Ref. PROEX 296/16) según la normativa española (RD 1201/2005 y RD53/2013) y de la Unión Europea (UE) (86/609/CEE, 2003/65/CE, 2010/63/UE). Se siguió además el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) utilizando el menor número de animales y teniendo en cuenta la minimización del sufrimiento.
- **Impacto económico:** Como se expone en el Capítulo 1, las enfermedades cerebrovasculares presentan una alta carga socioeconómica. Cada caso de ictus supone un gasto medio de 4.000€ durante los primeros 3 meses posteriores a la enfermedad. A este coste le sigue los posibles daños colaterales como las

bajas laborales, tanto del paciente como de los familiares que deben cuidar a la persona afectada. Además, en función de la gravedad de las secuelas, tras el alta el paciente suele requerir una rehabilitación, lo que implica también un coste a nivel sanitario [32]. La mejor manera de mitigar este impacto económico es la protección y reparación del daño provocado a nivel cerebral, que es en lo que se pretende colaborar con el desarrollo de este TFG, en la agilización del proceso de estudio y validación de nuevas estrategias terapéuticas que permitan hacer frente a esta enfermedad.

Por otra parte, este proyecto se ha llevado a cabo tratando de limitar el coste económico de manera que fuera fácilmente accesible y reproducible. La mayoría del software empleado es totalmente gratuito, y los recursos utilizados son asequibles y fáciles de adquirir. Además, no requiere de un mantenimiento constante, únicamente se deberán incluir mejoras conforme varíen las necesidades del proyecto. El coste total se puede observar en el Apéndice B.

- **Impacto social:** El entorno y la herramienta desarrollados en este TFG tienen como objetivo agilizar y mejorar la calidad de la evaluación del déficit motor que procede al ictus. Esto tiene una repercusión en la evaluación de los mecanismos de neurorreparación y de nuevas terapias experimentales. Por consiguiente, los investigadores reciben una nueva herramienta para utilizar en sus evaluaciones de modelos animales, lo que podría derivar en una mejora de su desempeño, con el objetivo de optimizar el estudio de nuevos tratamientos para el ictus.
- **Impacto medioambiental:** Durante el desarrollo de este proyecto se garantiza una producción y consumo responsable. Durante la fabricación de la estructura se ha procurado emplear únicamente el número necesario de materiales. Además, el sistema a su vez se ha construido para tener una larga duración, y las cámaras implementadas pueden usarse para otros proyectos una vez se acabe el trabajo.

A.3. Conclusiones

Este proyecto se ha comprometido a contribuir con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) adoptados por los Estados Miembros de las Naciones Unidas en 2015. Estos tienen como objetivo la protección del planeta y el alcance de una sociedad de paz y prosperidad para el año 2030, mediante la mejora de la salud y bienestar de las personas. Principalmente, este TFG se compromete con el Objetivo 3, *Salud y bienestar*, mejorando la calidad de la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas que pretenden mejorar y garantizar el bienestar de los ciudadanos.

Apéndice B

Presupuesto económico

En este anexo se detalla el presupuesto económico asociado al desarrollo de este TFG. Este presupuesto se encuentra dividido en dos bloques: el gasto personal y el gasto material. Por último, aparece un presupuesto total derivado de este TFG, resultante de la combinación de ambos bloques

- **Personal:** En este proyecto han estado implicados: dos directores de trabajo, una estudiante de ingeniería biomédica y un investigador predoctoral del IdiPAZ. En la Tabla B.1 se muestra el desglose correspondiente al gasto del personal.

	Coste horario (€)	Horas	Total (€)
Director del trabajo 1	60	20	1800
Director del trabajo 2	60	20	1800
Estudiante de ingeniería	30	670	9000
Investigador predoctoral	15	20	300
TOTAL			12.900

Tabla B.1: Costes de personal.

- **Costes de recursos materiales:** Este coste engloba todos los medios necesarios para el desarrollo del TFG, teniendo en cuenta el tiempo de uso de cada uno y calculando la depreciación correspondiente que ese tiempo conlleva (ver Tabla B.2). El coste del soporte se calcula por separado, teniendo en cuenta: el coste de realización del diseño haciendo uso del sistema *Autodesk Inventor* con la licencia de uso de UPM, el coste de los materiales de impresión y el coste del servicio de impresión. Este se detalla en la Tabla B.3, mientras que la Tabla B.4 refleja el coste total del proyecto.

	Tiempo de vida (años)	Uds.	Coste (€)	Amortización (€/mes)	Uso (meses)	Total (€)
Ordenador personal	5	1	800	13,33	6	80
GoPro Hero 8 Black	5	2	266,78	4,45	5	44,46
Python	Indefinido	1	0	0	6	0
TOTAL						124,46

Tabla B.2: Costes de recursos materiales.

	Coste (€)
Diseño de la estructura (sin IVA)	327,41
Coste del material de impresión	22,07
Coste del servicio de impresión	188,96
TOTAL	538,44

Tabla B.3: Coste del soporte.

	Coste (€)
Costes de personal	12.900,00
Costes de material	662,90
Subtotal	13.562,90
IVA	2.848,21
TOTAL	16.411,11

Tabla B.4: Costes totales.