

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 23-24
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO HISTOMORFOLÓGICO
PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y SEGMENTACIÓN
AUTOMÁTICA DE IMÁGENES

Andrea Rodríguez Despaigne

Tutores:

Dra. Gema Martínez Navarrete

Dr. Eduardo Fernández Jover

Instituto de Bioingeniería

Grupo de Neuroingeniería Biomédica



Declaración de los tutores

D. EDUARDO FERNÁNDEZ JOVER, Catedrático de Universidad y Director del Grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,
DÑA. GEMA MARTÍNEZ NAVARRETE, Dra. En Biología y perteneciente al Grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado:

“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO HISTOMORFOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y
SEGMENTACIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

ANDREA RODRÍGUEZ DESPAIGNE

ha sido realizado bajo su supervisión en el Grupo de Neuroingeniería Biomédica del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández, estimado que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado y defendido públicamente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche a 2 de septiembre de 2024.



Fdo.: Prof. Dr. Eduardo Fernández Jover



Fdo: Dra. Gema Martínez Navarrete

Resumen y palabras clave

En el campo de la neurobiología, la optimización de los protocolos histológicos es fundamental para obtener resultados precisos y fiables en el análisis de tejidos nerviosos. Este trabajo se enfocó en mejorar los métodos de fijación y contraste utilizados en el procesamiento histomorfológico del nervio ciático de ratas, un modelo clave en estudios del sistema nervioso periférico. Se demostró que el uso del glutaraldehído, solo o en combinación con el paraformaldehído, es efectivo para la preservación de las estructuras nerviosas. En lo que respecta al contraste, la combinación de osmio reducido con ferricianuro de potasio y tiocarbhidrazida resultó ser más eficaz para teñir las vainas de mielina, aunque presentó limitaciones en la penetración hacia zonas más profundas del tejido. Además, se identificaron desafíos en la precisión de la segmentación automática de axones debido a la calidad del contraste, lo que indica la necesidad de ajustes adicionales tanto en los protocolos experimentales como en el entrenamiento de los algoritmos.

Palabras clave: histología, fijación, contraste, tetraóxido de osmio, nervio ciático, segmentación automática

In the field of neurobiology, the optimization of histological protocols is fundamental to obtain precise and reliable results in the analysis of nervous tissue. This work focused on improving the fixation and contrast methods used in the histomorphological processing of the rat sciatic nerve, a key model in studies of the peripheral nervous system. It was demonstrated that the use of glutaraldehyde, either alone or in combination with paraformaldehyde, is effective for the preservation of nervous structures. Regarding contrast, the combination of reduced osmium with potassium ferricyanide and thiocarbhydrazide proved to be more effective for staining myelin sheaths, although it presented limitations in penetration into the deeper regions of the tissue. Additionally, challenges were identified in the accuracy of automatic axon segmentation due to contrast quality, indicating the need for further adjustments in both experimental protocols and algorithm training.

Keywords: histology, fixation, contrast, osmium tetroxide, sciatic nerve, automatic segmentation.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 SISTEMA NERVIOSO	8
1.2 SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP).....	11
1.3 NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS	14
1.4 REGENERACIÓN NERVIOSA EN EL SNP	15
1.5 TRATAMIENTO DE LESIONES DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS	16
1.6 EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL TEJIDO NERVIOSO MEDIANTE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	17
1.7 SEGMENTACIÓN DE IMÁGENES CON <i>DEEP LEARNING</i>	19
2. ANTECEDENTES	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 APROBACIÓN ÉTICA	23
4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	23
4.3 SACRIFICIO, PERFUSIÓN Y EXTIRPACIÓN QUIRÚRGICA DEL NERVIIO CIÁTICO.....	23
4.4 FIJACIÓN Y CONTRASTE.....	24
4.5 PROTOCOLO DE INCLUSIÓN.....	25
4.6 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	26
4.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	26
4.8 SEGMENTACIÓN AUTOMÁTICA.....	27
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
5 RESULTADOS	28
5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	28
5.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	31
5.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	34
6 DISCUSIÓN	39
7 CONCLUSIONES	44
8 BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) División del sistema nervioso en sus partes central y periférica (Drake et al., 2014). (B) Zona de transición entre el SNP y el SNC (Mtui et al., 2022).....	8
Figura 2. Estructura típica de una neurona (Tortora & Derrickson, 2006).	9
Figura 3. Composición de la neuroglía del SNC (Tortora & Derrickson, 2006).	10
Figura 4. Estructura y organización de las fibras mielínicas (derecha) y amielínicas (izquierda) (Tortora & Derrickson, 2006).	11
Figura 5. Organización y envolturas de tejido conectivo de los nervios espinales. (A) Corte transversal que muestra los revestimientos de un nervio espinal. (B) Corte transversal de 12 fascículos nerviosos (Tortora & Derrickson, 2006).....	12
Figura 6. (A) Componentes y ramos de los plexos sacro y coccígeo (Drake, 2020). (B) Recorrido e inervación del nervio ciático (Paulsen, 2024).	13
Figura 7. Procesos de degeneración y regeneración axonal (Tortora & Derrickson, 2006).....	15
Figura 8. (A) Apariencia ultraestructural normal del endoneuro. (B) Apariencia ultraestructural normal de los axones (Love et al., 2015).....	17
Figura 9. Segmentación de una imagen de tejido tumoral (Zambrano-Vizueté et al., 2022).	20
Figura 10. Ejemplo de segmentación automática por AxonDeepSeg. (A) Imágenes de entrada. (B) Resultado de la segmentación automática. Se muestra en rojo la vaina de mielina, en azul los axones y el negro el resto del tejido, catalogado como fondo. (Zaimi et al., 2018).	20
Figura 11. Distintas etapas del procesamiento histológico (A) Inclusión de los nervios en los moldes con resina sin polimerizar. (B) Nervio en un bloque de resina polimerizada. (C) Sección de 400 nm teñida con azul de toluidina.....	25
Figura 12. (A) Secciones semifinas obtenidas mediante ultramicrotomía. (B) Captura de una sección de un nervio obtenida con Motic EasyScan One.	26
Figura 13. (A) Corte ultrafino en una rejilla Single Hole (B) Portarrejillas (C) Imagen de microscopía electrónica, escala 10 μm	26
Figura 14. Morfología general de las muestras contrastadas con osmio reducido. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 μm . (B) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (C) Detalle de la zona central, escala 30 μm . (D) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 μm . (E) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (F) Detalle de la zona central, escala 30 μm	28
Figura 15. Morfología de las muestras contrastadas con Lugol. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 μm . (B) Detalle de la zona central, escala 30 μm . (C) Detalle de la	

periferia, escala 30 μm . (B) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 μm . (E) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (F) Detalle de la zona central, escala 20 μm	29
Figura 16. Morfología de las muestras contrastadas con osmio reducido con ferricianuro de potasio y tiocarbohidrazida. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 μm . (B) Detalle de la periferia, escala 40 μm . (C) Detalle de la zona central, escala 20 μm . (B) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 μm . (E) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (F) Detalle de la zona central, escala 20 μm	30
Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Detalle del centro de la muestra. (B) Detalle de la zona de la periferia. Escala 10 μm	31
Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 20 μm . (B) Nervio perfundido con glutaraldehído, escala 10 μm	32
Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Nervio perfundido con PFA y glutaraldehído. (B) Nervio perfundido con glutaraldehído. Escala 10 μm	32
Figura 20. Segmentación automática. (A) Imagen de entrada, sin procesar. (B) Resultado de la segmentación automática de vainas de mielina. (C) Resultado de la segmentación automática de axones. (D) Unión de la segmentación de vainas de mielina y axones.....	33
Figura 21. Comparación de los axones contados por el método manual y por AxonDeepSeg. Se muestra media \pm desviación estándar.	34
Figura 22. Gráfico de Bland-Altman para el recuento manual y automático de axones.	35
Figura 23. Análisis morfométrico. (A) Imagen sin procesar. (B) Imagen procesada manualmente. (C) Imagen procesada por AxonDeepSeg.....	35
Figura 24. Comparación de la media del área del axón entre el método manual y el automático.	36
Figura 25. Comparación de la media del área del axón entre el método manual y el automático para cada fotografía.....	36
Figura 26. Comparación de la media del área de la fibra entre el método manual y el automático....	37
Figura 27. Comparación de la media del área de la fibra entre el método manual y el automático por fotografía.	37
Figura 28. Comparación de la media del espesor de la mielina entre el método manual y el automático.	38
Figura 29. Comparación de la media del espesor de la mielina entre el método manual y el automático por fotografía.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de neuropatías periféricas según Seddon y Sunderland.	14
Tabla 2. Composición de las disoluciones de perfusión.....	24
Tabla 3. Composición de las distintas disoluciones de contraste.	24
Tabla 4. Grupos de muestras según el método de fijación y de contraste.....	25



1. Introducción

1.1 Sistema Nervioso

Generalidades y clasificación anatómica

El sistema nervioso permite al organismo interactuar de forma rápida y adaptativa con el entorno externo (el mundo exterior al cuerpo) como el interno (los componentes y cavidades del organismo) (Bruce M. Koeppen, 2009). Esta comunicación rápida y específica entre áreas muy distantes del cuerpo, tiene lugar gracias a la acción de células nerviosas especializadas (neuronas), que recogen y procesan la información y generan señales de respuesta adecuadas (Lowe et al., 2020).

Es útil dividir el sistema nervioso en sus partes central y periférica (Fig. 1A). El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal. El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por nervios y ganglios (pequeños grupos de neuronas) que inervan todas las partes del cuerpo y constituyen una superficie de contacto entre el entorno y el SNC. La transición entre el SNC y el SNP se produce en las raíces dorsales y ventrales, cerca del punto en el que salen de la médula espinal, y en las fibras de los pares craneales, cerca de su punto de origen en el encéfalo (Bruce M. Koeppen, 2009) (Fig. 1B).

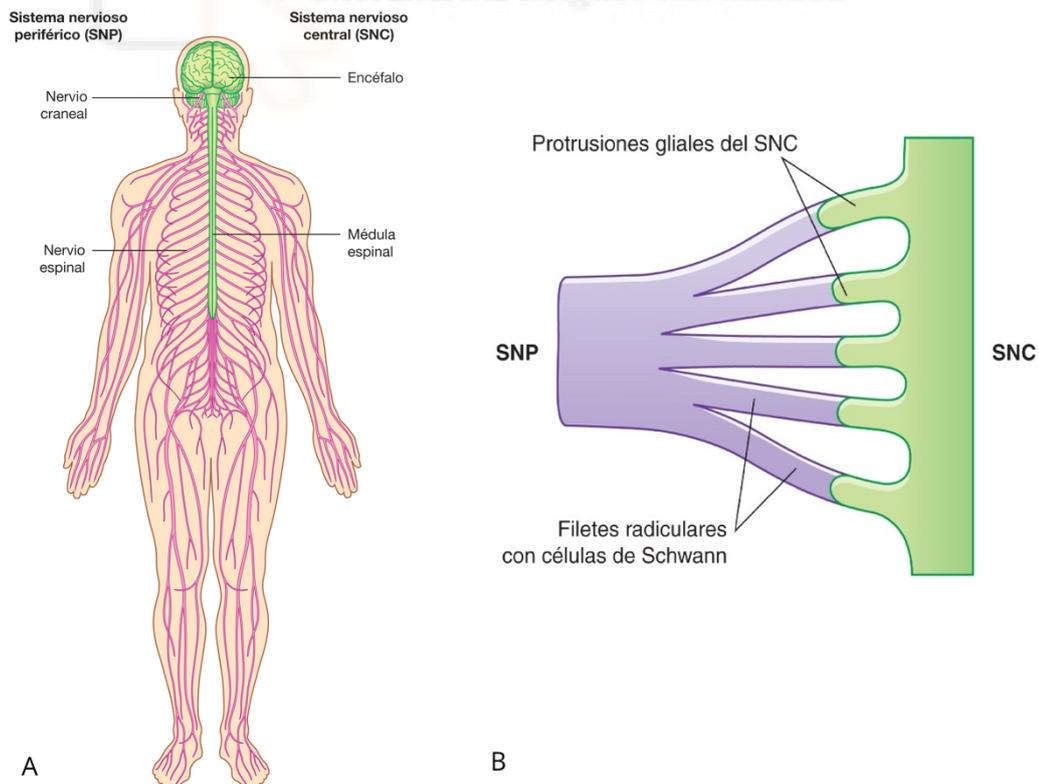


Figura 1. (A) División del sistema nervioso en sus partes central y periférica (Drake et al., 2014). (B) Zona de transición entre el SNP y el SNC (Mtui et al., 2022).

Componentes celulares

El sistema nervioso está compuesto principalmente por dos tipos de células: las neuronas y las células gliales.

Neuronas

Las neuronas son las unidades estructurales y funcionales del sistema nervioso. Generan y conducen cambios eléctricos en forma de impulsos nerviosos. Se comunican químicamente con otras neuronas en los puntos de contacto denominados sinapsis.

Una neurona típica tiene tres partes fundamentales: el cuerpo celular o soma, una o múltiples dendritas y un único axón (Fig. 2). El soma es la parte central de la neurona y en él se encuentran el núcleo y la mayor parte de los orgánulos celulares típicos. Del cuerpo celular surgen una o más prolongaciones que reciben el nombre de dendritas. Estas estructuras reciben los impulsos nerviosos provenientes de otras neuronas y los transmiten al soma. Cada neurona tiene un único axón, encargado de conducir los impulsos nerviosos desde el soma hacia otras neuronas o hacia músculos y glándulas. Además, también puede recibir impulsos nerviosos procedentes de otras neuronas.

La vaina de mielina es una cubierta multicapa formada por lípidos y proteínas que envuelve a ciertos axones, aislándolos y optimizando así la conducción de los potenciales de acción los aísla y aumenta la conducción de los impulsos nerviosos (Tortora & Derrickson, 2006). Los axones que presentan esta vaina de mielina reciben el nombre de mielínicos.

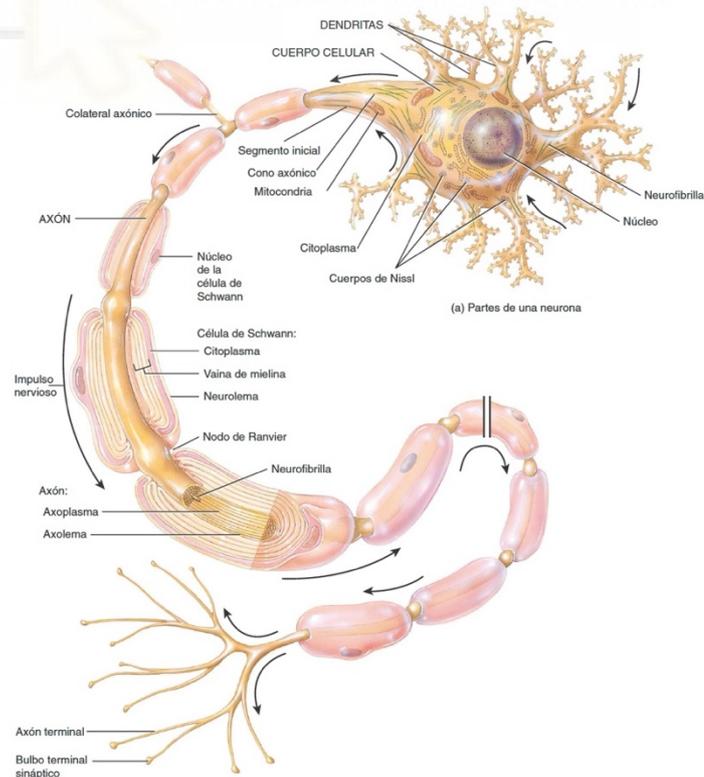


Figura 2. Estructura típica de una neurona (Tortora & Derrickson, 2006).

Neuroglía

Las células neurogliales son responsables de sostener, proteger y asistir a las neuronas en la realización de sus funciones (Gartner, 2021). Los distintos tipos celulares que la componen superan en número a las neuronas entorno a 10 veces. En el SNC la neuroglía está compuesta por los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimarias, mientras que en el SNP las células gliales son las células de Schwann y las células satélite (Fig. 3) (Bruce M. Koeppen, 2009). Por lo general, la neuroglía se concibe como un tejido que brinda soporte a las neuronas, ya que regulan su microentorno y son responsables de la mielinización de sus axones. Pese a ser el principal componente celular no neuronal del sistema nervioso, se sabe que las células gliales juegan un papel determinante en el flujo de señales en los circuitos neuronales, basándose en su capacidad para modular la transmisión sináptica y no sináptica y su papel en la sinaptogénesis y el mantenimiento de las sinapsis (Bruce M. Koeppen, 2009).

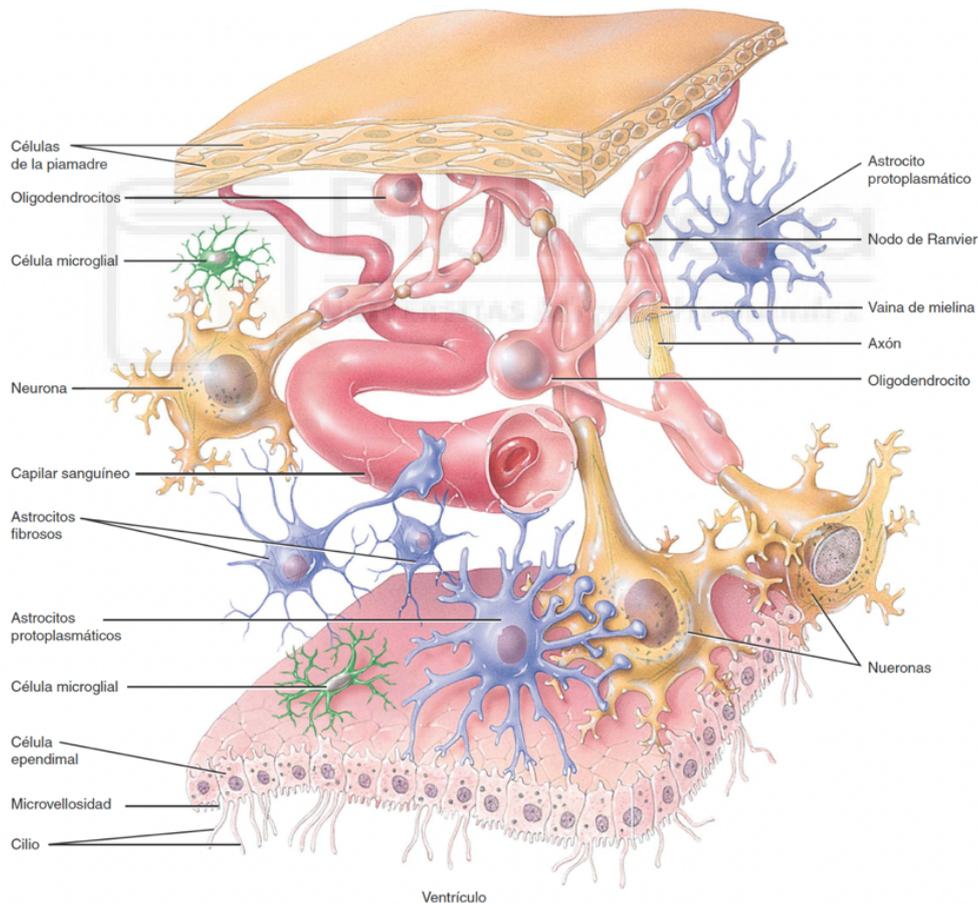


Figura 3. Composición de la neuroglía del SNC (Tortora & Derrickson, 2006).

1.2 Sistema Nervioso Periférico (SNP)

El sistema nervioso periférico (SNP) comprende todo el tejido nervioso que se encuentra fuera del encéfalo y de la médula espinal. Su principal función es conectar el SNC con el resto del cuerpo, facilitando así la transmisión de señales entre el cerebro y los órganos, músculos y tejidos periféricos. Está compuesto por los diez nervios craneales inferiores (emergen del cerebro y el tronco encefálico), las raíces nerviosas de la médula espinal, los ganglios espinales, los plexos, los troncos nerviosos y sus terminaciones en la piel y el músculo, así como los ganglios y nervios autónomos. A su vez, el SNP se subdivide en sistema nervioso autónomo, sistema nervioso somático y sistema nervioso entérico.

Nervio periférico

Un nervio es un haz de cientos de miles de axones (junto con el tejido conectivo y los vasos sanguíneos asociados) que se encuentran por fuera del encéfalo y la médula espinal (Tortora & Derrickson, 2006). Dentro de un nervio periférico, las prolongaciones neuronales pueden ser mielínicas o amielínicas. Las fibras mielínicas son de gran tamaño, y su vaina de mielina es crucial para que se transmitan de forma rápida los impulsos nerviosos involucrados en los reflejos o en movimientos rápidos y coordinados. Al mismo tiempo, las fibras amielínicas, debido a la ausencia de la vaina de mielina, son fibras de menor calibre que transmiten impulsos que no requieren una respuesta rápida, como el dolor crónico, las sensaciones térmicas y las funciones autónomas (Kandel et al., 2013).

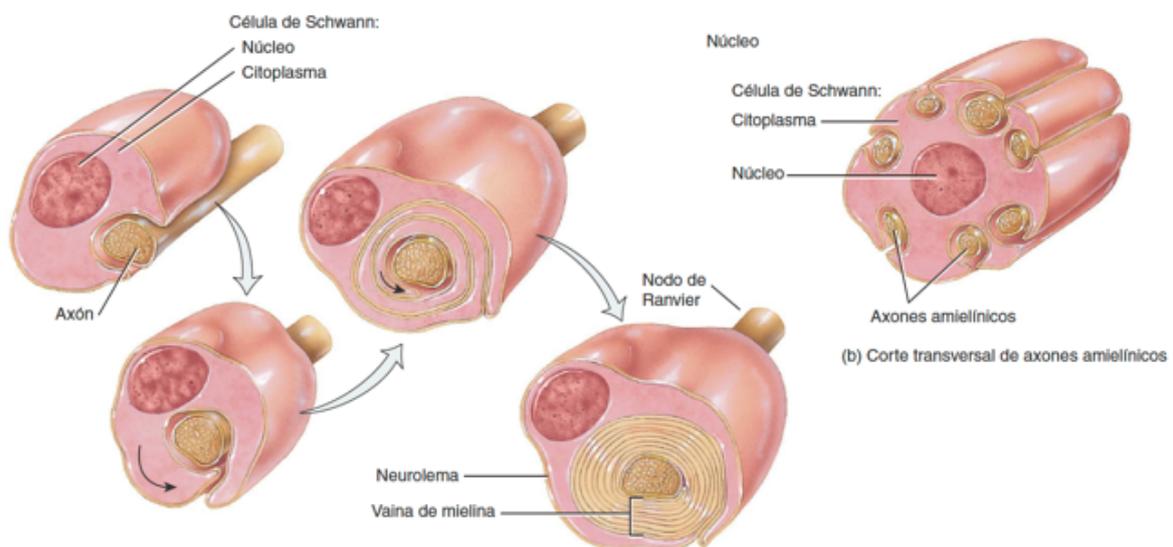


Figura 4. Estructura y organización de las fibras mielínicas (derecha) y amielínicas (izquierda) (Tortora & Derrickson, 2006).

A nivel celular, la mielina es una vaina espiral con múltiples capas, constituida en gran medida por fosfolípidos y formada por células de Schwann individuales, que se enrollan muchas veces sobre sí mismas en torno a una prolongación nerviosa. Esta cubierta sirve como un sistema de aislamiento, que determina en gran medida las características del impulso eléctrico (potencial de acción) transmitido a lo largo de las prolongaciones neuronales (Carlson, 2020).

La vaina de mielina no es continua, sino que existen tramos desprovistos de esta cubierta que reciben el nombre de nódulos de Ranvier, que facilitan la conducción saltatoria del impulso nervioso (potenciales de acción), ya que en ellos se concentran los canales iónicos encargados de producirlos. La conducción del impulso en los axones no mielinizados es continua, y su velocidad es reducida en comparación a la de los nervios mielinizados (Kierszenbaum & Tres, 2020).

En cuanto a su estructura general, cada nervio periférico está revestido por el epineuro, una vaina densa e irregular de tejido conectivo que rodea los fascículos (haces de fibras nerviosas) y los vasos sanguíneos que conforman el nervio. A su vez, cada fascículo está cubierto por el perineuro, que se compone de varias capas de epitelio pavimentoso dispuesto en láminas y actúa como una barrera hematonerviosa que ayuda a proteger los axones de la difusión de sustancias potencialmente tóxicas. Por último, alrededor de cada axón se encuentra una red de fibras de colágeno reticulares, el endoneuro (Mtui et al., 2022).

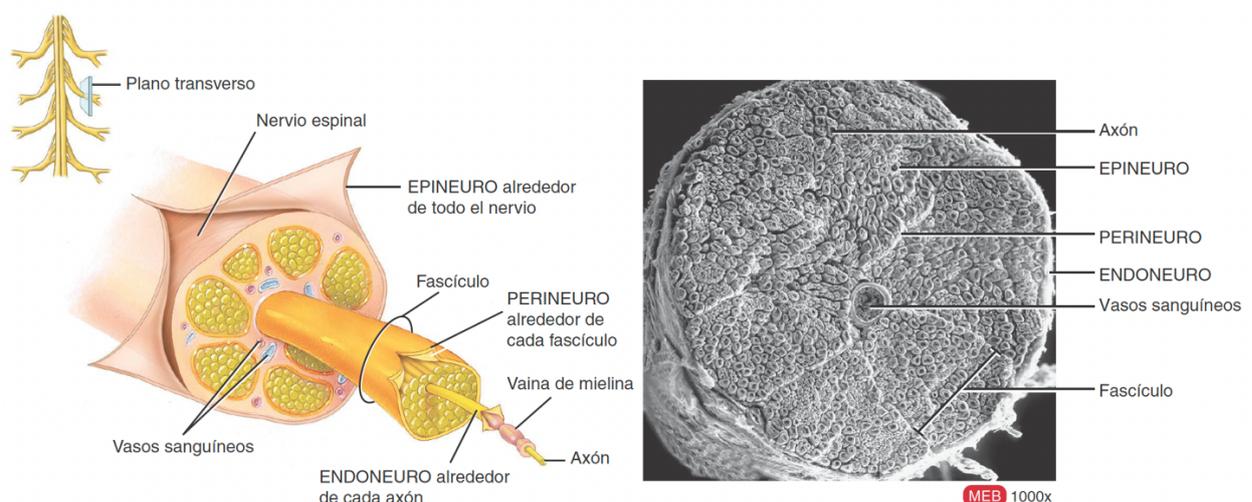


Figura 5. Organización y envolturas de tejido conectivo de los nervios espinales. (A) Corte transversal que muestra los revestimientos de un nervio espinal. (B) Corte transversal de 12 fascículos nerviosos (Tortora & Derrickson, 2006).

Nervio ciático

El nervio ciático, es uno de los nervios más grandes y largos del cuerpo humano. Se origina en el plexo sacro que es una red compuesta por las raíces nerviosas L4, L5, S1, S2 y S3, situadas en la parte inferior de la columna vertebral. Este nervio desciende a través de la pelvis, bajando por la parte posterior de la pierna y se divide en el nervio tibial y el peroneo común en la parte posterior de la rodilla (Snell, 2011). Este nervio inerva los músculos de la parte posterior del muslo, los músculos de la pierna y del pie (Moore et al., 2017), permitiendo movimientos como la flexión de la rodilla y la extensión de la cadera. Además, el nervio ciático es responsable de sensibilidad de la piel de la mayor parte de la pierna y del pie.

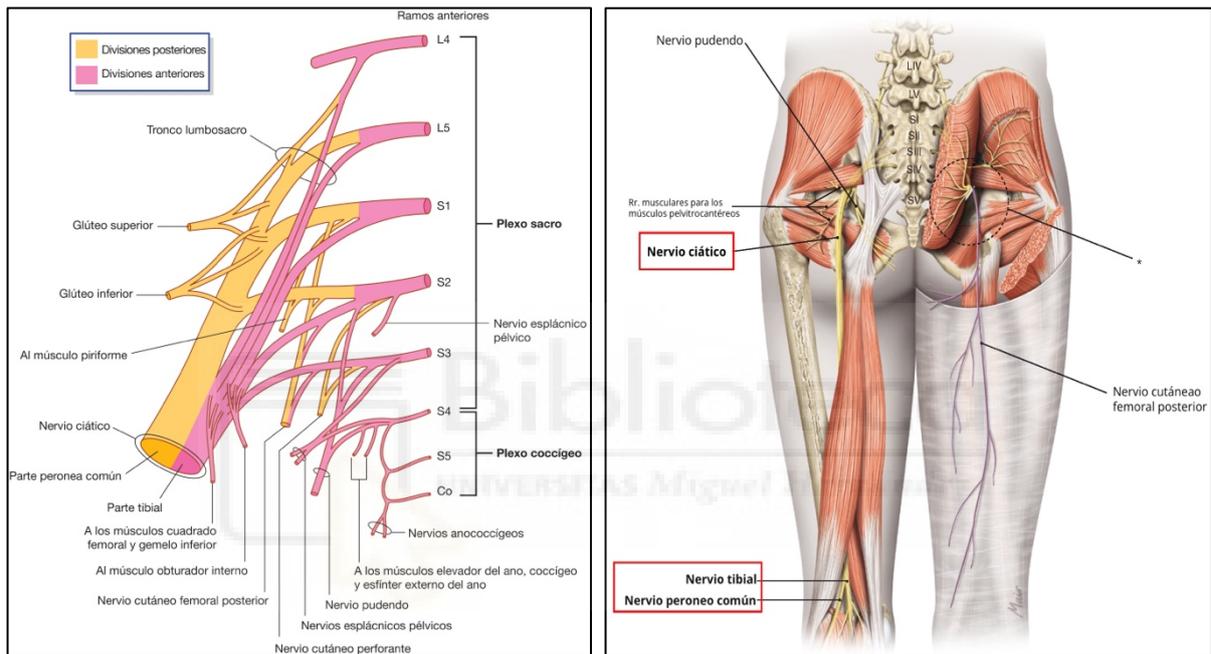


Figura 6. (A) Componentes y ramos de los plexos sacro y coccígeo (Drake, 2020). (B) Recorrido e inervación del nervio ciático (Paulsen, 2024).

El nervio ciático puede ser susceptible a varias afecciones que afectan a su función. Entre ellas destaca la ciática, que se caracteriza por un dolor que se extiende a lo largo del trayecto del nervio ciático, desde la parte baja de la espalda hasta los pies, recorriendo la parte posterior de las piernas. También pueden darse otros síntomas como sensación de quemazón, entumecimiento o debilidad muscular (Ropper & Samuels Martin A., 2019). Generalmente, la ciática se produce por una compresión del nervio ciático que, a su vez, puede tener varias causas: una hernia de disco lumbar, síndrome piriforme (el músculo piriforme, localizado en la región glútea, comprime el nervio ciático), embarazo, o estrechamiento del canal espinal.

1.3 Neuropatías periféricas

Las neuropatías periféricas son un grupo de trastornos que afectan al sistema nervioso periférico, para los cuales se han identificado cientos de etiologías (Siao & Kaku, 2019). Estas lesiones, resultan en la pérdida total o parcial de las funciones motoras y sensoriales de las partes del cuerpo inervadas por el nervio lesionado. Se estima que su incidencia anual es de entre 13 y 23 de cada 100 000 personas (Sullivan et al., 2016). Los accidentes automovilísticos son la causa de lesión predominante (Noble et al., 1998), seguida por lesiones penetrantes, caídas, heridas por arma de fuego, accidentes automovilísticos que involucraron a peatones, lesiones deportivas y lesiones misceláneas (Kouyoumdjian et al., 2017). La calidad de vida de las personas que sufren este tipo de lesiones se ve significativamente reducida y los costes de atención sanitaria derivados de los tratamientos son bastante elevados (Rosberg et al., 2005).

En 1942, Seddon estableció un sistema de clasificación de las neuropatías periféricas basado en la severidad de las lesiones (Seddon, 1943). En 1951, Sunderland expandió esta clasificación de Seddon desde tres tipos de lesiones hasta cinco (Sunderland, 1951) (Tabla 1.).

Seddon	Sunderland	Descripción
Neurapraxia	Grado I	- Bloqueo de la conducción
		- Desmielinización focal sin degradación axonal
		- Secundaria a lesiones leves como isquemia, compresión o toxinas
Axonotmesis	Grado II	- El axón, además de la vaina de mielina, se ve afectado por un daño irreversible.
		- El estroma neuronal (endoneuro, perineuro y epineuro) permanece intacto.
	Grado III	- El nervio distal a la lesión sufre degeneración walleriana
	Grado IV	- Pérdida de la continuidad axonal y endoneural
Neurotmesis	Grado V	- Pérdida de la continuidad axonal, endoneural y perineural
		- El axón, la vaina de mielina y el estroma están todos irreversiblemente dañados

Tabla 1. Clasificación de neuropatías periféricas según Seddon y Sunderland.

1.4 Regeneración nerviosa en el SNP.

Al contrario que en el sistema nervioso central, los nervios dañados del sistema nervioso periférico poseen la capacidad de regenerarse (Kiernan, 1979). Aunque los axones consigan regenerarse, otros factores como que los tejidos diana no sean capaces de aceptar esa reinervación (Gutmann & Young, n.d.) o que los axones sean incapaces de crecer a través del entorno de las células de Schwann preexistentes (Sunderland & Bradley, 1950), impiden una recuperación completa y exitosa de la funcionalidad del tejido nervioso. Además, la ratio de regeneración axonal es de entorno a 1-3 mm/día, lo que implica que un axón tarde meses e incluso años en regenerarse (Sulaiman & Gordon, 2000)

Cuando un nervio periférico sufre axonotmesis en cualquiera de sus grados o una neurotmesis, se desencadenan procesos de regeneración que involucran a los segmentos proximal y distal del sitio de lesión, a las neuronas circundantes y a las células no neuronales (Sullivan et al., 2016). Tras la lesión, las fibras nerviosas distales comienzan a descomponerse en un proceso conocido como degeneración walleriana. Las células de Schwann se multiplican y activan; eliminan los restos celulares y la mielina, forman una especie de tubo que guía el crecimiento de las fibras nerviosas y secretan factores de crecimiento. A medida que el axón regenerado crece, busca reconectar con los tejidos que inervaba en un principio, tales como músculos o glándulas. Una vez establecida esa conexión en la medida de lo posible, las células de Schwann comienzan a mielinizar el nuevo axón.

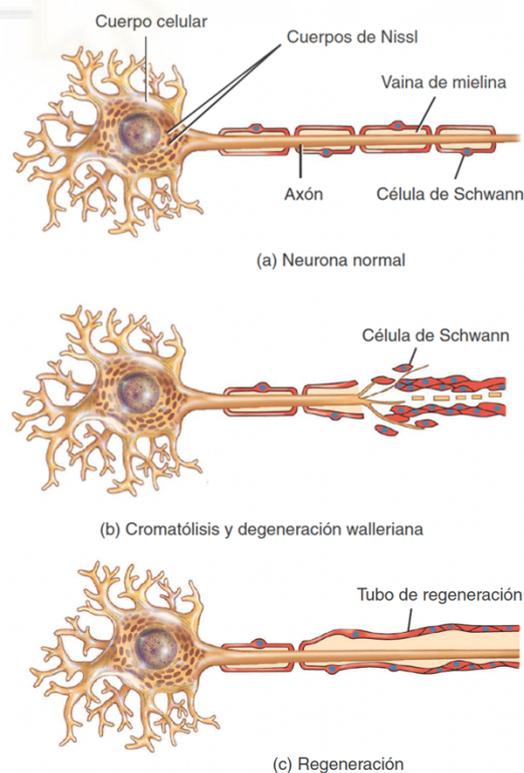


Figura 7. Procesos de degeneración y regeneración axonal (Tortora & Derrickson, 2006).

1.5 Tratamiento de lesiones de los nervios periféricos

Tras largos periodos de regeneración, es poco frecuente que se logre una reinervación funcional completa del nervio lesionado. Por esta razón, es necesario recurrir a un tratamiento, o incluso, a la combinación de varios de ellos. Actualmente, algunos de los tratamientos más empleados son:

- Métodos quirúrgicos:
 - Reparación quirúrgica directa: se realiza suturando los extremos del nervio para restablecer su continuidad. Este método es especialmente efectivo cuando se realiza poco tiempo después de la lesión.
 - Injertos nerviosos: se recurre a ellos cuando ha habido una pérdida significativa de tejido nervioso. Suelen ser autólogos, lo que comporta la desventaja de requerir la extracción de un nervio sano, causando probablemente una pérdida funcional en el área donante.
 - Tubos de guía de regeneración: se trata de dispositivos de materiales sintéticos o de origen biológico diseñados para guiar el crecimiento de los axones. Estos tubos proporcionan un entorno estructurado que evita la dispersión de los axones, mejorando la precisión de la regeneración.
 - Métodos quirúrgicos emergentes: unión fotoquímica de tejido o unión de los extremos de los axones seccionados con polietilenglicol (Lanier et al., 2021).
- Métodos no quirúrgicos:
 - Administración de células madre (Kubiak et al., 2020) o de factores de crecimiento como el NGF (factor de crecimiento nervioso por sus siglas en inglés).
 - Estimulación: eléctrica, magnética, con ultrasonidos de baja intensidad, fototerapia o biofotomodulación (Alvites et al., 2018) (Modrak et al., 2020)
 - Terapia génica, farmacológica o nutricional.

1.6 Evaluación del estado del tejido nervioso mediante técnicas histológicas

Actualmente, existen multitud de métodos para evaluar el estado de las fibras nerviosas tras una lesión y la regeneración nerviosa: recuperación conductual mediante pruebas motoras y sensoriales, evaluación de los músculos re-inervados a través de mediciones electrofisiológicas junto con el análisis de las fibras musculares re-inervadas, análisis histomorfométrico e inmunotinción de las fibras nerviosas regeneradas (tanto mielinizadas como no mielinizadas), longitud nodal e internodal y análisis de los cuerpos celulares neuronales en la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal (Ronchi et al., 2023). Por lo general no existe un único método que sea preferible a los demás; más bien, se combinan varios métodos para responder a según qué preguntas u obtener un tipo de información concreta.

En este contexto, es importante destacar las técnicas histomorfométricas. Estas tienen como fin la obtención de imágenes altamente informativas mediante distintas técnicas de microscopía, de las que se pueden extraer datos como el número total de cada uno de los tipos de fibras nerviosas (mielínicas, amielínicas, degeneradas, regenerantes) el área de los axones, el área de la fibra, el espesor de la mielina o la G-Ratio. El estudio de estos parámetros de densidad y morfométricos es fundamental para correlacionar cambios morfológicos con procesos patológicos (Goto & Goto, 2006) y evaluar el efecto de nuevos tratamientos. Cabe destacar que para todo ello es necesario primero conocer en profundidad como son todos estos parámetros en muestras sanas o controles, para posteriormente poder realizar las comparaciones pertinentes.



Figura 8. (A) Apariencia ultraestructural normal del endoneuro. (B) Apariencia ultraestructural normal de los axones (Love et al., 2015)

Procesamiento de las muestras y sus problemáticas

A pesar de su utilidad, las técnicas histomorfológicas se enfrentan a varios desafíos, ya que necesitan grandes inversiones de tiempo, personal y material.

Los procedimientos empleados se componen de numerosos pasos como la fijación, deshidratación, inclusión, corte y tinción de los tejidos, pasos requieren mucho tiempo y recursos (Slaoui et al., 2017) y deben ejecutarse con precisión para evitar cometer errores que puedan comprometer los resultados finales.

El manejo prolongado de las muestras durante estos numerosos pasos no solo es un proceso lento, sino que también incrementa el riesgo de degradación del tejido, contaminación o generación de artefactos, es decir, alteraciones del tejido como resultado de un factor externo (Seoane et al., 2004), que impiden un estudio completo y adecuado de las muestras.

Hay pasos especialmente críticos en el procesamiento, como por ejemplo, la fijación (Calvo, 2023), cuyo objetivo principal es estabilizar las proteínas y otros componentes celulares para evitar la descomposición post-mortem y para mantener la estructura de los tejidos lo más cercana posible al estado vivo (Slaoui et al., 2017). Por ello, es esencial que el fijador empleado penetre completamente en el tejido para preservar adecuadamente su estructura y, precisamente, la penetración efectiva de los fijadores es uno de los mayores desafíos de la fijación, ya que esta se ve limitada debido al volumen, complejidad y densidad de los tejidos (Kiernan, 2000). Así, se requiere un equilibrio cuidadosa entre el tipo de fijador (paraformaldehído, glutaraldehído...), el tiempo de exposición, y el tamaño de la muestra para garantizar resultados óptimos.

Otro paso crítico del tratamiento de las muestras, es el contraste, que consiste en usar agentes que intensifican las diferencias en la absorción de luz o electrones entre distintas partes del tejido, lo que facilita la diferenciación de componentes celulares y subcelulares que de otro modo serían difíciles de distinguir. El agente de contraste más utilizado, sobre todo en microscopía electrónica, es el tetraóxido de osmio OsO₄ (Studer et al., 2008) que actúa también como un fijador secundario.. Sin embargo, el tejido nervioso periférico presenta ciertas limitaciones a la hora de ser contrastado, debido al alto nivel de compactación de la mielina en los nervios (Kister & Kister, 2022), que impide la penetración del osmio hacia el centro de las muestras.

La mayoría de estudios histomorfológicos se realizan con procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM), aunque en determinados puntos del protocolo se pueden preparar secciones para observarlas por otras técnicas, como la microscopía óptica. Otras

técnicas basadas en rayos X, como la microtomografía computarizada (Micro-CT) o la microscopía de rayos X en 3D permiten la visualización tridimensional y no destructiva de las muestras (Ritman, 2011), eliminando la necesidad de realizar cortes de las muestras. Esto, mejora la integridad de los datos obtenidos, ya que se elimina la variabilidad que pueda existir entre secciones, y reduce drásticamente el tiempo de procesamiento.

La micro-CT es ideal para obtener imágenes detalladas de estructuras internas en tejidos y materiales, mientras que la microscopía de rayos X en 3D ofrece capacidades avanzadas de contraste de fase y resolución submicrométrica, permitiendo un análisis detallado de estructuras internas en alta resolución.

1.7 Segmentación de imágenes con *deep learning*

Interés clínico de la segmentación automática

Una vez obtenidas las imágenes tras el procesamiento histológico, extraer la información de interés de estas también supone un alto coste de tiempo, personal y de recursos. Aunque en análisis manual de las imágenes sigue siendo el *gold-standard* (método de referencia), existe un creciente interés por automatizarlo, especialmente mediante técnicas basadas en IA (Inteligencia Artificial).

La segmentación de imágenes es un proceso que consiste en aislar el objeto u objetos de interés del fondo (Olabarriaga & Smeulders, 2001), con el objetivo de simplificar la representación de la imagen para que sea más fácil de analizar. Esta se ha convertido en una práctica cada vez más habitual en el diagnóstico clínico ya que ayuda en el monitoreo de enfermedades como el cáncer (como se ejemplifica en la Figura 6) la modificación de dosis de medicamentos y a reducir la exposición a la radiación (Zambrano-Vizuet et al., 2022). A pesar de su utilidad, es un proceso lento y exigente, por lo que existe un creciente interés de desarrollar métodos automatizados basados en *deep learning*.

La implementación de algoritmos de *deep learning* para la segmentación automática en la práctica clínica enfrenta grandes desafíos. Entre ellos la necesidad de estandarizar los protocolos de estos programas y el entrenamiento de los algoritmos de manera rigurosa, comenzando con imágenes de muestras sanas.

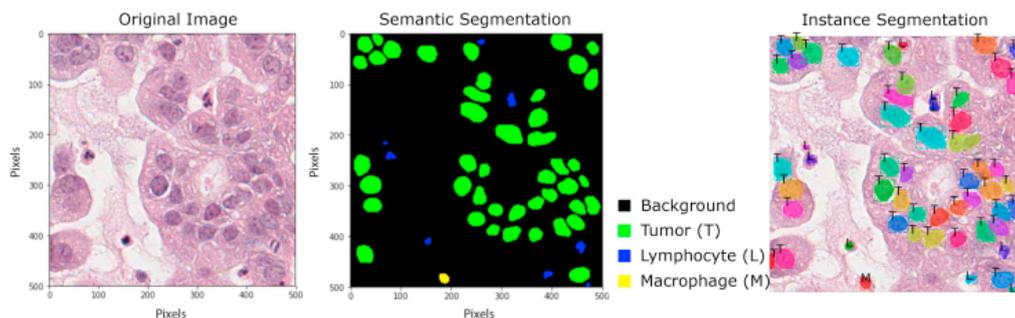


Figura 9. Segmentación de una imagen de tejido tumoral (Zambrano-Vizuet et al., 2022).

Segmentación de imágenes de microscopía de tejido nervioso

Un análisis manual de imágenes de microscopía de tejido nervioso consiste en contar cada axón y, para el análisis morfométrico, rodear con el cursor el exterior de cada fibra nerviosa y después, el exterior del axón. Además, se requiere un procesamiento de los datos posterior para obtener los valores de la densidad y de los parámetros morfométricos. En un intento de automatizar este laborioso análisis, se han aplicado múltiples algoritmos tradicionales de segmentación de imágenes para la segmentación y etiquetado de mielina y axones (Dweiri et al., 2022). Sin embargo estos no han tenido una gran acogida debido a sus limitados rango de aplicación y precisión (Zaimi et al., 2018). En los últimos años, los métodos de segmentación automática basados en deep learning han mostrado grandes capacidades para segmentar imágenes de este tipo (Ancires et al., 2012), reduciendo considerablemente el tiempo empleado en el análisis (respecto al manual y a los algoritmos clásicos) y brindando datos fiables.

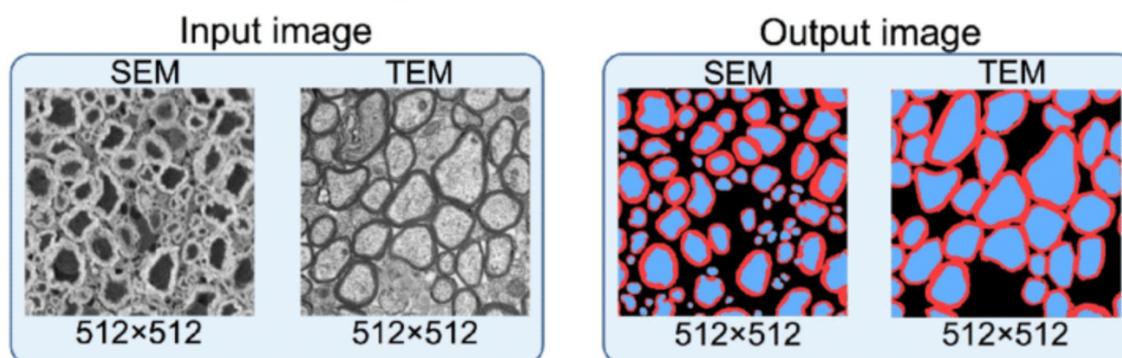


Figura 10. Ejemplo de segmentación automática por AxonDeepSeg. (A) Imágenes de entrada. (B) Resultado de la segmentación automática. Se muestra en rojo la vaina de mielina, en azul los axones y el negro el resto del tejido, catalogado como fondo. (Zaimi et al., 2018).

2. Antecedentes

La histología es una herramienta útil para caracterizar estados patológicos y evaluar la eficacia de tratamientos, partiendo siempre de la base de comprender como funcionan las células y tejidos en estados sanos. Sin embargo, tanto los protocolos empleados para tratar las muestras como los métodos para extraer datos de las imágenes obtenidas pueden ser optimizados.

Empezando por el procesamiento de las muestras, este trabajo se centra en optimizar dos puntos clave: la fijación y el contraste. En cuanto a la fijación, el paraformaldehído y el glutaraldehído son los fijadores por antonomasia (Yanoff, 1973). El paraformaldehído penetra de manera más rápida, mientras que el glutaraldehído lo hace de forma más lenta, pero proporciona una fijación más robusta. Es por ello, que podría resultar interesante el estudio de la fijación proporcionada solamente por el glutaraldehído, así como por la mezcla de ambos fijadores, que según Kiernan (2000) permite una preservación excelente de la ultraestructura celular, haciendo que sea una opción común en estudios que requieren alta resolución.

.Con respecto al contraste, debido a sus limitaciones numerosas investigaciones se centran en explorar métodos para mejorar la eficacia del osmio. Uno de los abordajes más comunes es el uso del osmio reducido, que se obtiene combinando el osmio con otros agentes como el ferrocianuro de potasio (White et al., 1979; Ströh et al., 2022), que elimina el osmio de manera eficiente de estructuras no lipídicas, aumentando la concentración de éste en los lípidos respecto a otras estructuras. Otra estrategia común para mejorar el rendimiento del osmio es usar la tiocarbohidrazida (Seligman et al., 1966a), que funciona como un puente que permite la deposición de más osmio en los sitios originales donde se encuentra el osmio tras una primera incubación (Tapia et al., 2012). También se ha optado por buscar compuestos alternativos al osmio, como es el Lugol. Su capacidad para penetrar tejidos densos y su menor toxicidad lo convierten en una opción interesante para algunas aplicaciones relacionada con la microtomografía computarizada (Micro-CT), especialmente en la visualización de tejidos blandos (Xia et al., 2020).

Además, sería útil estudiar la utilidad de herramientas automáticas como *AxonDeepSeg* (Zaimi et al., 2018) para suplir posibles deficiencias en el procesamiento, y evaluar su capacidad de asemejarse a un análisis efectuado de manera manual.

3. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster (TFM) es optimizar el procesamiento histomorfológico de muestras sanas de nervio ciático, con el fin de obtener imágenes con una histología uniforme y, por tanto, altamente informativas. De ser determinado, el mejor protocolo será utilizado para observar muestras mediante microscopía de rayos X y para realizar segmentación de las imágenes con Inteligencia Artificial de manera óptima.

En cuanto a los objetivos específicos, estos son:

- Determinar el mejor tipo de fijación, para establecer cuál de ellas ofrece una mejor preservación de las estructuras celulares y tisulares.
- Determinar el contraste que más realce la vaina de mielina.
- Segmentar de manera automática y óptima imágenes con histología deficiente.
- Comparación del conteo de axones y parámetros morfométricos entre una herramienta automática y el método manual.



4. Materiales y métodos

4.1 Aprobación ética

Los procedimientos experimentales llevados a cabo para este trabajo se ajustaron a la Directiva 2012/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, y al RD 53/2013 de la regulación española sobre la protección de animales utilizados con fines científicos y aprobados por el Comité de la Universidad Miguel Hernández de Elche para el uso de animales en el laboratorio con el Código de Investigación Responsable (COIR) 240718020604.

4.2 Animales de experimentación

Se han utilizado un total de cuatro ratas *Wistar*. Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura, humedad y ventilación, y fueron expuestas a ciclos de 12h de luz/oscuridad, con el fin de mantener correctamente los ritmos circadianos. Además, tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Previamente al sacrificio, las ratas fueron examinadas para garantizar que su estado de salud era óptimo y que no influiría negativamente en el procedimiento experimental.

4.3 Sacrificio, perfusión y extirpación quirúrgica del nervio ciático.

Las cuatro ratas *Wistar* fueron sacrificadas mediante una sobredosis intraperitoneal de Dolethal[®], un medicamento de uso veterinario cuyo componente principal, el ácido barbitúrico, actúa deprimiendo el SNC debido a una disminución en el consumo de oxígeno por el cerebro. Previamente a la inyección de Dolethal[®], las ratas fueron expuestas a la inhalación de isoflurano, un agente volátil que induce un estado de somnolencia, para garantizar que no sufrieran con la inyección intraperitoneal.

Tras el sacrificio, a las ratas se les realizó una perfusión transcardíaca. Esta técnica permite una distribución uniforme de fijadores a través del sistema circulatorio del animal. Para ello, se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo. Con el fin de permitir el drenaje primero de la sangre, y posteriormente del tampón y de la solución de fijación, se realizó un corte en la aurícula derecha. Mediante una bomba peristáltica, se hizo pasar primero 100 mL de tampón cacodilato 0,15M a un flujo de 0,45ml/min, hasta que se observó que se había drenado toda la sangre. A continuación, se hizo pasar por la bomba 250 mL de la solución de perfusión al mismo flujo que el tampón. En este caso se emplearon dos soluciones de distinta composición, que se especifican en la siguiente tabla, todo diluido en tampón cacodilato 0.15M.

Composición de las soluciones de fijación	
Tipo I	Tipo II
Paraformaldehido (PFA) 2% y glutaraldehido 2,5%.	glutaraldehido 2,5%.

Tabla 2. Composición de las disoluciones de perfusión.

Una vez completada la perfusión, se extrajeron ambos nervios ciáticos de cada rata y se cortaron en secciones de tamaño similar, para garantizar que los resultados fueran uniformes y no estuvieran influidos por el tamaño y grosor de las muestras.

4.4 Fijación y contraste

Fijación

Para fijar correctamente las muestras, estas fueron incubadas durante 24h en una disolución de PFA 2% y glutaraldehído 2,5%.

Contraste

A continuación, los nervios se introdujeron en las distintas disoluciones de contraste, cuyas composiciones se especifican en la tabla:

Solución de contraste		
Tipo I	Tipo II	Tipo III
Tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio (2h)	Lugol (24h)	Tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio (2h) Tiocarbohidracida (1h) Tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio (2h)

Tabla 3. Composición de las distintas disoluciones de contraste.

Al combinar los dos tipos de perfusiones y los tres tipos de contrastes, se obtuvieron un total de seis condiciones que comparar entre sí. El ensayo se realizó por duplicado, ya que se perfundieron dos ratas con cada tipo de solución (un total de 4 animales) y de cada una de ellas se extrajeron tres secciones de nervio para probar con cada uno de los tres diferentes contrastes, lo que hizo un total de doce muestras.

Perfusión					
Tipo I			Tipo II		
Paraformaldehido 2% + glutaraldehido 2.5%			Glutaraldehido 2.5%		
Contraste			Contraste		
I	II	III	I	II	III
Osmio	Lugol	Osmio reducido	Osmio	Lugol	Osmio reducido
reducido con		con ferricianuro	reducido con		con ferricianuro
ferricianuro		de potasio y	ferricianuro		de potasio y
de potasio		tiocarbohidrazida	de potasio		tiocarbohidrazida

Tabla 4. Grupos de muestras según el método de fijación y de contraste.

Así, las muestras perfundidas con disolución Tipo 1 se etiquetaron como 1.X, y las perfundidas con la disolución tipo II como 2.X. Las muestras contrastadas con la disolución de contraste I se etiquetaron como X.1, con el contraste II como X.2 y con el contraste X.3.

4.5 Protocolo de inclusión

Posteriormente las muestras se deshidrataron mediante un gradiente de alcoholes: (25% - 5 min, 50% - 5 min, 70% - 10 min, 90% - 15 min, 100% - 4x10 min). Finalmente, los nervios fueron incluidos en resina Agar100 de consistencia media y polimerizados a 62°C, obteniéndose unos bloques de resina individuales con los nervios embebidos en su interior, tal y como se observa en la Figura 11. Como líquido de transición entre los alcoholes y la resina se utilizó el óxido de propileno. Para comprobar si el procesamiento histológico se había llevado a cabo de forma correcta, se tiñeron varios cortes con azul de toluidina y fueron observados mediante microscopía óptica.

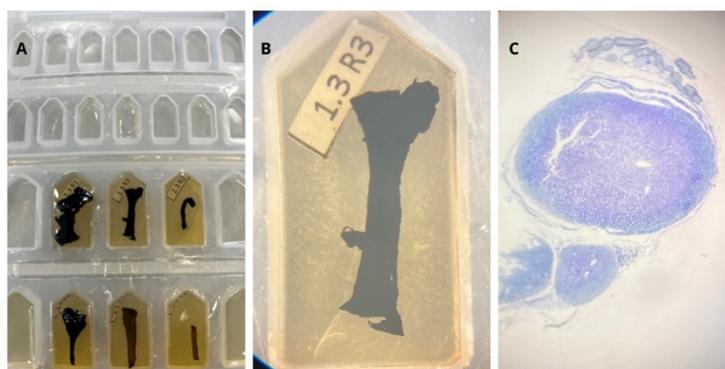


Figura 11. Distintas etapas del procesamiento histológico (A) Inclusión de los nervios en los moldes con resina sin polimerizar. (B) Nervio en un bloque de resina polimerizada. (C) Sección de 400 nm teñida con azul de toluidina.

4.6 Microscopía óptica

Una vez obtenidos los bloques con los nervios en su interior, se realizaron cortes semifinos (400 nm de espesor) con un ultramicrotomo (*Leica Ultracut UCT Ultramicrotome*). Se tiñeron los cortes con azul de toluidina, y se fotografiaron y digitalizaron con la ayuda de un escáner (*Motic EasyScan One*) y su correspondiente software para analizar las imágenes generadas (*MoticDSAssistant*).

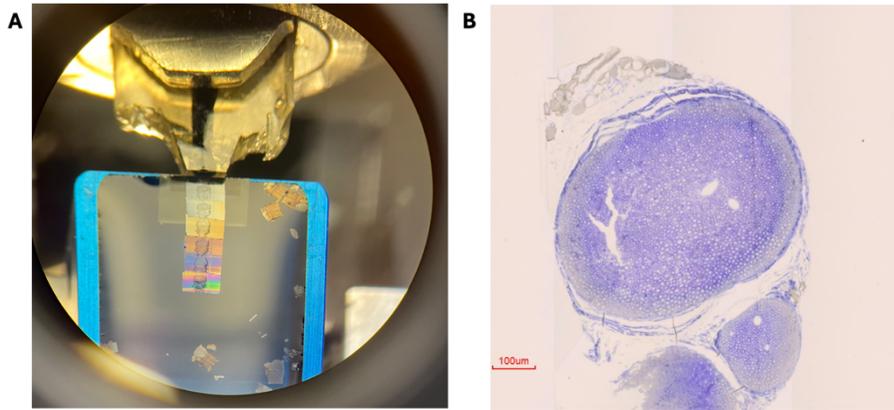


Figura 12. (A) Secciones semifinas obtenidas mediante ultramicrotomía. (B) Captura de una sección de un nervio obtenida con Motic EasyScan One.

4.7 Microscopía electrónica

Una vez obtenidos los cortes semifinos, se obtuvieron con el uso del ultramicrotomo cortes ultrafinos de 70 nm de espesor. Estos últimos, fueron colocados en rejillas para microscopía electrónica (Fig. 13A) y almacenados en un portarrejillas (Fig 13B). A continuación, los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y después observados y fotografiados mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, por sus siglas en inglés) modelo SIGMA 300 VP de ZEISS. Este instrumento ofrece mayor resolución y tiene un rango de energía mucho mayor que un microscopio electrónico convencional, con lo cual, permite observar detalles ultraestructurales, tal y como se observa en la Fig.13 C.

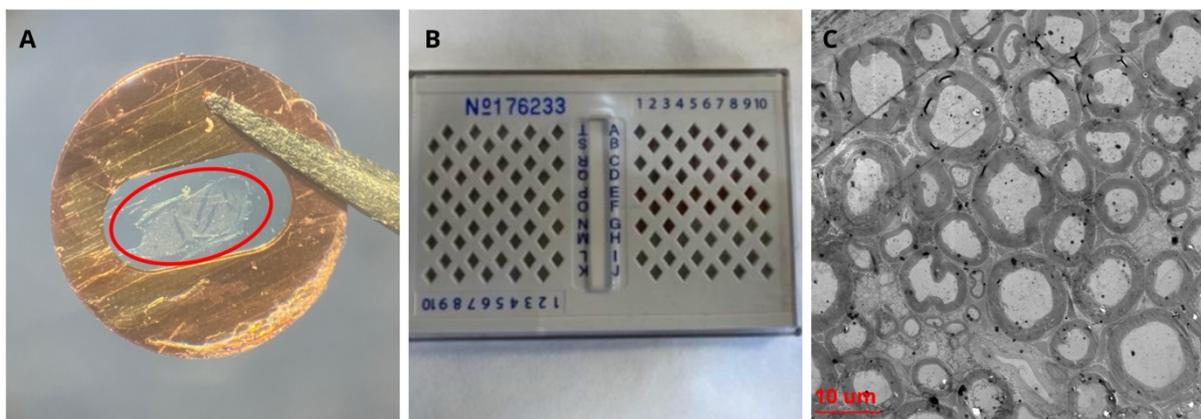


Figura 13. (A) Corte ultrafino en una rejilla Single Hole (B) Portarrejillas (C) Imagen de microscopía electrónica, escala 10 µm.

4.8 Segmentación automática.

Las imágenes de microscopía electrónica se emplearon para realizar una segmentación automática de axones y mielina con el programa *AxonDeepSeg* (Zaimi et al., 2018), una herramienta de software libre basada en *deep learning*. Este software utiliza modelos convolucionales de redes neuronales que han sido entrenados con datos específicos para identificar y segmentar con precisión las estructuras de axones y mielina en las imágenes. También es capaz de realizar análisis de densidad y morfometría de manera automática.

Los datos derivados de la segmentación automática se compararon con un análisis manual realizado con el programa ImageJ (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*).

4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la creación y ejecución de *scripts* en Python.

En primer lugar, se creó un gráfico de Bland-Altman, una herramienta para comparar dos métodos de medición que se aplican a la misma variable para determinar si son equivalentes (diferencias centradas alrededor de cero y límites de acuerdo estrechos). Además, se calculó el ICC (Índice de Correlación Intraclase), que ofrece una medida global de la concordancia. Un ICC elevado indica una alta concordancia o reproducibilidad entre las mediciones.

Se utilizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si las variables estudiadas seguían o no una distribución normal. En caso de seguir una distribución normal ($p > 0.05$), se realizó una prueba t de Student. En el caso de que las variables no siguiesen una distribución normal ($p < 0.05$) se realizó la prueba de la U de Mann-Whitney. Estos distintos tipos de análisis ayudaron a determinar si las diferencias entre los resultados obtenidos analizando las imágenes de forma manual o de forma automática presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

5 Resultados

5.1 Microscopía óptica

Tras el procesamiento histológico, se realizaron capturas a 80x de los nervios ciáticos. Para estudiar las muestras de la manera más completa posible, se realizaron capturas tanto de vistas globales de los nervios, como de detalles en la zona de la periferia y en la zona central.

Los resultados obtenidos para este análisis histológico, mediante la comparación de las imágenes más representativas de cada tipo de procesamiento se muestran a continuación.

Osmio reducido con ferricianuro de potasio

Para los nervios contrastado con tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio se observó, para ambas perfusiones (Fig. 14) que la mielina de los axones de la periferia tenía un contraste mayor que la mielina del centro de la muestra, donde el contraste resultó deficiente. Además, al observarse en detalle el centro de las muestras, se descubrió que había cierta discontinuidad en las vainas de mielina.

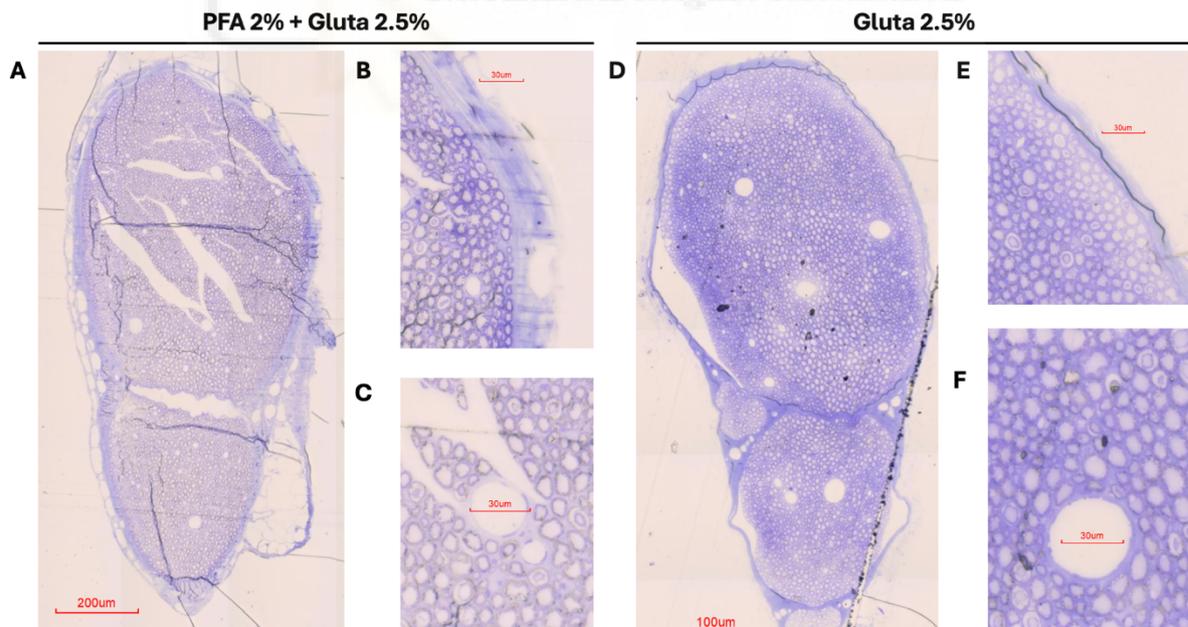


Figura 14. Morfología general de las muestras contrastadas con osmio reducido. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 µm. (B) Detalle de la periferia, escala 30 µm. (C) Detalle de la zona central, escala 30µm. (D) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 µm. (E) Detalle de la periferia, escala 30 µm. (F) Detalle de la zona central, escala 30 µm.

Lugol

Para los nervios contrastados con Lugol se observó para ambas perfusiones que el contraste tanto en el centro como en la periferia de las muestras era deficiente (Fig. 15). Además, al observarse en detalle las muestras, se descubrió que había cierta discontinuidad en las vainas de mielina.

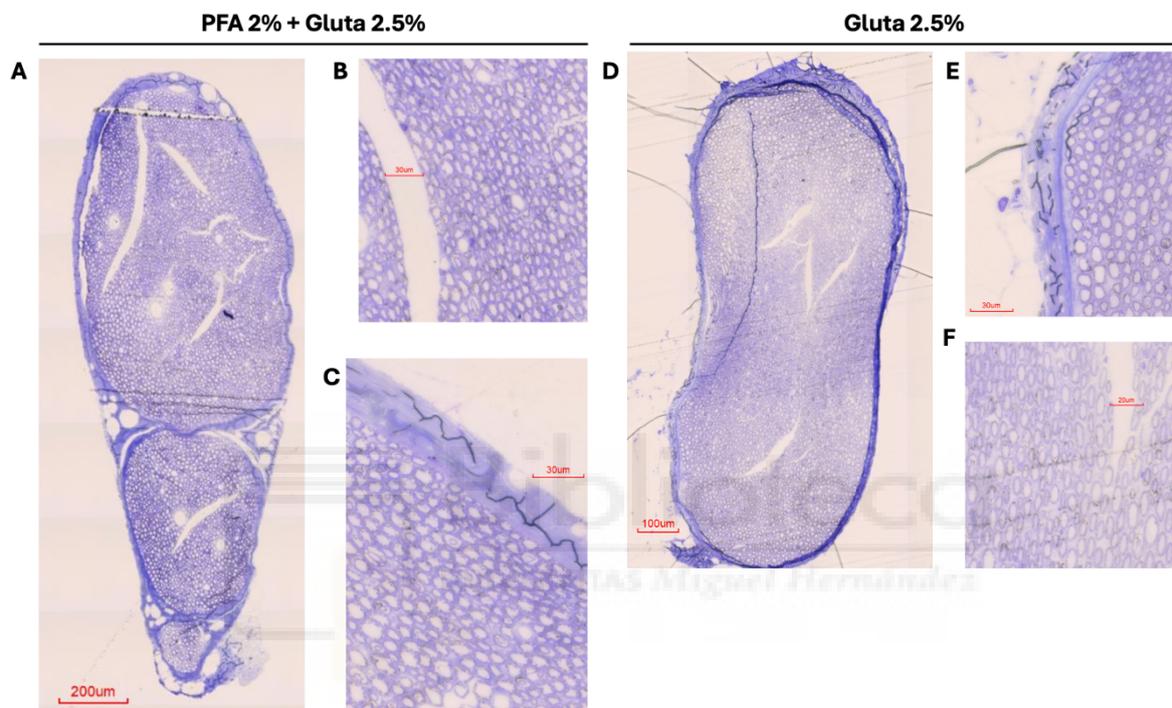


Figura 15. Morfología de las muestras contrastadas con Lugol. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 μm . (B) Detalle de la zona central, escala 30 μm . (C) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (D) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 μm . (E) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (F) Detalle de la zona central, escala 20 μm .

Osmio reducido con ferricianuro de potasio y tiocarbohidrazida

Para los nervios que se contrastaron con dos pasos de tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio y una incubación intermedia de tiocarbohidrazida se observó para ambos tipos de perfusiones (Fig. 16) que se observó que la mielina de los axones más periféricos tenía un contraste óptimo, a diferencia de la mielina de las fibras del centro de la muestra, donde el contraste resultó deficiente (Fig. 16C). Además, se observó que en el centro de las muestras (Fig. 16C y F) había cierta discontinuidad en las vainas de mielina.

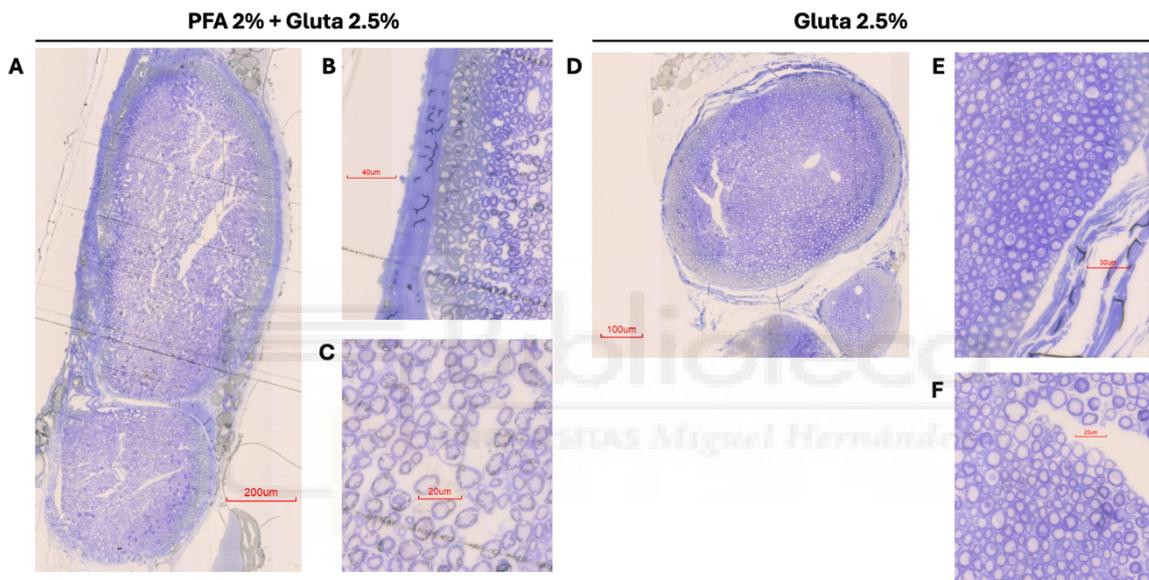


Figura 16. Morfología de las muestras contrastadas con osmio reducido con ferricianuro de potasio y tiocarbohidrazida. (A) Vista global de un nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 200 μm . (B) Detalle de la periferia, escala 40 μm . (C) Detalle de la zona central, escala 20 μm . (D) Vista global de un nervio perfundido con glutaraldehído, escala 100 μm . (E) Detalle de la periferia, escala 30 μm . (F) Detalle de la zona central, escala 20 μm .

5.2 Microscopía electrónica

Tras el estudio de las muestras mediante microscopía óptica, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), que al tener mayor resolución que la microscopía óptica, permite estudiar detalles ultraestructurales como la presencia de fibras amielínicas, axones hipomielínicos o fibras de colágeno. Con este análisis se pretendía estudiar más de cerca las vainas de mielina, para determinar la calidad de los métodos de contraste realizados, así como realizar una segmentación y análisis de densidad y morfométrico tanto por el método manual tradicional como por un método automático.

Osmio reducido con ferricianuro de potasio

Tal y como se observó en las capturas de microscopía óptica, para ambos tipos de perfusión se produjo un contraste mayor en la periferia que en la zona central de los nervios para ambas perfusiones. En la Figura 17B, se muestra como en la zona exterior del nervio (zona izquierda), hubo un mejor contraste de las vainas de mielina y, conforme se avanza hacia el centro del nervio (zona derecha) las vainas pierden contraste, como indica la dirección de la flecha amarilla. Además, se puede apreciar con mayor detalle la discontinuidad de las vainas de mielina, lo cual hace pensar que han perdido parte de su estructura.

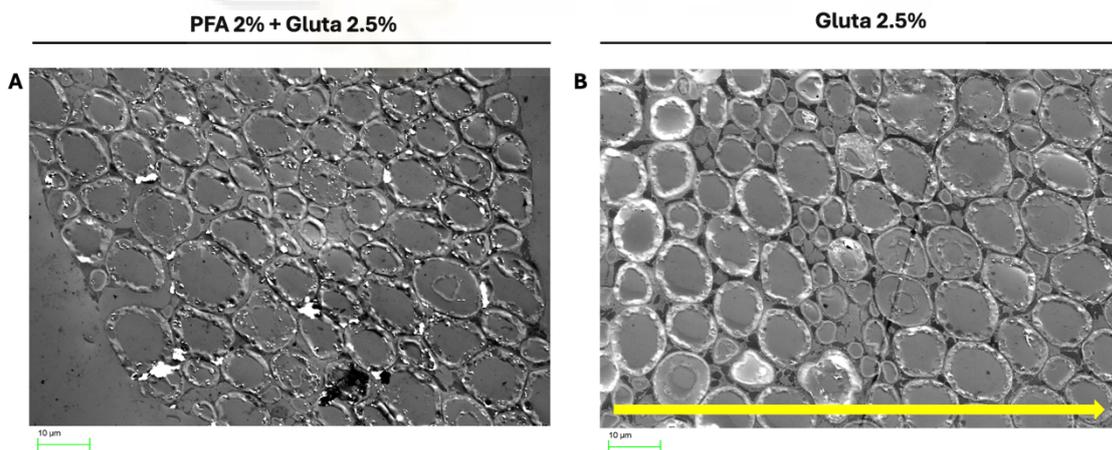


Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Detalle del centro de la muestra. (B) Detalle de la zona de la periferia. Escala 10 µm.

Lugol

En concordancia con lo observado en las capturas de microscopía electrónica, el contraste en todas las zonas de las muestras contrastadas con Lugol resultó deficiente para ambas perfusiones. Se intentó mejorar el contraste realizando ajustes en el momento de capturas las imágenes, modificando, por ejemplo, los detectores empleados. Pero estos ajustes no resultaron útiles a la hora de mejorar el contraste entre las vainas de mielina y los axones que rodean. Se pudo observar en detalle la falta de continuidad en las vainas de mielina. Además, se observaron unas esferas negras de pequeño tamaño (Fig. 18A), que podrían indicar la presencia de precipitados en las muestras.

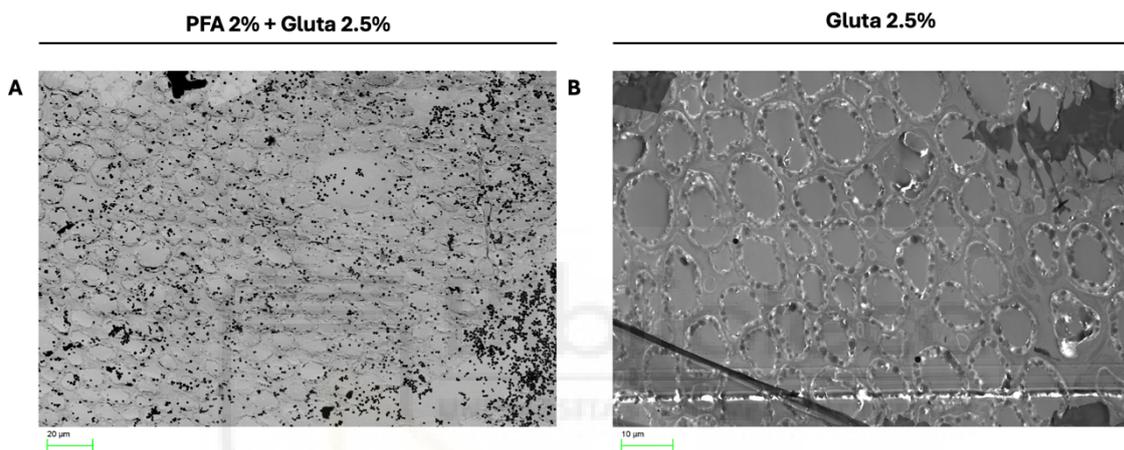


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Nervio perfundido con PFA y glutaraldehído, escala 20 µm. (B) Nervio perfundido con glutaraldehído, escala 10 µm.

Osmio reducido con ferricianuro de potasio y tiocarbhidrazida

Para los nervios que se contrastaron con dos pasos de tetraóxido de osmio reducido con ferricianuro de potasio y una incubación intermedia de tiocarbhidrazida se observó, al igual que en la microscopía óptica, que la periferia de las muestras estaba contrastada de manera óptima (Fig. 19A y B). Sin embargo, el contraste a medida que se profundiza en las muestras seguía siendo deficiente (Fig. 19A).

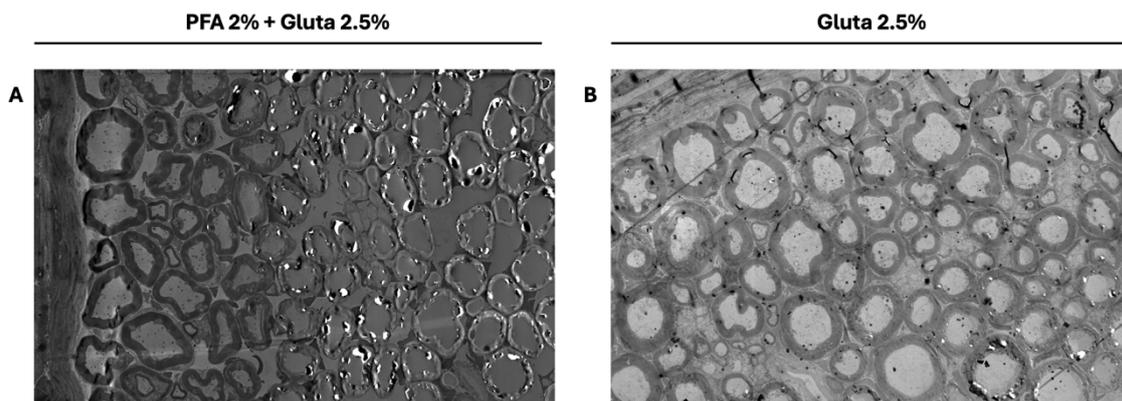


Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica. (A) Nervio perfundido con PFA y glutaraldehído. (B) Nervio perfundido con glutaraldehído. Escala 10 µm.

Segmentación automática con *AxonDeepSeg*

Una vez obtenidas las imágenes de microscopía electrónica, se decidió probar la herramienta de segmentación automática *AxonDeepSeg* (Zaimi et al., 2018), para ver si, pese a que la histología de la mayoría de las imágenes fuera deficiente, se podían segmentar correctamente y obtener datos de la densidad axonal y de parámetros morfométricos como el área del axón, el área de la fibra o el espesor de la mielina. Para comprobar la fiabilidad de los datos, se decidió realizar un análisis manual y una comparación con los obtenidos automáticamente con el programa.

Segmentación

Se llevó a cabo la segmentación automática de las imágenes, y se pudo observar que la calidad de la predicción realizada por el programa estaba estrechamente relacionada con la calidad de las imágenes empleadas. Esto se ejemplifica en la Figura 20. La zona de la izquierda, que se corresponde con la periferia de un nervio y, por tanto, está mejor contrastado, se segmenta mejor que la zona de la derecha, en la que el contraste de las vainas de mielina resulta deficiente.

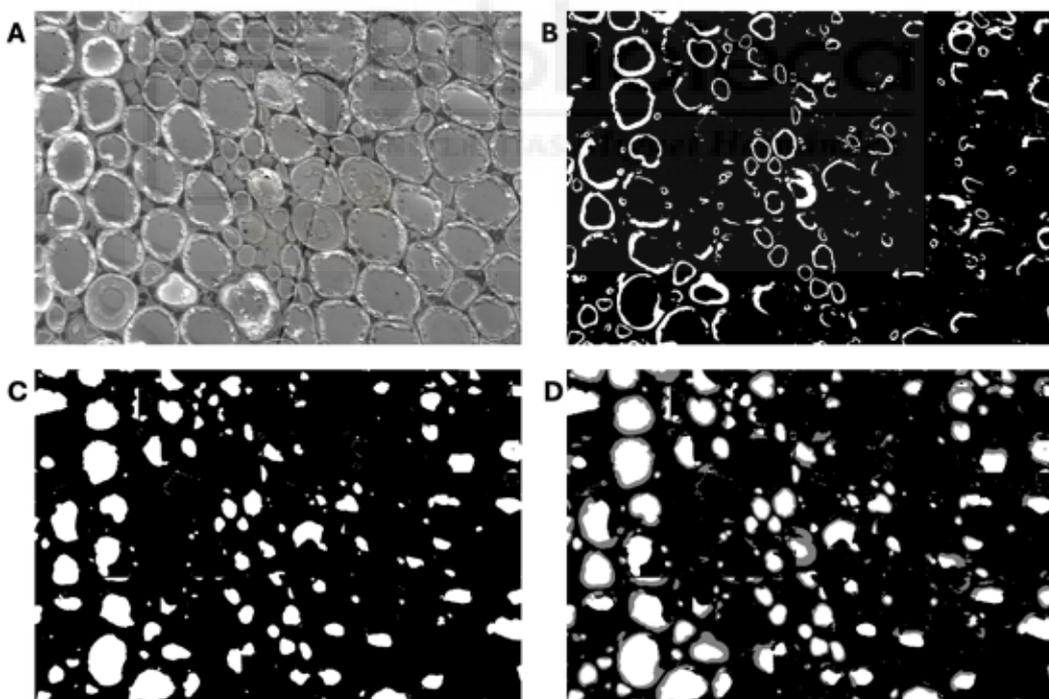


Figura 20. Segmentación automática. (A) Imagen de entrada, sin procesar. (B) Resultado de la segmentación automática de vainas de mielina. (C) Resultado de la segmentación automática de axones. (D) Unión de la segmentación de vainas de mielina y axones.

5.3 Análisis histológico

Un análisis histológico de tejido nervioso, generalmente se compone de un estudio de la densidad axonal y de una serie de parámetros morfométricos, como pueden ser el área del axón, el área de la fibra o el espesor de la mielina. A continuación, se muestran los datos de este análisis mediante *AxonDeepSeg*, a la vez que se comparan con un análisis manual, que se realizó analizando las imágenes una a una.

Recuento del número de axones

Un aspecto interesante en cualquier estudio histológico es la densidad axonal, que permite saber cuántos axones hay en un área determinada. En este caso, tras la segmentación automática realizada con el programa, este brinda una serie de datos, entre los cuales se encuentra el número de axones que hay en cada fotografía de entrada. Por otra parte, se realizó un análisis manual de conteo de axones de las mismas seis fotografías. Cabe destacar que, aunque el procesamiento de las imágenes no brindó imágenes altamente informativas, el número de axones en cada foto sí se pudo contar con facilidad.

La media para el conteo de axones en las seis fotografías de $100 \times 75 \mu\text{m}$ fue de $94,33 \pm 13,92$ para el recuento manual (media \pm desviación estándar) y de $263,17 \pm 40,48$ para *AxonDeepSeg* (Fig. 21). El análisis estadístico determinó que las diferencias de conteo entre ambos métodos son significativas, ya que $p < 0,05$.

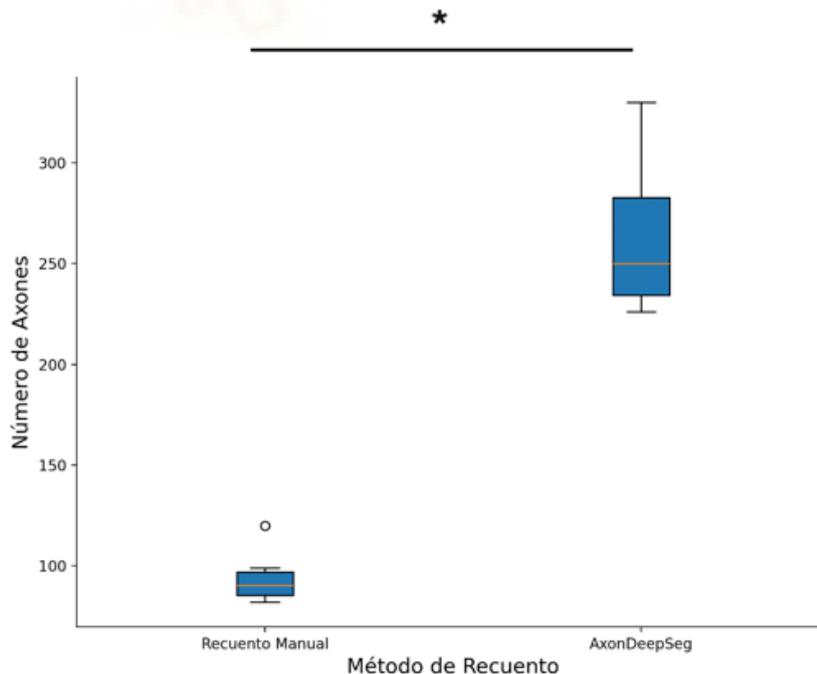


Figura 21. Comparación de los axones contados por el método manual y por AxonDeepSeg. Se muestra media \pm desviación estándar.

La comparación de Bland-Altman mostró una diferencia sistemática significativa entre los recuentos, con límites de acuerdo que oscilaron entre -245,58 y -92,08. El Coeficiente de Correlación Intraclassa (ICC) fue de -18,50, lo que indica un acuerdo extremadamente pobre entre los dos métodos.

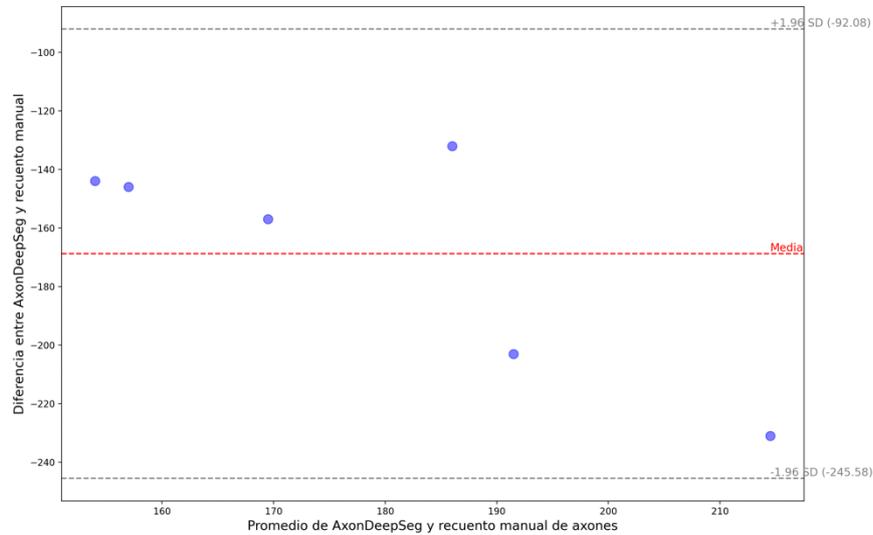


Figura 22. Gráfico de Bland-Altman para el recuento manual y automático de axones.

Análisis morfológico

Tras la segmentación automática, *AxonDeepSeg* proporciona varios parámetros morfológicos derivados de sus predicciones. En la figura 23, se muestra la comparación entre el análisis manual de una fotografía (Fig. 23B) y el realizado por *AxonDeepSeg* (Fig. 23C). El análisis manual se genera trazando un círculo alrededor de cada axón y después, uno alrededor del borde exterior de la vaina de mielina.

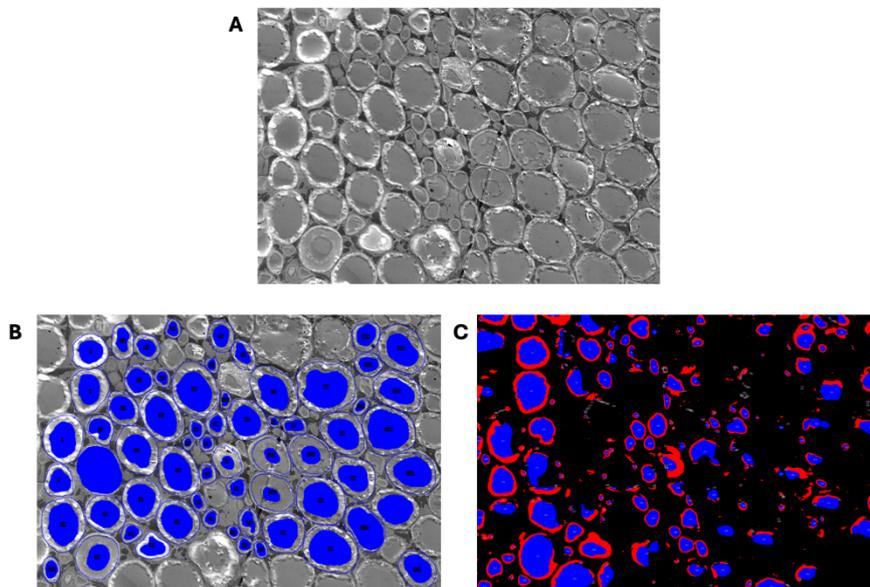


Figura 23. Análisis morfológico. (A) Imagen sin procesar. (B) Imagen procesada manualmente. (C) Imagen procesada por AxonDeepSeg.

Área del axón

El primer parámetro estudiado en el análisis morfométrico fue el área de los axones que componen el nervio ciático. En la figura 24 se muestra la media del área del axón obtenida mediante el método manual (rosa) y el método automático (azul). Se observó que para el primero de los análisis los axones presentaron un área de $21,889 \pm 17,778 \mu\text{m}^2$, mientras que para el segundo la media de esta área fue de $2,718 \pm 4,964 \mu\text{m}^2$. El análisis determinó que las diferencias entre las medias proporcionadas por ambos tipos de análisis son significativas. En la figura 25 se muestra la comparación entre ambos métodos para cada una de las fotografías.

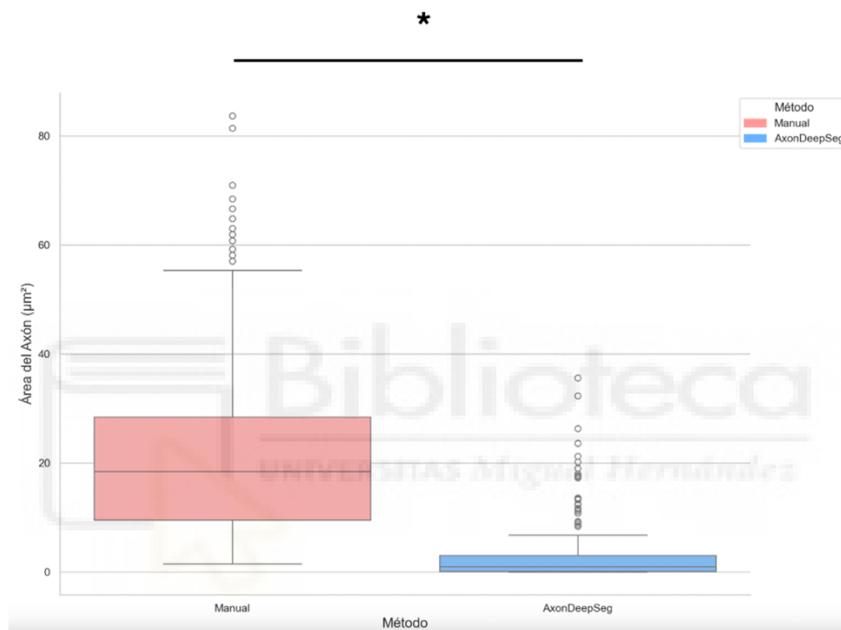


Figura 24. Comparación de la media del área del axón entre el método manual y el automático.

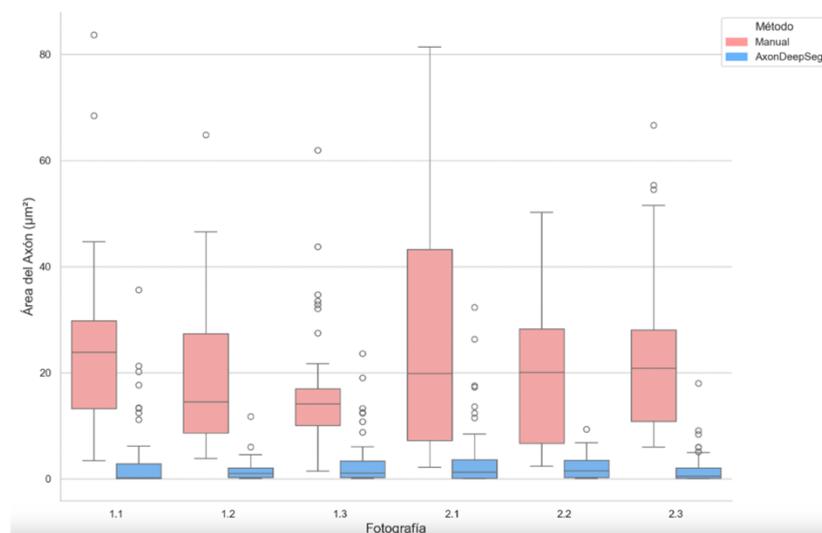


Figura 25. Comparación de la media del área del axón entre el método manual y el automático para cada fotografía.

Área de la fibra

El siguiente parámetro estudiado fue el área de la fibra. Esta medida comprende el área que ocupa el axón rodeado de su correspondiente vaina de mielina. En la figura 26 se muestra la media del área de la fibra mediante el método manual (rosa) y el método automático (azul). Se observó que para el primero de los análisis las fibras presentaron un área de $54,645 \pm 33,735 \mu\text{m}^2$, mientras que para el segundo la media de esta área fue de $6,718 \pm 8,721 \mu\text{m}^2$. El análisis determinó que las diferencias entre las medias proporcionadas por ambos tipos de análisis son significativas. En la figura 27 se muestra la comparación entre ambos métodos para cada una de las fotografías.

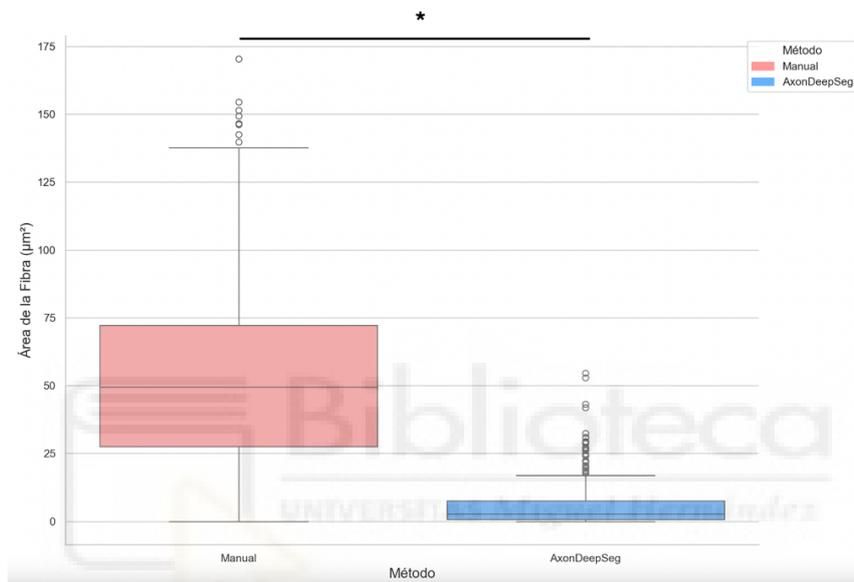


Figura 26. Comparación de la media del área de la fibra entre el método manual y el automático.

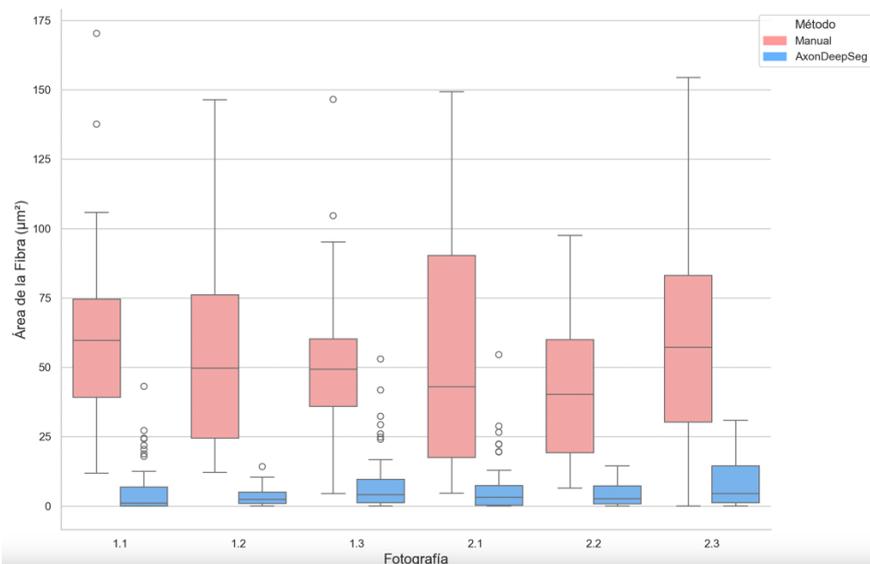


Figura 27. Comparación de la media del área de la fibra entre el método manual y el automático por fotografía.

Espesor de la mielina

El último de los parámetros estudiados fue el espesor de la mielina. En la figura 28 se muestra la media del espesor de la mielina mediante el método manual (rosa) y el método automático (azul). Se observó que para el primero de los análisis la mielina presentó un espesor de $1,505 \pm 0,547 \mu\text{m}$, mientras que para el segundo la media de este espesor fue de $0,441 \pm 0,421 \mu\text{m}$. El análisis determinó que las diferencias entre las medias proporcionadas por ambos tipos de análisis son significativas. En la figura 29 se muestra la comparación entre ambos métodos para cada una de las fotografías.

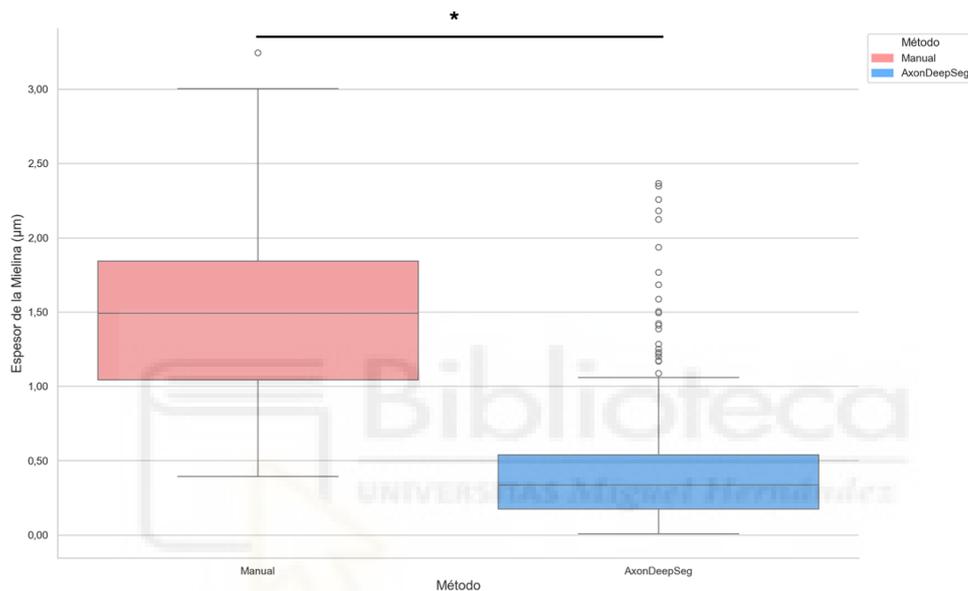


Figura 28. Comparación de la media del espesor de la mielina entre el método manual y el automático.

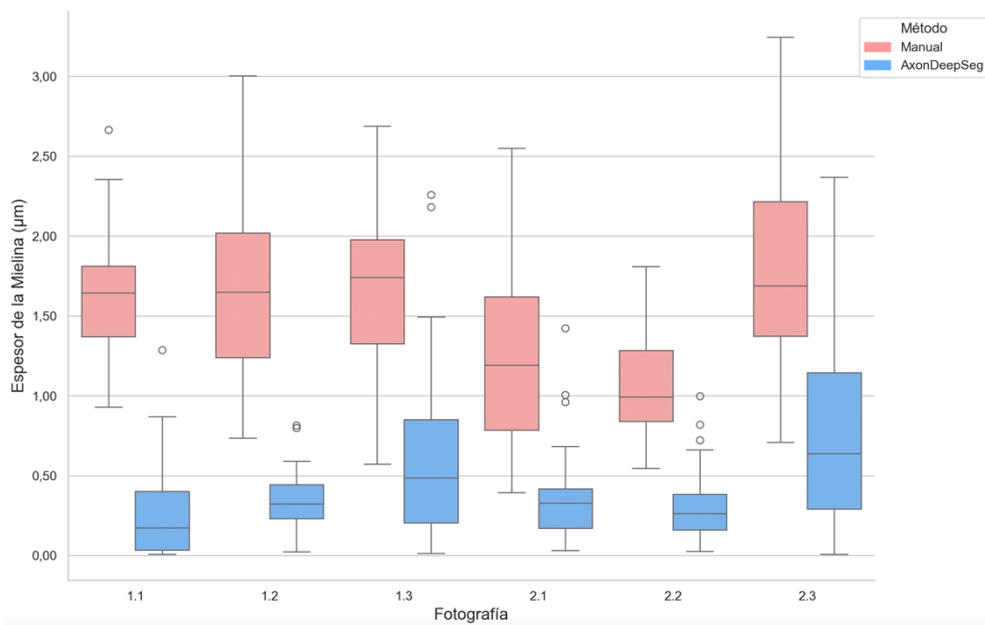


Figura 29. Comparación de la media del espesor de la mielina entre el método manual y el automático por fotografía.

6 Discusión

Conocer la estructura y función de los tejidos en el estado sano mediante estudios histológicos, es esencial para establecer las bases patológicas y mejorar el diagnóstico de enfermedades, así como evaluar su progresión y ayudar en el desarrollo y evaluación de medicamentos. La mayoría de estas técnicas se basa en la obtención de imágenes de microscopía que posteriormente se procesan para obtener datos como la presencia de ciertos tipos celulares, o el estado de algunas estructuras. Las técnicas de procesamiento histológico requieren numerosos pasos críticos, que pueden afectar a los resultados finales, por lo que la estandarización de protocolos es importante. Además, el análisis de las imágenes suele consumir cantidades ingentes de tiempo y su fiabilidad suele estar condicionada por la variabilidad entre investigadores, la calidad de las muestras o la resolución de la técnica de microscopía utilizada.

En este contexto, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es optimizar el procesamiento histomorfológico de muestras sanas de nervio ciático, para obtener imágenes con una histología uniforme y completa (tanto en la periferia como en el centro de la muestra), que posteriormente se intentarán procesar de forma automática. Para ello, se ha llevado a cabo un diseño experimental que combina dos tipos de soluciones de perfusión de distinta composición, con tres disoluciones de contraste. Además, paralelamente al análisis automático, se llevó a cabo uno manual con el objetivo de compararlos.

Se pensó probar distintas disoluciones para perfundir, puesto que este primer paso de fijación es crítico para el correcto procesamiento de las muestras (Calvo, 2023). En ocasiones anteriores en el laboratorio, no se ha conseguido una histología adecuada en el centro de las muestras mediante el uso de soluciones de fijación compuestas solo por PFA para perfundir, por lo que se decidió incluir glutaraldehído en esta parte del procesamiento. Este fijador químico, gracias a sus dos grupos aldehído, es capaz de formar enlaces cruzados covalentes entre las proteínas (Montuenga Badía et al., 2014), proporcionando una fijación más robusta, pero más lenta que el PFA. La literatura científica disponible sugiere, que el uso de ambos fijadores de manera conjunta podría ofrecer beneficios sinérgicos (Kiernan, 2000). Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias claras en cuanto a la preservación de las estructuras entre las muestras fijadas con la combinación de PFA y glutaraldehído (Fig. 14, 15 y 16 A, B y C) y aquellas fijadas solamente con glutaraldehído (Fig 14, 15 y 16 D, E y F) . Esto sugiere que, al menos en las condiciones específicas de este experimento el uso de glutaraldehído, en combinación con el paraformaldehído o solo, es capaz de fijar correctamente las muestras.

El tetraóxido de osmio (OsO_4) es uno de los agentes de contraste más usados para resaltar estructuras lipídicas en microscopía electrónica, debido a su elevado número atómico y a su habilidad para integrarse en las membranas celulares (Palade, 1952; Porter et al., 1945; Watson, 1958). El OsO_4 a pesar de reaccionar con las proteínas, es reducido por los lípidos y los elementos ricos en lípidos, como la mielina a un precipitado negro insoluble, fijando estas estructuras y proporcionando una tinción permanente y estable (Carriel et al., 2017). En el caso de las vainas de mielina, previene su hinchazón, proporcionando un contraste permanente y estable, lo que facilita enormemente la identificación y evaluación de las fibras nerviosas en condiciones normales y regenerativas. Sin embargo, se ha observado que el osmio presenta limitaciones en cuanto a la penetración en muestras de tejido nervioso, debido al alto grado de compactación de la mielina (Kister & Kister, 2022), lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas que ayuden a potenciar su efecto.

En este contexto, se decidió probar en primer lugar una disolución de osmio reducido, otro agente de contraste comúnmente utilizado que se sabe que produce un mayor contraste en las imágenes de microscopía electrónica en comparación con el OsO_4 no reducido (McDonald, 1984). En principio se pensaba que este efecto se debía a que, en estas mezclas, el ferricinauro de potasio creaba intermediarios de osmio en estados de oxidación más bajos que se inmovilizaban en los tejidos de manera más estable (White et al., 1979). Sin embargo, recientemente (Ströh et al., 2022) propusieron que los compuestos reductores de potasio y hierro limpian el citosol de osmio de manera más eficiente que las membranas celulares. Lo que podría resultar en un aumento general del contraste en la microscopía electrónica entre las membranas y el citosol.

En efecto, las muestras tratadas con OsO_4 reducido con ferricinauro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) mostraron un buen contraste, tal y como se observa en la figura 14. Sin embargo, este buen grado de contraste solo se observa en los primeras 20-40 μm de profundidad de la muestra (Fig. 14B, Fig. 17B), de ahí hacia el interior, el contraste resultó deficiente (Fig. 14C, Fig. 17A). Esto puede estar condicionado por las propiedades de difusión y acumulación del osmio en el tejido. Al inicio de la incubación el OsO_4 se une rápidamente a los sitios de unión disponibles en la periferia, lo que limita su capacidad para seguir difundiendo hacia el interior (Ströh et al., 2022). Así, es posible que variar parámetros como el tiempo de incubación, la temperatura o la composición de la solución de contraste pueda permitir que el osmio difunda hasta una profundidad mayor.

Otro de los protocolos de contraste estudiado, combinaba la mezcla de osmio reducido con el uso de tiocarbohidrazida (THC). En 1966 Seligman y Hanker desarrollaron el método OTO (osmio-tiocarbohidrazida-osmio) (Seligman et al., 1966), que utiliza la tiocarbohidrazida, que es osminofílica, para mejorar el contraste de osmio en los componentes lipídicos. La THC funciona adhiriéndose al

osmio ya presente de una primera incubación y actúa como puente que permite la deposición de osmio adicional en los sitios originales de osmio (Tapia et al., 2012). En concordancia con lo que establece la literatura científica disponible, las muestras contrastadas con osmio reducido dos veces y un paso intermedio de THC, mostraron un contraste óptimo de las vainas de mielina (Fig.16), incluso mejor que las muestras incubadas solo con osmio reducido (Fig. 14). A pesar de esto, se observó que, una vez más, el contraste de las vainas de mielina se restringía a los 20-40 μm más superficiales de la muestra (Fig. 19). Por tanto, la difusión y acumulación espaciotemporal del osmio, da lugar a un frente de contraste que se propaga hacia el centro de la muestra. La propagación de este frente de contraste puede aproximarse mediante un modelo cuadrático, esto significa, que si se dobla la distancia que el contraste debe penetrar, el tiempo de incubación requerido debe cuadruplicarse (Carnevale et al., 1979). Por lo que resultaría interesante considerar tiempos de incubación más prolongados que los utilizados en este estudio para conseguir que el osmio pueda difundir hasta el centro de la muestra.

Debido a que el osmio presenta limitaciones de penetración como se ha mencionado con anterioridad, y también de manejo debido a su elevado coste y toxicidad (Heimel et al., 2019a) se ha decidido probar un compuesto alternativo como es el Lugol (una mezcla de yodo y yoduro potásico). Este compuesto, destaca por ser capaz de penetrar rápidamente y funcionar bien en tejidos fijados (Metscher, 2009). Sin embargo, en el contexto específico de este experimento, se observó que las muestras incubadas en Lugol no fueron contrastadas (Fig. 15). Una posible explicación a este deficiente contraste por parte de la solución de Lugol, es que ciertos parámetros como el tiempo de incubación, o el volumen de disolución pueden requerir un ajuste más preciso. Por ejemplo, (Heimel et al., 2019), sugieren que el volumen de disolución de Lugol debe seguir una proporción unos 60 mL por cm^3 de muestra, por lo que sería necesario calcular el volumen de los nervios, aproximándolos al volumen de un cilindro, para saber la cantidad de solución óptima para conseguir un buen contraste. En el estudio llevado a cabo en este Trabajo de Fin de Máster, esta consideración no se tuvo en cuenta.

Para los tres tipos de disoluciones de contraste probadas, se observó que en las zonas deficientes de contraste, la vaina de mielina de los axones presentaba pérdidas de continuidad en su estructura. Esto puede deberse a que el osmio actúa como un fijador secundario (Studer et al., 2008), ayudando a mantener la integridad de la vaina de mielina al evitar que los lípidos se degraden o se desplacen durante el procesamiento. Esto hace pensar que la presencia de osmio es esencial para no solo contrastar, sino también para conservar la estructura de la vaina de mielina, permitiendo así una correcta visualización de esta mediante microscopía.

Tras comprobarse que los distintos procesamientos histomorfológicos no proporcionaron los resultados esperados, se decidió comprobar si mediante la herramienta de segmentación automática *AxonDeepSeg* (Zaimi et al., 2018), se podían suplir las deficiencias en el procesamiento. Para ello, se llevó a cabo un análisis de 6 imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

A pesar de que esta herramienta ha mostrado un gran potencial en estudios previos, los resultados obtenidos en este estudio revelaron que la capacidad de segmentar imágenes (discriminar y clasificar axones y vainas de mielina), puede estar estrechamente relacionada con la calidad de las imágenes de entrada. Esto se puede observar en la figura 20, en la que la zona con mejor contraste es también la mejor segmentada. Uno de los errores predominantes en estas segmentaciones es debido a las interrupciones en las vainas de mielina (Urso-Baiarda & Grobbelaar, 2006), lo que lleva al programa a identificar cada irregularidad como un axón con su correspondiente vaina de mielina, en lugar de clasificarlos como parte de una misma fibra. Esto provoca una sobreestimación en el conteo de axones y, como la proporción de axón y mielina de cada fibra, está directamente relacionada con los parámetros morfométricos, estos también resultan incorrectos. Es por ello que, comparando los resultados de la segmentación automática con el análisis manual, se encontraron diferencias significativas en el conteo de axones, el área del axón, el área de la fibra y el espesor de la mielina, tal y como se puede observar en las figuras 24-29. Además, el gráfico de Bland-Altman (Fig. 22) muestra un acuerdo extremadamente pobre entre los dos métodos.

A pesar de que el contraste de las imágenes no fue óptimo, mediante un análisis manual fue posible discriminar las vainas de mielina y los axones y realizar el conteo de estos últimos. Lo que sugiere, que en el contexto de este estudio, el análisis manual de la densidad y la morfometría sigue siendo el método de referencia, al menos para muestras con un procesamiento deficiente.

Para solucionar esta discrepancia entre los datos automáticos y los manuales, se podría realizar un entrenamiento con imágenes anotadas (donde los axones y la mielina ya hayan sido segmentadas manualmente) que reflejen las condiciones experimentales específicas. Así, el algoritmo aprenderá a distinguir las estructuras basándose en las características visuales presentes en las imágenes de entrada. Esto podría ayudar a no interpretar las interrupciones en la vaina de mielina como fibras distintas, corrigiendo la segmentación y, por ende, la morfometría.

Finalmente, se concluye que la composición de la solución de perfusión, en este estudio no ha sido determinante en el procesamiento, al contrario que la de contraste. Para esta, se ha visto que la incubación con dos pasos de osmio reducido y un paso intermedio de tiocarbhidrazida rinde los

mejores resultados para destacar las vainas de mielina, aunque el protocolo debe ser optimizado para garantizar la penetración del contraste hasta el centro de la muestra.



7 Conclusiones

Según los resultados obtenidos, el análisis de estos y la comparación con la literatura existente se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado que la perfusión con glutaraldehído, tanto solo como combinado con PFA, ofrece una fijación adecuada para las muestras de nervio ciático.
- Se confirmó que el tetraóxido de osmio, aunque es efectivo para proporcionar contraste en la periferia de las muestras, presenta limitaciones significativas en su capacidad de penetración hacia el centro de las mismas.
- Se ha comprobado que la acción del tetraóxido de osmio como fijador secundario es esencial para el correcto procesamiento de las muestras
- Se ha establecido que el tetraóxido de osmio reducido es más eficaz que el tetraóxido de osmio no reducido.
- Se ha visto que la combinación de osmio reducido con ferricianuro de potasio y un paso intermedio de tiocarbohidrazida proporcionó un contraste superior en las vainas de mielina en comparación con el osmio reducido solo.
- Se ha observado que el Lugol resultó inefectivo en el contraste de las muestras en las condiciones experimentales utilizadas.
- Se ha comprobado que la segmentación automática con *AxonDeepSeg* muestra un rendimiento altamente dependiente de la calidad del contraste en las imágenes.
- Se ha visto que el conteo y la parametrización derivados de la segmentación automática, presentan diferencias significativas con los derivados del análisis manual. Indicando un pobre acuerdo entre métodos.

Por tanto, se puede concluir que este estudio ha ayudado a confirmar la utilidad del osmio y la tiocarbohidrazida como un potente agente de contraste. Sin embargo, persisten desafíos en la penetración de la mezcla hacia el centro de las muestras, por lo que se debe proseguir en la optimización del protocolo en cuanto a los tiempos de incubación. También se ha visto que, aunque los métodos de segmentación automática basados en *deep learning* son útiles en diversos contextos, necesitan más entrenamiento para poder llegar a suplir las deficiencias en el procesamiento.

8 Bibliografía

- Alvites, R., Caseiro, A. R., Pedrosa, S. S., Branquinho, M. V., Ronchi, G., Geuna, S., Varejão, A. S. P., & Maurício, A. C. (2018). Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Medicine*, 5(1), 1466404. <https://doi.org/10.1080/2331205X.2018.1466404>
- Bruce M. Koepfen, B. A. S. (2009). Berne y Levy Fisiología. In *Elsevier*.
- Calvo, A. (2023). *Biología Celular Biomédica* (2nd ed.).
- Carlson, B. M. (2020). *Embriología humana y biología del desarrollo* (6th ed.). <https://www.clinicalkey.com/student/content/toc/3-s2.0-C20180056236>
- Carnevale, J., Cole, E. R., & Crank, G. (1979). Fluorescent light catalyzed autoxidation of beta-carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(2), 462–463. <https://doi.org/10.1021/JF60222A042>
- Carriel, V., Campos, A., Alaminos, M., Raimondo, S., & Geuna, S. (2017). Staining methods for normal and regenerative myelin in the nervous system. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1560, pp. 207–218). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9_15
- Cires,ancires,an, D. C., Giusti, A., Gambardella, L. M., & Urgen Schmidhuber, J. ". (2012). Deep Neural Networks Segment Neuronal Membranes in Electron Microscopy Images. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 25. <http://www.idsia.ch/>
- Dweiri, Y., Al-Zanina, M., & Durand, D. (2022). Enhanced Automatic Morphometry of Nerve Histological Sections Using Ensemble Learning. *Electronics 2022, Vol. 11, Page 2277, 11(14), 2277*. <https://doi.org/10.3390/ELECTRONICS11142277>
- Gartner, L. P. (2021). *Texto de Histología*.
- Goto, N., & Goto, J. (2006). Morphometric evaluations of the human nervous system. *Human Cell*, 19(2), 49–64. <https://doi.org/10.1111/J.1749-0774.2006.00013.X>
- Gutmann, E., & Young, J. Z. (n.d.). *The re-innervation of muscle after various periods of atrophy*.
- Heimel, P., Swiadek, N. V., Slezak, P., Kerbl, M., Schneider, C., Nürnberger, S., Redl, H., Teuschl, A. H., & Hercher, D. (2019a). Iodine-Enhanced Micro-CT Imaging of Soft Tissue on the Example of Peripheral Nerve Regeneration. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7483745>
- Heimel, P., Swiadek, N. V., Slezak, P., Kerbl, M., Schneider, C., Nürnberger, S., Redl, H., Teuschl, A. H., & Hercher, D. (2019b). Iodine-Enhanced Micro-CT Imaging of Soft Tissue on the Example of Peripheral Nerve Regeneration. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7483745>

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Sieglebaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles Of Neural Science* (5th ed.). <https://archive.org/details/PrinciplesOfNeuralScienceFifthKANDEL/page/n7/mode/2up>
- Kiernan, J. A. (1979). Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 54(2), 155–197. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.1979.TB00871.X>
- Kiernan, J. A. (2000). *Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do*. <https://doi.org/10.1017/S1551929500057060>
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2020). *Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica*. (5th ed.). <https://www.clinicalkey.com/student/content/toc/3-s2.0-C20190044457>
- Kister, A., & Kister, I. (2022). Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1041961. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.1041961/BIBTEX>
- Kouyoumdjian, J. A., Graça, C. R., & Ferreira, V. F. M. (2017). Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 1124 cases. *Neurology India*, 65(3), 551–555. https://doi.org/10.4103/NEUROINDIA.NI_987_16
- Kubiak, C. A., Grochmal, J., Kung, T. A., Cederna, P. S., Midha, R., & Kemp, S. W. P. (2020). Stem-cell–based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle & Nerve*, 61(4), 449–459. <https://doi.org/10.1002/MUS.26760>
- Lanier, S. T., Hill, J. R., Dy, C. J., & Brogan, D. M. (2021). Evolving Techniques in Peripheral Nerve Regeneration. *The Journal of Hand Surgery*, 46(8), 695–701. <https://doi.org/10.1016/J.JHSA.2021.04.019>
- Lowe, J. S., Anderson, P. G., & Anderson, S. I. (2020). *Stevens y Lowe. Histología humana*.
- McDonald, K. (1984). Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. *Journal of Ultrastructure Research*, 86(2), 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(84\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(84)80051-9)
- Metscher, B. D. (2009). MicroCT for developmental biology: A versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics*, 238(3), 632–640. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21857>
- Modrak, M., Talukder, M. A. H., Gurgenshvili, K., Noble, M., & Elfar, J. C. (2020). Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *Journal of Neuroscience Research*, 98(5), 780–795. <https://doi.org/10.1002/JNR.24538>
- Montuenga Badía, Luis., Esteban Ruiz, F. J., & Calvo González, Alfonso. (2014). *Técnicas en histología y biología celular*. https://books.google.com/books/about/T%C3%A9cnicas_en_histolog%C3%ADa_y_biolog%C3%ADa_cel.html?hl=es&id=e0h1BAAAQBAJ

- Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, Anne. M. R. (2017). *Anatomía con orientación clínica* (8th ed.). Wolters Kluwer. <https://books.google.com.ec/books?id=-Le5bc5F0sYC&printsec=copyright#v=snippet&q=%22sciatic%20nerve%22&f=false>
- Mtui, E., Gruener, G., & Dockery, P. (2022). *Fitzgerald. Neuroanatomía clínica y neurociencia*.
- Noble, J., Munro, C. A., & Vannemreddy, P. (1998). Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injuries in a Population of Patients with Multiple Injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 116–122.
- Olabarriaga, S. D., & Smeulders, A. W. M. (2001). Interaction in the segmentation of medical images: A survey. *Medical Image Analysis*, 5(2), 127–142. [https://doi.org/10.1016/S1361-8415\(00\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S1361-8415(00)00041-4)
- PALADE, G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. *The Journal of Experimental Medicine*, 95(3), 285–298. <https://doi.org/10.1084/JEM.95.3.285>
- Porter, K. R., Claude, A., & Fullam, E. F. (1945). A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY : METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS. *The Journal of Experimental Medicine*, 81(3), 233–246. <https://doi.org/10.1084/JEM.81.3.233>
- Ritman, E. L. (2011). Current status of developments and applications of micro-CT. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13, 531–552. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071910-124717>
- Ronchi, G., Fregnan, F., Muratori, L., Gambarotta, G., & Raimondo, S. (2023). Morphological Methods to Evaluate Peripheral Nerve Fiber Regeneration: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 1818, 24(3), 1818. <https://doi.org/10.3390/IJMS24031818>
- Ropper, A. H., & Samuels Martin A. (2019). *Adam and Victor's Principles of Neurology*. In *Distribution*. McGraw-Hill Education.
- Rosberg, H. E., Carlsson, K. S., & Dahlin, L. B. (2005). Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: Costs, function, and general health. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 39(6), 360–369. <https://doi.org/10.1080/02844310500340046>
- Seddon, H. J. (1943). THREE TYPES OF NERVE INJURY. *Brain*, 66(4), 237–288. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/66.4.237>
- Seligman, A. M., Wasserkrug, H. L., & Hanker, J. S. (1966a). A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide(TCH). *The Journal of Cell Biology*, 30(2), 424–432. <https://doi.org/10.1083/JCB.30.2.424>

- Seligman, A. M., Wasserkrug, H. L., & Hanker, J. S. (1966b). A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide(TCH). *The Journal of Cell Biology*, 30(2), 424–432. <https://doi.org/10.1083/JCB.30.2.424>
- Seoane, J., Varela-Centelles, P. I., Ramírez, J. R., Cameselle-Teijeiro, J., & Romero, M. A. (2004). Artefacts in oral incisional biopsies in general dental practice: a pathology audit. *Oral Diseases*, 10(2), 113–117. <https://doi.org/10.1111/J.1354-523X.2003.00983.X>
- Siao, P., & Kaku, M. (2019). A Clinician's Approach to Peripheral Neuropathy. *Seminars in Neurology*, 39(5), 519–530. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1694747>
- Slaoui, M., Bauchet, A. L., & Fiette, L. (2017). Tissue Sampling and Processing for Histopathology Evaluation. *Methods in Molecular Biology*, 1641, 101–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_4
- Snell, R. S. (2011). *Anatomía clínica por regiones* (10th ed.). Wolters Kluwer.
- Ströh, S., Hammerschmith, E. W., Tank, D. W., Sebastian Seung, H., & Andreas Wanner, A. (2022). *In situ X-ray-assisted electron microscopy staining for large biological samples*. 11, 72147. <https://doi.org/10.7554/eLife>
- Studer, D., Humbel, B. M., & Chiquet, M. (2008). Electron microscopy of high pressure frozen samples: Bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(5), 877–889. <https://doi.org/10.1007/S00418-008-0500-1>
- Sullivan, R., Dailey, T., Duncan, K., Abel, N., & Borlongan, C. (2016). Peripheral Nerve Injury: Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 2101*, 17(12), 2101. <https://doi.org/10.3390/IJMS17122101>
- Sunderland, S. (1951). A CLASSIFICATION OF PERIPHERAL NERVE INJURIES PRODUCING LOSS OF FUNCTION. *Brain*, 74(4), 491–516. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/74.4.491>
- Sunderland, S., & Bradley, K. C. (1950). Denervation atrophy of the distal stump of a severed nerve. *Journal of Comparative Neurology*, 93(3), 401–409. <https://doi.org/10.1002/CNE.900930304>
- Tapia, J. C., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Schalek, R., Lichtman, J. W., Smith, S. J., & Buchanan, J. (2012). High-contrast en bloc staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy. *Nature Protocols*, 7(2), 193–206. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.439>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología* (11th ed.). Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Urso-Baiarda, F., & Grobbelaar, A. O. (2006). Practical nerve morphometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 156(1–2), 333–341. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2006.02.014>

- WATSON, M. L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(6), 727–730. <https://doi.org/10.1083/JCB.4.6.727>
- White, D. L., Mzurkiewicz, J. E., & Barnett, R. J. (1979). *A Chemical Mechanism for Tissue Staining by Osmium Tetroxide-Ferrocyanide Mixtures*.
- Xia, C. W., Gan, R. L., Pan, J. R., Hu, S. Q., Zhou, Q. Z., Chen, S., Zhang, L., Hu, Q. G., & Wang, Y. X. (2020). Lugol's Iodine-Enhanced Micro-CT: A Potential 3-D Imaging Method for Detecting Tongue Squamous Cell Carcinoma Specimens in Surgery. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.550171>
- Yanoff, M. (1973). Formaldehyde-glutaraldehyde fixation. *American Journal of Ophthalmology*, 76(2), 303–304. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(73\)90178-5](https://doi.org/10.1016/0002-9394(73)90178-5)
- Zaimi, A., Wabartha, M., Herman, V., Antonsanti, P. L., Perone, C. S., & Cohen-Adad, J. (2018). AxonDeepSeg: Automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using convolutional neural networks. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22181-4>
- Zambrano-Vizueté, M., Botto-Tobar, M., Huerta-Suárez, C., Paredes-Parada, W., Patiño Pérez, D., Ahanger, T. A., & Gonzalez, N. (2022). Segmentation of Medical Image Using Novel Dilated Ghost Deep Learning Model. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6872045>