



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DISEÑO INDUSTRIAL

Grado en Ingeniería Electrónica y Automática Industrial

TRABAJO FIN DE GRADO

MARCADOR DE BRECHA MEDIANTE
MICROFOTOGRAFÍA SOBRE CÉLULAS
EPIDÉRMICAS CULTIVADAS EN PETRI PARA
DETERMINAR EL EFECTO DE
ELECTROTERAPIA

Marina de Andrés Zamora

Tutor: Carlos Platero Dueñas

Departamento: Automática, Electrónica e Informática Industrial

Madrid, Septiembre 2016



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DISEÑO INDUSTRIAL

Grado en Ingeniería Electrónica y Automática Industrial

TRABAJO FIN DE GRADO

MARCADOR DE BRECHA MEDIANTE
MICROFOTOGRAFÍA SOBRE CÉLULAS
EPIDÉRMICAS CULTIVADAS EN PETRI PARA
DETERMINAR EL EFECTO DE
ELECTROTHERAPIA

Firma Autor

Firma Tutor

Título: Marcador de brecha mediante microfotografía sobre células epidérmicas cultivadas en Petri para determinar el efecto de Electroterapia

Autor: Marina de Andrés Zamora

Tutor: Carlos Platero Dueñas

EL TRIBUNAL

Presidente:

Vocal:

Secretario:

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

VOCAL

SECRETARIO

PRESIDENTE

Agradecimientos

Con este proyecto, pongo punto y final a una etapa muy especial de mi vida. Quiero dedicárselo, en primer lugar, a mi familia, en particular a mi padre, que siempre que le necesito está ahí para arrimar el hombro y concederme, sin reproches, su valioso tiempo. La trayectoria estudiantil que he seguido hasta llegar aquí, no habría sido igual sin sus enseñanzas y su disciplina. Gracias, papá.

En segundo lugar, agradecer a mis tutores el esfuerzo, tiempo y ayuda que me han brindado desde el primer día de este trabajo. En especial a Carlos Platero, por introducirme en el mundo de la Visión Artificial aplicada a la Medicina, guiarme, animarme a seguir avanzando y enseñarme a confiar un poquito más en mi misma. Ahora más que nunca sé, que quien no arriesga, no gana.

Al equipo completo del Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, formado por M. Luisa Hernández Bule, M. Ángeles Trillo, M. Antonia Martínez, Alejandro Úbeda, Elena Toledano, Rocío Ruiz, Raquel Roldán y Celia de Lara, que me acogieron de la mejor manera posible desde que llegué. A ellos pertenece una pequeña gran parte de este proyecto.

En tercer lugar, mencionar a mis amigos y compañeros de este viaje, que siempre han tratado de dar apoyo y sacar sonrisas, y que han permanecido tanto en las buenas como en las malas. En especial, a mis queridos Yoli y Andrés, con los que tantos y tan buenos momentos he compartido durante estos cinco años. A Hectorcillo, a Montes, a Moreno, a Sobrino y a Mérida, los cinco chicos con los que más he reído y los mejores acompañantes que podría haber tenido durante este trayecto. A Jorge Pérez, que le debo muchísimo por saber escucharme, aconsejarme y prestarme toda la ayuda posible. A Tatiana, que siempre que la he visto, me ha preguntado por este proyecto mostrando un inmenso entusiasmo. Y cómo no, a Sergio Liébana, fiel amigo desde que le conocí, de esos que no se encuentran tan fácilmente.

Tengo la certeza de que haber tomado la decisión de realizar este proyecto y no cualquier otro, ha sido una de las mejores cosas que he hecho. Este trabajo me ha proporcionado la oportunidad de adentrarme en un campo por el cual siempre me había sentido atraída, el de la investigación, y ha sido un placer poder realizar esta aportación.

Este fantástico libro se cierra aquí, pero ya hay otro abierto con las hojas en blanco esperando a ser escrito con futuras experiencias profesionales.

Resumen

Con este proyecto se logra el desarrollo e implementación de una intuitiva aplicación biomédica. La interfaz de usuario creada va acompañada de dos algoritmos de análisis y procesamiento de imágenes de microscopía. Dichas fotografías son realizadas en el Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

La solución propuesta cuantifica el porcentaje de cicatrización de una brecha practicada sobre células epiteliales tras la aplicación de Electroterapia en forma de pulsos de corriente de 448 KHz a distintos intervalos de tiempo.

Este proyecto tiene como finalidad facilitar el trabajo del equipo investigador y técnico del Servicio, consiguiendo un método de medida objetivo, fiable y con un nivel mínimo de error.

Para llevar a cabo este trabajo, se ha utilizado Matlab y sus diversas Toolboxes de procesamiento de imágenes. Queriendo finalmente comprobar si existen diferencias significativas tras la electroestimulación, se han analizado los resultados de una serie de experimentos con ayuda de Statgraphics.

Palabras clave: cicatrización, células epiteliales, electroterapia.

Abstract

The goal of this project is to develop a software application for automatic biomedical image segmentation. The new method use two artificial vision algorithms. One of them is based in experience, the other one uses the different textures that exist in the same image.

The interface offers the possibility of measuring the area of a wound practiced on keratinocytes, the predominant cell type in the epidermis. Besides, the solution quantifies the percentage of wound healing after apply Electrotherapy at different time intervals.

This project aims to facilitate the work of research and technical service team of Ramón y Cajal hospital in Madrid, achieving an objective and reliable measurement method.

To complete this work, the numerical results obtained from the biomedical application have been analysed with statistical programs, getting some very interesting conclusions for current research.

Keywords: wound, keratinocytes, Electrotherapy.

Índice general

Agradecimientos	v
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción	1
1.1. Motivación del proyecto	1
1.2. Objetivos	1
1.3. Estructura del documento	1
2. Estado del arte	3
2.1. Introducción al procesamiento de imágenes biomédicas	3
2.2. Procesamiento manual de imágenes biomédicas	4
2.3. Procesamiento digital de imágenes biomédicas	4
2.3.1. Procesamiento digital de microfotografías	5
2.4. La Ingeniería Biomédica del futuro	6
2.5. Problema a resolver mediante procesamiento de imágenes	6
2.5.1. Medida de un área sobre microfotografías	6
2.5.2. Estado de la técnica antes de automatizarla.	7
3. Investigación biomédica en Electroterapia	9
3.1. Objetivo del estudio de investigación	9
3.2. Fundamentos del estudio de investigación	9
3.2.1. Qué es la Electroterapia	9
3.2.2. Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR)	10
3.2.3. Aplicaciones médicas de la terapia TECR	11
4. Protocolo de investigación empleado	13
5. Herramientas para el procesamiento de microfotografías	17
5.1. MATLAB	17
5.1.1. Image Processing Toolbox	18
5.2. ImageJ	19
5.3. CMEIAS	20

6. Algoritmos de segmentación y procesamiento	23
6.1. Introducción	23
6.2. Algoritmo empírico	23
6.2.1. Análisis del código en MATLAB	24
6.3. Algoritmo de segmentación por textura	27
6.3.1. Análisis del código en MATLAB	27
6.4. Comparativa entre algoritmos	30
7. Diseño y desarrollo de interfaces gráficas de usuario	33
7.1. Importancia de la etapa de diseño	33
7.2. GUI en MATLAB	33
8. Interfaz de aplicación biomédica. Funcionamiento	37
8.1. Necesidades cubiertas por la aplicación	37
8.2. Funcionamiento paso a paso	38
9. Herramientas y técnica para el análisis estadístico de datos	45
9.1. Herramientas de análisis	45
9.1.1. GraphPad Prism	45
9.1.2. Statgraphics	46
9.2. Análisis de la Varianza	47
9.2.1. Introducción	47
9.2.2. El modelo ANOVA tradicional	47
9.2.3. Marco teórico	47
9.2.4. Homocedasticidad	49
9.2.5. ANOVA de efectos fijos, aleatorios o mixtos	49
10. Análisis de los datos proporcionados por la aplicación biomédica	51
10.1. ANOVA Simple en Statgraphics	51
10.2. Experimentos estimulados a $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$	52
10.2.1. Contraste de porcentaje de brecha a un tiempo T	52
10.2.2. Contraste de porcentaje de cicatrización a un tiempo T	56
10.3. Experimentos estimulados a $100 \mu\text{A}/\text{mm}^2$	58
10.3.1. Contraste de porcentaje de brecha a un tiempo T	58
10.3.2. Contraste de porcentaje de cicatrización a un tiempo T	61
11. Resultados y discusión	63
11.1. Resultados del proyecto de ingeniería	63
11.1.1. Relación rendimiento - calidad de las microfotografías	63
11.2. Resultados del proyecto biomédico	64
12. Gestión del proyecto	67
12.1. Ciclo de vida	67
12.2. Planificación	68
12.3. Personal involucrado	68
13. Conclusiones	69
13.1. Conclusión	69
13.2. Desarrollos futuros	69

Anexos	71
A. A: Extracto del ensayo por el equipo investigador	73
A.1. Objetivo	73
A.2. Modelo biológico: Línea celular de epitelio humano	73
A.3. Metodología	74
A.3.1. Procedimiento para la adquisición de las imágenes de los cultivos	74
A.4. Estadística	76
A.5. Conclusión a partir de la aplicación del método estándar (medición de distancia)	76
A.6. Análisis y conclusión de los resultados aplicando el algoritmo y software diseñados ad hoc (medición de superficie de la brecha)	77
A.7. Comentario final	78
B. B: Publicitación del Congreso de INDIBA	81
Bibliografía	83

Índice de figuras

2.1.	A la izquierda, la primera radiografía que W. Conrad Röntgen realizó: la mano de su mujer; a la derecha, el físico alemán.	3
2.2.	Máquina de Resonancia Magnética	4
2.3.	Microscopio de fluorescencia	5
2.4.	Microfotografía de la brecha.	7
2.5.	Ejemplo de cicatrización en un intervalo de seis horas.	7
2.6.	Resultado que se muestra tras procesar la imagen.	7
2.7.	Microscopio óptico utilizado para la toma de imágenes.	8
2.8.	Logotipo del programa ImageJ.	8
3.1.	Aplicación del tratamiento TECR.	11
4.1.	Placa Petri con las marcas guía en negro y la simulación de la brecha en rojo.	14
4.2.	Microscopio óptico utilizado para la toma de imágenes.	14
4.3.	Objetivos del microscopio óptico.	15
4.4.	Esquema donde se muestran los pasos segundo, tercero y cuarto del experimento.	15
4.5.	Imágenes de microscopía a procesar donde se puede observar el estado de la brecha a diferentes horas.	16
5.1.	Logotipo de MATLAB.	17
5.2.	Ejemplo de eliminación de ruido utilizando funciones de Image Processing Toolbox.	18
5.3.	Segmentación basada en colores.	19
5.4.	Logotipo del programa ImageJ.	19
5.5.	Entorno de trabajo y ejemplos de análisis en ImageJ.	20
5.6.	Logotipo del software CMEIAS.	20
5.7.	Once morfotipos diferentes que asigna CMEIAS a los elementos identificados en una imagen.	21
6.1.	Ejemplo de funcionamiento del comando <i>imFill()</i>	24
6.2.	Resultado de las funciones <i>bwlabel()</i> y <i>regionprops()</i> antes y después de resolver la problemática con el comando <i>imFill()</i>	25
6.3.	Resultado del algoritmo antes y después de resolver la problemática con el comando <i>imFill()</i>	25
6.4.	Resultado tras insertar el valor del área de la brecha en la imagen y marcar su perímetro.	26

6.5. Resultado tras superponer el perímetro de la brecha en la imagen original.	27
6.6. <i>Output</i> del algoritmo empírico.	27
6.7. Resultado tras insertar el valor del área de la brecha en la imagen y marcar su perímetro.	29
6.8. Resultado tras superponer el perímetro de la brecha en la imagen original.	30
6.9. <i>Output</i> del algoritmo de segmentación por textura.	30
6.10. A la izquierda, <i>output</i> del algoritmo empírico. A la derecha, <i>output</i> del algoritmo de segmentación por textura.	31
6.11. A la izquierda, <i>output</i> del algoritmo empírico. A la derecha, <i>output</i> del algoritmo de segmentación por textura.	31
7.1. Cuadro de diálogo con las plantillas GUI prediseñadas.	34
7.2. Entorno de diseño de GUI.	35
8.1. Árbol genealógico de carpetas.	38
8.2. Contenido de la carpeta PUNTO 1.	38
8.3. Interfaz de la aplicación biomédica.	39
8.4. Interfaz de la aplicación biomédica.	40
8.5. Interfaz de la aplicación biomédica.	41
8.6. Interfaz de la aplicación biomédica.	41
8.7. Interfaz de la aplicación biomédica.	41
8.8. Interfaz de la aplicación biomédica.	41
8.9. Interfaz de la aplicación biomédica.	42
8.10. Interfaz de la aplicación biomédica.	42
8.11. Interfaz de la aplicación biomédica.	43
8.12. Interfaz de la aplicación biomédica.	43
8.13. Apariencia del Excel creado por la aplicación.	44
9.1. Logotipo de GraphPad Prism.	45
9.2. Logotipo de Statgraphics.	46
9.3. Entorno de Statgraphics.	46
10.1. Cuadro de diálogo para el ingreso de datos en Statgraphics. (ANOVA Simple)	52
10.2. Gráficos para un tiempo de cero horas.	53
10.3. Gráficos para un tiempo de cuatro horas.	54
10.4. Gráficos para un tiempo de seis horas.	55
10.5. Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en cuatro horas.	56
10.6. Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en seis horas.	57
10.7. Gráficos para un tiempo de cero horas.	59
10.8. Gráficos para un tiempo de seis horas.	60
10.9. Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en seis horas.	61
11.1. Ejemplo de procesamiento incorrecto (Algoritmo empírico).	64
11.2. Ejemplo de procesamiento incorrecto (Algoritmo por texturas).	64
13.1. A la izquierda, cultivo de fibroblastos. A la derecha, cultivo de queratinocitos.	70

A.1. Esquema explicativo del procedimiento para la adquisición de las imágenes.	75
A.2. Esquema explicativo del procedimiento para la adquisición de las imágenes.	75
A.3. Método de medida del ancho de la brecha.	76
A.4. Histograma representativo de los resultados de la tabla A.3.	78
A.5. Histograma representativo de los resultados de la tabla A.4.	78
B.1. Publicitación del Congreso.	81

Índice de tablas

9.1. Expresiones para el Análisis de Varianza	49
10.1. Tabla ANOVA para 0h por CT	53
10.2. Tabla de Medias para 0h por CT con intervalos de confianza del 95,0 %	53
10.3. Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 4)	54
10.4. Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0 % (Time = 4)	54
10.5. Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 6)	55
10.6. Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0 % (Time = 6)	56
10.7. Tabla ANOVA para (0h-Th)/0h*100 por CT (Time = 4)	56
10.8. Tabla de Medias para (0h-Th)/0h*100 por CT con intervalos de con- fianza del 95,0 % (Time = 4)	57
10.9. Tabla ANOVA para (0h-Th)/0h*100 por CT (Time = 6)	58
10.10. Tabla de Medias para (0h-Th)/0h*100 por CT con intervalos de con- fianza del 95,0 % (Time = 6)	58
10.11. Tabla ANOVA para 0h por CT	59
10.12. Tabla de Medias para 0h por CT con intervalos de confianza del 95,0 %	59
10.13. Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 6)	60
10.14. Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0 % (Time = 6)	61
10.15. Tabla ANOVA para (0h-Th)/0h*100 por CT (Time = 6)	61
10.16. Tabla de Medias para (0h-Th)/0h*100 por CT con intervalos de con- fianza del 95,0 % (Time = 6)	62
11.1. Tabla de parámetros para los experimentos realizados a seis horas. . .	65
A.1. Tabla con distancias, media y desviación por punto.	76
A.2. Tabla que muestra el porcentaje de cicatrización.	77
A.3. Tabla de resultados de la evolución del cierre en seis horas.	77
A.4. Tabla de resultados de la evolución del cierre en seis horas (utilizando el algoritmo).	77

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación del proyecto

Este proyecto nace en el Laboratorio del Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Surge debido a la necesidad existente de encontrar la manera de automatizar una etapa de análisis y procesamiento de imágenes de microscopía. Esta tarea, perteneciente a una técnica experimental básica, resultaba tediosa, monótona y poco objetiva.

Por ello, se ha tratado de encontrar una solución que resulte eficaz y útil, pudiendo ahorrar mucho tiempo al equipo de investigación y perfeccionar las técnicas utilizadas.

1.2. Objetivos

El principal objetivo de este proyecto es el diseño y la búsqueda del algoritmo de procesamiento de imágenes más útil y eficaz para un determinado tipo de microfotografías, de manera que puedan analizarse las mismas obteniéndose el mínimo error.

Así mismo, otro de los objetivos es acompañar a dicho algoritmo de una interfaz de usuario de uso lo más simple e intuitivo posible, de forma que las imágenes no tengan que ser procesadas de una en una, sino por directorios o carpetas.

1.3. Estructura del documento

A continuación y para facilitar la lectura de este documento, se resume brevemente el contenido del que consta cada capítulo.

- En el primer capítulo se realiza una pequeña introducción donde se pueden encontrar los objetivos y la motivación de este proyecto.
- En el segundo capítulo se encuentra el estado del arte.
- En el tercer capítulo se comentan los fundamentos del estudio de investigación que han sido la base del proyecto.
- En el cuarto capítulo se profundiza en el protocolo de investigación empleado.

- En el quinto capítulo se resumen las herramientas utilizadas para el procesamiento de microfotografías.
- En el sexto capítulo se tratan los algoritmos de segmentación y procesamiento desarrollados.
- El séptimo capítulo habla sobre diseño y desarrollo de interfaces gráficas de usuario.
- En el capítulo octavo se especifica el funcionamiento de la aplicación biomédica creada.
- En el capítulo noveno se encuentra el marco teórico de la estadística utilizada.
- En el capítulo décimo se resume el análisis de los datos proporcionados por la aplicación biomédica.
- En el capítulo undécimo se tienen los resultados obtenidos del análisis y su discusión.
- En el capítulo duodécimo se habla sobre la gestión del proyecto y su planificación.
- En el último capítulo se resumen las conclusiones del trabajo llevado a cabo.
- Al final del documento, se pueden encontrar los anexos y la bibliografía utilizada.

Capítulo 2

Estado del arte

2.1. Introducción al procesamiento de imágenes biomédicas

El campo de las imágenes médicas ha sido uno de los que más se ha beneficiado de los avances tecnológicos en las últimas décadas.

A finales del siglo XIX y mientras investigaba la fluorescencia violeta que generaban los rayos catódicos, el físico alemán Wilhelm Conrad Röntgen descubrió los Rayos X. Este hecho marcó el comienzo de la imagen médica. Pronto, las imágenes de Rayos X se utilizaron para hacer radiografías, que resultaron de gran utilidad en el diagnóstico médico.



Figura 2.1: A la izquierda, la primera radiografía que W. Conrad Röntgen realizó: la mano de su mujer; a la derecha, el físico alemán.

Pocos años después, a comienzos del siglo XX y con la aparición de la televisión, se consiguió una mayor resolución en la obtención de imágenes en tiempo real, pudiendo visualizarlas en monitores.

Tres décadas más tarde aparecería la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y el primer tomógrafo comercial, permitiendo visualizar el cuerpo humano en secciones o rodajas.

Desde su existencia, las imágenes biomédicas han sido analizadas e interpretadas por profesionales del campo de la salud y la investigación, con todo lo que ello conlleva.

En los últimos años, con la constante introducción de algoritmos de análisis y procesamiento de imágenes en este campo, se está dando solución a problemas existentes y hasta el momento no abordados, permitiendo así que grandes avances en la Ciencia y en la Medicina tengan lugar. Con ello se permite automatizar tareas laboriosas y monótonas, tardando una mínima parte del tiempo que invertiría el personal médico y científico en realizar dicho análisis manualmente y siendo el resultado mucho más preciso, minucioso, elaborado y objetivo. Con los resultados facilitados por el algoritmo o la interfaz con la que el profesional trabaja, a éste último ya solo le queda realizar la interpretación de los mismos y establecer el diagnóstico final.

A continuación, se resumen dispareos métodos utilizados actualmente para llevar a cabo la segmentación, el procesamiento y el análisis de imágenes biomédicas, en concreto en imágenes de microscopía. Se pueden dividir en dos categorías bien diferenciadas: métodos manuales y métodos automatizados.

2.2. Procesamiento manual de imágenes biomédicas

Como ya se ha comentado anteriormente, el procesamiento de determinadas imágenes de investigación se sigue realizando, en gran medida, de manera manual, debido, en muchas ocasiones, a la falta de medios digitales o de herramientas informáticas que lo generen.

En el área de la microscopía, son muchos los centros que aún no disponen de algoritmos de procesamiento de microfotografías para resolver problemáticas específicas, teniendo que adaptarse a los medios de los que disponen.

2.3. Procesamiento digital de imágenes biomédicas

La aparición en las últimas décadas de técnicas más modernas de imagen médica ha hecho posible grandes avances en biomedicina. Ejemplo de ello son las Resonancias Magnéticas o los Rayos-X por Tomografía Computarizada (TAC), ya mencionado anteriormente. Técnicas como estas permiten obtener imágenes altamente detalladas permitiendo así al personal cualificado dar un mejor diagnóstico o detectar una gran variedad de enfermedades a corto plazo.



Figura 2.2: Máquina de Resonancia Magnética

Desde los años 70 existe un aumento del uso de técnicas y algoritmos de Visión Artificial aplicados al análisis de imágenes biomédicas. A pesar de esto, el desarrollo

de estas herramientas no ha logrado grandiosos avances [20], debido a que los propios profesionales encargados del análisis de las imágenes muestran, en algunas ocasiones, ciertas reticencias a la informatización de los mismos.

2.3.1. Procesamiento digital de microfotografías

Actualmente, el procesamiento de imágenes de microscopía es una acción que se lleva a cabo a diario en todos los laboratorios de investigación. Dentro de la inmensa diversidad del ámbito médico y biológico existen innumerables tipologías de imagen realizadas con microscopio. Los más comúnmente utilizados son los ópticos convencionales, aunque en biología celular también destacan los microscopios de fluorescencia. [6]



Figura 2.3: Microscopio de fluorescencia

Si bien es cierto que hoy en día, salvo los microscopios que se emplean en salas de cultivo, todos los utilizados en investigación biomédica incluyen un software de procesamiento propio, que permite analizar y realzar automáticamente la información requerida, para que su interpretación por el profesional sea más sencilla y directa. El problema aparece cuando es necesario disponer de algoritmos que realicen funciones muy específicas. [20]

Un inconveniente que aparece a la hora de informatizar estas funciones y que se ha de tener en cuenta, es que el diseño de una herramienta de análisis para este tipo de imágenes es, en gran medida, dificultoso, puesto que estas aplicaciones suelen estar destinadas únicamente a una problemática concreta [20] y bien definida; es decir, es inusual que el algoritmo diseñado pueda ser altamente reutilizable para otro otro tipo de imagen, pues existen múltiples tipologías.

Otro factor a tener en cuenta es la importancia de la calidad de las imágenes, éstas deben haber sido tomadas en condiciones óptimas. Los algoritmos de procesamiento pueden no funcionar correctamente y cometer graves errores si las capturas presentan ruido o manchas. Por lo tanto, obtener el máximo rendimiento de estas herramientas dependerá, en gran medida, del proceso previo a la segmentación, que es la toma de las imágenes y la calibración de los instrumentos destinados a ello.

Es evidente el ahorro de tiempo que supone automatizar y digitalizar la ejecución de las tareas de segmentación de microfotografías, permitiendo al profesional destinar este tiempo a otras tareas que requieran su atención y reduciendo el tiempo invertido en realizar un diagnóstico.

2.4. La Ingeniería Biomédica del futuro

Lanzando la vista al futuro, es incuestionable que los avances en la automatización de procesos de análisis de imágenes biomédicas van a ser excepcionales y que los algoritmos de procesamiento y los programas destinados a ello van a ir mejorándose a pasos agigantados.

A día de hoy estas técnicas ya se están incluyendo, por ejemplo, en cirugías en tiempo real, donde el especialista es capaz de planificar la intervención y el acceso antes de proceder a ella.

No se conoce un tiempo finito, pero contemplando la velocidad a la que avanza la tecnología y la informática en nuestros días, sí incita a ser optimista y a pensar que en un plazo relativamente corto, se fusionarán medicina e ingeniería para llegar a límites insospechables.

2.5. Problema a resolver mediante procesamiento de imágenes

Las problemáticas que se pueden encontrar a día de hoy en hospitales y laboratorios de investigación que podrían ser automatizadas en un futuro no muy lejano son innumerables.

En este capítulo se hablará de la problemática a la que se ha puesto solución con ayuda de algoritmos de análisis y procesamiento de imágenes de microscopía. Así mismo, se intentará poner en situación al lector sobre el estado en el que se encontraba la misma antes de ser automatizada.

2.5.1. Medida de un área sobre microfotografías

Como se ha comentado anteriormente, los software actuales que incorporan los microscopios no suelen prestar soluciones a problemas muy específicos. En este proyecto, se ha tratado de mejorar la técnica de medida utilizada para cuantificar un área.

Es importante especificar que todas las imágenes procesadas con el algoritmo desarrollado forman parte únicamente de ese proyecto, y se resumen en imágenes de cultivos de células epiteliales que muestran la apariencia de la Figura 2.4.

Como se puede apreciar, en las imágenes se evidencia un surco destacable. Esta brecha, como se explicará en profundidad en el siguiente capítulo, simula una herida

en las capas superficiales de la piel. Este tipo de imágenes son realizadas a distintos intervalos de tiempo, dejando así constancia de la cicatrización de la herida.

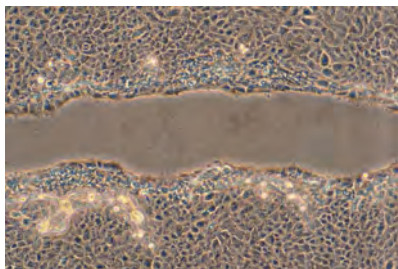


Figura 2.4: Microfotografía de la brecha.

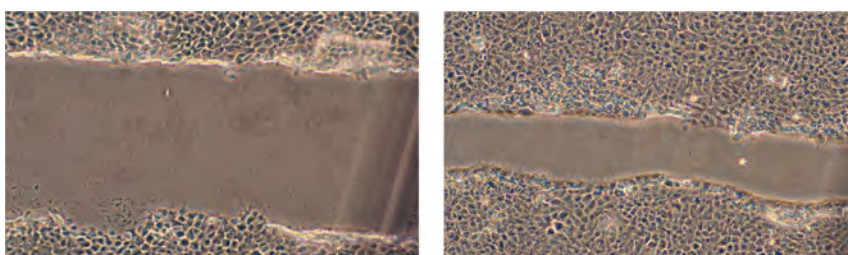


Figura 2.5: Ejemplo de cicatrización en un intervalo de seis horas.

Para medir el área de este surco de manera objetiva y con un reducido error, se ha desarrollado un algoritmo de Visión Artificial que realiza esta acción de manera automática. Dicho algoritmo se analizará más adelante, en el capítulo seis.

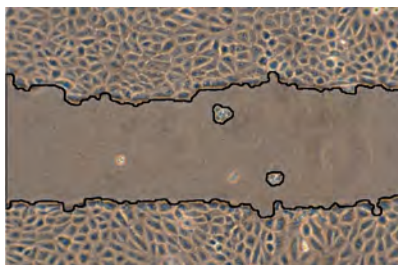


Figura 2.6: Resultado que se muestra tras procesar la imagen.

Como se observa en la figura anterior, el algoritmo identifica la superficie a cuantificar y la señala, quedando su perímetro marcado por una línea negra poco gruesa.

2.5.2. Estado de la técnica antes de automatizarla.

Tras diversas búsquedas de información y sabiendo que en otros laboratorios del resto del mundo se realiza esta misma técnica experimental, se trató de conocer la manera en que se mide esta superficie. Los métodos utilizados son muy diferentes, pero todos tienen algo en común: ninguno ellos mide área de forma directa, sino distancias entre puntos situados a ambos extremos del surco, para luego realizar estimaciones.

Uno de los primeros métodos de los que se tuvo conocimiento, trata de medir directamente desde el microscopio, disponiendo éste de una regla incorporada. En este caso no se llegan a realizar las microfotografías, simplemente se anotan varias distancias del ancho de la brecha (generalmente tres) y se realiza después la media de los valores anotados.

Otro método, algo más informatizado, es realizar la misma operación, pero en este caso, llegando a capturar las imágenes con una cámara incorporada a un microscopio óptico. Con ayuda de un programa avanzado de edición fotográfica como es Photoshop, se mide la anchura del surco en tres puntos equidistantes a lo largo de la fotografía. Después, al igual que en el primer método, se realizan las medias de las medidas anotadas.



Figura 2.7: Microscopio óptico utilizado para la toma de imágenes.

Un tercer y último método que se conoce, es la utilización del programa ImageJ [3] [9] [12], del que se hablará detalladamente en el capítulo de herramientas de trabajo. En esta metodología, las imágenes son procesadas con este software, donde se pueden programar algoritmos en lenguaje Java. En este caso, se acotan entre cincuenta y sesenta distancias de la anchura de la brecha a lo largo de toda ella y, finalmente, de igual manera que para los otros métodos, se realiza una media de estas longitudes.



Figura 2.8: Logotipo del programa ImageJ.

Todas estas técnicas son válidas y aceptadas entre la comunidad científica, pero pueden ser perfeccionadas. De ahí el interés del proyecto de ingeniería llevado a cabo, pudiendo cambiar el enfoque de lo que se mide: área en lugar de distancias.

Capítulo 3

Investigación biomédica en Electroterapia

En este capítulo se explicará detalladamente en qué consiste el estudio de investigación trienal que se lleva a cabo actualmente en el Laboratorio de BioElectromagnetismo del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, para el cual ha sido desarrollado este proyecto.

3.1. Objetivo del estudio de investigación

Uno de los objetivos del estudio de investigación es saber cómo funciona, a nivel biológico, un tipo concreto de terapia eléctrica que se aplica actualmente en clínicas. Para ello, se realizan una serie de técnicas de investigación en las que se simula una herida utilizando cultivos celulares de piel, para más adelante comprobar si la cicatrización de la misma es más veloz al serle aplicado el tratamiento. La metodología llevada a cabo se explicará detalladamente en la última sección de este capítulo.

El análisis de los efectos del tratamiento se trata de establecer, como es lógico, al final del experimento, simplemente realizando una comparativa entre cultivos celulares que han recibido estimulación eléctrica y cultivos que no lo han hecho.

3.2. Fundamentos del estudio de investigación

El proyecto de investigación que se realiza tiene sus orígenes en la necesidad de conocer si existen efectos significativos al aplicar, en cultivos de células epiteliales humanas, Electroterapia, o más concretamente, la terapia por Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR). De estas terapias eléctricas se conocen sus efectos terapéuticos desde hace casi cien años.

Con el objetivo de establecer una base sólida, se explicarán seguidamente los fundamentos de este tipo de terapias y algunas de sus aplicaciones médicas.

3.2.1. Qué es la Electroterapia

Por definición, se denomina Electroterapia a la aplicación de energía electromagnética al organismo. Ésta puede ser aplicada de diversas formas, comúnmente

en forma de campos electromagnéticos o mediante corrientes eléctricas. El fin de esta terapia es producir en el organismo alteraciones tanto biológicas como fisiológicas con el objetivo de conseguir una mejora frente a una lesión o una enfermedad.

Desde hace tiempo, estas terapias se utilizan regularmente en dermatología, traumatología, medicina estética y en medicina del deporte para aliviar dolores musculares o fomentar la irrigación sanguínea. Así mismo, actualmente se están empezando a aplicar en el campo de la oncología como coadyudantes en el tratamiento de determinados tipos de tumores [2].

Se sabe que el organismo es un conductor de segundo orden (los iones contenidos en las disoluciones y dispersiones coloidales transmiten la energía aplicada) [13]. Como es lógico, la mayor o menor conductividad de un tejido dependerá del contenido de agua como disolvente y los solutos que incorpore. Así, se podrían considerar a la piel, los tendones, los cartílagos y los tejidos musculares como buenos conductores, mientras que las uñas, el pelo y los huesos serán todo lo contrario.

Las terapias basadas en corrientes eléctricas son muy variadas y se diferencian en el tipo de corriente utilizada y en su modo de aplicación. Estas se agrupan en función de los efectos que generen sobre el organismo, en función de las frecuencias y en función de las formas de onda. [17]

Pueden aplicarse en forma de pulsos aislados o de trenes o ráfagas. Además, la aplicación también puede ser mantenida durante unos instantes y a frecuencia fija.

Se utilizan corrientes del espectro electromagnético no ionizantes, cuyo límite se encuentra en las radiaciones ultravioleta de tipo B. La frecuencia a aplicar variará en función de la lesión a tratar, yendo desde los 0 a los 1.000 Hz (baja frecuencia) hasta los 450.000 - 600.000 Hz (alta frecuencia). Dentro de este último rango del espectro de radiofrecuencias, se encuentra la terapia electrotérmica por Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR), cuyos efectos han sido y son objeto de estudio del proyecto trienal de investigación que se menciona. [17] [18]

3.2.2. Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR)

La técnica de Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR) consiste en la aplicación de una corriente eléctrica de radiofrecuencia. Al atravesar esta corriente los tejidos blancos, induce en ellos un potencial eléctrico que da lugar a un incremento térmico. Esta técnica se basa en dos principios físicos, que son: la transferencia eléctrica capacitiva (TEC), que permite transferir la corriente de radiofrecuencia a los tejidos a tratar aprovechando las propiedades de acumulación de carga eléctrica de los condensadores, y la transferencia eléctrica resistiva (TER), que aprovecha directamente la resistencia de los tejidos al paso de la corriente eléctrica.

Tanto en el caso capacitivo como en el resistivo, la corriente genera un movimiento de iones o partículas cargadas (sin desplazamiento neto de cargas) presentes en los tejidos expuestos. Dicho movimiento es el que da lugar a incrementos de temperatura en los mismos, que son consecuencia directa de los fenómenos de rozamiento

entre partículas adyacentes. [7]

En los tratamientos terapéuticos, las corrientes TECR son aplicadas mediante electrodos de acero inoxidable conectados a un generador de señales. De este modo, la corriente proveniente del generador se aplica mediante un electrodo móvil (denominado electrodo activo), que se desplaza manualmente sobre la región a tratar, previamente lubricada con crema conductora. El circuito es cerrado con un electrodo de retorno (denominado electrodo inmóvil), que se coloca en la región anatómica opuesta a la zona tratada.

Cabe destacar que los electrodos que se usan en las clínicas son distintos a los utilizados en los experimentos realizados en estudios *in vitro*, que fueron fabricados ad hoc para su colocación en las placas Petri del laboratorio. [17]

3.2.3. Aplicaciones médicas de la terapia TECR

La evidencia clínica sobre las aplicaciones de la terapia TECR es todavía muy limitada, si bien, los estudios publicados han aumentado en número durante los últimos años y abarcan disciplinas muy diversas. La gran mayoría de estos estudios son realizados en rehabilitación física, pero sobretodo en medicina deportiva para el tratamiento de lesiones osteoarticulares, donde esta terapia ha sido empleada con éxito para disminuir el dolor de pacientes con lesiones musculares y/o óseas crónicas o agudas. [19] Esta terapia también se ha mostrado eficaz en patologías del tendón y en lesiones deportivas, donde otras terapias físicas o químicas no habían resultado efectivas.



Figura 3.1: Aplicación del tratamiento TECR.

Otras disciplinas donde se ha aplicado la terapia TECR incluyen la neumología, la regeneración de lesiones vasculares y la oftalmología.

Capítulo 4

Protocolo de investigación empleado

Como ya se ha comentado anteriormente, el objetivo del estudio de investigación es conocer, a nivel celular, cómo y por qué esta terapia es capaz de regenerar heridas, y para ello, se emplea una técnica conocida como *Wound assay* sobre cultivos de queratinocitos humanos.

La técnica llevada a cabo puede durar hasta veinticuatro horas y se resume en electro-estimular, a distintos intervalos de tiempo, cultivos monocapa de células epiteliales a los que a las cero horas se les ha realizado un surco, que simula una herida en las capas más superficiales de la piel. Midiendo y analizando el área de esas brechas en los espacios de tiempo correspondientes y comparándolas con las de los cultivos sin estimular, se trata de construir una teoría final sobre los efectos del tratamiento.

Los pasos previos hasta obtener las imágenes de microscopía a procesar utilizando el algoritmo de Visión Artificial desarrollado, forman parte de un protocolo experimental que se detalla a continuación.

1. Cultivo o siembra de células epiteliales

La línea celular sembrada se denomina HaCaT, esto es, se trabaja con queratinocitos humanos.

Estas células se siembran en placas Petri y tardan un tiempo promedio de una semana en formar monocapa. Para realizar el experimento, se utiliza, por un lado, un cultivo de esta línea celular que se estimulará con corrientes, y por otro, lo que se denominan un cultivo control, es decir, un cultivo que no se trata y que se utilizará más adelante para comparar con el que sí haya sido expuesto.

2. Realización del surco en la monocapa

Cuando ya se dispone de monocapa de células en las placas Petri, es cuando se realiza la brecha. Se hace con ayuda de una punta de micropipeta P1000 o P200. La brecha mide de largo entre dos o tres centímetros y será la que simule la herida en la superficie de la epidermis.

3. Dibujo de marcas guía en las placas Petri

Para facilitar la toma de las imágenes con el microscopio, se dibujan tres marcas

guía perpendiculares a la brecha a lo largo de toda ella. Estas marcas se realizan con un rotulador en el reverso de la placa Petri. Así mismo, se indican doce puntos situados a ambos lados de la brecha, por encima y por debajo de cada línea.

En la Figura 4.1 se muestra una placa Petri con las marcas guía realizadas y lo que sería la brecha, simulada por la línea roja hecha a rotulador.



Figura 4.1: Placa Petri con las marcas guía en negro y la simulación de la brecha en rojo.

En los intervalos de tiempo que corresponda, se calculará el área de la misma.

4. Realización de imágenes de microscopía a las cero horas

Las fotografías se realizan con un microscopio Nikon, modelo TMS-F que incorpora una cámara digital de marca y modelo Nikon D90 (Figura 4.2). El objetivo empleado es 10x (Figura 4.3) y todas las imágenes están realizadas con el mismo aumento. Los objetivos empleados son los del propio microscopio, la cámara únicamente captura las imágenes.



Figura 4.2: Microscopio óptico utilizado para la toma de imágenes.

La intensidad de la luz a la hora de capturarlas es siempre la misma, la máxima ofrecida por la lámpara del microscopio. Este paso es primordial, ya que el rendimiento de algoritmos de Visión Artificial destinados a procesar este tipo de



Figura 4.3: Objetivos del microscopio óptico.

imágenes será proporcional a la calidad de las imágenes tomadas, teniendo en cuenta factores como la iluminación, el ruido, manchas que puedan aparecer, el enfoque, etc.

El número de imágenes que se realizan de una única placa Petri es de seis, dos por cada marca guía horizontal (una por encima y otra por debajo de cada marca). A cada una de las seis zonas fotografiadas se le asigna el nombre de 'punto', por lo que al final, se tendrán seis puntos (punto1, punto2,...,punto6).

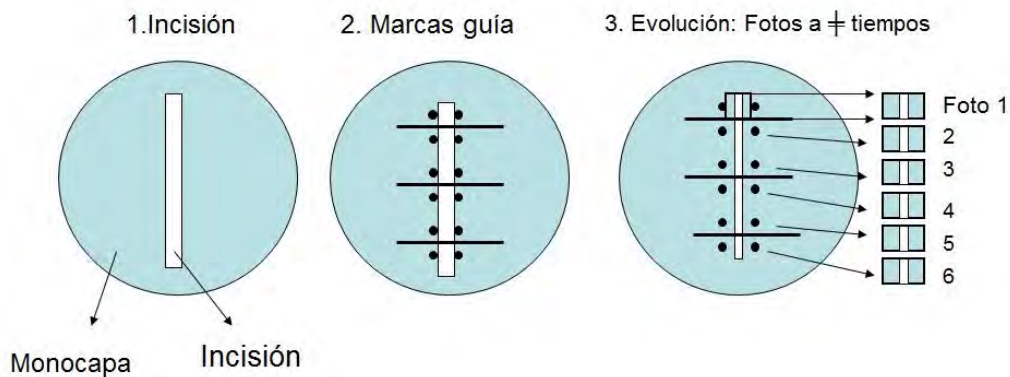


Figura 4.4: Esquema donde se muestran los pasos segundo, tercero y cuarto del experimento.

5. Electro-Estimulación de las placas Petri

Para aplicar la terapia TECR a las placas, se procede a la introducción de los electrodos en las mismas. Seguidamente, los electrodos se conectan en serie para que todas sean atravesadas por la misma intensidad. El circuito se conecta al estimulador de radiofrecuencia y se introducen en la incubadora donde mantendrán las condiciones idóneas para su cultivo.

El tratamiento eléctrico es a 100 microamperios por milímetro cuadrado aplicado en pulsos de cinco minutos cada, aproximadamente, cuatro horas, y la duración total de la estimulación depende del ensayo; puede ser durante cuatro, seis, doce o veinticuatro horas.

Las placas control que no son tratadas eléctricamente, también son introducidas en una incubadora.

6. Obtención de imágenes de microscopía post-tratamiento / Siguiete estimulación

En función del experimento, en este paso se volverá a estimular las placas si es necesario, o bien, si no procede, serán extraídas del estimulador y se realizará la segunda tanda de imágenes. A cada imagen se la nombra como XH, donde X son las horas(H) a las que ha sido realizada la captura (por ejemplo, 0H, 4H, etc). Finalmente, las imágenes se almacenan por carpetas denominadas PUNTOX, donde X representa un número del uno al seis (por lo explicado en el cuarto paso). (Este detalle será importante en el capítulo ocho, donde se habla del funcionamiento de la aplicación biomédica desarrollada.)

En estas imágenes ya es apreciable cómo la herida ha cerrado. El porcentaje de cicatrización será proporcional a las horas que hayan transcurrido desde que fueron introducidas en el estimulador.

Del mismo modo, las placas control también son fotografiadas.

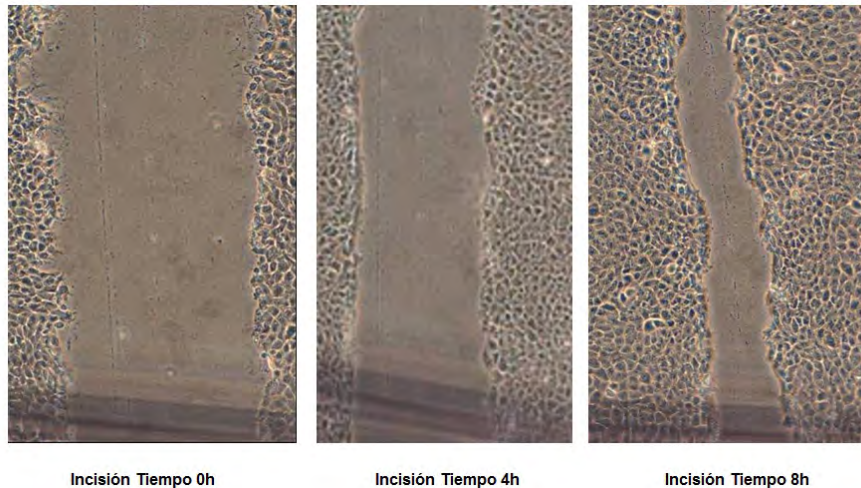


Figura 4.5: Imágenes de microscopía a procesar donde se puede observar el estado de la brecha a diferentes horas.

Capítulo 5

Herramientas para el procesamiento de microfotografías

El procesamiento de imágenes de microscopía es una etapa trascendental para aquellos colectivos e industrias que trabajan en áreas como diagnóstico médico, investigación o análisis de datos en laboratorio.

En este capítulo se hablará de las principales herramientas que se utilizan hoy en día para desempeñar estas funciones.

5.1. MATLAB

Disponible para las plataformas de Unix, Windows y Apple, MATLAB [16], abreviatura de MATrix LABoratory, es un entorno de análisis y desarrollo utilizado actualmente por una inmensa mayoría de ingenieros y científicos.



Figura 5.1: Logotipo de MATLAB.

Este software matemático con lenguaje de programación propio (lenguaje M) ofrece un entorno de desarrollo integrado (IDE), y está presente en diversas áreas de trabajo e investigación, como pueden ser: naves espaciales interplanetarias, dispositivos de monitorización de la salud o redes eléctricas inteligentes, entre otros muchos campos.

Esta plataforma, está optimizada para resolver problemas de ingeniería y científicos, integrando análisis numérico y cálculo matricial.

De entre su multitud de prestaciones básicas, las más utilizadas en este proyecto son la manipulación de matrices, la implementación de algoritmos y la creación de interfaces de usuario (GUI), de la que se hablará más adelante.

Esta herramienta, además de incorporar un inmenso conjunto de comandos destinados al tratamiento de datos, optimización o cálculo, entre otros, pone a disposición del usuario las denominadas *toolboxes* (cajas de herramientas), consistentes en paquetes de funciones para trabajar en áreas concretas.

Algunas de estas áreas incluyen diseño, identificación y modelado de sistemas de control, procesamiento de señales, finanzas computacionales, redes neuronales o procesamiento de imágenes y Visión Artificial. Este último sector ha sido el más trabajado en este proyecto.

5.1.1. Image Processing Toolbox

Para el caso de manipulación de imágenes se emplea esta *toolbox* [15], que proporciona un conjunto completo de algoritmos, funciones y aplicaciones para el procesamiento, el análisis y la visualización de imágenes, así como para el desarrollo de algoritmos.

Mediante los comandos que incorpora esta caja de herramientas, se pueden llevar a cabo análisis, segmentación y mejora de imágenes, reducción de ruido y transformaciones geométricas.



Figura 5.2: Ejemplo de eliminación de ruido utilizando funciones de Image Processing Toolbox.

Además, *Image Processing Toolbox* soporta un conjunto diverso de tipos de imágenes. Las características y aplicaciones de visualización permiten explorar imágenes y vídeos, examinar una región de píxeles, ajustar el color y el contraste, crear contornos o histogramas y manipular regiones de interés.

Como resultado, las funciones que incorpora esta *toolbox* hacen fácil e intuitivo efectuar el procesamiento de imágenes y las operaciones de análisis de morfología binaria, manipulación geométrica o la conversión de espacios de colores (Figura 5.3).

En el siguiente capítulo, se entrará en detalle y se mostrará la implementación de las técnicas más utilizadas a la hora de tratar imágenes de microscopía.



Figura 5.3: Segmentación basada en colores.

5.2. ImageJ

Inspirado en el *NIH Image*, que fue desarrollado en la Subdivisión de Servicios de Investigación (RSB) del Instituto Nacional de Salud Mental (NIMH), ImageJ es otro de los programas utilizados para procesamiento de imágenes de microscopía. Este software es de dominio público. [10]



Figura 5.4: Logotipo del programa ImageJ.

Al igual que MATLAB, este programa está disponible para las plataformas de Unix, Windows y Apple.

Con este software se puede visualizar, editar, analizar y procesar imágenes de 8, 16 o 32 bits. Es importante destacar que permite leer diversos formatos de imagen, incluyendo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS y raw”.

Sus funcionalidades permiten calcular áreas y valores estadísticos de regiones de una imagen previamente seleccionadas por el usuario. Así mismo, ImageJ puede medir distancias y ángulos y también ofrece histogramas de densidad, entre muchos otros.

Esta aplicación también desempeña las funciones estándar de procesamiento de imágenes, como pueden ser la manipulación del contraste, la nitidez, el suavizado, la detección de bordes, etc.

ImageJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona expansibilidad a través de *plugins* en Java. Desarrollando estos complementos, el usuario puede ser capaz de resolver prácticamente cualquier problema de procesamiento de imágenes. Actualmente, existen más de quinientos elementos editables disponibles, que se pueden clasificar por funcionalidad en:

- Adquisición
- Análisis
- Color
- Filtros

- Segmentación
- Gráficos

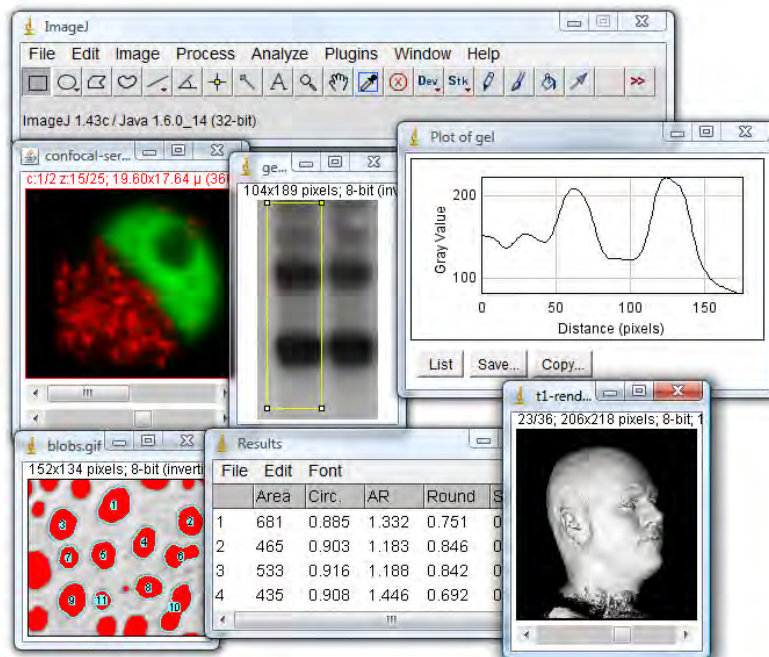


Figura 5.5: Entorno de trabajo y ejemplos de análisis en ImageJ.

5.3. CMEIAS

El software CMEIAS (Center for Microbial Ecology Image Analysis System) [4] está siendo desarrollado actualmente por un equipo formado por ecologistas, informáticos y matemáticos de la Universidad Estatal de Michigan.

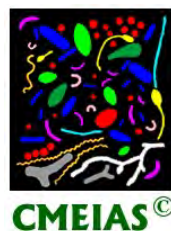


Figura 5.6: Logotipo del software CMEIAS.

El programa consiste en varios *plugins* personalizados elaborados para UTHSCSA (University of Texas Health Science Center at San Antonio) ImageTool, un software gratuito de análisis de imágenes que opera en ordenadores cuyo sistema operativo sea Windows.

En este programa, el usuario escoge una región sobre la imagen y el software se encarga de proporcionar la información referida a los objetos que se encuentren

en primer plano. Detallará el tamaño, la forma, la luminosidad o las coordenadas espaciales de cada elemento identificado.

Así mismo, clasifica de forma selectiva grupos de objetos dentro de una imagen hasta un máximo de dieciséis categorías distintas. El clasificador CMEIAS opera por morfología y asigna automáticamente a cada cuerpo diferenciado uno de los once tipos morfológicos microbianos predominantes en la naturaleza (Figura 5.7).












Classification Criteria	Morphotype (Label)	Pseudocolor Cell
I. Round cells (spheroid, ovoid, coccobacilli)	Cocci (A)	
II. Elongated Cells		
A. Unbranched (2 poles)		
1. Repeated waveform	Spiral (B)	
2. Single curvature		
a. Vibroid or crescent curvature	Curved Rod (C)	
b. U-shaped curvature	U-rod (D)	
3. Unbranched, no medial axis curvature		
a. Constant cell width		
i. Length/Width < 16:1	Regular Straight Rod (E)	
ii. Length/Width > 16:1	Unbranched Filament (F)	
b. Widest at center, tapered at poles	Ellipsoid (G)	
c. Wider at 1 pole		
i. Tapered at opposite pole	Club (H)	
ii. Thin stalked appendage	Prosthecate (I)	
B. Branched (> 2 poles)		
1. Length/Width < 16:1	Rudimentary Branched Rod (J)	
2. Length/Width > 16:1	Branched Filament (K)	

Figura 5.7: Once morfotipos diferentes que asigna CMEIAS a los elementos identificados en una imagen.

Este software de análisis de imágenes de microscopía, al igual que ImageJ, es libre y gratuito y ofrece amplias aplicaciones en la investigación ecología microbiana, además de utilizarse con fines didácticos.

Actualmente, se encuentra disponible un paquete de herramientas de segmentación para facilitar las tareas de edición de imágenes y poder analizar microfotografías que presenten abundante información.

A día de hoy, CMEIAS se encuentra en fase de desarrollo y se pretende que en un futuro cercano el software de análisis presente diversas mejoras.

Capítulo 6

Algoritmos de segmentación y procesamiento

En este capítulo, se detallarán los algoritmos desarrollados para procesar las imágenes de microscopía facilitadas por el Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

6.1. Introducción

El principal objetivo era alcanzar un algoritmo que proporcionara el máximo rendimiento y que fuera apto y reutilizable a la hora de procesar las casi tres mil imágenes pertenecientes al proyecto de investigación.

Es importante destacar que cuando tuvo comienzo este proyecto, prácticamente el total de las microfotografías a segmentar habían sido ya realizadas con bastante anterioridad, por lo que a la hora de crear los algoritmos, se ha tratado de optimizarlos al máximo teniendo en cuenta algunas carencias que éstas presentaban (falta de iluminación homogénea, ruido, manchas, desenfoque, ...).

A continuación, se comentan en profundidad y en orden de creación, los dos algoritmos planteados que mejor han funcionado a la hora de solucionar la problemática en cuestión, ya explicada en capítulos anteriores.

6.2. Algoritmo empírico

Tras llevar a cabo un profundo análisis visual de las microfotografías a procesar, se desarrolla un algoritmo de ensayo y error. Esta forma de proceder es lo que se denomina una técnica de carácter heurístico. Basada en la experimentación, consiste en ir probando estrategias factibles y verificar si los resultados obtenidos son una solución válida para el problema que se plantea. En caso de no serlo, se propone una nueva alternativa que se aplica y se evalúa.

Un inconveniente de este tipo de métodos es que no siempre aseguran un resultado positivo, pero en esta ocasión, este algoritmo es el más preciso de los que han sido elaborados y testados.

6.2.1. Análisis del código en MATLAB

```

% @File: Algoritmo1.m // Algoritmo empírico
% @Author: Marina de Andrés Zamora
% @Date: Septiembre, 2016. Madrid.
% @Brief: Script que ejecuta un algoritmo de Visión Artificial desarrollado
         para procesamiento de microfotografías realizadas en el Servicio de
         Bioelectromagnetismo del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.
% -----

function [imOut, imFil]= Algoritmo1(NomFichImg)
% Leer la imagen y reducirla de tamaño
ImgEnt = imread (NomFichImg);
ImgEnt = imresize (ImgEnt,0.25);

% Binarización y Top-hat
imTH = imtophat (ImgEnt, strel ('disk',5));
imBW = im2bw (imTH, graythresh (imTH));

% Unir los bordes y limpiarlos
closeBW = imclose (imBW, strel ('disk',12));
cleanBW = imerode (closeBW, strel ('disk',5));

% Rellenar huecos
imFill= imfill (cleanBW, 'holes');
imAO = bwareaopen (imFill,500);
imDil= imdilate (imAO, strel ('disk',5));
imFil= imfill (imDil, 'holes');
imFil= ~imFil;

```

Para hallar el área de la brecha se utiliza la matriz proporcionada por el comando *bwlabel()*. Si se conserva el elemento más repetido de dicha matriz (sin considerar el cero ya que es *background*), se tendrá el valor asignado al área de la herida (siempre es el cuerpo más grande de entre todos los identificados). El resto de indicadores serán anulados más adelante, solucionando así el problema que genera el comando *imFill()* al no cerrar los huecos y regiones que interseccionan con los bordes de una imagen.

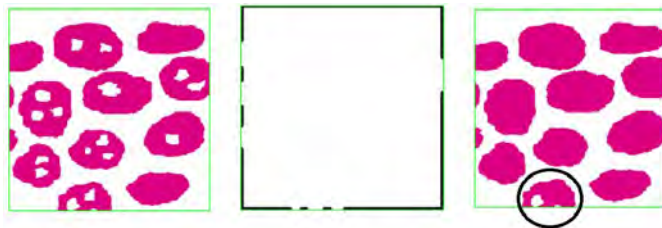


Figura 6.1: Ejemplo de funcionamiento del comando *imFill()*.

En las siguientes figuras (Figura 6.2 y Figura 6.3) se expresa gráficamente lo dicho en el párrafo anterior, para que el lector pueda hacerse una idea visual sobre cómo trabaja el algoritmo.

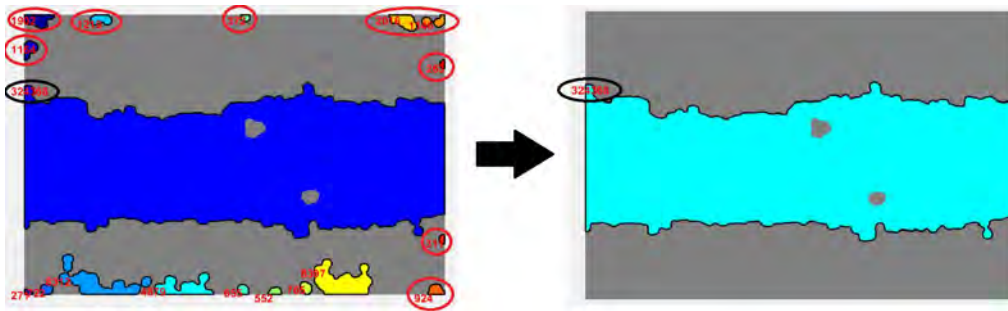


Figura 6.2: Resultado de las funciones *bwlabel()* y *regionprops()* antes y después de resolver la problemática con el comando *imFill()*.

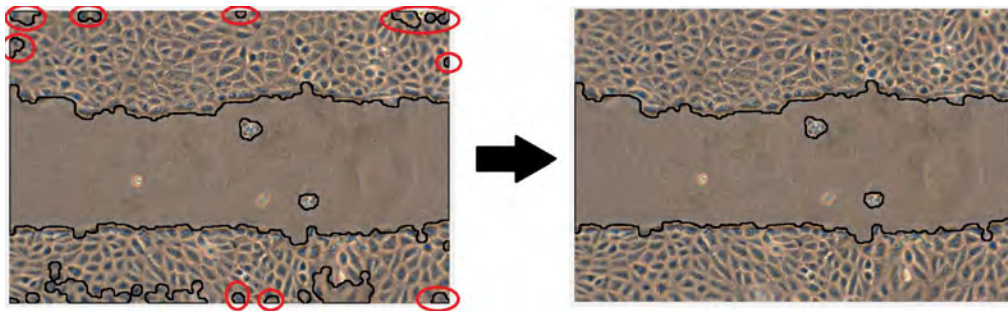


Figura 6.3: Resultado del algoritmo antes y después de resolver la problemática con el comando *imFill()*.

```

% Hallar el área de la brecha
% ¿Cuál es el valor que más se repite en la matriz? (área más grande -> area
  de la brecha)-> Ese elemento permanece, los demás se anulan.
imgEtiq=bwlabel(imFil); % Etiquetar los objetos de la imagen
vector=[];

for k=0:max(max(imgEtiq))
    numero=find (imgEtiq==k);
    repetido=length(numero); % Repetido x veces
    vector(k+1)=repetido;
end

% Crear un nuevo vector (vector2) que contiene todos los elementos menos el
  cero (background).
vector2= vector(2:k+1);

% Buscar la posición del más repetido -> j
[i, j]=find(vector2==max(max((vector2))));

% Conservar el valor más repetido del vector anulando el resto (se ponen a
  cero todos los elementos que no sean brecha).
for k=0:max(max(imgEtiq))
    if (k ~= j)
        imgEtiq(imgEtiq==k)=0;
    end
end

imFil = im2bw(imgEtiq);

% Insertar el área de la brecha en la imagen
stats = regionprops(imgEtiq, 'Area');

```

```

stats_c = cell2mat(struct2cell(stats));
for k = 1: length (stats_c);
    a= stats_c(1);
    if (stats_c(k) > a)
        aux=a;
        stats_c(1)=stats_c(k);
        stats_c(k)=aux;
    end;
end

global areamax_m;
global porc;

areamax = stats_c(1); % Área de la brecha en píxeles
areamax_m = stats_c(1)*0.212*0.212; % Factor de conversión de píxeles a
    micrómetros. Área de la brecha en micras^2.
porc = (areamax*100)/(763264); % Porcentaje de brecha. La imagen es de
    712*1072 = 763264 píxeles.

% Marcar con una línea el perímetro de la herida
[datos, imgEtiq] = bwboundaries(imgEtiq, 'noholes');
figure; imshow(label2rgb(imgEtiq, @jet, [.5 .5 .5]))
hold on
    boundary = datos{1};
    plot(boundary(:,2), boundary(:,1), 'k', 'LineWidth', 2)
hold off

% display the results
metric_string = sprintf('%2.f', areamax);

text(boundary(1,2)-35, boundary(1,1)+13, metric_string, 'Color', 'r', ...
    'FontSize', 14, 'FontWeight', 'bold');

```

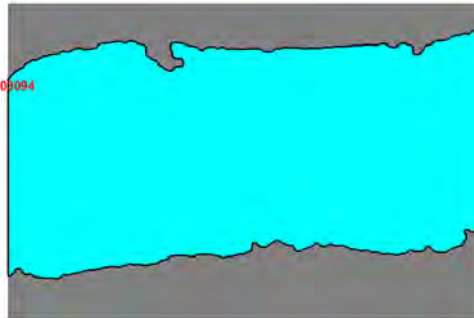


Figura 6.4: Resultado tras insertar el valor del área de la brecha en la imagen y marcar su perímetro.

```

% Dibujar la línea que bordea la brecha sobre la imagen original
imAux=ImgEnt(:,:,1);
boundaries=imdilate(bwperim(imgEtiq), strel('disk',3));
imAux(boundaries)=0;
imOut(:,:,1)=imAux;
imAux=ImgEnt(:,:,2);
imAux(boundaries)=0;
imOut(:,:,2)=imAux;
imAux=ImgEnt(:,:,3);
imAux(boundaries)=0;
imOut(:,:,3)=imAux;

```

```

% Output
figure; imshow(imOut);
subplot(1,3,1); imshow(ImgEnt); title('Imagen de entrada');
subplot(1,3,2); imshow(imFil); title('Imagen segmentada');
subplot(1,3,3); imshow(imOut); title('Imagen de salida');
figure; imshow(imOut); title('Imagen de salida');
end

```

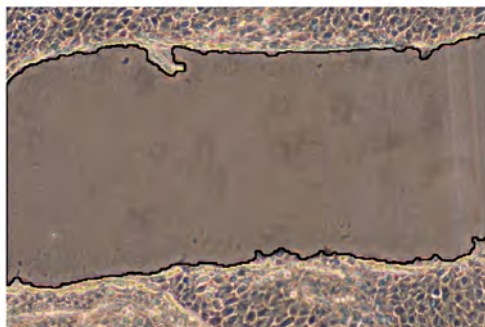


Figura 6.5: Resultado tras superponer el perímetro de la brecha en la imagen original.



Figura 6.6: *Output* del algoritmo empírico.

6.3. Algoritmo de segmentación por textura

Este segundo algoritmo está basado en la diferencia de texturas que coexisten en un misma imagen. Si se examina detenidamente cualquiera de las microfotografías a analizar, se observa que el cultivo celular presenta una textura muy diferente a la que posee la zona de la brecha. Es por ello que este algoritmo trata de identificar la superficie de la herida haciendo uso de los diferentes tejidos que se identifican.

6.3.1. Análisis del código en MATLAB

Utilizando las funciones morfológicas que incorpora Image Processing Toolbox de MATLAB y tomando como referencia el ejemplo de segmentación de texturas mediante filtros que nos presenta Mathworks, se consigue desarrollar un algoritmo que, a pesar de ser algo menos efectivo que el anterior, también ofrece buenos resultados a la hora del procesamiento.

```

% @File: Algoritmo2.m // Algoritmo de segmentación por textura.
% @Author: Marina de Andrés Zamora
% @Date: Septiembre, 2016. Madrid.
% @Brief: Script que ejecuta un algoritmo de Visión Artificial desarrollado
para procesamiento de microfotografías realizadas en el Servicio de
Bioelectromagnetismo del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.
% -----

function [imOut, imFil]= Algoritmo2(NomFichImg)
% Leer la imagen y reducirla de tamaño
ImgEnt = imread ( NomFichImg );
ImgEnt = imresize(ImgEnt,0.25);

% Top-hat
imTH = imtophat(ImgEnt, strel('disk',5));
imBW = im2bw(imTH, graythresh(imTH));

E=entropyfilt(imBW);
Eim=mat2gray(E);

BW1=im2bw(Eim,0.8);
BWao=bwareaopen(BW1,2);
BWao=imdilate(BWao, strel('disk',5));
nhood=true(9);
closeBWao=imclose(BWao, nhood);

imFil=imfill(closeBWao, 'holes');
imFil= ~imFil;

```

A partir de este punto, se repite el proceso de cálculo del área de la herida y el marcaje de su perímetro, realizándose de igual manera que en el algoritmo anterior.

```

% Hallar el área de la brecha
% ¿Cuál es el valor que más se repite en la matriz? (área más grande -> area
de la brecha)-> Ese elemento permanece, los demás se anulan.
imgEtiq=bwlabel(imFil); % Etiquetar los objetos de la imagen
vector=[];

for k=0:max(max(imgEtiq))
    numero=find(imgEtiq==k);
    repetido=length(numero); % Repetido x veces
    vector(k+1)=repetido;
end

% Crear un nuevo vector (vector2) que contiene todos los elementos menos el
cero (background).
vector2= vector(2:k+1);

% Buscar la posición del más repetido -> j
[i, j]=find(vector2==max(max((vector2))));

% Conservar el valor más repetido del vector anulando el resto (se ponen a
cero todos los elementos que no sean brecha).
for k=0:max(max(imgEtiq))
    if (k ~= j)
        imgEtiq(imgEtiq==k)=0;
    end
end
imFil = im2bw(imgEtiq);

```

```

%Insertar el área de la brecha en la imagen
stats = regionprops(imgEtiq, 'Area');
stats_c = cell2mat(struct2cell(stats));
for k = 1: length (stats_c);
    a= stats_c(1);
    if (stats_c(k) > a)
        aux=a;
        stats_c(1)=stats_c(k);
        stats_c(k)=aux;
    end;
end

global areamax_m;
global porc;

areamax = stats_c(1); %Área de la brecha en píxeles
areamax_m = stats_c(1)*0.212*0.212; %Factor de conversión de píxeles a
    micrómetros. Área de la brecha en micras^2.
porc = (areamax*100)/(763264); %Porcentaje de brecha. La imagen es de
    712*1072 = 763264 píxeles.

%Marcar con una linea el perímetro de la herida
[datos, imgEtiq] = bwboundaries(imgEtiq, 'noholes');
figure; imshow(label2rgb(imgEtiq, @jet, [.5 .5 .5]))
hold on
    boundary = datos{1};
    plot(boundary(:,2), boundary(:,1), 'k', 'LineWidth', 2)
hold off

%display the results
metric_string = sprintf('%2.f', areamax);

text(boundary(1,2)-35, boundary(1,1)+13, metric_string, 'Color', 'r', ...
    'FontSize', 14, 'FontWeight', 'bold');

```

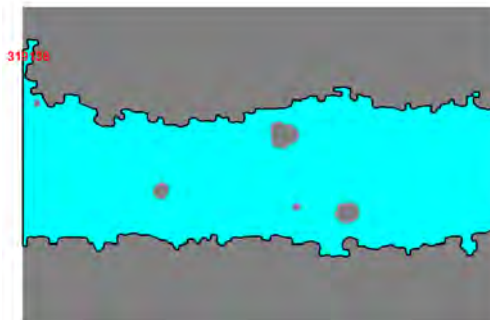


Figura 6.7: Resultado tras insertar el valor del área de la brecha en la imagen y marcar su perímetro.

```

% Dibujar la línea que bordea la brecha sobre la imagen original
imAux=ImgEnt(:, :, 1);
boundaries=imdilate(bwperim(imgEtiq), strel('disk', 3));
imAux(boundaries)=0;
imOut(:, :, 1)=imAux;
imAux=ImgEnt(:, :, 2);
imAux(boundaries)=0;
imOut(:, :, 2)=imAux;
imAux=ImgEnt(:, :, 3);

```

```

imAux(boundaries)=0;
imOut(:,:,3)=imAux;

% Output
figure; imshow(imOut);
subplot(1,3,1);imshow(ImgEnt);title('Imagen de entrada');
subplot(1,3,2);imshow(imFil);title('Imagen segmentada');
subplot(1,3,3);imshow(imOut);title('Imagen de salida');
figure; imshow(imOut);title('Imagen de salida');
end

```

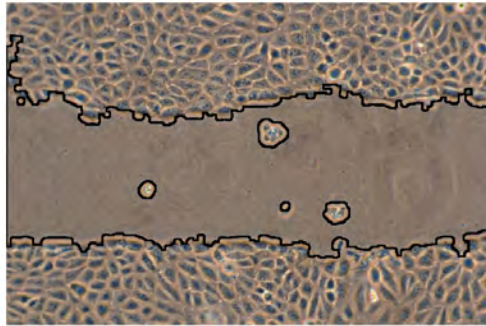


Figura 6.8: Resultado tras superponer el perímetro de la brecha en la imagen original.

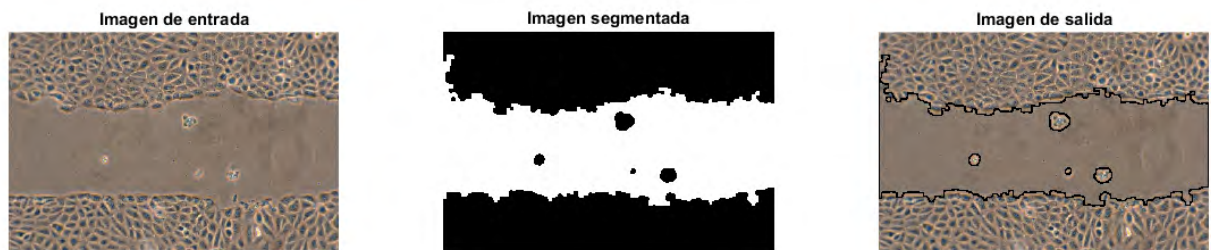


Figura 6.9: *Output* del algoritmo de segmentación por textura.

6.4. Comparativa entre algoritmos

Para realizar una comparativa entre los resultados ofrecidos por ambos algoritmos, se ha procesado la misma microfotografía con cada uno de ellos.

Si el lector observa las figuras 6.10 y 6.11, podrá advertir fácilmente las diferencias entre las capturas que se muestran. El marcaje del área que proporciona el algoritmo que toma las texturas como referencia, es algo más abrupto que el proporcionado por el código de carácter heurístico. Al ser más suave la aproximación aportada por éste último, se define como el más preciso, viéndose así reducido el error cometido al cuantificar el total de la superficie que comprende la brecha.

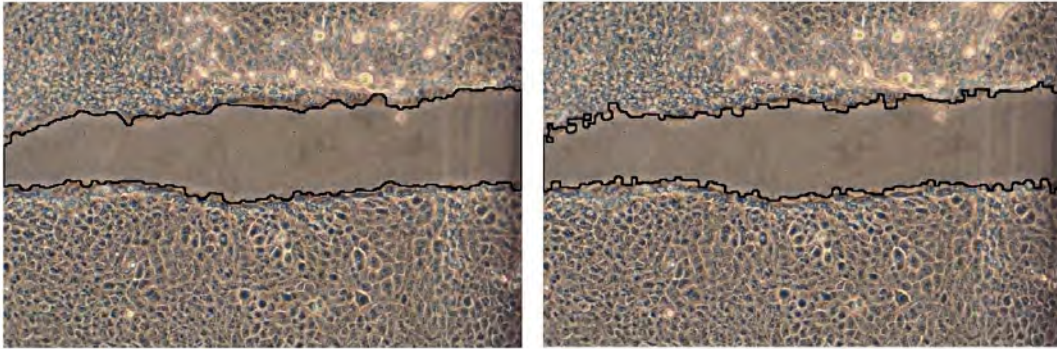


Figura 6.10: A la izquierda, *output* del algoritmo empírico. A la derecha, *output* del algoritmo de segmentación por textura.

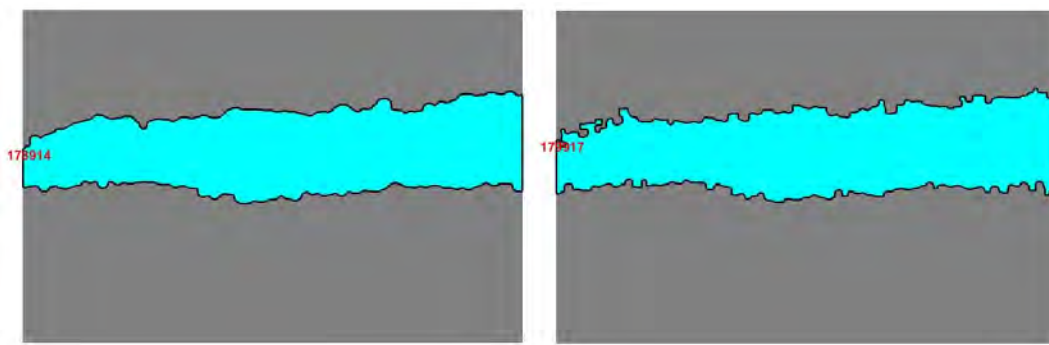


Figura 6.11: A la izquierda, *output* del algoritmo empírico. A la derecha, *output* del algoritmo de segmentación por textura.

Capítulo 7

Diseño y desarrollo de interfaces gráficas de usuario

En este capítulo se hablará de interfaces gráficas de usuario, también conocidas como GUI (Graphical User Interface) [14]. Son entornos visuales con los que el usuario interactúa y mediante los cuales se comunica con el sistema operativo de una máquina.

7.1. Importancia de la etapa de diseño

Cuando se comienza a diseñar una interfaz de usuario, es necesario conocer cuáles son las necesidades que han de ser cubiertas por la misma. El usuario final será el encargado de comunicar esta información al desarrollador. Esta acción se llevará a cabo en el punto de partida del proceso de desarrollo. Así mismo, el cliente deberá notificar las modificaciones que precise o que vayan originándose sobre la marcha.

El programador tendrá que conocer con antelación el tipo de datos o variables con las que trabajará la interfaz, e intentará que ésta cubra el total de las necesidades y el máximo de excepciones que puedan darse.

El usuario final especificará cómo quiere que se representen los datos (en gráficos, en tablas,...) y establecerá cómo han de presentarse los resultados y dónde y en qué formato han de almacenarse.

La fase de diseño es esencial a la hora de desarrollar interfaces gráficas de usuario. Ahorrará muchísimo tiempo al programador tener las ideas claras y se evitarán malentendidos con el cliente final. Para ello puede ser muy útil realizar un boceto de la misma antes de sentarse frente al ordenador. Es importante que el desarrollador sepa quién hará uso de la interfaz y la adapte al máximo a los requisitos que se exigen, pues presentar abundante información o añadir elementos innecesarios solamente la transformará en algo difícil de manejar y poco útil. [5]

7.2. GUI en MATLAB

MATLAB ofrece nuevamente una solución muy completa, en esta ocasión destinada a la creación de interfaces gráficas de usuario. [8]

GUIDE (entorno de desarrollo de GUI), proporciona herramientas para diseñar de manera sencilla interfaces de usuario para aplicaciones personalizadas. Mediante el editor de diseño que proporciona, se pueden incluir controles tales como menús, barras de herramientas, barras deslizantes y/o botones, además de cuadros de texto editables, entre otros. GUIDE genera entonces de manera automática el código de MATLAB necesario para construir la interfaz, el cual puede ser modificado en cualquier momento para programar el comportamiento de la misma.

Para iniciar un proyecto, se tecleará en la ventana de comandos de MATLAB la instrucción:

```
>> guide
```

Seguidamente, se abrirá un cuadro de diálogo como el de la figura 7.1, donde se muestran algunas plantillas prediseñadas:

- **Blank GUI (Default)**
- **GUI with Uicontrols**
- **GUI with Axes and Menu**
- **Modal Question Dialog**

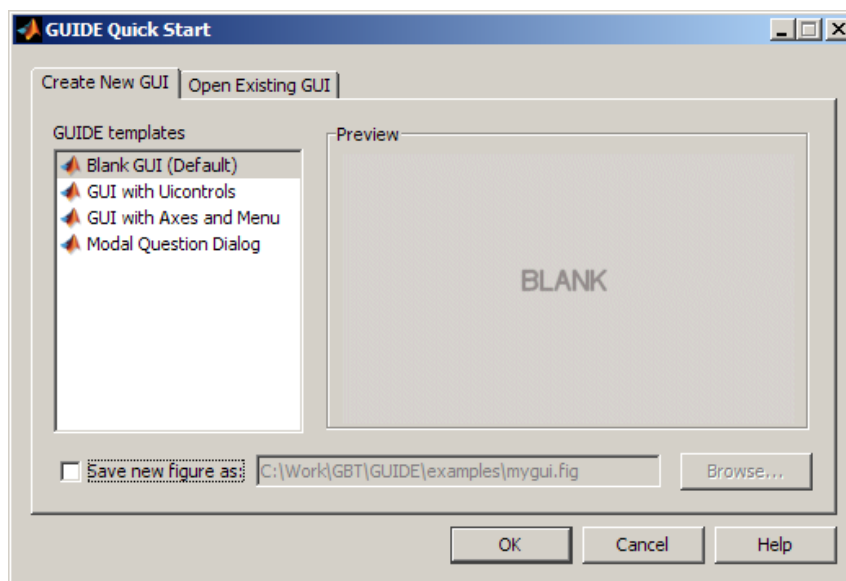


Figura 7.1: Cuadro de diálogo con las plantillas GUI prediseñadas.

Por defecto, se seleccionará la primera de las plantillas, abriéndose un entorno de diseño virgen, donde el programador podrá comenzar a añadir controles para crear la aplicación deseada (Figura 7.2).

Tras haber colocado cualquier elemento sobre el área de diseño, ha de ser programada su funcionalidad. Esto se realiza desde el *Callback* que tenga asociado, que se encuentra en el archivo de extensión `.m` ligado a la interfaz.

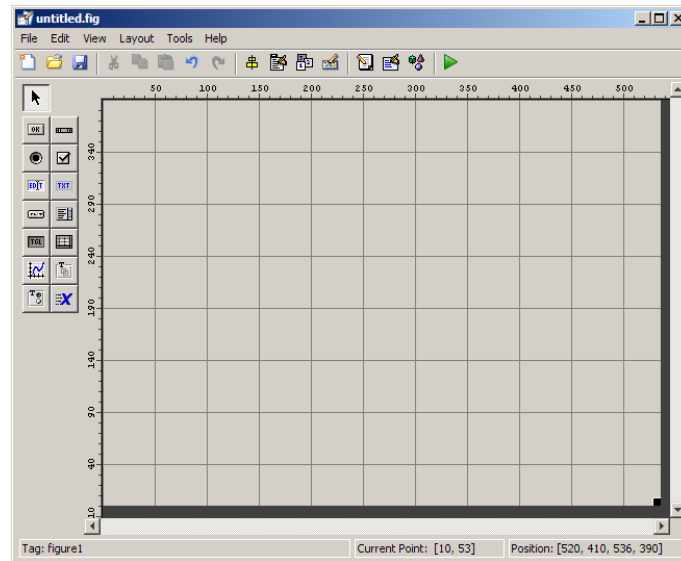


Figura 7.2: Entorno de diseño de GUI.

En el recuadro siguiente se muestra el *Callback* de un botón perteneciente a una interfaz gráfica de usuario.

```

%— Executes on button press in pushbutton2.
function pushbutton2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pushbutton2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
global listaImagenesC;
    figure; imshow(Algoritmo1(listaImagenesC{1}));

```

En el siguiente capítulo, se analizará detalladamente el funcionamiento de la interfaz desarrollada con la que se ha intentado cubrir las necesidades del Laboratorio de investigación del Hospital Ramón y Cajal.

Capítulo 8

Interfaz de aplicación biomédica. Funcionamiento

En este capítulo se mostrará la apariencia y el funcionamiento de la interfaz desarrollada para realizar el procesamiento de imágenes de microscopía.

8.1. Necesidades cubiertas por la aplicación

A la hora de diseñar la aplicación biomédica que trata las microfotografías, se realizó un estudio de las necesidades que ésta debía cubrir. Se enumeran a continuación los requisitos que cumple:

- Solicitar al usuario el directorio o carpeta de imágenes a procesar.
- Procesar automáticamente las microfotografías con uno de los dos algoritmos desarrollados.
- Posibilidad de intercambiar, de manera sencilla, el algoritmo seleccionado para el procesamiento.
- Mostrar las microfotografías procesadas y en orden de captura.
- Mostrar, para cada imagen, el área de la brecha en micrómetros.
- Mostrar, para cada imagen, el porcentaje de brecha (tomando como el cien por cien el tamaño completo de una imagen).
- Mostrar, en micrómetros, la diferencia de área entre dos tiempos.
- Mostrar el porcentaje de cicatrización dado entre dos tiempos.
- Posibilidad de ampliar cualquier imagen procesada mediante un botón de ZOOM.
- Crear una hoja de cálculo Excel que almacene los resultados numéricos (área y porcentaje de brecha de cada imagen).
- Disponer de un botón que permita modificar una columna del documento Excel en función de la validez de una imagen.
- Uso fácil e intuitivo.

8.2. Funcionamiento paso a paso

A continuación, se muestra cómo funciona la interfaz. Para ello, se pondrá un ejemplo procesando una carpeta de doce imágenes cedida por el Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Ramón y Cajal.

Antes de comenzar a detallar el funcionamiento, es conveniente saber cómo están organizadas las microfotografías realizadas. Éstas se encuentran ordenadas en seis subcarpetas. La carpeta que contiene estas subcarpetas, se llama 'XC' o 'XT', donde X representa el número de experimento (1,2,3,...), C se asocia con experimentos Control y T con experimentos Tratado. Por lo que siempre existirá una carpeta de control por cada una de tratado (y viceversa). Por ejemplo, se tendrán las carpetas 1C y 1T, o bien 2C y 2T, etc.

Así mismo, las seis subcarpetas serán nombradas como PUNTO 1, PUNTO 2, PUNTO 3,...PUNTO 6, por lo explicado en el capítulo cuatro. El número de imágenes que contengan estas subcarpetas dependerá de la duración del experimento, habiendo como mínimo dos imágenes por carpeta y como máximo tres.

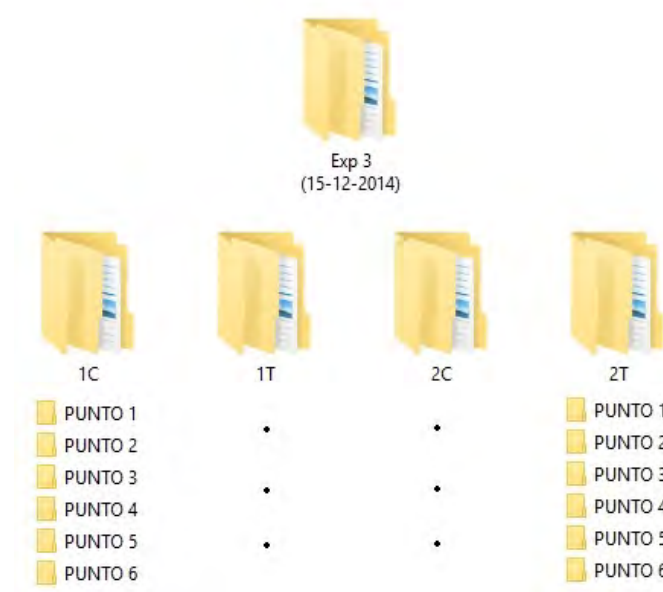


Figura 8.1: Árbol genealógico de carpetas.

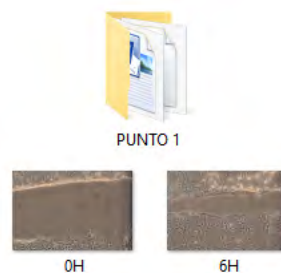


Figura 8.2: Contenido de la carpeta PUNTO 1.

Sabiendo esto, se dará paso a enumerar las indicaciones a seguir para procesar una carpeta de imágenes.

1. Abrir la interfaz

Para comenzar, se tecleará la siguiente instrucción en la ventana de comandos de MATLAB:

```
>> ventana_HELEN
```

Tras pulsar INTRO, se abrirá la interfaz, que muestra la siguiente apariencia:



Figura 8.3: Interfaz de la aplicación biomédica.

2. Seleccionar la carpeta de imágenes a procesar

Para seleccionar el directorio de microfotografías, se pulsará el botón amarillo situado a la derecha del cuadro de texto que se indica (Figura 8.4). Se abrirá una ventana para explorar y buscar la carpeta correspondiente (Figura 8.5).

3. Pulsar el botón OK

Una vez seleccionada la carpeta de imágenes, debemos asegurar que se ha leído correctamente el número de imágenes que contiene (Figura 8.6). De ser así, se presionará el botón de 'OK' que se encuentra justo al lado del contador (Figura 8.7). En caso contrario, se ha de volver a repetir el paso 2.

4. Análisis visual de las imágenes y los valores numéricos

Tras esperar unos segundos, las microfotografías procesadas se visualizan. Así mismo, se advierte, debajo de cada una, a la izquierda el área de la brecha en micrómetros y a la derecha el porcentaje que ocupa la misma sobre la imagen (Figura 8.8).

Entre las imágenes a cero horas y las imágenes a seis horas, se muestran también las diferencias entre los valores anteriores. En primer lugar se indica la diferencia entre áreas, y debajo, la diferencia entre porcentajes (Figura 8.9).

En este caso, la lectura de los valores se realizaría de la siguiente manera: "Para el punto 1, al inicio del experimento, la brecha tenía un área de 22668.7

micrómetros cuadrados y ocupaba un 66.08 % de la imagen. Para el mismo punto, transcurridas seis horas, la brecha mide ahora 8041.11 micrómetros cuadrados y ocupa un 23.44 % de la imagen. En seis horas, la brecha ha cerrado 14627.6 micrómetros cuadrados y en total ha cicatrizado un 42.64 %." Para el resto de puntos se realizaría de la misma manera.

5. Botón ZOOM

Si se desea, se puede ampliar cualquier imagen pulsando el botón de ZOOM que se encuentra debajo de cada instantánea. El resultado tras activarlo es el siguiente (Figura 8.10).

6. Botón NO

Este botón sirve para seleccionar la validez de las imágenes; por defecto, todas son válidas. Será el usuario el que decida si existe una o varias microfotografías que han de ser descartadas por la imposibilidad de realizar mediciones en ellas. Para ello se ha de pulsar este marcador (Figura 8.11). En el documento Excel generado, se verá reflejada dicha selección al aparecer en la última columna la palabra 'FALSO'.

7. Validación de los resultados

Una vez examinados los resultados, se validarán utilizando el botón rojo que se encuentra en la parte superior derecha de la interfaz (Figura 8.12).

Automáticamente se generará un documento Excel en el directorio de imágenes procesado (Figura 8.13). Los datos mostrados en la hoja de cálculo son el área y el porcentaje de brecha para cada imagen y también habrá una columna en la que se indica 'VERDADERO/FALSO', que clasifica a las imágenes de válidas o inválidas para el estudio de investigación.

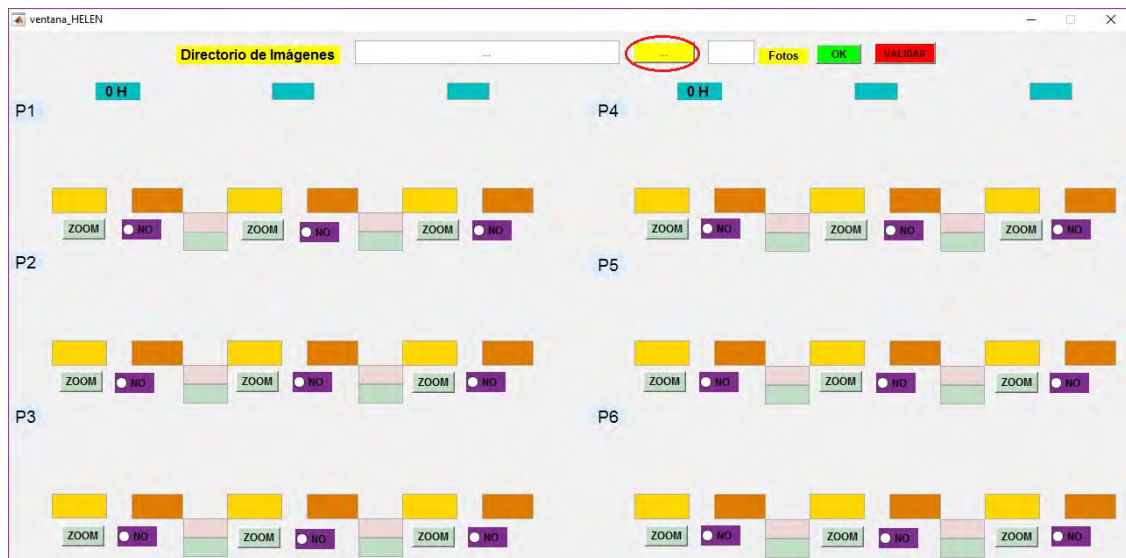


Figura 8.4: Interfaz de la aplicación biomédica.

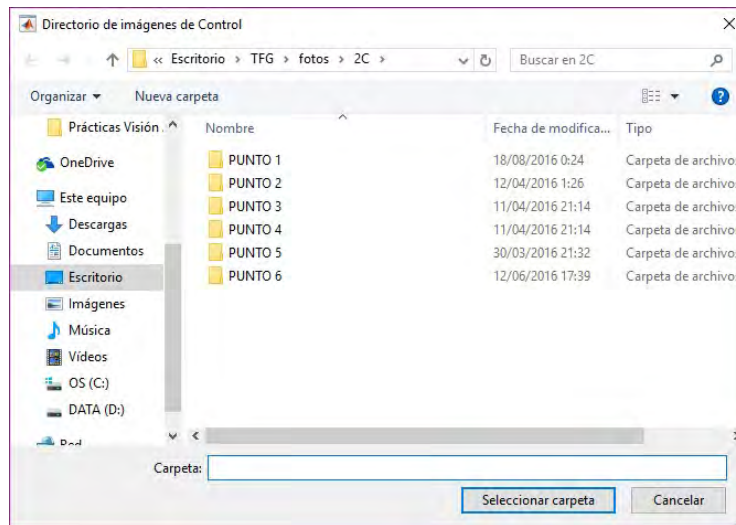


Figura 8.5: Interfaz de la aplicación biomédica.

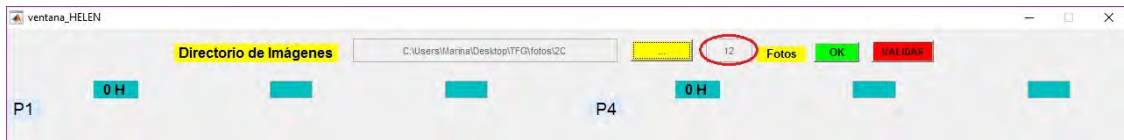


Figura 8.6: Interfaz de la aplicación biomédica.

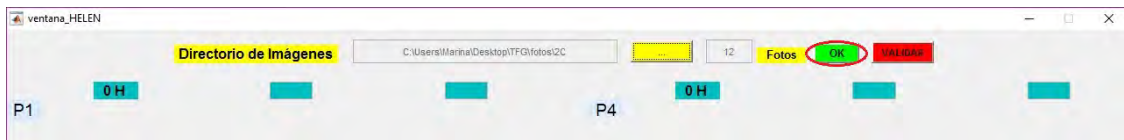


Figura 8.7: Interfaz de la aplicación biomédica.

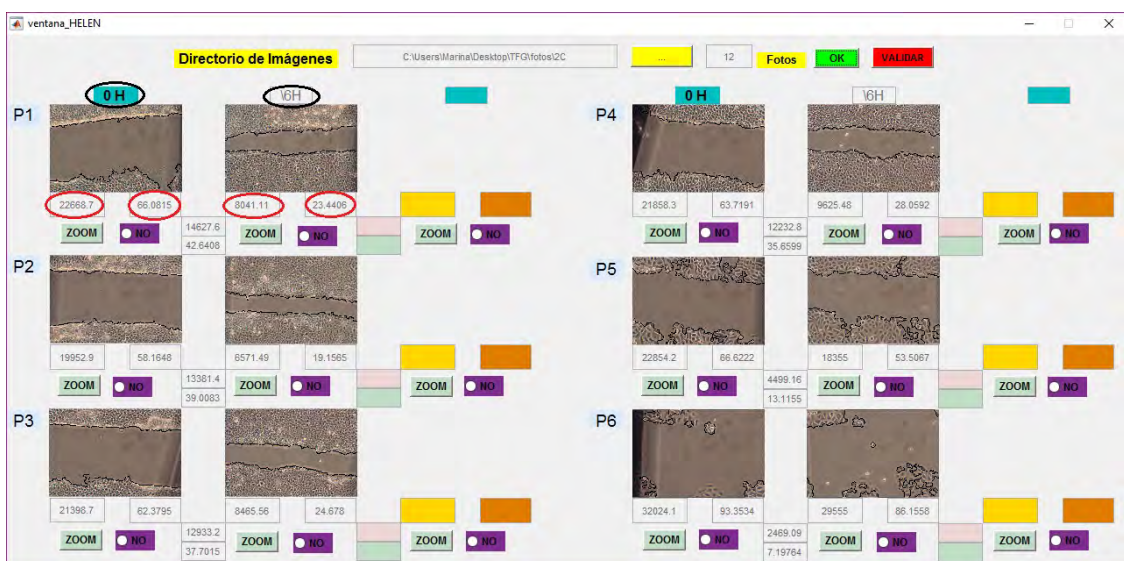


Figura 8.8: Interfaz de la aplicación biomédica.

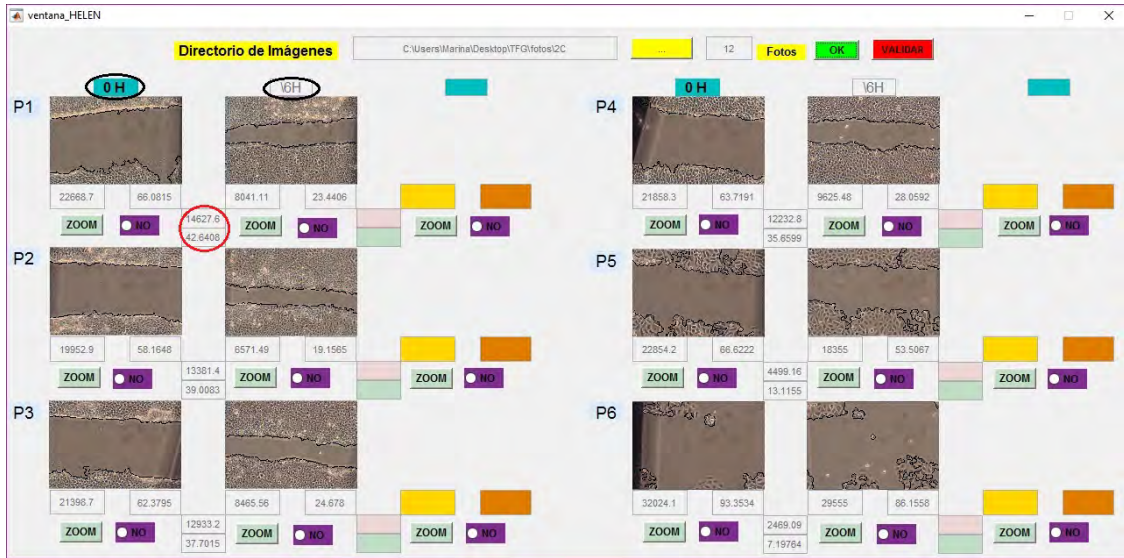


Figura 8.9: Interfaz de la aplicación biomédica.

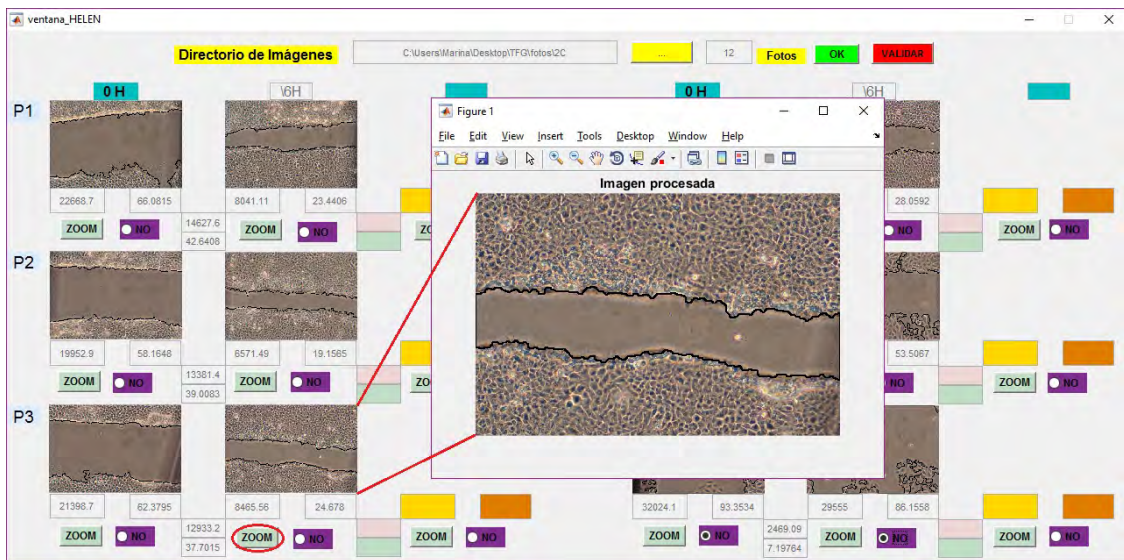


Figura 8.10: Interfaz de la aplicación biomédica.

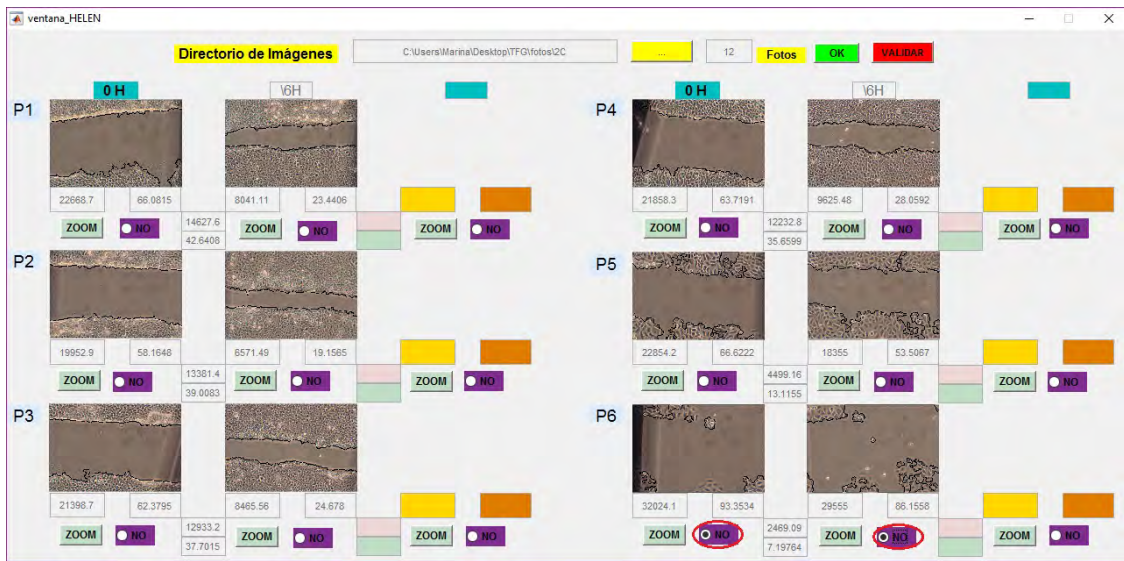


Figura 8.11: Interfaz de la aplicación biomédica.

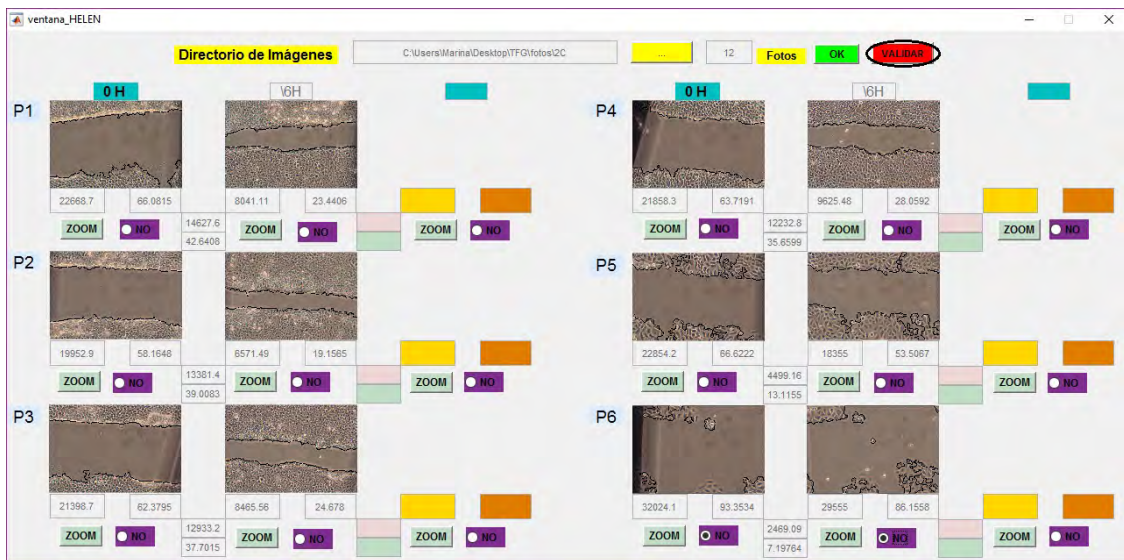
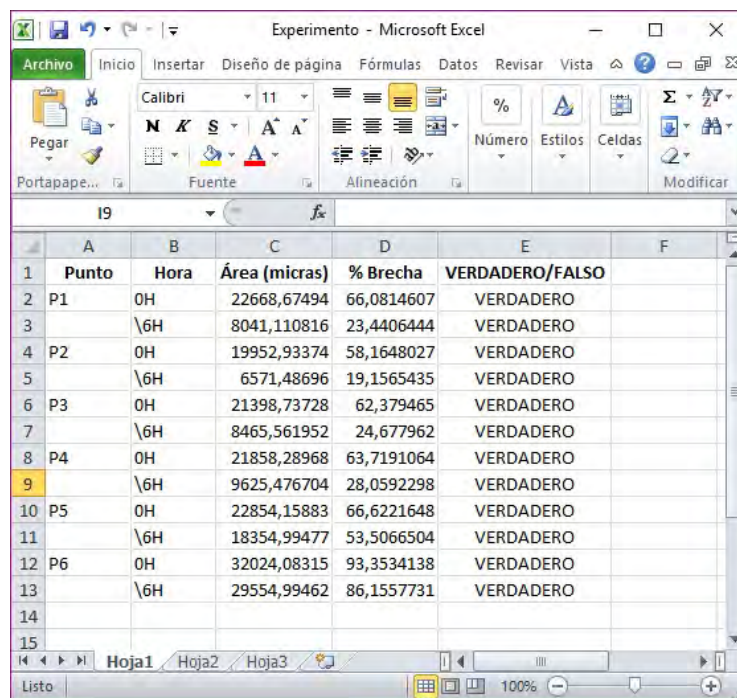


Figura 8.12: Interfaz de la aplicación biomédica.



Experimento - Microsoft Excel

Archivo Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista

Calibri 11 Fuente Alineación Número Estilos Celdas Modificar

	A	B	C	D	E	F
1	Punto	Hora	Área (micras)	% Brecha	VERDADERO/FALSO	
2	P1	0H	22668,67494	66,0814607	VERDADERO	
3		\6H	8041,110816	23,4406444	VERDADERO	
4	P2	0H	19952,93374	58,1648027	VERDADERO	
5		\6H	6571,48696	19,1565435	VERDADERO	
6	P3	0H	21398,73728	62,379465	VERDADERO	
7		\6H	8465,561952	24,677962	VERDADERO	
8	P4	0H	21858,28968	63,7191064	VERDADERO	
9		\6H	9625,476704	28,0592298	VERDADERO	
10	P5	0H	22854,15883	66,6221648	VERDADERO	
11		\6H	18354,99477	53,5066504	VERDADERO	
12	P6	0H	32024,08315	93,3534138	VERDADERO	
13		\6H	29554,99462	86,1557731	VERDADERO	
14						
15						

Hoja1 Hoja2 Hoja3

Listo 100%

Figura 8.13: Apariencia del Excel creado por la aplicación.

Capítulo 9

Herramientas y técnica para el análisis estadístico de datos

En este capítulo, se hablará sobre las herramientas y la técnica estadística empleadas para el análisis de los resultados numéricos proporcionados por la aplicación biomédica descrita anteriormente.

9.1. Herramientas de análisis

Actualmente, existen diversidad de programas para llevar a cabo análisis estadísticos. En este caso, se tratarán dos de ellos; el empleado en el Servicio de Bioelectromagnetismo para establecer los resultados de la investigación y el utilizado para concluir el proyecto de ingeniería aquí documentado.

9.1.1. GraphPad Prism

Disponible para ordenadores Windows y Mac, GraphPad Prism es una aplicación desarrollada para procesar tablas de datos y crear gráficos científicos. [21]



Figura 9.1: Logotipo de GraphPad Prism.

En un principio, esta aplicación fue desarrollada para biólogos experimentales que formaban parte de escuelas de medicina y/o compañías farmacéuticas. Con el paso del tiempo, su uso se ha extendido a otros sectores y actualmente es utilizada por todo tipo de biólogos, así como en ciencias sociales y físicas. A día de hoy, más de doscientos mil científicos de todo el mundo utilizan esta herramienta para analizar sus datos y dibujar gráficamente sus resultados.

Prisma combina bioestadística, ajustes de curvas y herramientas gráficas en un único programa y cubre la totalidad de las necesidades de manejo de datos de los investigadores de laboratorio. Así mismo, permite que los gráficos sean personalizables y que estos puedan ser exportados como archivos de alta resolución para

presentarlos en publicaciones.

Si por algo destaca esta herramienta es por su simplicidad de uso. A pesar de ello, no se olvida de los usuarios más exigentes, incluyendo una serie de opciones avanzadas para aquellos que desean más precisión en sus cálculos.

9.1.2. Statgraphics

Statgraphics [22] es una potente herramienta para el análisis de datos. Combina una amplia gama de procedimientos analíticos con gráficos interactivos, proporcionando rigurosos análisis estadísticos. Así mismo, presenta un interfaz muy intuitiva e incluye funciones estadísticas avanzadas. El conjunto de complementos creados está destinado a profesionales de todos los sectores.



Figura 9.2: Logotipo de Statgraphics.

La edición de 32 bits trabaja en cualquier versión de 32 o de 64 bits de Windows XP, Windows Vista, Windows 7 y Windows 8; mientras que la edición de 64 bits trabaja únicamente en las versiones de 64 bits de Windows XP, Windows Vista, Windows 7 y Windows 8.

Entre los principales aspectos del programa merecen destacarse el StatAdvisor, que da una interpretación de los resultados; StatFolio, que permite guardar y reutilizar los análisis realizados previamente; gráficos interactivos; StatGallery que permite combinar textos y gráficos en múltiples páginas y StatWizard, que guía en la selección de los datos y los análisis.

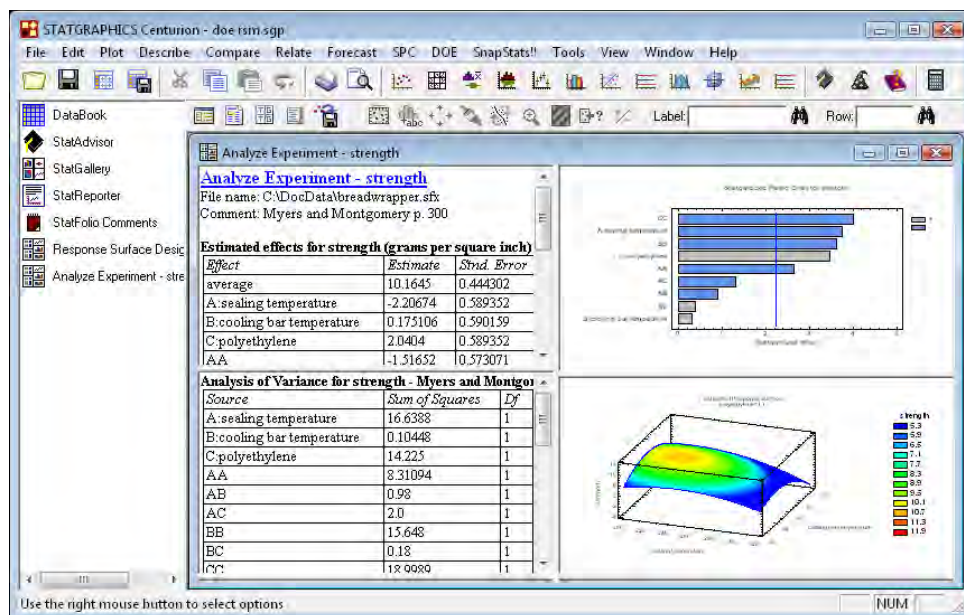


Figura 9.3: Entorno de Statgraphics.

9.2. Análisis de la Varianza

9.2.1. Introducción

El Análisis de la Varianza (ANOVA o AVAR) es uno de los procedimientos estadísticos más utilizados para el análisis de datos experimentales. Esta técnica es muy flexible y permite comprobar si un número determinado de muestras provienen o no de poblaciones con la misma media, cuando su valor ha sido constatado en diversas circunstancias o condiciones establecidas.

En resumidas cuentas, el ANOVA permite dividir la varianza de la variable dependiente en dos o más componentes, cada uno de los cuales puede ser atribuido a una fuente (variable o factor) identificable.

Por medio del análisis de la varianza de un factor se estudia el caso de muestras independientes (ANOVA Simple o ANOVA de un factor/vía). Para el caso de muestras relacionadas, se realiza el análisis de la varianza de dos o más factores (ANOVA Multifactorial o ANOVA de dos factores/vías).

Relacionando este capítulo con la técnica de análisis de datos empleada en el proyecto, se explicará a continuación el marco teórico de la ANOVA de un factor. El desarrollo del análisis estadístico utilizando este procedimiento se muestra en el siguiente capítulo. Se ha elegido el ANOVA de una vía puesto que era la manera más sencilla de representar e interpretar los distintos valores de la cicatrización en función de un único factor, denominado CT, que engloba dos niveles: control y tratado.

9.2.2. El modelo ANOVA tradicional

El modelo ANOVA tradicional tiene la siguiente expresión:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

- Y_{ij} es la variable objeto de estudio (variable dependiente).
- μ es una constante e indica la media de la variable.
- α_i es el efecto diferencial que distingue a las poblaciones.
- ε_{ij} es un término de error, considerado como variable aleatoria.

El ANOVA tradicional parte de descomponer la variación total de la muestra en dos componentes que se explican a continuación: variación entre grupos y variación intra grupos.

9.2.3. Marco teórico

El análisis de la varianza [1] permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K = \mu$$

$$H_1 : \exists \mu_j \neq \mu \quad j = 1, 2, \dots, K$$

La utilización del modelo ANOVA requiere el cumplimiento las siguientes condiciones:

- Las muestras deben tener una distribución aproximadamente normal.
- El tamaño de las muestras sobre las que se aplican los tratamientos no deben discernir en gran medida. Si se tienen grupos de muy diferente magnitud, se hará más compleja la interpretación de los resultados.
- Todas las poblaciones han de presentar igual varianza (homoscedasticidad).

Supónganse k muestras aleatorias independientes, de tamaño n , extraídas de una única población normal. A partir de ellas existen dos maneras independientes de estimar la varianza de la población σ^2 .

1. Varianza dentro de los grupos (ya que sólo contribuye a ella la varianza dentro de las muestras), varianza de error, o cuadrados medios del error.
Se calcula como la media de las k varianzas muestrales. Es un cociente: al numerador se le llama suma de cuadrados del error (cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias) y al denominador, grados de libertad, por ser los términos independientes de la suma de cuadrados. (Ver expresiones Tabla 9.1)
2. Varianza entre grupos (sólo contribuye a ella la varianza entre las distintas muestras), varianza de los tratamientos o cuadrados medios de los tratamientos.
Se calcula a partir de la varianza de las medias muestrales. También es un cociente; al numerador se le llama suma de cuadrados de los tratamientos (cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global) y al denominador, grados de libertad. (Ver expresiones Tabla 9.1)

Ambas estiman la varianza poblacional en la hipótesis de que las k muestras provengan de la misma población. El cociente de dos estimaciones independientes de la varianza de una población normal es la razón F (ver Tabla 9.1), con los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador, respectivamente. Por lo tanto, se puede contrastar dicha hipótesis utilizando este parámetro.

Si en base a esto, se rechaza la hipótesis de que se estime la misma varianza, se puede rechazar la hipótesis de que las k medias provengan de una misma población. Este rechazo, implica entonces que las medias poblacionales son distintas. En definitiva, si H_0 es cierta, es de esperar que el cociente entre ambas estimaciones sea aproximadamente igual a la unidad. De igual forma, se rechazará H_0 si dicho cociente difiere significativamente de uno.

La significancia estadística de la razón de F es mucho más fácil de juzgar por su valor de P . Si el valor de P es menor que 0.05, la hipótesis nula de medias iguales se rechaza al nivel de significancia del 5%.

Existe una tercera manera de estimar la varianza de la población, considerando las kn observaciones como una única muestra. Se le denomina varianza total. También es un cociente, al numerador se le llama suma de cuadrados total y al denominador grados de libertad.

Tabla 9.1: Expresiones para el Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Razón F
Entre grupos	$SC_{entre} = \sum_{j=1}^K n_j (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2$	$gl_{entre} = q - 1$	$CM_{entre} = \frac{SC_{entre}}{gl_{entre}}$	$F = \frac{CM_{entre}}{CM_{intra}}$
Intra grupos	$SC_{intra} = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$gl_{intra} = \sum_{j=1}^K (n_j - 1)$	$CM_{intra} = \frac{SC_{intra}}{gl_{intra}}$	
Total	$SC_{total} = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$n - 1$		

De la tabla 9.1 se conoce que: $gl_{total} = gl_{entre} + gl_{intra}$

y que: $SC_{total} = SC_{entre} + SC_{intra}$.

9.2.4. Homocedasticidad

Para que el contraste de hipótesis basado en la razón F, lo sea de la igualdad de medias, es necesario que todas las muestras provengan de una población con la misma varianza. La prueba más utilizada para contrastar si varias muestras son homocedásticas (si tienen la misma varianza) es la prueba de Bartlett, apropiada para grupos en los que es indiferente el tamaño. También está la de Cochran, aunque ésta es adecuada únicamente si el número de observaciones dentro de cada nivel es el mismo.

En caso de que las muestras no sean homocedásticas, no se podrá, en un principio, realizar el análisis de la varianza. Para solucionar esto, existen otras alternativas, como pueden ser la de Sokal y la de Rohlf.

En la práctica, si las pruebas de homocedasticidad obligan a rechazar la hipótesis nula, se prueba con alguna de estas transformaciones. En este caso, se realizaría el ANOVA con los datos transformados.

9.2.5. ANOVA de efectos fijos, aleatorios o mixtos

Se pueden distinguir tres tipos de modelos de ANOVA según sean de:

- Efectos fijos: únicamente se estudian determinados niveles de un factor.
- Efectos aleatorios: para este caso, los niveles son infinitos y se estudia una muestra de los mismos. Los resultados son aleatorios.
- Efectos mixtos: casos en los que existe uno o más factores combinando los dos tipos anteriores.

Capítulo 10

Análisis de los datos proporcionados por la aplicación biomédica

Con la finalidad de informar al lector sobre el desenlace de la investigación biomédica llevada a cabo en el Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, se desarrolla a continuación un breve análisis estadístico de los valores numéricos proporcionados por la aplicación biomédica empleada.

Con ayuda de Statgraphics, se ha aplicado el procedimiento ANOVA sobre dos conjuntos de ensayos diferentes. Uno de ellos agrupa experimentos estimulados a cincuenta microamperios por milímetro cuadrado, mientras, otro asocia los excitados a cien microamperios por milímetro cuadrado.

10.1. ANOVA Simple en Statgraphics

El procedimiento ANOVA Simple está diseñado para construir un modelo estadístico que describa el impacto de un solo factor categórico X sobre una variable dependiente Y . Se realizan estudios para determinar si existen diferencias significativas entre las medias, varianzas y/o medianas de Y para diferentes valores de X .

En Statgraphics, los datos se pueden representar de varias formas, incluyendo un gráfico múltiple de dispersión, un gráfico de medias, un gráfico ANOM y un gráfico de medianas. En este procedimiento, los datos se colocarán en dos columnas, en una la variable dependiente Y y en otra los niveles de X .

- **Variable Dependiente:** columna numérica que contiene las n observaciones de Y .
- **Factor:** columna numérica o no numérica que contiene un identificador para los niveles del factor X .
- **Selección:** selección de un subconjunto de datos.

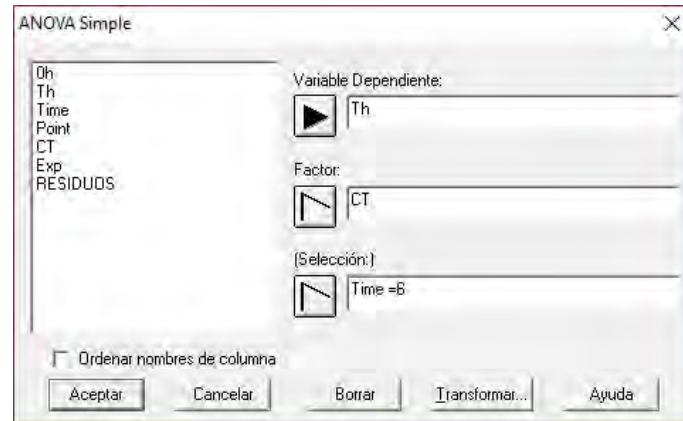


Figura 10.1: Cuadro de diálogo para el ingreso de datos en Statgraphics. (ANOVA Simple)

10.2. Experimentos estimulados a $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$

En este conjunto de ensayos, se analizan medidas tomadas en placas tratadas y placas control a los intervalos siguientes de horas: 0 horas, 4 horas y 6 horas. El número total de experimentos es diez.

10.2.1. Contraste de porcentaje de brecha a un tiempo T

Comparando los datos con un ANOVA Simple en Statgraphics, se obtiene lo siguiente.

- **Time = 0 horas**

En este procedimiento se ejecuta un análisis de varianza de un factor para 0h. Statgraphics construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de 0h para los 2 diferentes niveles de CT (C = Control, T = Tratado). La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: 0h (Porcentaje de brecha a 0h)

Factor: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Número de observaciones: 287

Número de niveles: 2

Para comparar de manera rápida y visual si existen diferencias significativas, se pueden observar dos gráficos que proporciona la herramienta: el de Dispersión por Código de Nivel y el de Caja y Bigotes.

De igual manera, se muestran la tabla ANOVA y la tabla de Medias.

La tabla ANOVA (Tabla 10.1) descompone la varianza de 0h en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,778502, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la

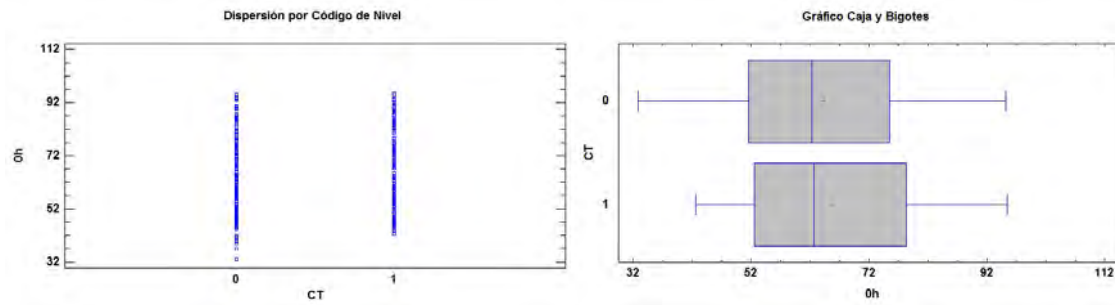


Figura 10.2: Gráficos para un tiempo de cero horas.

Tabla 10.1: Tabla ANOVA para 0h por CT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	177,19	1	177,19	0.78	0.3783
Intra grupos	64867,0	285	245,893		
Total (Corr.)	65044,2	286			

razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Th entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.2: Tabla de Medias para 0h por CT con intervalos de confianza del 95,0%

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	150	64,2681	1,23181	62.5536	65.9825
1	137	65,8412	1,28893	64.0472	67.6351
Total	287	65,019			

La tabla 10.2 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

■ Time = 4 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Th. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Th para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: Th (Porcentaje de brecha a Th)

Factor: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 4

Número de observaciones: 164

Número de niveles: 2

Para comparar de manera rápida y visual si existen diferencias significativas, se pueden observar dos gráficos que proporciona la herramienta: el de Dispersión por Código de Nivel y el de Caja y Bigotes.

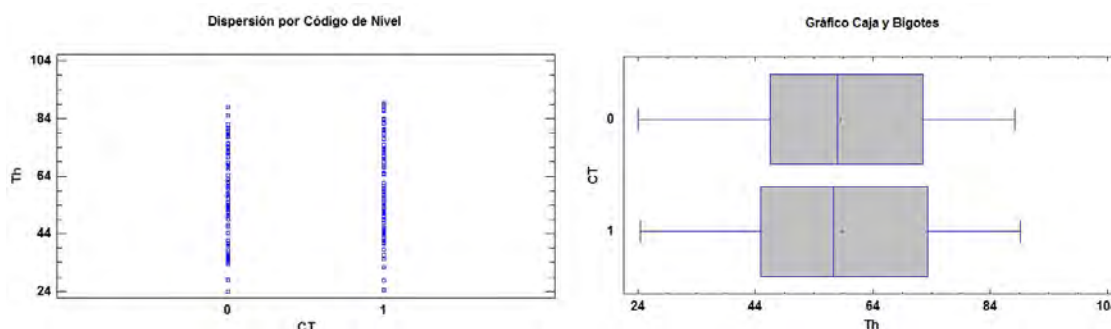


Figura 10.3: Gráficos para un tiempo de cuatro horas.

De igual manera, se muestran la tabla ANOVA y la tabla de Medias.

Tabla 10.3: Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 4)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,72502	1	2,72502	0.01	0.9200
Intra grupos	43582,2	162	269.026		
Total (Corr.)	43585,0	163			

La tabla ANOVA (Tabla 10.3) descompone la varianza de Th en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,0101292, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Th entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.4: Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 4)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	78	58,5223	1.85716	55.9291	61.1155
1	86	58,7804	1.76868	56.3108	61.2501
Total	164	58,6577			

La tabla 10.4 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

■ Time = 6 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Th. Construye varias pruebas y gráficos para comparar los valores medios de Th para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si

hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: Th (Porcentaje de brecha a Th)

Factor: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 6

Número de observaciones: 69

Número de niveles: 2

Para comparar de manera rápida y visual si existen diferencias significativas, se pueden observar dos gráficos que proporciona la herramienta: el de Dispersión por Código de Nivel y el de Caja y Bigotes.

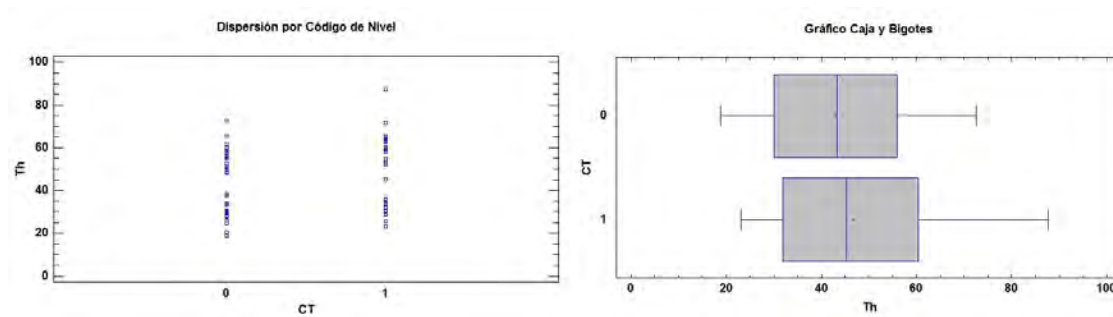


Figura 10.4: Gráficos para un tiempo de seis horas.

De igual manera, se muestran la tabla ANOVA y la tabla de Medias.

Tabla 10.5: Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 6)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	232,043	1	232,043	0.94	0.3348
Intra grupos	16474,8	67	245,893		
Total (Corr.)	16706,9	68			

La tabla ANOVA (Tabla 10.5) descompone la varianza de Th en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,943675, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Th entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla 10.6 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Tabla 10.6: Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 6)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	36	42,9921	2,61349	39.3035	46.6808
1	33	46,6633	2,72971	42.8106	50.516
Total	69	44,7479			

10.2.2. Contraste de porcentaje de cicatrización a un tiempo T

Comparando los datos con un ANOVA Multifactorial en Statgraphics, se obtiene lo siguiente.

■ Time = 4 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para $(0h-Th)/0h*100$. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de $(0h-Th)/0h*100$ para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: $(0h-Th)/0h*100$

Factores: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 4

Número de observaciones: 164

Número de niveles: 2

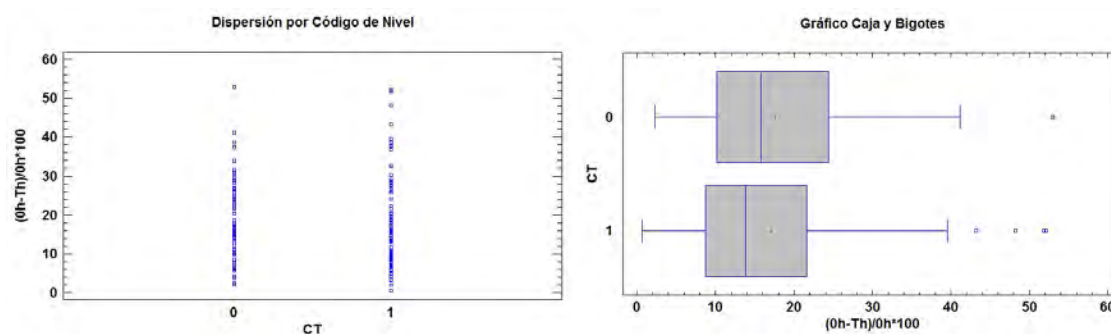


Figura 10.5: Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en cuatro horas.

Tabla 10.7: Tabla ANOVA para $(0h-Th)/0h*100$ por CT (Time = 4)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10.3426	1	10.3426	0.09	0.7672
Intra grupos	19049.5	162	117.589		
Total (corregido)	19059.8	163			

La tabla ANOVA (Tabla 10.7) descompone la varianza de $(0h-Th)/0h*100$ en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,0879549, es el cociente entre

el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.8: Tabla de Medias para $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 4)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	78	17.5711	1.22783	15.8566	19.2855
1	86	17.0682	1.16932	15.4355	18.701
Total	164	17.3074			

La tabla 10.8 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

■ Time = 6 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$

Factores: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 6

Número de observaciones: 69

Número de niveles: 2

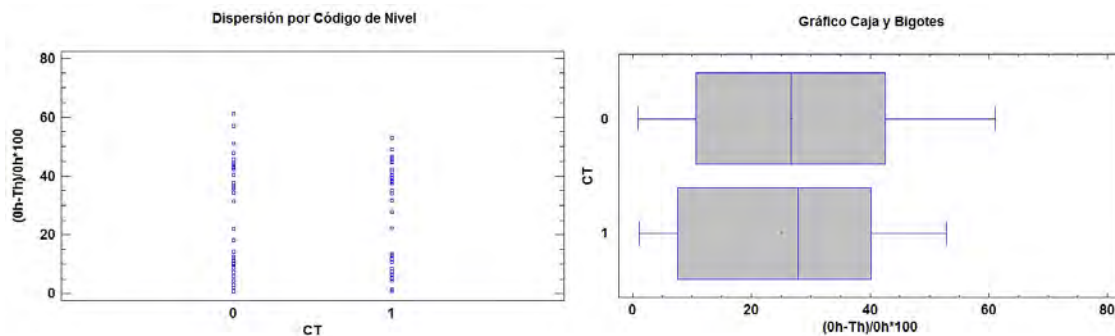


Figura 10.6: Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en seis horas.

La tabla ANOVA (Tabla 10.9) descompone la varianza de $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,132867, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente

Tabla 10.9: Tabla ANOVA para $(0h-Th)/0h*100$ por CT (Time = 6)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41.4634	1	41.4634	0.13	0.7166
Intra grupos	20908.5	67	312.068		
Total (corregido)	20950.0	68			

significativa entre la media de $(0h-Th)/0h*100$ entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.10: Tabla de Medias para $(0h-Th)/0h*100$ por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 6)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	36	26.6193	2.94424	22.4638	30.7748
1	33	25.0674	3.07516	20.7272	29.4077
Total	69	25.8771			

La tabla 10.10 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

10.3. Experimentos estimulados a $100 \mu A/mm^2$

En este conjunto de ensayos, se analizan medidas tomadas en placas tratado y placas control a los intervalos siguientes de horas: 0 horas y 6 horas. El número total de experimentos es ocho.

10.3.1. Contraste de porcentaje de brecha a un tiempo T

Comparando los datos con un ANOVA Simple en Statgraphics, se obtiene lo siguiente.

- **Time = 0 horas**

En este procedimiento se ejecuta un análisis de varianza de un factor para 0h. Statgraphics construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de 0h para los 2 diferentes niveles de CT (C = Control, T = Tratado). La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: 0h (Porcentaje de brecha a 0h)

Factor: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Número de observaciones: 209

Número de niveles: 2

Para comparar de manera rápida y visual si existen diferencias significativas, se pueden observar dos gráficos que proporciona la herramienta: el de Dispersión por Código de Nivel y el de Caja y Bigotes.

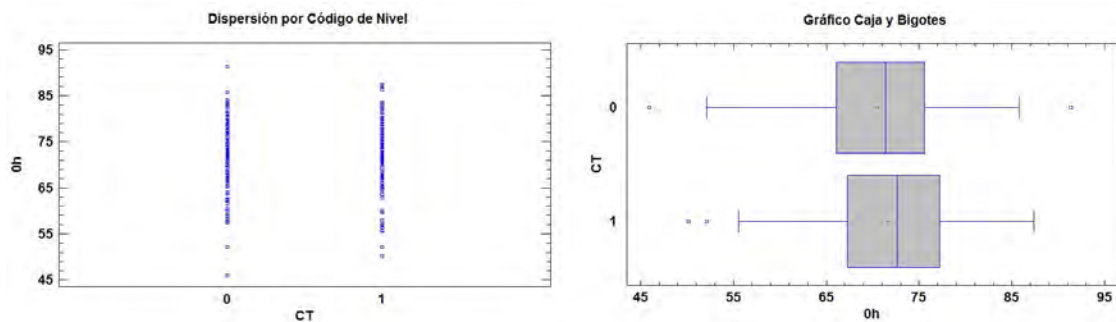


Figura 10.7: Gráficos para un tiempo de cero horas.

De igual manera, se muestran la tabla ANOVA y la tabla de Medias.

Tabla 10.11: Tabla ANOVA para 0h por CT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	57.6779	1	57.6779	0.92	0.3378
Intra grupos	12936.2	207	62.4935		
Total (Corr.)	12993.8	208			

La tabla ANOVA (Tabla 10.11) descompone la varianza de 0h en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,922942, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Th entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.12: Tabla de Medias para 0h por CT con intervalos de confianza del 95,0%

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	106	70.6455	0.767829	69.5751	71.7159
1	103	71.6963	0.778931	70.6104	72.7822
Total	209	71.1634			

La tabla 10.12 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

■ Time = 6 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Th. Construye varias pruebas y gráficos para comparar los valores medios de Th para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si

hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: Th (Porcentaje de brecha a Th)

Factor: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 6

Número de observaciones: 209

Número de niveles: 2

Para comparar de manera rápida y visual si existen diferencias significativas, se pueden observar dos gráficos que proporciona la herramienta: el de Dispersión por Código de Nivel y el de Caja y Bigotes.

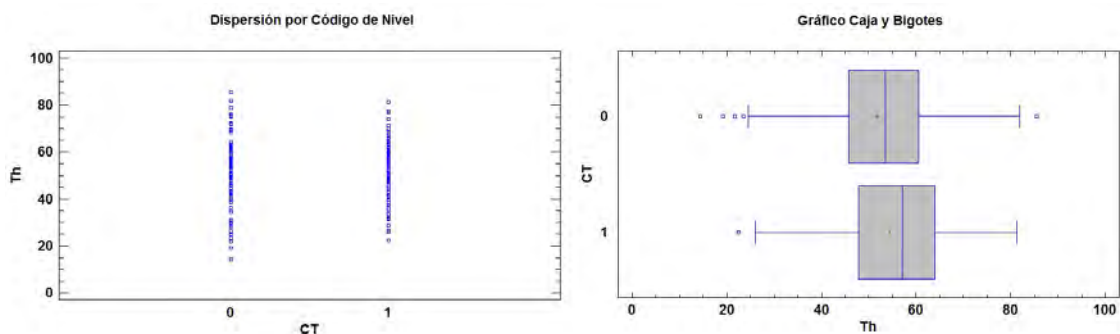


Figura 10.8: Gráficos para un tiempo de seis horas.

De igual manera, se muestran la tabla ANOVA y la tabla de Medias.

Tabla 10.13: Tabla ANOVA para Th por CT (Time = 6)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	407,225	1	407,225	2.24	0.1362
Intra grupos	37661.9	207	181.942		
Total (Corr.)	38069.2	208			

La tabla ANOVA (Tabla 10.13) descompone la varianza de Th en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2,23821, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Th entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla 10.14 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Tabla 10.14: Tabla de Medias para Th por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 6)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	106	51.6756	1.31013	49.8492	53.502
1	103	54.4676	1.32907	52.6148	56.3204
Total	209	53.0516			

10.3.2. Contraste de porcentaje de cicatrización a un tiempo T

Comparando los datos con un ANOVA Multifactorial en Statgraphics, se obtiene lo siguiente.

■ Time = 6 horas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ para los 2 diferentes niveles de CT. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Variable dependiente: $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$

Factores: CT (C = Control = 0, T = Tratado = 1)

Selección de la Variable: Time = 6

Número de observaciones: 209

Número de niveles: 2

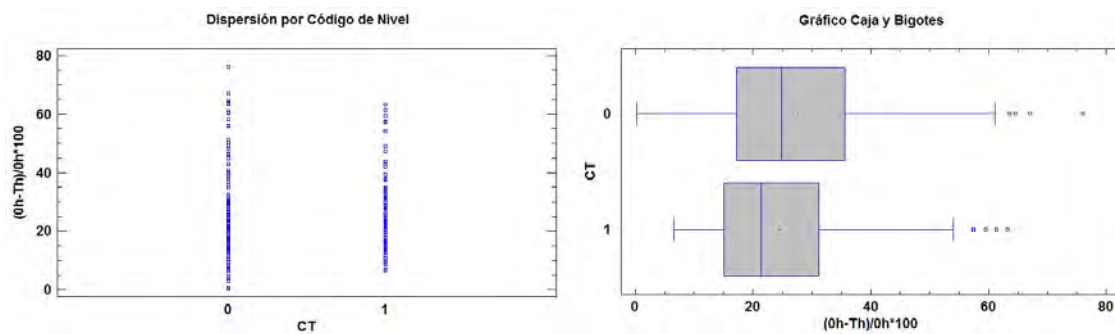


Figura 10.9: Gráficos para la estimación del porcentaje de cierre en seis horas.

Tabla 10.15: Tabla ANOVA para $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ por CT (Time = 6)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	510.401	1	510.401	2.37	0.1252
Intra grupos	44579.8	207	215.361		
Total (corregido)	45090.2	208			

La tabla ANOVA (Tabla 10.15) descompone la varianza de $(0\text{h-Th})/0\text{h} \cdot 100$ en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2,36998, es el cociente entre

el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de $(0h-Th)/0h*100$ entre un nivel de CT y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.16: Tabla de Medias para $(0h-Th)/0h*100$ por CT con intervalos de confianza del 95,0% (Time = 6)

CT	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
0	106	27.6468	1.42538	25.6597	29.6338
1	103	24.521	1.44599	22.5052	26.5368
Total	209	26.1063			

La tabla 10.16 muestra la media de Th para cada nivel de CT. También muestra el error estándar de cada media y un intervalo alrededor de la misma. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Capítulo 11

Resultados y discusión

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos del proyecto de ingeniería. Del mismo modo, se muestran los que son fruto del análisis estadístico de los valores proporcionados por la aplicación desarrollada, tratando así de concluir también el estudio de investigación.

11.1. Resultados del proyecto de ingeniería

El resultado principal fruto de este proyecto ha sido lograr la automatización de una etapa perteneciente a un experimento de investigación.

Con ello, se ha conseguido implementar un método de medida eficaz, objetivo y muy útil permitiendo al personal de investigación disponer de una herramienta intuitiva y de fácil uso para utilizar en su proyecto. Como consecuencia, se tiene además un importante ahorro de tiempo, pudiendo procesar y analizar una cantidad determinada de microfotografías en pocos minutos.

Cabe destacar, que desde que la aplicación biomédica fue instalada, su funcionamiento está siendo puesto a prueba prácticamente a diario. Por el momento, no han sido registrados graves fallos y opera de forma normal.

En definitiva, se puede afirmar que se ha puesto solución a la problemática presentada en un principio y que los resultados obtenidos de este proyecto son muy satisfactorios.

En el anexo B de este documento, queda referenciada la aplicación software diseñada *ad hoc* para el procesamiento de imágenes de microscopía obtenidas en la investigación que se lleva a cabo.

11.1.1. Relación rendimiento - calidad de las microfotografías

Es importante destacar que los algoritmos desarrollados, aun presentando un elevado rendimiento y un alto índice de eficacia a la hora de segmentar las microfotografías, pueden fallar en ocasiones excepcionales.

El funcionamiento de los algoritmos dependerá en todo momento de la calidad de las imágenes de microscopía. A pesar de que éstos están adaptados e intentan corregir algunas deficiencias, es probable que la segmentación no sea cien por cien correcta si la imagen presenta manchas o la iluminación no está homogéneamente distribuida. Por ello, en estas situaciones se suele hacer bastante hincapié en que la etapa previa al procesamiento, la realización de las capturas, ha de ser realizada prestando especial atención. De esta manera, podrá sacarse el máximo partido a los algoritmos desarrollados.

En las figuras 9.1 y 9.2 se evidencia un ejemplo de mal funcionamiento de ambos algoritmos. Como se puede observar, en la zona oscura de la imagen, el algoritmo comete errores al bordear la brecha.

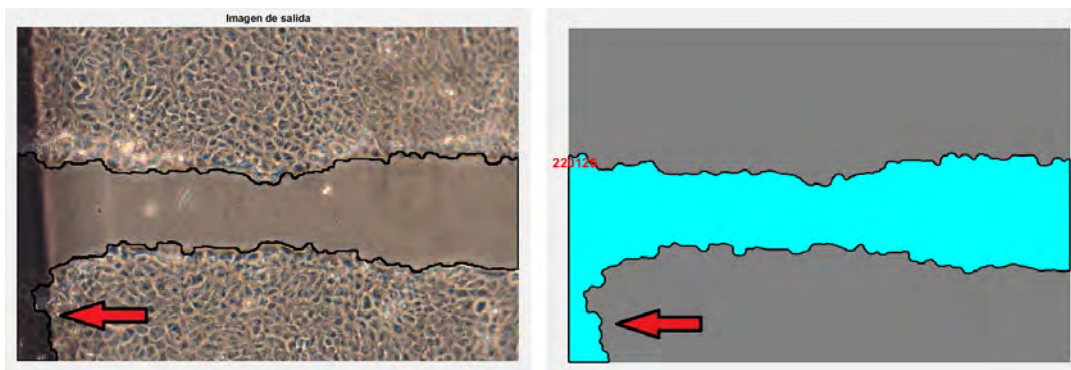


Figura 11.1: Ejemplo de procesamiento incorrecto (Algoritmo empírico).

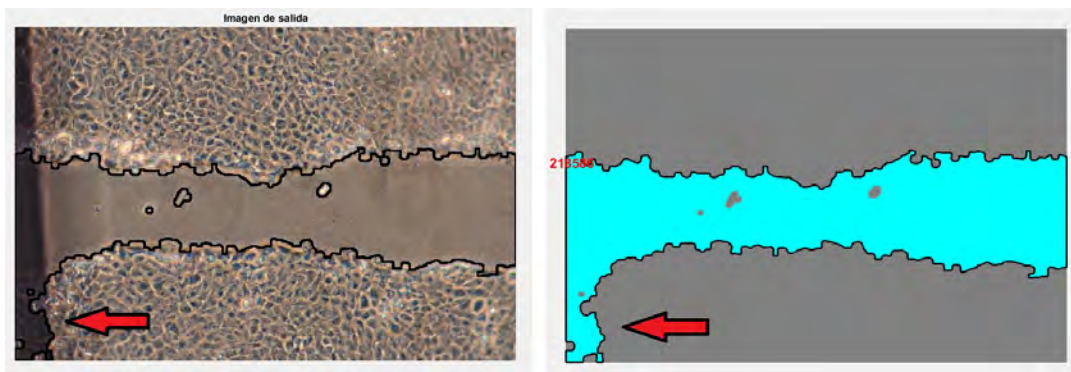


Figura 11.2: Ejemplo de procesamiento incorrecto (Algoritmo por texturas).

11.2. Resultados del proyecto biomédico

En base al análisis estadístico de los resultados obtenidos con la aplicación biomédica resumidos en el capítulo anterior, se puede concluir que, en general, no existen evidencias de diferencias significativas al comparar los experimentos control con los tratados.

Es importante destacar, que a pesar de no haber encontrado disparidad, si aparece una posible tendencia a que existan diferencias significativas en los experimentos

estimulados a $100 \mu\text{A}/\text{mm}^2$. Se ha de tener en cuenta, que a partir de esta intensidad por unidad de superficie, la temperatura aumenta y las células sufren hipertermia. En la tabla 11.1 se recopilan algunos valores estadísticos con los que queda reflejado lo dicho anteriormente.

Tabla 11.1: Tabla de parámetros para los experimentos realizados a seis horas.

Variable dependiente	$\mu\text{A}/\text{mm}^2$	Razón-F	Valor-P
Porcentaje de brecha	50	0.94	0.3348
Porcentaje de cicatrización	50	0.13	0.7166
Porcentaje de brecha	100	2.24	0.1362
Porcentaje de cicatrización	100	2.37	0.1252

Estos resultados son analizados en mayor profundidad por el equipo investigador en el anexo A.

Capítulo 12

Gestión del proyecto

En este capítulo se resume la gestión que ha tenido este proyecto.

12.1. Ciclo de vida

El proyecto de automatización del proceso de medida de brecha para el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, ha tenido una duración aproximada de seis meses, dando comienzo en enero de 2016 y finalizando en junio de ese mismo año.

Las diferentes fases por las que ha pasado se detallan a continuación.

1. Conocimiento y definición de la problemática existente

En esta primera fase, se trató de comprender a fondo la problemática existente. Para ello fueron necesarias diversas visitas al Servicio de Bioelectromagnetismo, donde se pusieron en contacto ingenieros y personal de laboratorio.

2. Análisis de imágenes

Más tarde, una vez comprendida la problemática, las microfotografías fueron cedidas por el Hospital para comenzar el análisis visual de las mismas. Así mismo, se siguió de cerca el proceso de realización de varios experimentos, pudiendo profundizar en la metodología utilizada y asimilar nuevos conocimientos.

3. Búsqueda de información relacionada con la problemática

Una vez definida la problemática y conocida la tipología de las imágenes de microscopía, se trató de encontrar la manera de automatizar el proceso de medida de brecha. Para ello, se investigó sobre los métodos empleados con tal fin en otros laboratorios del mundo.

Así mismo, se trató de conocer los software que se utilizan actualmente para ello, descubriendo los programas de los que se ha hablado en el capítulo de herramientas para el procesamiento de microfotografías.

4. Estudio de las técnicas de procesamiento de imágenes

Tras elegir MATLAB como la herramienta estrella para resolver la problemática y diseñar los algoritmos, fue necesario estudiar las técnicas de segmentación existentes y las funciones de las que dispone el usuario programador.

5. Diseño e implementación de algoritmos

Conocida la *toolbox* de MATLAB de la que se ha hablado anteriormente (Image

Processing Toolbox), se comenzó con el diseño de algoritmos para el procesamiento de las imágenes cedidas. Los algoritmos con los que trabaja la interfaz desarrollada se tuvieron completamente terminados a primeros de mayo. Durante todo el proceso de escritura de los mismos, fueron probados con las imágenes originales.

6. Diseño e implementación de interfaces

Antes de diseñar la interfaz final, fueron implementadas cuatro interfaces más. Con ello se consiguió el manejo de la herramienta GUIDE de MATLAB, utilizada para el desarrollo de todas ellas.

A la hora de diseñar la interfaz definitiva para la aplicación biomédica, se tuvo una reunión con el personal de laboratorio para realizar un croquis bien detallado de la misma. Así mismo, se redactaron todos los requisitos que ésta debía cumplir.

7. Instalación de la aplicación biomédica

Con la interfaz programada, se acudió de nuevo al Servicio de Bioelectromagnetismo. La interfaz fue probada con éxito por el personal de investigación y se le dieron los últimos retoques. La aplicación de procesamiento de imágenes fue instalada en el laboratorio del Hospital el día 13 de junio de 2016.

8. Documentación del proyecto

Con esta fase de documentación sobre el funcionamiento de la aplicación biomédica y los algoritmos de procesamiento que emplea, se da por concluido este proyecto.

12.2. Planificación

En cuanto a la planificación, se puede dividir el proyecto en tres fases bien diferenciadas.

Los meses de enero, febrero y marzo estuvieron dedicados al estudio del estado actual de la problemática y a la búsqueda de soluciones técnicas. En abril, los algoritmos empezaron a desarrollarse y en mayo se consiguió tenerlos funcionando al cien por cien. En junio fue cuando se diseñó e implementó la interfaz definitiva con la que actualmente funciona la aplicación biomédica instalada en el Servicio de Bioelectromagnetismo.

12.3. Personal involucrado

En este proyecto han participado profesionales pertenecientes a diferentes campos de estudio: el de la ingeniería y el de la investigación científica. Se ha trabajado codo con codo con biólogas y técnicos de laboratorio y a su vez con ingenieros. Cada colaborador ha aportado ideas desde su punto de vista, en base a sus conocimientos y a la experiencia laboral en su área.

Capítulo 13

Conclusiones

En esta última parte del documento se presentan las conclusiones que se desprenden del proyecto llevado a cabo. Así mismo, se comentarán algunos posibles desarrollos futuros que tendrán como objetivo conseguir la optimización de las herramientas creadas.

13.1. Conclusión

A día de hoy, es evidente que la ciencia y la tecnología están en constante desarrollo. Los avances surgidos en los últimos años en ambas áreas eran impensables hace décadas. En este proyecto, se ha logrado fusionar dos campos de estudio muy diferentes, pero que día a día y poco a poco, se va logrando una mayor sinergia entre ambos: la medicina y la ingeniería.

Haciendo uso de técnicas de visión artificial y de programación, se ha conseguido implementar una aplicación informática que facilita el análisis y el procesamiento de imágenes de microscopía, realizando el tratamiento de las mismas de manera automática. Con la utilización de la nueva herramienta, se obtienen unos resultados que presentan un elevado nivel de precisión y fiabilidad. Además, se proporciona al especialista un gran ahorro de tiempo en la ardua tarea de segmentación de microfotografías. Con ello, queda constancia, una vez más, lo beneficioso que puede llegar a ser aplicar las técnicas y los principios del campo de la ingeniería al mundo de la investigación.

Para concluir, se puede afirmar que se ha alcanzado la meta fijada. Se ha logrado poner solución a una problemática concreta y bien definida, con la implementación de un método eficaz, pero sobretodo, objetivo. Con ello, también se ha conseguido realizar un pequeño aporte al gran mundo que engloba lo relacionado con la investigación y el desarrollo.

13.2. Desarrollos futuros

En cuanto a las mejoras que podría presentar en un futuro la aplicación biomédica, cabe decir que ésta es muy completa, ya que se realizó codo con codo con el equipo de investigación y fueron añadidos todos los detalles necesarios durante su

proceso de creación. No obstante, actualmente la interfaz está siendo optimizada y se le están añadiendo nuevas funcionalidades y más cálculo estadístico.

Uno de los posibles desarrollos futuros a estudiar, sería convertirla en una aplicación cuya ejecución no dependiera de MATLAB, sino que pudiera ser abierta en cualquier máquina sin necesidad de poseer este soporte y con independencia del sistema operativo instalado en el ordenador en el que se ejecuta. Este proceso no se ha llevado a cabo en este proyecto puesto que se requería una interfaz de manera inmediata, y se consideró que realizar esta transformación no añadiría, por el momento, gran valor al producto.

Otro elemento susceptible de mejoras podrían ser los algoritmos de segmentación, pues como ya se comentó en el capítulo de resultados, el procesamiento a veces no es cien por cien preciso. Esto depende de algunos factores, como por ejemplo la calidad de las imágenes. En un futuro, podrían desarrollarse nuevos algoritmos o modificar los existentes, con el fin de resolver este problema u otros que surgieran. La aplicación está diseñada para que los algoritmos con los que trabaja sean fácilmente intercambiables, por lo que hacer un cambio de este tipo no supondría un grave trastorno.

En el caso de este proyecto, se ha resuelto una problemática que utiliza una línea celular concreta. Si el cultivo celular fuera otro, la apariencia de las imágenes cambiaría, pero los algoritmos podrían ser igualmente adaptables. En la figura 13.1 se muestra una microfotografía de la misma técnica experimental, pero utilizando otro tipo de células: fibroblastos. Nótese la textura que presenta el cultivo en esta ocasión y la diferencia morfológica de las células con respecto a las utilizadas en este proyecto.

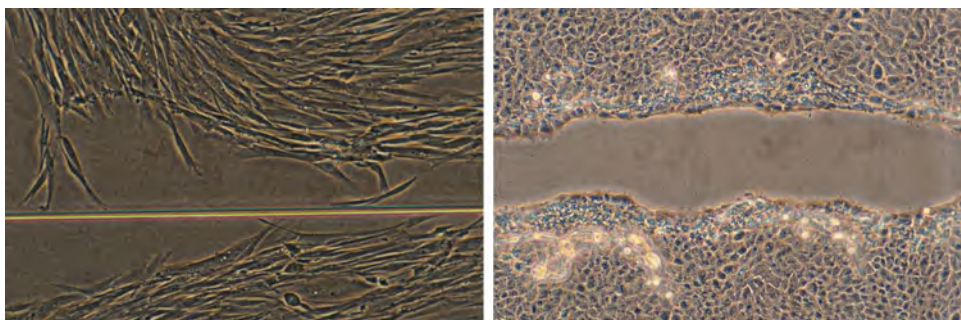


Figura 13.1: A la izquierda, cultivo de fibroblastos. A la derecha, cultivo de queratinocitos.

En definitiva, tanto los algoritmos como la interfaz están abiertos a futuros cambios y mejoras, con el fin de intentar cubrir el máximo de necesidades que puedan surgir de una investigación biomédica y que sean referentes al procesamiento digital de imágenes. De esta manera, se facilitará el trabajo en la medida de lo posible a los especialistas, que además se beneficiarán de un gran ahorro de tiempo en sus proyectos.

ANEXOS

Apéndice A

A: Extracto del ensayo por el equipo investigador

A.1. Objetivo

Los sistemas de terapia electrotérmica por Transferencia Eléctrica Capacitiva-Resistiva (TECR) mediante el uso de corrientes de radiofrecuencia (RF), se han mostrado altamente eficaces en sus aplicaciones clínicas para la reparación y cicatrización de heridas epiteliales. Sin embargo, los fenómenos celulares y moleculares implicados en esos efectos terapéuticos de los tratamientos TECR no han sido identificados hasta la fecha. Los trabajos en curso en el Servicio BEM-Investigación del Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS están dirigidos a la identificación y caracterización de dichos fenómenos a nivel molecular y celular.

En los procesos de reparación y cicatrización cutánea, se consideran críticos los fenómenos de proliferación y migración celular, cuyas dinámicas (tasa y cronología) difieren entre los dos principales estratos del epitelio: epidémico (externo) y dérmico (interno.) En esta primera fase del estudio se prioriza la investigación de la respuesta migratoria temprana en cultivos de células epidérmicas humanas a la estimulación con pulsos (dos pulsos de 5 minutos) con corriente RF TECR débil (subtérmica.) Los efectos en la migración celular se valoran a través del estudio de la tasa o velocidad de cierre de una herida, brecha o surco abierto en la monocapa formada por las células epidérmicas cultivadas en placas de Petri. Los cambios tempranos (6 primeras horas de cierre) en las dimensiones de la brecha se cuantifican mediante dos procedimientos: 1) procedimiento estándar de medición de distancias entre los bordes de la brecha, que se describe a continuación, y 2) algoritmo y software diseñados ad hoc para calcular la superficie de la brecha.

A.2. Modelo biológico: Línea celular de epitelio humano

HaCaT es una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada gracias a una mutación en el gen p53 y posee una alta capacidad de proliferación en cultivo. Estas células se emplean habitualmente en estudios experimentales de respuesta cutánea, ya que poseen un genotipo y fenotipo muy similares a los de los queratinocitos primarios humanos, cuyo cultivo es inviable. Sin embargo, aunque se trata de una línea establecida, el crecimiento en cultivo de las células HaCaT es menos

homogéneo y estable que el de otras líneas celulares de uso regular.

Como hemos mencionado, la migración de los queratinocitos constituye un proceso fundamental para la regeneración de la superficie cutánea. Para realizar el ensayo de la migración celular se ha usado la técnica de *wound assay* o *cierre de la herida* sobre los cultivos de HaCaT. En conjunto con el análisis de marcadores moleculares de migración celular, el estudio de la evolución de la herida realizada en la monocapa de queratinocitos permitirá determinar si el tratamiento TEQR afecta a la migración.

A.3. Metodología

Los queratinocitos HaCaT fueron cultivadas en T-Flasks (Falcon) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10% (vol/vol) de suero bovino, L-Glutamina (4 mM), penicilina-estreptomicina con fungizona (100 U/ml), crecidas en una atmósfera a 37°C y 5% de CO_2 en una incubadora (Forma Scientific), y subcultivadas una vez por semana. Para el conjunto de los experimentos, las células se sembraron en placas Petri (Nunc) de 60 mm de diámetro a una densidad de $3,7 \times 10^4$ células/ml.

En el presente estudio, se ha analizado un total de 6 replicados experimentales, usando cultivos en pasajes de 5 - 12 semanas. En cada replicado se sembró un total de 6 placas Petri: 3 tratadas y 3 controles sometidas a simulacro de tratamiento. Tras cuatro días de cultivo en placa, se efectuó un surco o herida en la monocapa de células, utilizando para ello una punta de pipeta p200. A continuación (Tiempo 0 horas: T_0) se toman fotomicrografías digitales de la herida, utilizando un objetivo de (10x) en un microscopio Nikon, modelo TMS-F, equipado con cámara digital Nikon, modelo D90. Inmediatamente después, los cultivos fueron sometidos a tratamiento real (dos pulsos de 5 min, uno a T_0 y otro a T_4) o simulado. A T_6 horas, completado el intervalo experimental de tratamiento/simulacro, los cultivos fueron fotografiados nuevamente en la misma región fotografiada a T_0 .

En todos los procedimientos y análisis se aplicaron protocolos ciegos para tratamiento, haciendo uso de claves alfanuméricas para la identificación de las muestras. De esta forma, el estudio de los cultivos se realizaba en ausencia de información sobre su condición de tratados o controles.

A.3.1. Procedimiento para la adquisición de las imágenes de los cultivos

Inmediatamente después de realizar el surco (T_0) cada una de las placas Petri fue marcada mediante puntos y líneas guía, con el fin de localizar con precisión cada una las regiones a fotografiar (Figura A.1).

Se fotografían los dos campos que están por encima y por debajo de cada línea guía, delimitada por 4 puntos guía, como se muestra en el esquema de la Figura A.2.

Una vez adquiridas las imágenes, en cada campo se mide el grosor o apertura de la brecha en 3 puntos representativos. Las mediciones se ejecutan utilizando

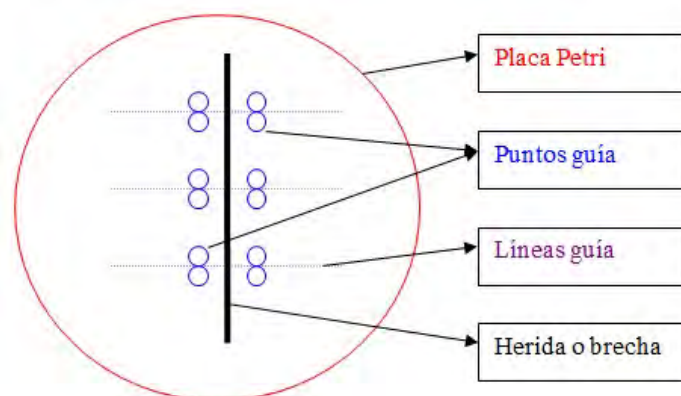


Figura A.1: Esquema explicativo del procedimiento para la adquisición de las imágenes.

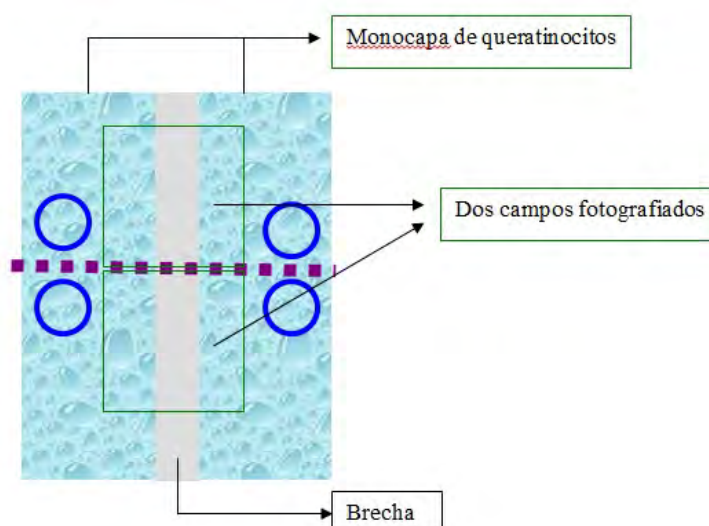


Figura A.2: Esquema explicativo del procedimiento para la adquisición de las imágenes.

la herramienta *regla* del programa Photoshop para análisis de imagen asistida por computador.

En la figura A.3 se representan las distancias entre los bordes de la herida, a medir en la imagen adquirida para estimar el grosor de la brecha.

Los datos de distancias obtenidos se vuelcan en un archivo Excel y se calcula la media y la desviación estándar de estos (Tabla A.1).

De cada herida se obtiene un total de 6 imágenes, y de cada imagen, 3 datos de distancia/longitud; con lo que por cada brecha y tiempo estudiado tenemos un total de 18 datos de distancia, que permitirán valorar la evolución del cierre de la herida.

Con los valores de las medias obtenidas a los dos tiempos considerados (T_0 y T_6) se elabora un documento Excel que permite comparar los datos en términos de porcentaje de cierre de la herida (Tabla A.2).

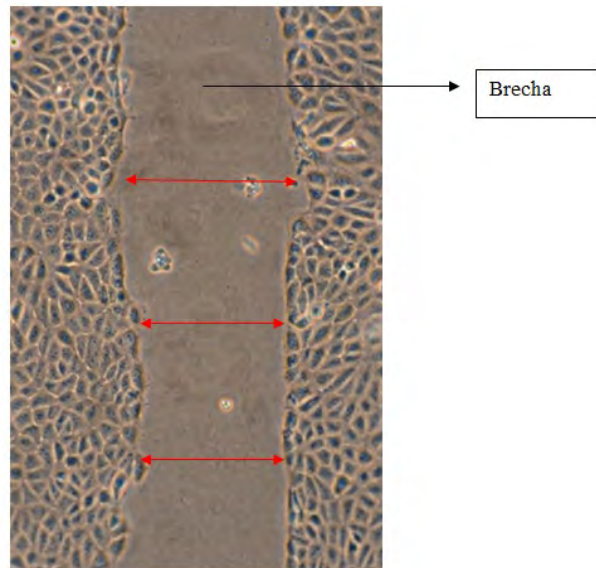


Figura A.3: Método de medida del ancho de la brecha.

Tabla A.1: Tabla con distancias, media y desviación por punto.

FOTO	PUNTO 1	PUNTO 2	PUNTO 3	MEDIA	DESVIACIÓN
339	17,48	17,14	17,34	17,32	0,17088007
340	17,61	18,69	17,34	17,88	0,71435285
341	17,68	15,31	15,99	16,32666667	1,22034148
342	15,51	16,26	17,41	16,39333333	0,95699181
343	15,99	13,68	15,31	14,99333333	1,18711134
344	15,85	15,24	16,66	15,91666667	0,71234355

A.4. Estadística

La tabla A.3 muestra los resultados correspondientes a la evolución temprana del cierre de un surco (DIF 0-6 H) entre el inicio del tratamiento (T_0 : 0H) y las 6 horas posteriores (T_6 : 6H.) Los datos obtenidos así fueron sometidos a análisis estadístico mediante el test de la t de Student para datos no apareados. Las diferencias entre tratados y controles fueron consideradas estadísticamente significativas cuando p fue menor que 0,05.

A.5. Conclusión a partir de la aplicación del método estándar (medición de distancia)

A tiempo T_6 la distancia media entre los bordes de la brecha en las regiones estudiadas era $11,89 \pm 4,68\%$ mayor en las muestras tratadas con TEQR que en los controles sometidos a tratamiento simulado. Esta diferencia resultó ser significativa estadísticamente ($p \approx 0,03$). Una inhibición de la emigración de las células epidérmicas puede afectar favorablemente al proceso general de cicatrización de heridas cutáneas, al evitar los problemas originados frecuentemente por el cierre prematuro de la epidermis con respecto a la dermis.

Tabla A.2: Tabla que muestra el porcentaje de cicatrización.

	0H	6H	DIF 0-6H	% CIERRE
PUNTO 1	17,32	17,88	-0,56	-3,23325635
PUNTO 2	17,88	17,3633333	0,51666667	2,8896346
PUNTO 3	16,3266667	15,3066667	1,02	6,24744794
PUNTO 4	16,3933333	14,79	1,60333333	9,78039854
PUNTO 5	14,9933333	13,86	1,13333333	7,55891507
PUNTO 6	15,9166667	14,0433333	1,87333333	11,7696335
MEDIA FINAL	16,4716667	15,5405556	0,93111111	5,65280448

Tabla A.3: Tabla de resultados de la evolución del cierre en seis horas.

Unpaired t test	0,0292
P value	*
P value summary	Yes
Significantly different? (P < 0.05)	Two-tailed
One- or two-tailed P value?	t=2,542 df=10
t, df	
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	100,0 ± 0,01726 N=6
Mean ± SEM of column B	88,13 ± 4,677 N=6
Difference between means	-11,89 ± 4,677

A.6. Análisis y conclusión de los resultados aplicando el algoritmo y software diseñados ad hoc (medición de superficie de la brecha)

Tras analizar las mismas imágenes con la interfaz creada, los resultados obtenidos se muestran en la tabla A.4:

Tabla A.4: Tabla de resultados de la evolución del cierre en seis horas (utilizando el algoritmo).

Unpaired t test	0,1162
P value	Ns
P value summary	No
Significantly different? (P < 0.05)	Two-tailed
One- or two-tailed P value?	t=1,762 df=8
t, df	
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	100,0 ± 0,02067 N=5
Mean ± SEM of column B	88,67 ± 6,441 N=5
Difference between means	-11,35 ± 6,441

Con este procedimiento, la superficie media de la brecha en las mismas imágenes era $-11,35 \pm 6,44$ % mayor en las muestras tratadas con TECR que en los controles sometidos a tratamiento simulado. Esta diferencia no alcanzó el nivel de significación estadística ($p \approx 0,11$.)

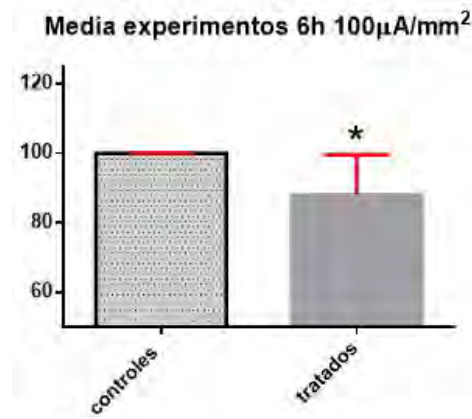


Figura A.4: Histograma representativo de los resultados de la tabla A.3.

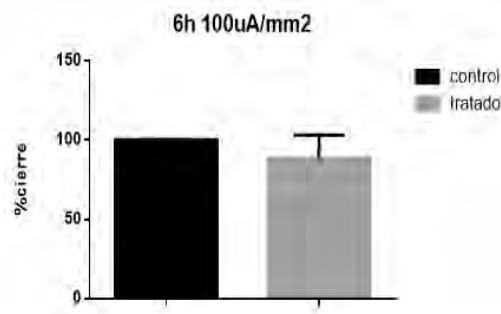


Figura A.5: Histograma representativo de los resultados de la tabla A.4.

A.7. Comentario final

Ambos procedimientos alcanzaron resultados muy similares, indicativos de una inhibición o retardo de la migración (en el cierre de la herida) en las muestras tratadas eléctricamente, del orden del 11,5 % con respecto a los controles. Sin embargo, el hecho de que las desviaciones en los datos de superficie resulten ser ligeramente superiores a las obtenidas en los datos de distancia/longitud, determina en parte la falta de significación estadística para las diferencias entre tratados y controles.

A falta de completar los datos sobre marcadores moleculares de migración, y dado que: 1) este segundo procedimiento basado en la estimación de superficies está diseñado para garantizar la máxima objetividad en su aplicación, y 2) el método científico establece que rechazar un efecto potencialmente real es preferible a aceptar un efecto potencialmente falso, la conclusión obtenida de la comparación de los dos métodos aplicados es que las diferencias observadas no son significativas. Sin embargo, lo anterior no significa que los dos métodos empleados conduzcan a conclusiones diferentes. En efecto, las coincidencias entre los resultados son evidentes, por lo que es previsible que una ampliación de la muestra mediante replicados experimentales adicionales, llevaría a conclusiones concluyentes. Además, tal ampliación del estudio contribuiría a comprobar si la menor desviación con respecto a la media en el procedimiento estándar se mantiene o no. Y si se mantiene, habría que determinar si esta menor desviación pudiera deberse a un sesgo por subjetividad del investigador a la hora de seleccionar los puntos para medición de distancias, o a que

los valores de superficies están sujetos a mayor variación que los de longitud. En este punto conviene recordar que la posibilidad de sesgos por subjetividad se considera eliminada por la aplicación de protocolos ciegos para exposición de las muestras, y para toma y análisis de imágenes.

Apéndice B

B: Publicitación del Congreso de INDIBA

Según se ha especificado en la sección 11.1 del capítulo de Resultados y discusión, la aplicación software diseñada fue puesta en práctica por el equipo investigador desde el día que se dio por concluida su instalación.

Como evidencia de lo anterior, se anexa a continuación publicitación del Congreso que celebrará INDIBA [11] (Empresa patrocinadora de los estudios de investigación) en la ciudad de Gijón (Asturias) a mediados del próximo mes de Octubre.



Figura B.1: Publicitación del Congreso.

En este evento se expondrán las diferentes líneas de investigación biomédica sobre *Mecanismos celulares de regeneración cutánea en tratamientos INDIBA*, siendo parte colaboradora de una de sus fases el presente proyecto.

A continuación se adjunta el póster descriptivo de los estudios de investigación realizados por el Servicio de Bioelectromagnetismo del Hospital Ramón y Cajal en colaboración con la Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Diseño Industrial de la Universidad Politécnica de Madrid, que serán presentados en el citado Congreso.

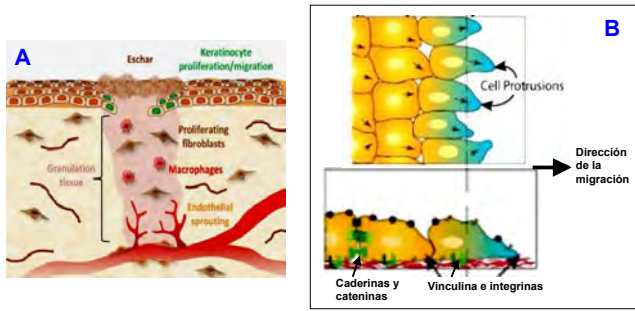
Mecanismos celulares de regeneración cutánea en tratamientos INDIBA

M. L. Hernández Bule¹, E. Toledano Macías¹, M. de Andrés Zamora².

¹ Servicio BEM-Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal –IRYCIS, Madrid. ² Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Diseño Industrial, Universidad Politécnica de Madrid

INTRODUCCIÓN

Existe evidencia clínica de que INDIBA promueve la regeneración y cicatrización de heridas y lesiones cutáneas. Tal efecto podría deberse en parte a incrementos en la circulación sanguínea y en el metabolismo de los tejidos subcutáneos en respuesta al estímulo térmico. Sin embargo, otros mecanismos potencialmente implicados no han sido investigados todavía. La reparación de heridas cutáneas implica procesos de proliferación y migración celular (Figura A), que requieren de una regulación específica de la expresión y localización de moléculas de adhesión célula-célula y célula-sustrato (Figura B).



OBJETIVOS

Investigar las bases biológicas de la potencial acción de la señal eléctrica INDIBA en procesos de regeneración cutánea, epidérmica y dérmica.

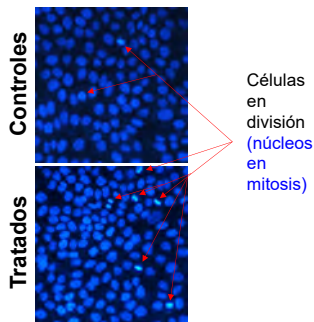
MATERIALES Y MÉTODOS

- Línea de queratinocitos humanos HaCaT
- Tratamiento eléctrico: subtérmico, 100 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$, 5 min ON-4 h OFF durante 6, 12 o 48 horas
- Técnicas de proliferación: Ensayo XTT
- Técnicas de migración:
 1. Inmunofluorescencia e inmunoblot para moléculas de adhesión intercelular: E-caderina y β -catenina, y de adhesión al sustrato: vinculina
 2. Ensayo de cierre de la brecha



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

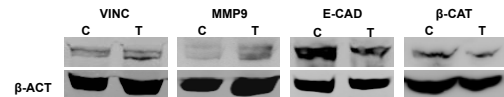
1. Proliferación celular



Resultados: INDIBA indujo incrementos significativos en la proliferación celular (ensayos XTT e inmunofluorescencia)

Discusión: una tasa incrementada de proliferación en queratinocitos promovería regeneración epidérmica, ya que en la intervención de estas células en regeneración prima la proliferación sobre la migración

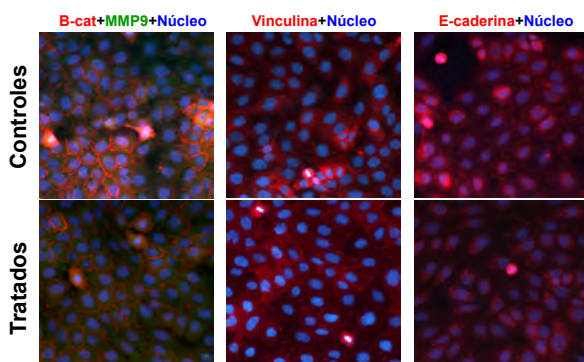
2. Inmunoblot para expresión de E-caderina, β -catenina, vinculina y MMP9



Resultados: INDIBA indujo sobreexpresión significativa de las proteínas de adhesión al sustrato, vinculina (VINC), y de migración, MMP9, y subexpresión de las proteínas de adhesión intercelular, E-caderina (E-CAD) y β -catenina (β -CAT).

Discusión: Una mayor adhesión de las células al sustrato y menor adhesión entre células, podría favorecer la migración y/o proliferación.

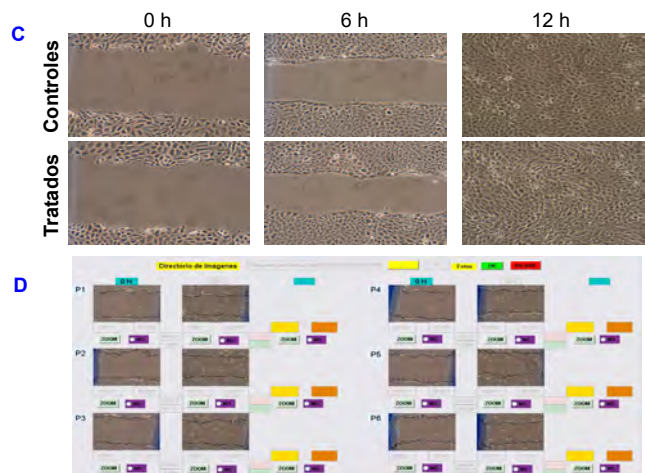
3. Inmunofluorescencia para expresión de E-caderina, β -catenina, vinculina y MMP9.



Resultados: INDIBA indujo incrementos significativos en la expresión de MMP9 y de la proteína de adhesión al sustrato vinculina, así como su desplazamiento desde el citoplasma hacia la membrana celular, donde es funcionalmente activa. Por el contrario, las proteínas de unión intercelular E-caderina y β -catenina, resultaron subexpresadas, sufriendo además la E-caderina una translocación hacia el citoplasma, lo que determina la inactivación de la proteína.

Conclusiones: Tales cambios en la expresión y localización de complejos de adhesión celular, inducidos por el estímulo eléctrico INDIBA serían compatibles con una acción promotora de la migración celular implicada en procesos de regeneración epidérmica.

4. Cierre de la brecha



Resultados: Para elucidar si los efectos observados en proteínas podrían resultar en cambios de la migración celular, se realizó un ensayo piloto de cierre de la herida (Figura C). La evolución del cierre de un surco practicado en la monocapa se analizó mediante software diseñado ad hoc (Figura D). En un primer análisis no se han detectado diferencias significativas entre las muestras controles y las tratadas con INDIBA, en la velocidad de cierre del surco.

Conclusiones: Los cambios electroinducidos, tanto en la proliferación celular como en la expresión y localización de complejos de adhesión celular, no resultaron en cambios detectables en la velocidad de cierre del surco. Esto podría deberse a que, en las condiciones aplicadas, el proceso de cierre es demasiado rápido ($t < 12$ h) para poder detectar efectos en su cinética.

CONCLUSIÓN

Estos resultados identifican mecanismos celulares y subcelulares implicados en la electroestimulación de la proliferación y migración de queratinocitos, y constituyen un respaldo a las aplicaciones de INDIBA en regeneración y cicatrización cutánea

Bibliografía

- [1] Víctor Abraira and Alberto Pérez de Vargas Luque. *Métodos multivariantes en bioestadística*. Centro de Estudios Ramón Areces, 1996.
- [2] Alexandre Barbault, Frederico P Costa, Brad Bottger, Reginald F Munden, Fin Bomholt, Niels Kuster, and Boris Pasche. Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1):1, 2009.
- [3] Ngoc Thuy Bui, Manh Tin Ho, Young Mee Kim, Yoongho Lim, and Moonjae Cho. Flavonoids promoting hacat migration: li. molecular mechanism of 4?, 6, 7-trimethoxyisoflavone via nox2 activation. *Phytomedicine*, 21(4):570–577, 2014.
- [4] CMEIAS. <http://cme.msu.edu/cmeias/>.
- [5] G Fernández de Córdoba. Creación de interfaces gráficas de usuario (gui) con matlab. *Salamanca*, 2007.
- [6] María Gloria Bueno García and Julián Dorado de la Calle. *Gestión, procesado y análisis de imágenes biomédicas*, volume 52. Univ de Castilla La Mancha, 2007.
- [7] S Grimmes and ØG Martinsen. Electrolytics. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*, 2000.
- [8] Diego Orlando Barragán Guerrero. Manual de interfaz gráfica de usuario en matlab. *Parte I-www. matpic. com*, 2008.
- [9] Manh Tin Ho, Hyun Sik Kang, Jung Sik Huh, Young Mee Kim, Yoongho Lim, and Moonjae Cho. Effects of the novel compound dk223 ([1e, 2e-1, 2-bis (6-methoxy-2h-chromen-3-yl) methylene] hydrazine) on migration and proliferation of human keratinocytes and primary dermal fibroblasts. *International journal of molecular sciences*, 15(7):13091–13110, 2014.
- [10] ImageJ. <https://imagej.nih.gov/>.
- [11] INDIBA. <http://www.indibaactiv.com/es/>.
- [12] Xu-pin Jiang, Dong-xia Zhang, Miao Teng, Qiong Zhang, Jia-ping Zhang, and Yue-sheng Huang. Downregulation of cd9 in keratinocyte contributes to cell migration via upregulation of matrix metalloproteinase-9. *PloS one*, 8(10):e77806, 2013.

- [13] José María Rodríguez Martín. *Electroterapia en fisioterapia*. Ed. Médica Panamericana, 2004.
- [14] Mathworks. <http://es.mathworks.com/discovery/matlab-gui.html>.
- [15] Mathworks. <http://es.mathworks.com/products/image/>.
- [16] Mathworks. <http://es.mathworks.com/products/matlab/>.
- [17] Raquel Roldán Montero. *Estudio de los efectos de corrientes eléctricas de radiofrecuencia de uso terapéutico sobre cultivos de la línea de neuroblastoma NB69. Trabajo de Fin de Grado*. 2016.
- [18] Enrique Medel Osset. *El efecto citostático de corrientes eléctricas de radiofrecuencia terapéutica sobre células de neuroblastoma humano. Trabajo de Fin de Grado*. 2015.
- [19] E Parolo and MP Onesta. Ipertermia a trasferimento energetico resistivo e capacitivo nel trattamento di lesioni muscolo-scheletriche acute e croniche. *Evidenze cliniche*, 1998.
- [20] Carlos Platero, K Verbiest, A Úbeda, A Gosálvez J Trillo, and J Bartolomé. Plataforma abierta para el procesamiento y gestión de imágenes biomédicas. *XXI Jornadas de Automática, ISBN*, pages 84–699.
- [21] GraphPad Prism. <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>.
- [22] Statgraphics. <http://www.statgraphics.com/>.