



# UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Informática  
*Mención en Computación*

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
Grado en Ingeniería Informática

## Caracterización de la toxicidad en membranas mediante técnicas de procesamiento digital de imagen

**Alumno:** Mateo Gende Lozano  
**Directores:** Manuel F. González Penedo  
                  Marcos Ortega Hortas  
**Fecha:** 4 de septiembre de 2018



**Título:** Caracterización de la toxicidad en membranas mediante técnicas de procesamiento digital de imagen

**Clase:** Proyecto de desarrollo en investigación

**Autor:** Mateo Gende Lozano

**Directores:** Manuel F. González Penedo  
Marcos Ortega Hortas

**Fecha:** 4 de septiembre de 2018

**Tribunal:**

**Fecha de  
defensa:**

**Calificación:**



*A mi familia.*



# Agradecimientos

Gracias a mis tutores Manuel F. González Penedo y Marcos Ortega Hortas por guiarme y ayudarme en todo lo necesario para el desarrollo de este proyecto. También quisiera agradecer su amable colaboración a Andrea, Anxo y el resto del equipo de la Facultad de Farmacia de la USC.

Gracias a mis amigos y compañeros, por apoyarme y animarme cuando importaba.

Un especial agradecimiento a mi familia, que siempre ha estado ahí para mí.



## **Resumen**

El análisis HET-CAM consiste en la determinación del potencial irritante de una sustancia mediante la inoculación de la membrana corioalantoide de un huevo de gallina. La reacción de dicha membrana ante el compuesto permite determinar lo dañina que puede resultar sobre el tejido ocular humano. Esta reacción se graba y se analiza posteriormente para determinar la cronología de tres hitos que determinan cómo clasificar la sustancia de acuerdo a su potencial irritante. HET-CAM es aplicado de forma muy frecuente a la hora de desarrollar fármacos, especialmente los destinados a los ojos. Posee grandes ventajas respecto a otros estudios *in vivo* como el test de Draize ya que evita el sufrimiento animal innecesario y resulta muy sencillo de realizar. No obstante, este proceso es tedioso y subjetivo, sujeto al criterio personal del experimentador y requiere de largos períodos observando videos de sangrados.

Esto motiva realizar un estudio de la aplicabilidad de las ciencias de la computación y, en especial, el campo de la visión artificial, a fin de proporcionar una metodología de análisis que permita una evaluación objetiva y cómoda de estas grabaciones. Los videos de los ensayos HET-CAM se prestan a ser analizados utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes y obtener datos numéricos y representaciones gráficas de las reacciones del tejido a los compuestos. Dado que no existen precedentes en la bibliografía de la aplicación de las técnicas del campo de la informática al análisis HET-CAM, se realiza un estudio de la aplicabilidad y utilidad que pueden dar diversas técnicas de visión artificial a este experimento. Esto tiene la finalidad de proporcionar herramientas que permitan realizar el análisis de una forma objetiva e informada.

Con esto, se procede a sentar las bases de una metodología de análisis que permita evaluar las grabaciones de estos ensayos con neutralidad y objetividad, ayudando a los expertos a tomar decisiones más informadas que aquellas únicamente motivadas por la observación visual de los videos.



## **Lista de Palabras Clave**

HET-CAM, membrana corioalantoide, visión artificial, irritantes, farmacología, angiografía, detección de vasos sanguíneos, detección de sangre, sangrado



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción al dominio . . . . .	1
1.2. Motivación y objetivos . . . . .	2
1.3. Estructura de la memoria . . . . .	2
<b>2. Descripción del Dominio</b>	<b>5</b>
2.1. HET-CAM . . . . .	5
2.1.1. Estudios preclínicos . . . . .	5
2.1.2. Membrana corioalantoidea . . . . .	6
2.1.3. Ensayo HET-CAM . . . . .	8
2.1.4. Irritantes . . . . .	10
2.2. Visión Artificial . . . . .	11
2.2.1. Imagen Digital . . . . .	11
2.2.2. Color . . . . .	11
2.2.3. Umbralización . . . . .	13
2.2.4. Histograma y Ecualización . . . . .	14
2.2.5. Convolución . . . . .	17
2.2.6. Operaciones Morfológicas . . . . .	18
2.2.7. Filtrado Secuencial Alternante . . . . .	21
<b>3. Análisis del problema</b>	<b>25</b>
3.1. Estructura del proyecto . . . . .	25
3.2. Planificación del Proyecto . . . . .	27
3.3. Modelización del Problema . . . . .	28
3.4. Determinación de las Características . . . . .	28
3.5. Metodología . . . . .	30
<b>4. Implementación de la metodología</b>	<b>33</b>

## **ÍNDICE GENERAL**

---

4.1.	Análisis global por vasos sanguíneos . . . . .	33
4.1.1.	Análisis y diseño . . . . .	33
4.1.2.	Implementación y resultados . . . . .	37
4.2.	Análisis global conjunto . . . . .	40
4.2.1.	Análisis . . . . .	40
4.2.2.	Refinado . . . . .	45
4.2.3.	Reducción de ruido . . . . .	49
4.2.4.	Validación . . . . .	55
4.3.	Metodología de adquisición y selección de área de interés . . . . .	60
4.3.1.	Adquisición de los datos . . . . .	60
4.3.2.	Evaluación y selección del área de interés . . . . .	65
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>69</b>
5.1.	Preliminares . . . . .	69
5.2.	Fotogramas . . . . .	71
5.3.	Representación de las evoluciones . . . . .	75
<b>6.</b>	<b>Aplicación</b>	<b>81</b>
6.1.	Análisis . . . . .	81
6.2.	Diseño . . . . .	82
6.2.1.	Estructura . . . . .	82
6.2.2.	Interfaz . . . . .	85
6.3.	Implementación . . . . .	91
6.3.1.	Material para el desarrollo . . . . .	91
6.3.2.	Codificación . . . . .	92
6.4.	Guía de uso . . . . .	97
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y líneas futuras</b>	<b>103</b>
7.1.	Conclusiones . . . . .	103

---

## ÍNDICE GENERAL

7.2. Líneas futuras . . . . .	104
-------------------------------	-----



# Índice de figuras

2.1.	Pasos de desarrollo preclínico de un fármaco. . . . .	5
2.2.	Estructura de un huevo de gallina fecundado. . . . .	6
2.3.	Fotografía de la membrana corioalantoidea. . . . .	7
2.4.	Pasos del ensayo HET-CAM. . . . .	8
2.5.	Las cuatro fases del proceso inflamatorio. a) muestra el huevo antes de la reacción, b) el comienzo de la hemorragia, c) el comienzo de la lisis y d) coagulación. . . . .	9
2.6.	Instantáneas antes y cinco minutos después de la adición de distintos compuestos. a) NaCl (control negativo), b) Etanol, c) Polisorbato 20, d) NaOH (control positivo) . . . . .	10
2.7.	Separación de una imagen CAM en sus tres componentes RGB. . . . .	12
2.8.	Separación de una imagen CAM en sus tres componentes HSV. . . . .	13
2.9.	Umbralización de dos imágenes de un mismo vídeo, antes y después de producirse sangrado. . . . .	14
2.10.	Imagen con su histograma. . . . .	15
2.11.	Imagen con su histograma tras ecualización. . . . .	16
2.12.	Imagen con su histograma tras aplicación de CLAHE. . . . .	16
2.13.	Comparativa en umbralización de imagen con ecualización de histograma global (izq) y CLAHE (der). . . . .	17
2.14.	Ilustración de convolución 2D. . . . .	17
2.15.	Ejemplo de dilatación morfológica con un elemento estructurante horizontal. .	18
2.16.	Ejemplo de erosión morfológica con un elemento estructurante horizontal. .	19
2.17.	Ejemplo de apertura usando un elemento estructurante con forma de cruz. .	19
2.18.	Ejemplo de cierre usando un elemento estructurante con forma de cruz. .	20
2.19.	Ejemplo de aplicación de operadores morfológicos a escala de grises. Fotografía original (arriba), dilatación (izquierda) y erosión (derecha). . . . .	21
2.20.	Ejemplo de apertura (izquierda) y cierre (derecha) sobre una imagen en escala de grises. . . . .	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

2.21. Aplicación de un Alternating Sequential Filter paso por paso. . . . .	23
3.1. Diagrama de la metodología seguida a lo largo del trabajo. . . . .	25
3.2. Planificación inicial del proyecto. . . . .	27
3.3. Desarrollo final del proyecto. . . . .	28
3.4. Modelo básico del proceso. . . . .	29
3.5. Evolución de los capilares en la respuesta a un proceso de irritación. . . .	30
3.6. Esquema inicial de la metodología a aplicar. . . . .	31
4.1. Primeros pasos de la segmentación de vasos sanguíneos. . . . .	34
4.2. Filtrado final de la segmentación de vasos sanguíneos. . . . .	35
4.3. Comparativa final de segmentación de vasos sanguíneos. . . . .	35
4.4. Evolución de los fotogramas en un vídeo con detección de vasos sanguíneos. .	38
4.5. Gráfica del resultado de la primera iteración . . . . .	38
4.6. Comparación en la segmentación antes y después de la destrucción de la estructura vascular. . . . .	39
4.7. Cambios de color dentro de un mismo vídeo. . . . .	41
4.8. Diferencias en color entre distintos vídeos. . . . .	41
4.9. Comparativa entre la componente verde y la saturación para segmentar sangre. . . . .	42
4.10. Comparativa de resultados de umbralización entre componentes. . . . .	43
4.11. Gráfica con ambas evoluciones, en azul los píxeles detectados como vasos sanguíneos, en naranja, los píxeles detectados como sangre. . . . .	44
4.12. Comparación entre las componentes saturación y matiz. . . . .	45
4.13. Aplicación del producto punto a punto entre las componentes S y H. . . . .	47
4.14. Aplicación de AND entre las segmentaciones producidas por las componentes S y H. . . . .	48
4.15. Comparación visual de segmentación entre aproximaciones. . . . .	49
4.16. Comparación entre las gráficas de las aproximaciones. . . . .	49
4.17. Ejemplo del ruido al analizar un vídeo. . . . .	50

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

4.18. Esquema de funcionamiento del suavizado utilizando vectores. . . . .	51
4.19. Reducción de ruido en un vídeo de control positivo. a) Antes de reducción. b) Tras reducción por suavizado de umbrales. . . . .	52
4.20. Reducción de ruido en un vídeo de control negativo. a) Antes de reducción. b) Tras reducción por suavizado de umbrales. . . . .	52
4.21. Comparación visual entre umbralización global y subdividiendo la imagen. .	54
4.22. Mayor reducción de ruido con subdivisión en control positivo. a) Reducción por suavizado de umbrales. b) Reducción por subdivisión de la imagen y suavizado de umbrales. . . . .	54
4.23. Mayor reducción de ruido con subdivisión en control negativo. a) Reducción por suavizado de umbrales. b) Reducción por subdivisión de la imagen y suavizado de umbrales. . . . .	55
4.24. Dos fotogramas consecutivos mostrando cambios de resolución, con sus res- pectivas segmentaciones. . . . .	56
4.25. Detección de vasos sanguíneos en el primer vídeo. . . . .	57
4.26. Detección de vasos sanguíneos en el segundo vídeo. . . . .	57
4.27. Detección de vasos sanguíneos en el tercer vídeo. . . . .	58
4.28. Detección de vasos sanguíneos en el cuarto vídeo. . . . .	58
4.29. Variaciones externas en la iluminación de un vídeo. . . . .	61
4.30. Efecto de las variaciones luminosas en los datos. En azul detección de vasos, en naranja detección de sangre. . . . .	61
4.31. Efecto de una vibración externa sobre la segmentación de vasos sanguíneos.	63
4.32. Efecto de los cambios de resolución sobre la segmentación de vasos sanguíneos.	63
4.33. Diagrama del equipo utilizado. . . . .	64
4.34. Desplazamiento del embrión en el plano. . . . .	65
4.35. Desplazamiento de una burbuja en el plano. . . . .	65
4.36. Cresta en los datos provocada por la aparición de una burbuja. . . . .	66
4.37. Efecto en la segmentación de la aparición de la cáscara en el plano. . . . .	67
5.1. Primer ejemplo de detección de vasos. . . . .	71
5.2. Segundo ejemplo de detección de vasos. . . . .	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

5.3. Tercer ejemplo de detección de vasos. . . . .	72
5.4. Primer ejemplo de detección de sangre. . . . .	73
5.5. Segundo ejemplo de detección de sangre. . . . .	73
5.6. Tercer ejemplo de detección de sangre. . . . .	74
5.7. Ejemplo 1 de detección de sangre en control negativo. . . . .	76
5.8. Ejemplo 1 de detección de vasos sanguíneos en control negativo. . . . .	76
5.9. Ejemplo 2 de detección de sangre en control negativo. . . . .	76
5.10. Ejemplo 2 de detección de vasos sanguíneos en control negativo. . . . .	77
5.11. Ejemplo 1 de detección de sangre en control positivo. . . . .	77
5.12. Ejemplo 1 de detección de vasos sanguíneos en control positivo. . . . .	77
5.13. Ejemplo 2 de detección de sangre en control positivo. . . . .	78
5.14. Ejemplo 2 de detección de vasos sanguíneos en control positivo. . . . .	78
5.15. Ejemplo de detección de sangre en un ensayo con polisorbato 20. . . . .	78
5.16. Ejemplo de detección de vasos sanguíneos en un ensayo con polisorbato 20. . . . .	79
5.17. Ejemplo de detección de sangre en un ensayo con cloroformo. . . . .	79
5.18. Ejemplo de detección de vasos sanguíneos en un ensayo con cloroformo. . . . .	79
6.1. Diagrama del patrón <i>MVC</i> . . . . .	84
6.2. Diagrama simplificado de la estructura del sistema. . . . .	85
6.3. Prototipo de selección de fichero. . . . .	87
6.4. Prototipo de elección de instante inicial. . . . .	88
6.5. Prototipo de ventana de configuración. . . . .	89
6.6. Prototipo de ventana de selección de área de interés. . . . .	89
6.7. Prototipo de ventana de resultados. . . . .	90
6.8. Diagrama de la clase modelo. . . . .	92
6.9. Diagrama de las clases vista y controlador. . . . .	93
6.10. Vista final de la elección de instante inicial. . . . .	94
6.11. Vista final de la ventana de configuración. . . . .	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

6.12. Ejemplo de un error de configuración. . . . .	94
6.13. Vista final de la selección del área de interés. . . . .	95
6.14. Vista final de la ventana de resultados. . . . .	96
6.15. Selección de fichero. . . . .	97
6.16. Resultados utilizando la configuración por defecto de la herramienta. . . . .	98
6.17. Resultados reduciendo la duración del ensayo. . . . .	99
6.18. Resultados aumentando el salto de frames. . . . .	99
6.19. Efectos de modificar el suavizado de umbrales. . . . .	100
6.20. Resultados con subdivisión de imágenes. . . . .	101
6.21. Progreso del procesado del vídeo. . . . .	102



# Índice de cuadros

4.1.	Valoraciones de los expertos para el primer vídeo. . . . .	57
4.2.	Valoraciones de los expertos para el segundo vídeo. . . . .	57
4.3.	Valoraciones de los expertos para el tercer vídeo. . . . .	58
4.4.	Valoraciones de los expertos para el cuarto vídeo. . . . .	58
6.1.	Tabla de restricciones y efectos de las opciones de configuración. . . . .	101



# **Capítulo 1**

## **Introducción**

Los últimos años han visto grandes avances en las tecnologías de la información, permitiendo su aplicación en múltiples campos de la ciencia. En concreto los sistemas de visión artificial y de tratamiento digital de imagen han sido de gran ayuda a la medicina y al diagnóstico y seguimiento de enfermedades. Este trabajo presenta una aplicación en el campo de la farmacia, donde los sistemas informáticos pueden ser de gran utilidad no sólo automatizando procesos, sino también aportando información objetiva sobre experimentos que se desarrollan en el laboratorio.

### **1.1. Introducción al dominio**

A la hora de desarrollar fármacos para consumo humano, los farmacéuticos deben evaluar diferentes parámetros relativos a su seguridad, uno de ellos es la toxicidad. Esta describe los daños que provoca la sustancia a evaluar sobre nuestro tejido. Para productos destinados a los ojos existen diferentes tests como el Test de Draize [1] o la técnica HET-CAM [2]. Esta última es la base del trabajo al que pertenece esta memoria.

HET-CAM proviene de Hen's Egg Test - ChorioAllantoic Membrane y se basa en utilizar la membrana corioalantoide de un huevo fecundado de gallina. Esta membrana es rica en vasos sanguíneos y responde a los procesos inflamatorios de forma similar al tejido conjuntivo del ojo. La facilidad de desarrollo del experimento, en comparación al uso de animales conscientes como en el test de Draize, hacen de esta técnica una forma muy recomendable de evaluar la toxicidad. En el experimento, se dispone de un huevo fecundado e incubado entre 9 y 10 días. Se procede a eliminar la parte superior de la cáscara del huevo. Esto expone al aire la membrana corioalantoide, sobre la que se aplica la sustancia a evaluar. En los siguientes minutos se observa esta membrana para determinar el tiempo que tardan en aparecer daños en los vasos sanguíneos. Daños mayores y más tarde en el tiempo indican una mayor irritación y en consecuencia mayor toxicidad de la sustancia que se está evaluando.

## 1.2. Motivación y objetivos

Este proyecto existe para estudiar la aplicabilidad de un sistema de visión artificial a la detección automática de las lesiones que aparecen sobre la membrana corioalantoide. Dada la naturaleza visual del experimento, resulta muy sencillo obtener imágenes en vídeo de su desarrollo que se prestan a ser analizadas por un programa informático. Dicho programa podría ayudar a los experimentadores a desarrollar mejor sus funciones proporcionando dos ventajas importantes. La primera es la automatización, evitando al usuario tener que analizar manualmente cada vídeo. Estos son de 5 minutos de duración y la evaluación de un único compuesto requiere de múltiples test. La segunda es aportar un estándar objetivo. Los ensayos de HET-CAM los evalúan los propios experimentadores en base a tres fenómenos que suelen ocurrir en los vídeos: hemorragia, lisis y coagulación. En el momento en el que el investigador cree que ha sucedido uno de ellos, anota el tiempo actual. Este proceso es subjetivo, y depende en gran medida de la persona que está llevando a cabo el experimento. Usar una herramienta informática que sea capaz de mostrar datos objetivos y cuantitativos de lo que sucede en el vídeo proporcionaría un mayor rigor a este test, y ayudaría a delimitar con mayor facilidad las diferencias entre distintos grados de irritación.

Esto motiva estudiar qué técnicas de procesamiento digital de imagen son aplicables a este test, qué información contenida en los vídeos permite extraer conclusiones sobre la irritabilidad de los compuestos y cómo obtenerla y presentarla a los investigadores de forma que les ayude a realizar mejor sus funciones. De esta forma evitando el tedio de analizar a mano vídeos repetitivos en los que puede no suceder nada y aportando datos objetivos sobre lo que se puede observar en ellos. Se busca establecer una metodología estandarizada tanto de adquisición de datos como de evaluación de los mismos, de forma que se dote a la técnica del rigor que merece, no sustituyendo la evaluación por parte de los investigadores sino complementándola con información objetiva.

## 1.3. Estructura de la memoria

La memoria está estructurada de forma que su lectura permita una comprensión del dominio al que pertenece el problema que se quiere abordar, hacer un análisis de los problemas de los que adolece esta técnica y cómo se pretenden suplir utilizando herramientas informáticas. A continuación se detalla el proceso seguido para sentar una metodología válida tanto para la obtención de los datos como para su tratamiento, junto con un estudio progresivo de cómo aplicar distintas técnicas de procesamiento digital de imagen,

sus resultados y su utilidad en este campo. Para finalizar, se ilustra la implementación de una herramienta que aproveche los contenidos de este estudio para ayudar al equipo de laboratorio en la evaluación de sustancias.

- **Capítulo 1: Introducción.** Introducción breve al dominio del problema, explicación de las motivaciones que llevaron al desarrollo de este trabajo y los objetivos que pretende cumplir. Estructura de la memoria.
- **Capítulo 2: Descripción del Dominio.** Explicación completa del dominio del problema, en qué consiste la técnica y cómo se desarrolla actualmente este experimento. Además, se ilustran las técnicas de visión artificial utilizadas en el proyecto.
- **Capítulo 3: Análisis del problema.** Una vez establecidas las bases sobre las que se asienta el trabajo, se procede a un análisis de la problemática asociada al proceso tal y como se realiza actualmente. A continuación, se explican los pasos que se siguieron para trasladar y modelar el problema de forma que pueda ser abordado desde el punto de vista de la ingeniería.
- **Capítulo 4: Implementación de la metodología.** Habiendo modelado el problema, se procede a ilustrar la metodología que se ha seguido a lo largo de este trabajo. Mostrando las distintas etapas en las que ha consistido, cómo se han analizado los vídeos, qué mejoras se han podido aplicar, cómo se ha refinado el proceso y cómo se desarrolla en la actualidad.
- **Capítulo 5: Resultados.** Con la metodología desarrollada y aplicada a los vídeos, se muestran los resultados obtenidos y su correlación con los eventos que aparecen en los vídeos.
- **Capítulo 6: Implementación de una herramienta.** Aprovechando los resultados de este estudio, se procedió al desarrollo de una aplicación que ayude a los expertos en el desempeño de sus funciones. Este capítulo explica el proceso de diseño e implementación de dicha herramienta.
- **Capítulo 7: Conclusiones y líneas futuras.** Aquí se comentan los resultados y las mejoras que esta metodología puede aportar a la técnica HET-CAM. Además, se proponen distintas formas de abordar este problema posteriormente, con posibles trabajos futuros para continuar este estudio o vías alternativas que podrían servir para modelar este problema.



## Capítulo 2

# Descripción del Dominio

Las ciencias de la información y la computación han mostrado una gran capacidad de adaptabilidad a múltiples campos de la ciencia y la tecnología, simplificando tareas complejas, automatizando procesos y permitiendo recabar información adicional en sus dominios de aplicación. Este trabajo pretende estudiar su utilidad en el campo de la farmacia mediante técnicas de procesamiento digital de imagen y busca sentar una metodología estandarizada para un test de irritabilidad de sustancias farmacéuticas. A fin de ayudar a comprender el dominio y el alcance de este proyecto, se proceden a ilustrar una serie de conceptos básicos sobre el test HET-CAM y las técnicas de visión artificial utilizadas.

### 2.1. HET-CAM

#### 2.1.1. Estudios preclínicos

A la hora de desarrollar un fármaco para consumo humano, existen distintas fases. Antes de que se puedan realizar ensayos clínicos (sobre humanos), existe la fase del desarrollo o estudio preclínico, necesario para comprobar la seguridad del compuesto y evitar daños en las pruebas sobre personas. Se estima que alrededor de 1 entre 5000 compuestos que entran en la fase de estudios preclínicos es finalmente aprobado para consumo[3].

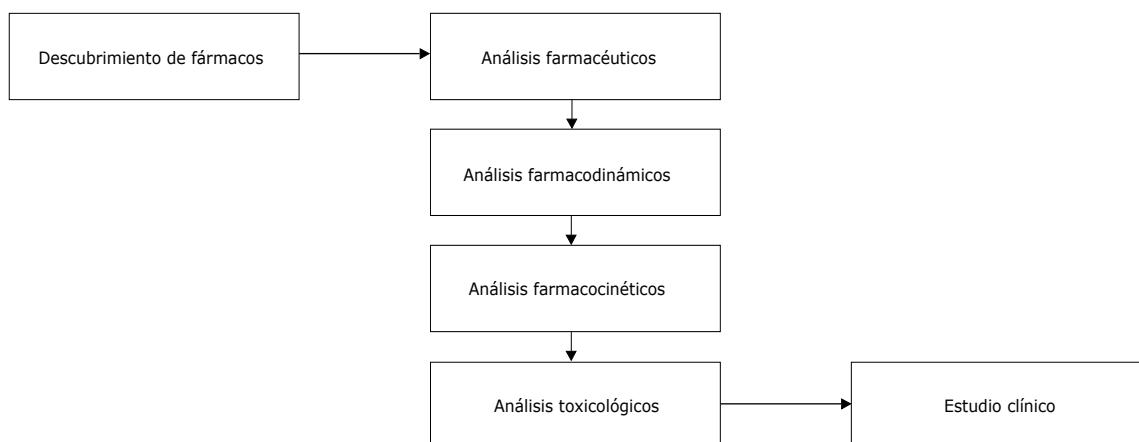


Figura 2.1: Pasos de desarrollo preclínico de un fármaco.

Entre los diferentes parámetros que se evalúan de cada posible fármaco, como el metabolismo o la biodisponibilidad, está la toxicidad. La evaluación de la toxicidad indica el grado en el que una sustancia es capaz de dañar el tejido vivo. Algunos experimentos se pueden desarrollar *in vitro* mientras que otros han de realizarse *in vivo*. HET-CAM es un test preclínico de toxicidad, que permite comprobar el daño que se produce sobre un tejido similar al del ojo humano. Mediante observación directa de la reacción de la membrana corioalantoidea a la sustancia cuya toxicidad se quiere evaluar, se puede determinar el grado de irritación que ésta produciría sobre nuestro tejido.

### 2.1.2. Membrana corioalantoidea

Para comprender mejor en qué consiste el experimento, conviene ilustrar primero la estructura de un huevo de gallina y qué es esta membrana, qué aspecto tiene y por qué resulta de especial interés para los ensayos de toxicidad.

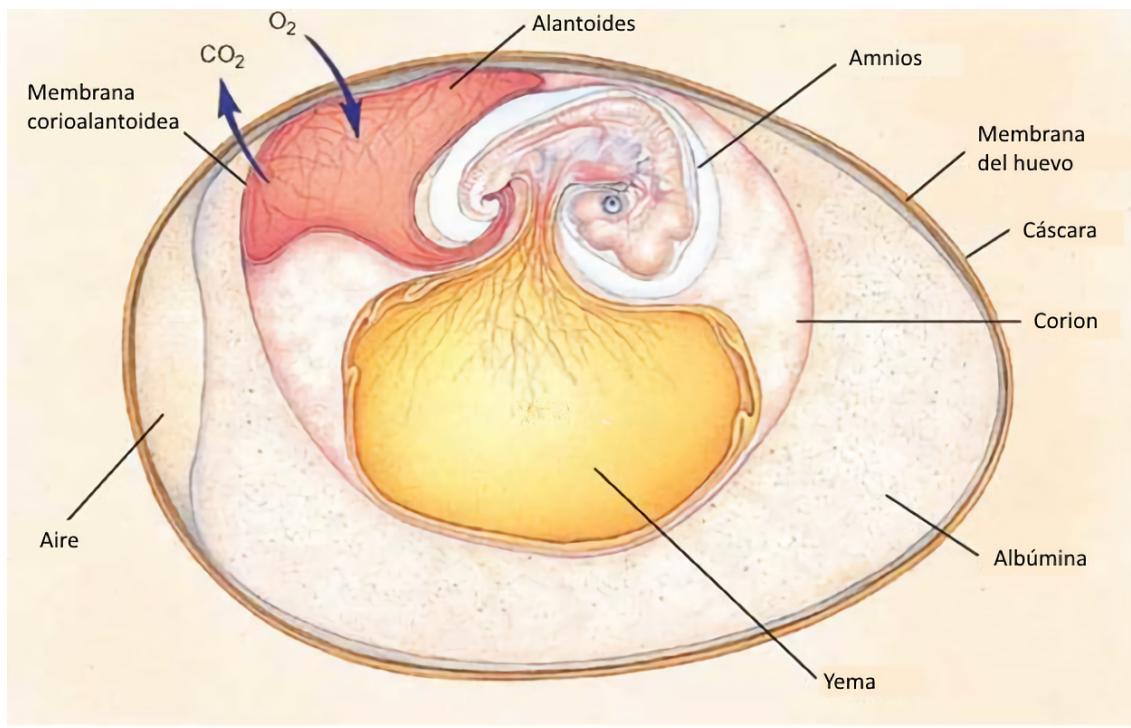


Figura 2.2: Estructura de un huevo de gallina fecundado.

La membrana corioalantoidea o corioalantoica, comúnmente abreviada como CAM, es la fusión de las capas mesodérmicas del alantoides y el corion. Permite el intercambio de gases entre el embrión en desarrollo y el exterior, habilitando la respiración. En los mamíferos esta estructura se acabaría convirtiendo en la placenta, y en el caso de las aves,

permite la absorción de parte del calcio de la cáscara del huevo. En la figura 2.2 se puede observar etiquetada en la esquina superior izquierda junto con otras partes del huevo.

Está formada por tres capas, el epitelio del corion, un tejido mesenquimal intermedio y el epitelio del alantoides. La capa coriónica posee gran cantidad de capilares sanguíneos para permitir el intercambio de gases. Esto la hace muy atractiva para ensayos de irritación[4], angiogénesis[5][6], investigaciones sobre la propagación de virus[7] y helmintos[8], así como sobre el desarrollo de tumores[9].



Figura 2.3: Fotografía de la membrana corioalantoidea.

En la figura 2.3 se muestra el aspecto de esta membrana en un huevo después de un ensayo de HET-CAM. Nótese la irritación sobre los capilares sanguíneos debido a la acción de la sustancia a validar (Polisorbato 20 en este caso).

Entre las ventajas de utilizar la CAM como modelo sobre otros ensayos *in vivo* están su rapidísimo desarrollo de sólo 7 días (entre los días 3 y 10) lo que le confiere un gran atractivo para el estudio de la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis, su accesibilidad y facilidad de manejo en comparación a cualquier otro ensayo sobre un animal y su coste, ya que un huevo fertilizado vale alrededor de 100 veces menos que un simple ratón común. Por no decir que el uso de un embrión en lugar de un animal consciente supone una forma mucho menos cruel y controvertida de evaluar compuestos [10][11].

Existen, sin embargo, algunas limitaciones. En primer lugar, para estudios sobre anticuerpos, citocinas y partidores, algunos de los reactivos pueden no ser compatibles con

aves, requiriendo ensayos sobre mamíferos. Además, estudios que se prolongan demasiado en el tiempo pueden desencadenar una reacción inflamatoria no específica que dificultaría extraer resultados concluyentes de los mismos. Afortunadamente estas limitaciones no afectan en gran medida a los ensayos de irritación como HET-CAM.

### 2.1.3. Ensayo HET-CAM

A la hora de desarrollar el experimento existen una serie de pasos determinados para realizar el ensayo de forma consistente. En primer lugar, se obtienen huevos fecundados de gallina y se introducen en una incubadora a 37,5°C de temperatura y un 50-60 % de humedad. A partir del tercer día se comienza a desarrollar la membrana. Los huevos se posicionan con la cámara de aire en la zona superior, de forma que el corion y el alantoides floten hacia arriba. Entre el noveno y décimo día se retira el casquete superior del huevo utilizando una pequeña sierra circular y se elimina la membrana blanca situada bajo la cáscara, de esta forma exponiendo la cámara de aire al exterior con la membrana corioalantoidea debajo. Esta operación debe realizarse con sumo cuidado para evitar contaminar la membrana con restos de cáscara o peor aún, dañar la propia membrana causando un sangrado previo e invalidando el huevo para la prueba. A continuación se impregna la membrana con una solución salina (0.9 % NaCl) y se introduce de nuevo en la incubadora. Tras unos minutos el huevo está listo para el test.

Para comenzar el test, se retira la solución salina previamente añadida y se sitúa el huevo debajo de algún instrumento de grabación. Este comienza a grabar y utilizando una pipeta se añade la solución que se quiera evaluar a la membrana. Tras 5 minutos el ensayo se da por concluido. Se finaliza la grabación, se retira el huevo y se termina con su crecimiento, bien utilizando congelación o una solución de NaOH inyectada en el embrión.

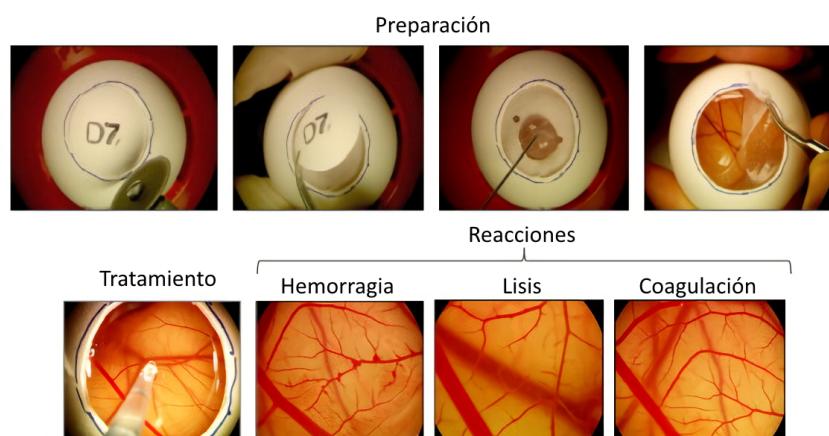


Figura 2.4: Pasos del ensayo HET-CAM.

La figura 2.4 ilustra los pasos a seguir en un ensayo HET-CAM, desde la apertura del huevo a las distintas reacciones que se pueden dar en la membrana. En el transcurso de los 5 minutos, en caso de ser una sustancia irritante, comenzará en la membrana un proceso inflamatorio, normalmente comenzado con una hemorragia, continuado por lisis y finalmente coagulación o, alternativamente, hiperemia, hemorragia y coagulación. La detección y temporización de estos eventos es la que aporta los resultados de la prueba, para al final obtener un I.S. o *Irritation Score* que indica la toxicidad de la sustancia, con un máximo de 21. La forma de calcular este score es la siguiente:

$$I.S. = \left( \left( \frac{301 - T_H}{300} \right) \times 5 \right) + \left( \left( \frac{301 - T_L}{300} \right) \times 7 \right) + \left( \left( \frac{301 - T_C}{300} \right) \times 9 \right) \quad (2.1)$$

Dónde  $T_H$  es el tiempo en segundos desde que se inocula la membrana hasta que comienza la hemorragia,  $T_L$  el tiempo hasta la lisis y  $T_C$  el tiempo hasta que coagula.

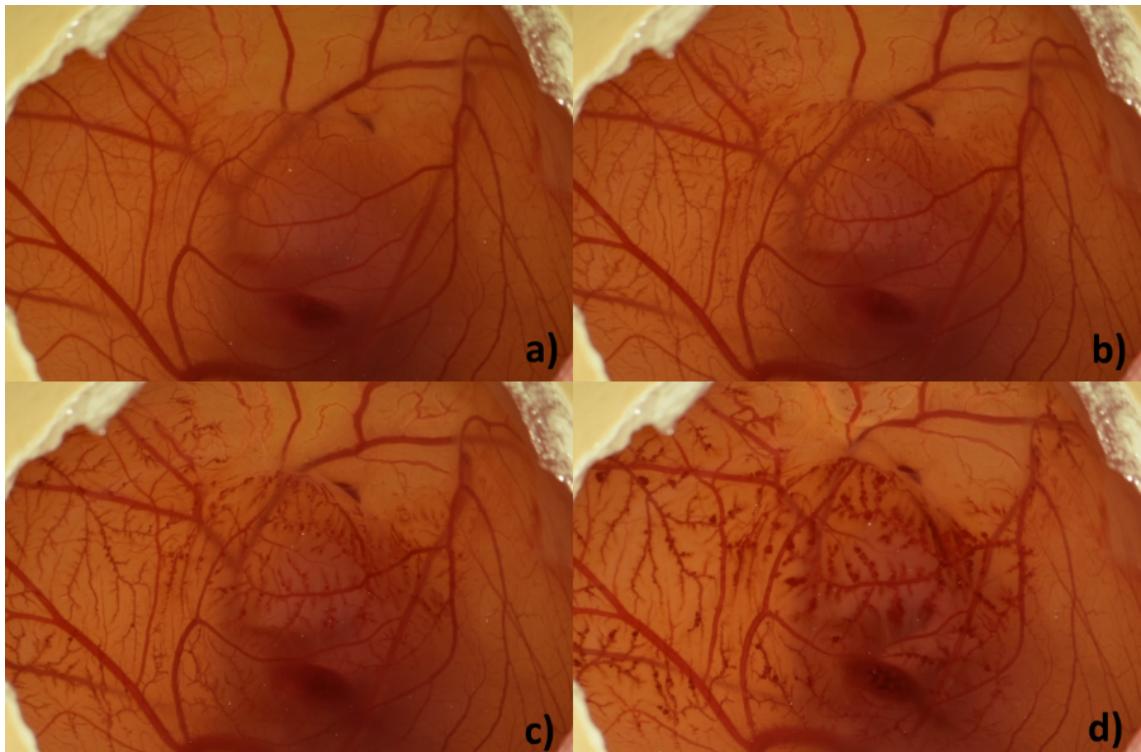


Figura 2.5: Las cuatro fases del proceso inflamatorio. a) muestra el huevo antes de la reacción, b) el comienzo de la hemorragia, c) el comienzo de la lisis y d) coagulación.

Obsérvese la figura 2.5 como referencia a las fases de la reacción etiquetadas por un experto en uno de los videos. Cada fase se define de la siguiente manera:

- **Hemorragia:** Sangrado. Salida de la sangre a fuera de los vasos. En este caso presencia de sangre fuera de los capilares.
- **Lisis:** Deterioro en una célula por lesiones en su membrana. En este caso rotura de los vasos sanguíneos.
- **Coagulación:** Pérdida de liquidez de la sangre para formar coágulos que por hemostasis frenen la pérdida de sangre. En este caso, reducción en el ritmo de la hemorragia.

Se puede intuir que dichos eventos consisten más en fases de una evolución que en hechos puntuales. Esto es, aparecen como cambios en la intensidad de un proceso, en lugar de como eventos aislados. Así pues, para analizar este tipo de reacciones no basta con una instantánea, sino que debe verse cómo encaja cada fase a lo largo de la evolución del proceso.

#### 2.1.4. Irritantes

Distintos compuestos producen distintas reacciones sobre la membrana corioalantoide, en general, los irritantes pasan en mayor o menor medida por las fases descritas en el anterior apartado, sin embargo, el tiempo que tardan en aparecer es importante, y es difícil evaluar los daños únicamente por la instantánea del final del proceso.

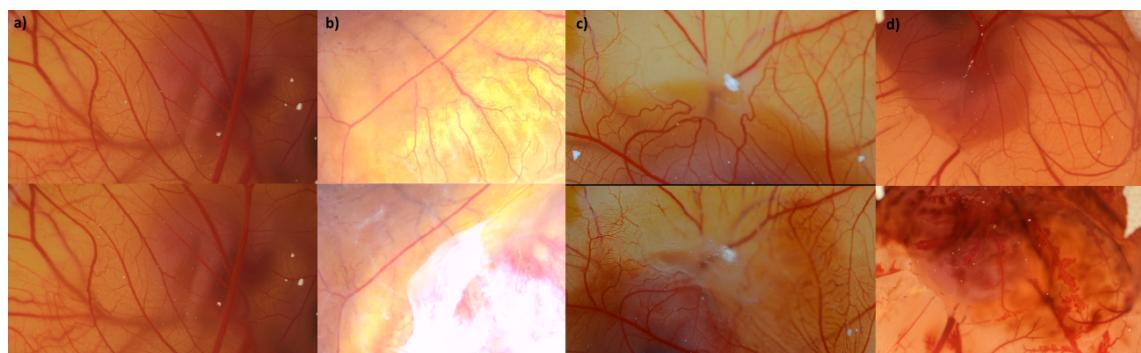


Figura 2.6: Instantáneas antes y cinco minutos después de la adición de distintos compuestos. a) NaCl (control negativo), b) Etanol, c) Polisorbato 20, d) NaOH (control positivo)

En la figura 2.6 se pueden observar las reacciones que provocan distintos compuestos, desde una solución salina que no causa irritación a una disolución 0.1N de sosa cáustica que rompe casi todos los vasos. Nótese que no sólo ocurren daños en los vasos sanguíneos, sino que también hay un movimiento en general de la estructura vascular provocado por contracciones del embrión. Asimismo, si se observa la segunda evolución, provocada por

etanol, llama la atención la aparición de una película blanca opaca que dificulta mucho la observación de los daños a la membrana.

## 2.2. Visión Artificial

A continuación se ilustran una serie de conceptos básicos de visión artificial que se utilizarán a lo largo del trabajo para intentar extraer información de los vídeos de HET-CAM.

### 2.2.1. Imagen Digital

Una imagen digital se puede entender como una matriz de píxeles, cada uno con sus valores de color. Otra forma de interpretarla es como una señal o función discreta de las coordenadas  $(x,y)$  de cada punto en la imagen. Esto permite distintas aproximaciones a la hora de tratarlas para extraer información relevante. Este trabajo utilizará ambas interpretaciones para obtener distintos enfoques sobre lo que está sucediendo en los vídeos.

### 2.2.2. Color

Como se indicaba en el anterior apartado, una imagen puede ser vista como una matriz bidimensional de puntos dónde cada uno tiene un color. Una de las aproximaciones clásicas al color es RGB. En ésta, cada punto tiene un valor de rojo, un valor de verde y un valor de azul (o una matriz de valores de rojo, otra de verde y otra de azul). Existen muchos espacios de color más, donde la forma de representar el color utiliza otras componentes con distintos significados.

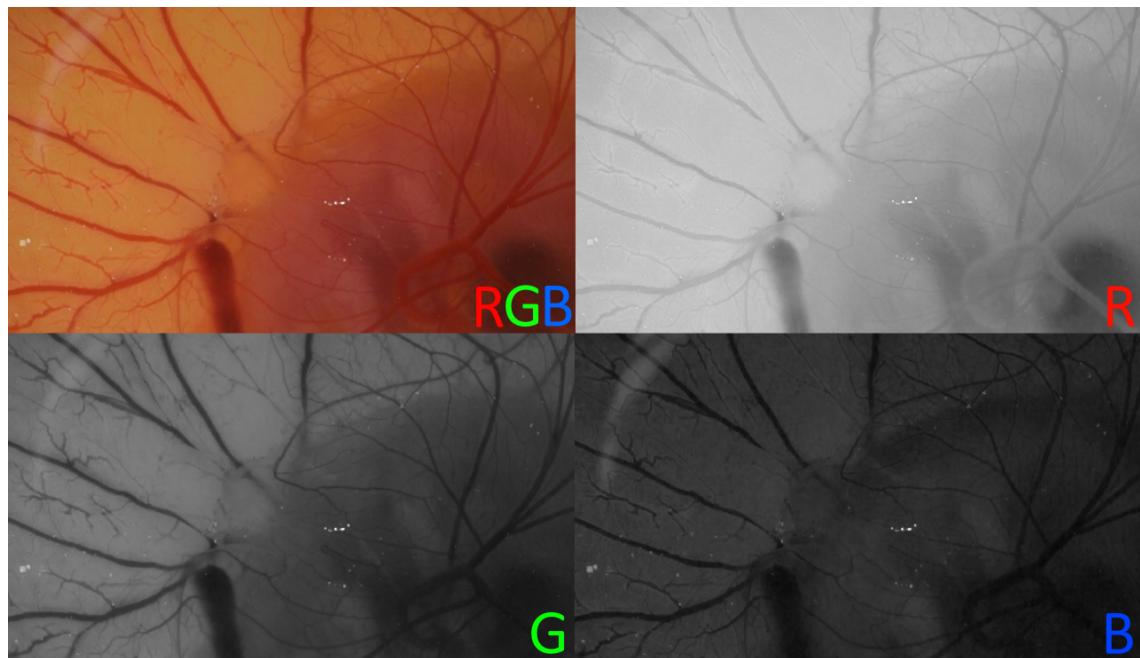


Figura 2.7: Separación de una imagen CAM en sus tres componentes RGB.

Obsérvese en la figura 2.7 el resultado de separar en distintas componentes una imagen de la membrana. Es destacable la claridad que toma en la componente roja, ya que al tratarse de una imagen naranja, con vasos sanguíneos cubriendo la membrana, el rojo acumula valores altos a lo largo y ancho de la imagen. La componente azul produce lo contrario, una imagen oscura en la que también se dificulta distinguir las formas de los vasos, especialmente en la parte inferior derecha donde hay menos luz. La componente verde produce una imagen con algo más de contraste entre las zonas con vasos sanguíneos y el fondo. Estas imágenes son lo suficientemente claras para que el ojo humano y nuestro cerebro sepan detectar los vasos sanguíneos, pero la vaguedad de los grises hace que no resulte sencillo automatizar esta detección por computador.

Anteriormente se indicó la existencia de gran cantidad de espacios de color, como pueden ser  $L^*a^*b^*$ , CMYK o HSV. Este último resulta de especial interés para este trabajo. HSV separa la imagen en Hue (matiz), Saturation (saturación) y Value (brillo). Esto produce componentes de mayor contraste de color a lo largo de la imagen, evitando distorsiones por la iluminación irregular como la zona oscura de la esquina inferior derecha de la imagen ejemplo.

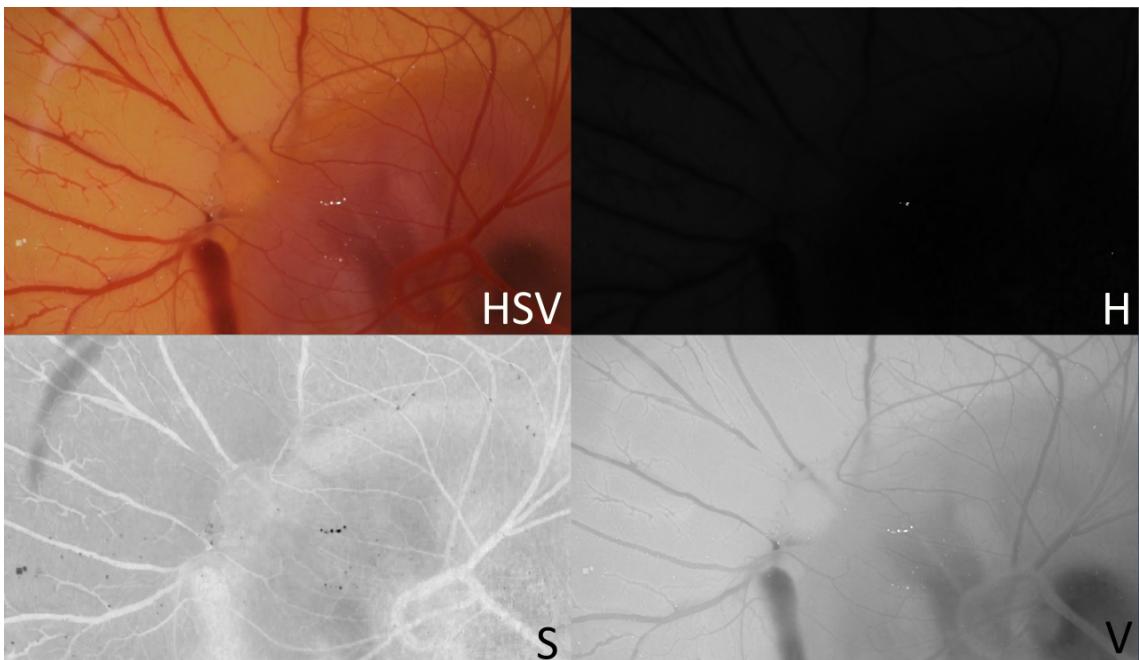


Figura 2.8: Separación de una imagen CAM en sus tres componentes HSV.

Como se puede ver en la figura 2.8, la componente de saturación destaca en valores muy altos las estructuras vasculares, y en la componente del matiz, son prácticamente negras. Esto resultará de gran utilidad más adelante, para detectar automáticamente estas estructuras.

### 2.2.3. Umbralización

La umbralización (thresholding en inglés) consiste en la separación de uno o varios objetos de la imagen de su entorno o fondo. Funciona estableciendo uno o varios umbrales en la imagen, y asignando un valor determinado a cada pixel según supere o no estos umbrales. Así, el valor de cada punto  $(x, y)$  de la imagen  $g$  tras una umbralización con umbral  $T$  será:

$$f(x, y) = \begin{cases} 255 & g(x, y) \geq T \\ 0 & \text{En cualquier otro caso} \end{cases} \quad (2.2)$$

Todos aquellos puntos que tengan un valor en la imagen superior a  $T$  tendrán valor máximo, y lo demás 0, produciendo una imagen en la que destaca en blanco el objeto a segmentar sobre el fondo. El resultado de esta técnica depende casi por completo del umbral escogido y, dependiendo de la imagen, puede no existir un umbral que separe

perfectamente el objeto y ninguna parte del fondo. Así pues, hallar un umbral que satisfaga las necesidades de segmentación y conseguir una imagen en la que la umbralización sea una forma efectiva de segmentar es una técnica en sí misma.

En este trabajo se utilizó el Algoritmo de Otsu para hallar el umbral que mejor segmenta las imágenes de forma automática. Este algoritmo busca el umbral que mejor separe la imagen en regiones que sean distintas entre ellas y parecidas en su interior. Para hacer esto, se toma como indicación de la bondad de un umbral la varianza entre los píxeles de una misma clase, la varianza *inter-clase*, quedándose con el umbral que minimice dicha medida.

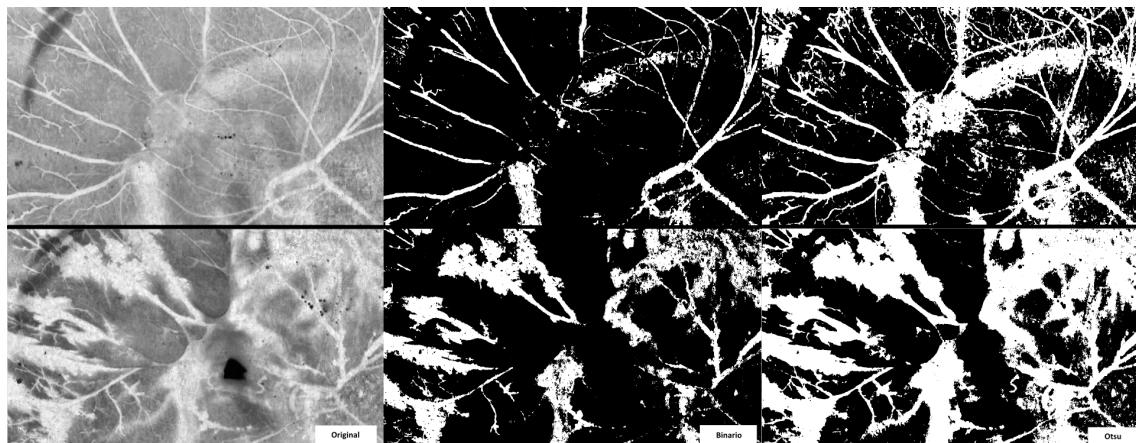


Figura 2.9: Umbralización de dos imágenes de un mismo vídeo, antes y después de producirse sangrado.

La figura 2.9 muestra una umbralización de dos imágenes de un mismo vídeo, una antes de la adición de un irritante y otra después. La imagen de la izquierda es la original (en este caso la componente de saturación con una mejora del contraste), la imagen intermedia es un umbral ajustado manualmente y la de la derecha uno generado automáticamente utilizando Otsu. Nótese en ambos casos el incremento de la zona segmentada como "sangre" tras la adición del compuesto.

#### 2.2.4. Histograma y Ecualización

El histograma de una imagen muestra la distribución de valores que toman sus píxeles. Es decir, que muestra la cantidad de puntos que toman cada valor dentro del espectro mostrado en la imagen, independientemente de la distribución espacial de los mismos. Esto permite, entre otras cosas, hallar entre qué valores se comprime gran parte de la información de la imagen, y qué partes del espectro no contienen apenas puntos.

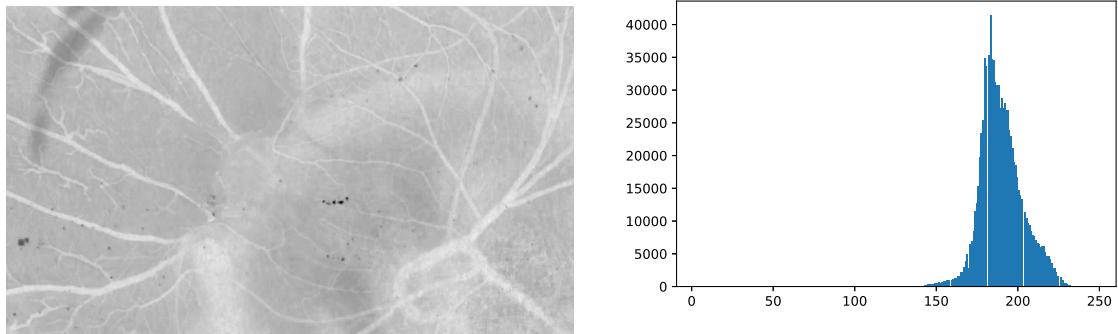


Figura 2.10: Imagen con su histograma.

La figura 2.10 muestra una imagen de la componente saturación junto con su correspondiente histograma. Nótese la acumulación de puntos en torno a 160-180, comprimiendo gran parte de la imagen en una banda estrecha de color. Aplicando una ecualización de histograma, se pueden redistribuir los valores de forma que las zonas que aglutan mucha información estén distribuidas en un espectro mayor y los valores que no contienen apenas píxeles ocupen un rango menor. Una ecualización básica de histograma utilizará el histograma acumulado de la imagen  $H_c(g)$  que, siendo  $H(g)$  el histograma de la imagen, se define como:

$$H_c(g) = \sum_{i=0}^g H(i) \quad (2.3)$$

Con él podemos definir la función de transformación  $T(g)$  que a un valor de gris  $g$  asignará su nuevo valor en el histograma ecualizado:

$$T(g) = \frac{H_c(g)}{M \times N} \times 255 \quad (2.4)$$

Donde  $M \times N$  son las dimensiones de la imagen.

En la figura 2.11 se puede apreciar el efecto de una ecualización de histograma a la misma imagen que en 2.10. Nótese la redistribución de puntos a lo ancho del espectro y el cambio que provoca esto sobre la imagen.

En ocasiones, no basta con simplemente ecualizar el histograma en base a la información global, sino que conviene utilizar una aproximación más local que tenga en cuenta los valores de pequeñas zonas de la imagen. Esto se conoce como ecualización adaptativa de histograma, donde se realiza la misma función pero por separado en pequeñas zonas o *tiles*. Hacer esto conllevaría también un aumento del ruido en caso de tenerlo en ciertas zonas.

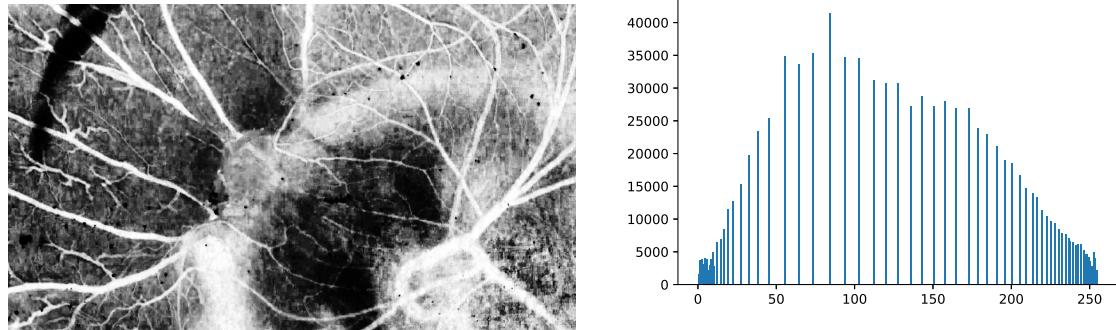


Figura 2.11: Imagen con su histograma tras ecualización.

Para evitar esto se utiliza una técnica de limitación de contraste, donde si una zona supera un cierto umbral de contraste entre sus píxeles, estos son redistribuidos equitativamente a lo largo del histograma. Estas técnicas en conjunto son conocidas como CLAHE, *Contrast Limited Adaptive Histogram Enhancement*.

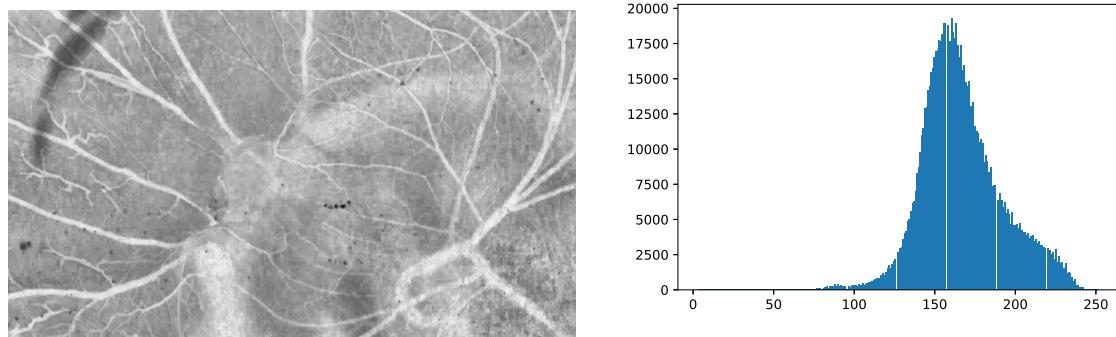


Figura 2.12: Imagen con su histograma tras aplicación de CLAHE.

La figura 2.12 muestra el resultado de aplicar esta técnica a la misma imagen. En 2.13 podemos ver la diferencia al aplicar la umbralización de Otsu a una imagen ecualizada globalmente y a la misma usando CLAHE. Hay una gran diferencia entre la cantidad de ruido de fondo que queda segmentado como vaso sanguíneo utilizando la aproximación básica y la ecualización adaptativa, especialmente en el lado derecho de las imágenes. Es por ello que en este trabajo se utiliza CLAHE para ayudar en la mejora de contraste antes de umbralizar las imágenes.

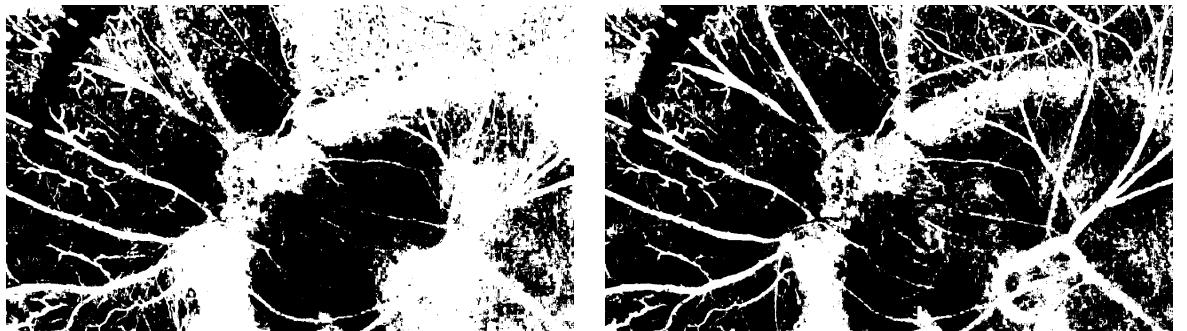


Figura 2.13: Comparativa en umbralización de imagen con ecualización de histograma global (izq) y CLAHE (der).

### 2.2.5. Convolución

En procesamiento digital de imágenes se suele utilizar la operación de convolución 2D, esta consiste en, considerando la imagen como una gran matriz bidimensional de puntos, aplicar punto a punto una matriz o máscara de filtrado. El resultado de la aplicación de esta matriz de filtrado será el sumatorio del resultado de los productos de cada punto de la matriz de filtrado por el punto de la matriz imagen sobre el que recae.

Formalmente se puede expresar de la siguiente manera:

$$(f \cdot g)(i, j) = \sum_{s=-a}^a \sum_{t=-b}^b f(i + s, j + t) \cdot g(s, t), i = a..(M - a), j = b..(N - b) \quad (2.5)$$

Para una imagen  $f$  de tamaño  $M \times N$ , una máscara  $g$  de tamaño  $m \times n$ , con  $a = \frac{m-1}{2}$  y  $b = \frac{n-1}{2}$ . La imagen 2.14 muestra este proceso de forma gráfica.

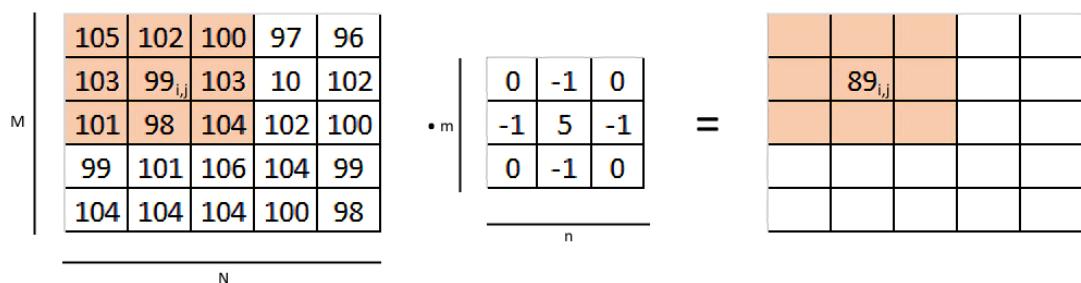


Figura 2.14: Ilustración de convolución 2D.

Para un proceso de convolución completo, se realiza esta operación para cada pixel de la imagen, creando una nueva imagen a partir del resultado de todos los puntos. Esto resulta de utilidad para la aplicación de filtros, como el gaussiano, o para el uso de operadores morfológicos.

### 2.2.6. Operaciones Morfológicas

El procesado morfológico de imágenes se basa en el álgebra de conjuntos y en la topología. Se toma como imagen un subconjunto del espacio 2D de todos los enteros  $Z^2$ . Cada punto de la imagen se representa con un par de coordenadas enteras indicando su posición y, en su forma más básica, tomarán los valores 0 o 1 según pertenezcan a un objeto o no. En las operaciones morfológicas se cuenta con un elemento estructurante (E.E.). Este elemento actúa como la máscara de filtrado en una convolución y se aplica sobre la imagen utilizando operaciones de álgebra de conjuntos, como la unión, intersección, complemento o diferencia a los puntos sobre los que recae. A continuación se explican las operaciones morfológicas básicas:

- **Dilatación:** la dilatación consiste en expandir el objeto haciendo que su salida sea el conjunto de los puntos barridos por el centro del EE cuando algún punto del mismo coincidía en algún punto de la imagen original. Así, la dilatación de la imagen I por el elemento estructurante E, será

$$I \oplus E = \{p \in \varepsilon^2 : p = i + e | i \in I, e \in E\} \quad (2.6)$$

0	1	0	0
0	1	0	0
1	1	0	0
0	0	1	0

⊕

1	1
---	---

=

0	1	1	0
0	1	1	0
1	1	1	0
0	0	1	1

I                          E                           $I \oplus E$

Figura 2.15: Ejemplo de dilatación morfológica con un elemento estructurante horizontal.

- **Erosión:** la erosión contrae el objeto, de forma que su salida equivale al conjunto de puntos que pueden contener el EE, y deja fuera todos aquellos en los que este no

quepa. La erosión de la imagen  $I$  por el elemento estructurante  $E$  es

$$I \ominus E = \{p \in \varepsilon^2 : p + e \in I, \forall e \in E\} \quad (2.7)$$

0	1	0	0
0	1	0	0
1	1	0	0
0	0	1	0

Θ

1	1
---	---

=

0	0	0	0
0	0	0	0
0	1	0	0
0	0	0	0

I                    E                     $I \ominus E$

Figura 2.16: Ejemplo de erosión morfológica con un elemento estructurante horizontal.

- **Apertura:** erosión de la imagen original con un elemento estructurante seguida de una dilatación con el mismo EE. Esto separa objetos en puntos estrechos, elimina protuberancias donde el objeto no quepa y evita salientes, redondeando las esquinas. Su fórmula es

$$I \circ E = (I \ominus E) \oplus E \quad (2.8)$$

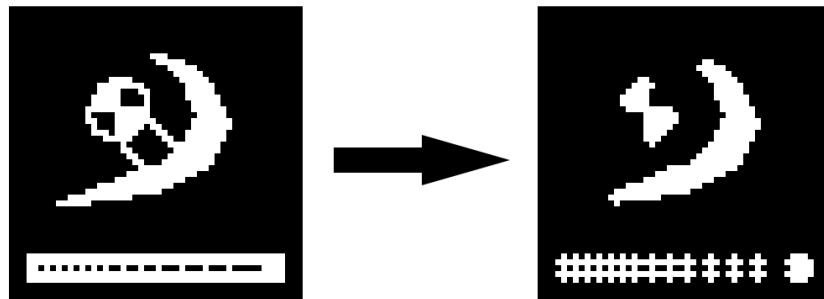


Figura 2.17: Ejemplo de apertura usando un elemento estructurante con forma de cruz.

- **Cierre:** dilatación de la imagen original con un elemento estructurante seguida de una erosión con el mismo. De esta forma se rellenan agujeros y vacíos en el contorno, se conectan objetos próximos que previamente estaban separados y alisa contornos rugosos. Describo por

$$I \bullet E = (I \oplus E) \ominus E \quad (2.9)$$

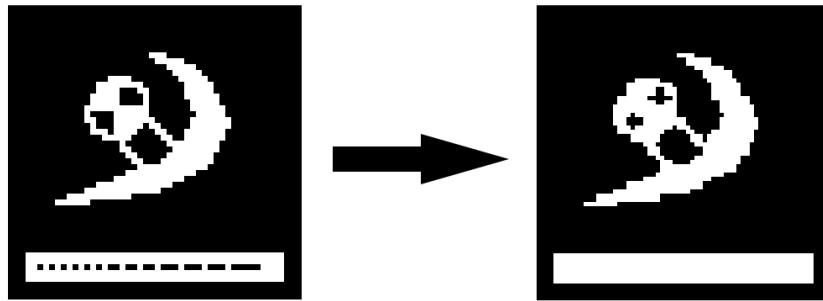


Figura 2.18: Ejemplo de cierre usando un elemento estructurante con forma de cruz.

Estas operaciones permiten trabajar sobre imágenes binarias de forma sencilla, siendo de gran utilidad para encontrar contornos y fronteras, separar o juntar figuras y trabajar en general sobre imágenes previamente umbralizadas. Además, con un sencillo ajuste, nos permiten trabajar sobre imágenes en escalas de gris, que son las que encontraremos tras separar las componentes de los fotogramas de los vídeos.

- **Dilatación en escala de grises:** consiste en aplicar un filtro de máximo con la máscara dada por el elemento estructural (asumiendo que éste es simétrico respecto del origen). Viene dado por:

$$(I \oplus E)(s, t) = \max\{I(s - x, t - y) + E(x, y) \quad t.q. \quad (s - x, t - y) \in D_I, (x, y) \in D_E\} \quad (2.10)$$

Donde  $D_I$  es el dominio de la imagen  $I$  y  $D_E$  el de la máscara  $E$ .

- **Erosión en escala de grises:** análogamente a la dilatación en escala de grises, la erosión utiliza un filtro de mínimos como EE, con las mismas consideraciones que con la dilatación. Su fórmula es:

$$(I \ominus E)(s, t) = \min\{I(s - x, t - y) - E(x, y) \quad t.q. \quad (s - x, t - y) \in D_I, (x, y) \in D_E\} \quad (2.11)$$

Donde  $D_I$  es el dominio de la imagen  $I$  y  $D_E$  el de la máscara  $E$ .

- **Apertura y cierre en escala de grises:** Combinar dilatación y erosión crea las operaciones de apertura y cierre, igual que utilizando imágenes binarizadas. Así la apertura se definirá como

$$I \circ E = (I \ominus E) \oplus E \quad (2.12)$$

y el cierre como

$$I \bullet E = (I \oplus E) \ominus E \quad (2.13)$$

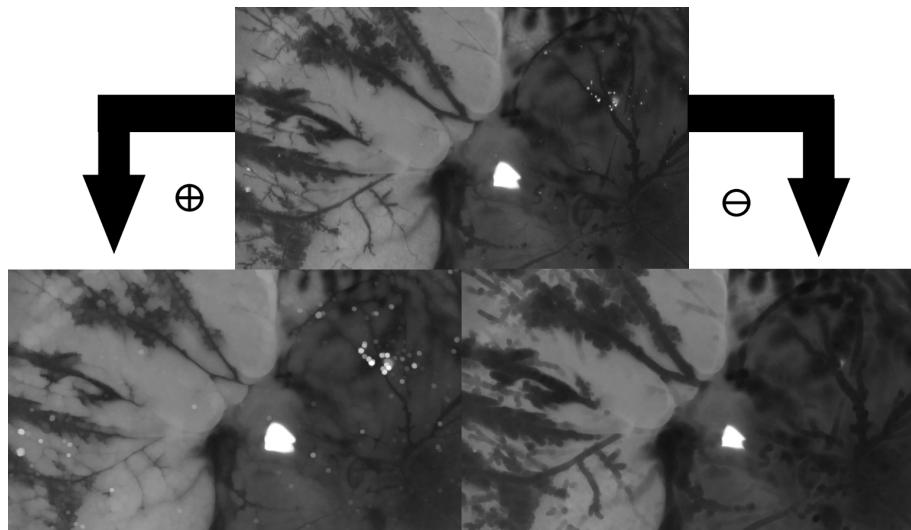


Figura 2.19: Ejemplo de aplicación de operadores morfológicos a escala de grises. Fotografía original (arriba), dilatación (izquierda) y erosión (derecha).

- **Extracción de contornos:** Los operadores morfológicos son de utilidad para extraer bordes de las imágenes utilizando la diferencia entre las imágenes originales y el resultado de la aplicación de los operadores. De forma similar, existe el gradiente morfológico, definido como la diferencia entre una dilatación y una erosión:

$$g = (I \oplus E) - (I \ominus E) \quad (2.14)$$

Éste resalta los cambios entre ambas imágenes, es decir, los contornos de las figuras. En este trabajo se utiliza una aproximación similar a esta, aunque algo más elaborada.

### 2.2.7. Filtrado Secuencial Alternante

Proviene de *Alternating Sequential Filtering*, o *ASF*. Es un tipo de filtrado morfológico utilizado para suavizar figuras irregulares en una imagen. Utiliza una serie de aperturas y cierres secuenciales, aplicados cada uno a la salida del anterior, y que usan como elemento estructural círculos progresivamente más grandes. Resulta de gran utilidad para detectar vasos sanguíneos por morfología, es decir, utilizando su forma. La fórmula de su forma utilizada en este trabajo es:

$$ASF(I, [a, b, c]) = (((((I \circ E_a) \bullet E_a) \circ E_b) \bullet E_b) \circ E_c) \bullet E_c \quad (2.15)$$

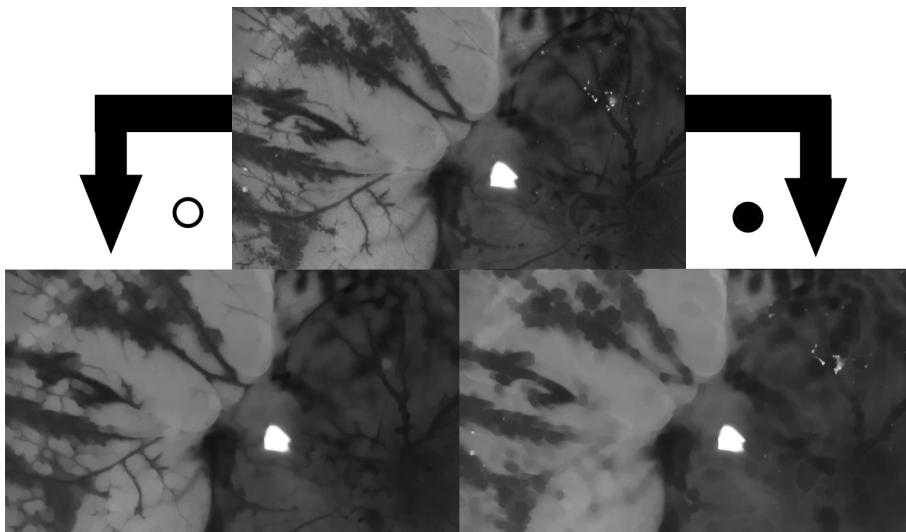


Figura 2.20: Ejemplo de apertura (izquierda) y cierre (derecha) sobre una imagen en escala de grises.

Dónde  $I$  es la imagen a filtrar,  $[a, b, c]$  son los diámetros de los elementos estructurantes utilizados y  $E_x$  es un elemento estructurante circular de radio  $x$ .

Una vez obtenida la imagen suavizada, puede realizarse una resta entre la imagen original y la filtrada para obtener una imagen diferencia, que muestra la forma de algunas figuras. Es esto lo que resulta de gran utilidad a este trabajo, a la hora de detectar vasos sanguíneos.

La figura 2.21 muestra cada paso de la aplicación de un ASF. En la esquina superior izquierda está la imagen original, seguida de, respectivamente, una apertura y un cierre con un EE de diámetro 5, apertura y cierre con EE de diámetro 11, apertura y cierre con diámetro 23 y, finalmente imagen diferencia entre la original y el último paso. Nótese como en blanco aparecen las figuras y bordes que se han ido perdiendo con la aplicación del filtro, independientemente del color original.

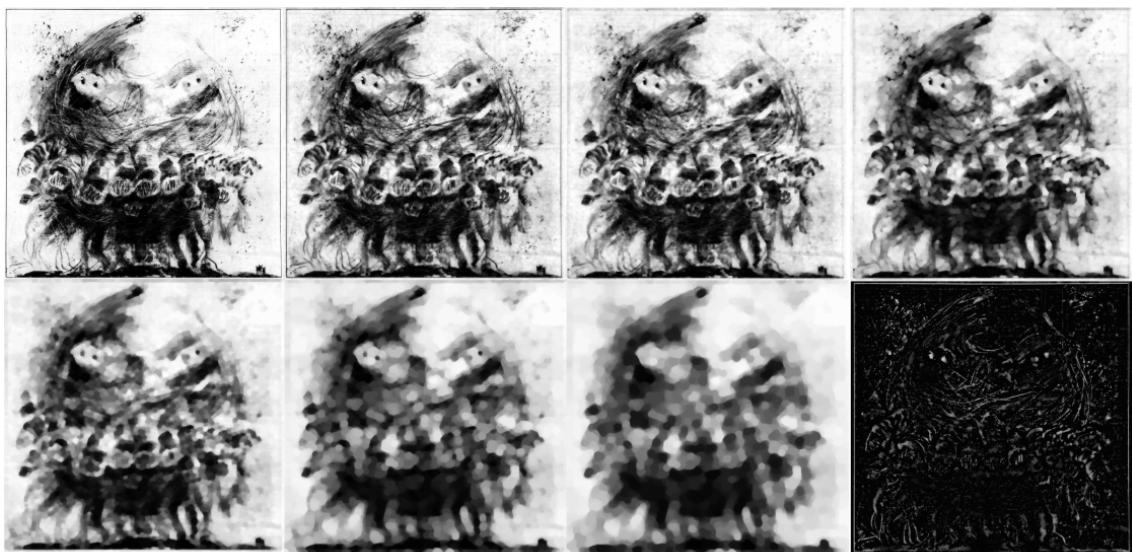


Figura 2.21: Aplicación de un Alternating Sequential Filter paso por paso.



# Capítulo 3

## Análisis del problema

Al comenzar el desarrollo de un proyecto de investigación, debe primero analizarse cómo abordar el problema. Este capítulo existe para explicar cómo se modeló inicialmente el problema para trasladarlo al dominio de la ingeniería y las bases de la metodología de análisis que se pretenden sentar.

### 3.1. Estructura del proyecto

Este proyecto está dedicado a investigar la posible aplicación de las ciencias de la computación a un experimento real. Para llevarlo a cabo, se eligió un modelo de desarrollo iterativo que permita analizar las métricas y técnicas a utilizar con los resultados que arrojan para determinar su viabilidad o relación con la información que se quiere extraer del proceso. El refinado y ajuste de estas técnicas permitirá obtener una base sobre la que trabajar en la siguiente iteración.



Figura 3.1: Diagrama de la metodología seguida a lo largo del trabajo.

La naturaleza de un proyecto de investigación como este, que requiere de un constante análisis de la validez y significado de sus resultados, encaja bien con una metodología de desarrollo de este tipo. De esta forma es posible extraer información útil tanto de aquellas técnicas que funcionan bien como las que por alguna razón no acaban de encajar en el problema.

Previo a desarrollarse el proyecto se estableció una planificación básica sobre cómo organizar el trabajo de investigación, constando de las siguientes fases:

- **Estudio del dominio:** Antes de adentrarse en cómo abordar el experimento se comenzó estudiando la información existente sobre la técnica HET-CAM, cómo se realiza, de qué pasos se compone y qué información se puede extraer del proceso.
- **Búsqueda de técnicas:** Debido a la naturaleza innovadora de la aplicación de técnicas de visión artificial a este proceso, existe poca información sobre qué herramientas pueden resultar útiles para obtener resultados. Así pues, se procede a buscar e investigar posibles técnicas con aplicación en otros campos como el análisis de imágenes de retina.
- **Estudio de la utilidad de la metodología:** A esta fase se le dedica la mayor parte del trabajo del proyecto, ya que consiste en la aplicación de las técnicas, el estudio de los resultados y refinado de la metodología de forma iterativa.

**Análisis:** Al comienzo de cada ciclo iterativo se analiza la información de la que se dispone, en un primer momento, se busca cómo llevar las técnicas que se han investigado a la práctica sobre este problema. En iteraciones posteriores se procede a estudiar los resultados anteriores, su correlación con los procesos de irritación observados en los vídeos y cómo mejorarlos.

**Diseño:** Antes de desarrollar la aplicación de las técnicas, se elabora un diseño de cómo ha de ser dicha aplicación, así como de qué resultados se pretende obtener y cómo presentarlos. El análisis de vídeos fotograma a fotograma puede ser muy costoso en términos computacionales, así que un diseño eficiente puede ahorrar en pruebas fallidas y tiempo perdido.

**Programación:** En cada iteración se lleva a cabo una aproximación al problema, siendo estas más refinadas según avanza el proceso de desarrollo. En esta fase se codifica un programa que aplique las técnicas de visión artificial que puedan resultar de interés. De dicho programa se podrán obtener resultados que arrojen luz sobre la utilidad de las herramientas utilizadas.

**Resultados:** La última fase de cada iteración consiste en el uso del programa desarrollado para procesar el material del que se dispone, y la extracción de resultados para analizar en el siguiente ciclo iterativo.

- **Desarrollo de una aplicación:** Para aprovechar el trabajo este estudio, se desarrolla una pequeña aplicación que pone en práctica las técnicas que han demostrado ser de utilidad a lo largo del proyecto. Su intención es ayudar a los expertos a realizar su trabajo de forma más cómoda y objetiva.

- **Realización de esta memoria:** Como última fase del proyecto, se procede a desarrollar esta memoria, que tiene como fin explicar y documentar el proceso de investigación seguido a lo largo del trabajo.

## 3.2. Planificación del Proyecto

Siendo este un proyecto de investigación en un campo en el que existen pocos precedentes y que pretende aplicar una serie de técnicas innovadoras, la planificación del mismo resulta complicada y sujeta a múltiples variaciones. En ocasiones las técnicas que se están investigando no producen los resultados esperados, en otras se persigue la utilidad de una metodología sólo para que esta demuestre ser de escaso valor para el trabajo. En ciertos casos, el material necesario para el proyecto no está disponible en el momento previsto y la investigación debe posponerse hasta que se disponga del mismo.

Todo esto dificulta el seguimiento del proyecto de una forma tradicional y estructurada, y conlleva modificar fechas, posponer ensayos y retrasar la evaluación de distintas técnicas. No obstante, se elaboró una línea base que asignara tiempo equivalente a las aproximaciones que se habían de realizar y un desarrollo paralelo de la aplicación que acompañaría a esta memoria junto con su redacción.

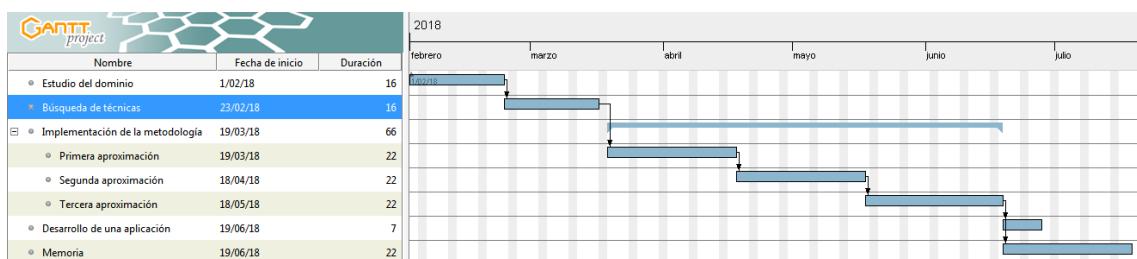


Figura 3.2: Planificación inicial del proyecto.

Debido a diversos factores como los anteriormente mencionados, errores de estimación, problemas con los proveedores de los huevos y otra serie de sucesos, la planificación pasó de ser como la mostrada en la figura 3.2 a la de la figura 3.3. Afortunadamente, se contó con tiempo suficiente como para el desarrollo de la metodología y los estudios pertinentes. No obstante, de haberse dispuesto de más tiempo y no haber empujado el desarrollo hacia el mes de agosto, se habría podido obtener más material con el que trabajar, así como más resultados de evaluaciones de expertos.

### Capítulo 3. Análisis del problema

---

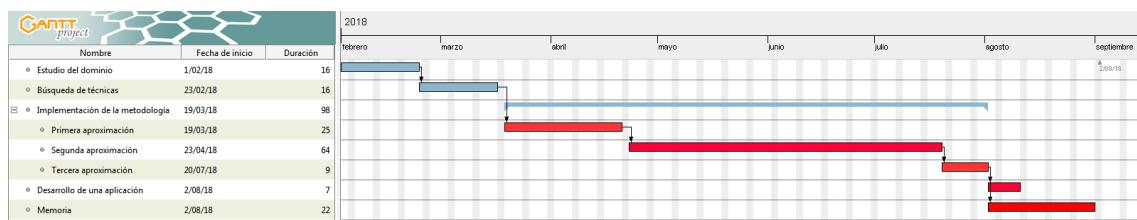


Figura 3.3: Desarrollo final del proyecto.

### 3.3. Modelización del Problema

Como se ha visto en el capítulo dedicado a la introducción al dominio, HET-CAM es un test experimental destinado a determinar el potencial irritante de compuestos farmacéuticos destinados a consumo humano. Este trabajo estudia la aplicación de las técnicas de visión artificial a este test, más concretamente, a analizar los resultados de este test en forma de vídeo. Así pues, independientemente de la técnica de adquisición de datos (que más adelante se demostrará de interés), el objeto de este estudio será una serie de fotogramas espaciados en el tiempo que muestran la evolución de una reacción de irritación de la membrana. Como también se ha podido comprobar en el análisis del dominio, en HET-CAM se busca temporizar los fenómenos de hemorragia, lisis y coagulación, y estas reacciones, en lugar de ser eventos situados en un punto del tiempo, constituyen más una evolución o un cambio visible en la estructura vascular.

Así pues, aprovechando que se dispone de una serie ordenada de fotogramas y que se buscan ciertas reacciones que son observables como un contraste respecto a cómo era la imagen antes y después de ocurrir, se decide modelar el problema como el análisis de la evolución de distintas características a lo largo del vídeo. Es decir, se analizará el vídeo fotograma a fotograma, tomando unas determinadas medidas en cada uno, y después se agruparán estas medidas en un eje temporal, permitiendo una visualización sencilla de su evolución. Dado que HET-CAM es utilizado para situar los compuestos dentro de un I.S. o Irritation Score, el análisis de dichas evoluciones debería permitir encuadrar el compuesto que las causa en una clase por similitud, además de permitir visualizar en un instante el desarrollo completo de la reacción, y de ser posible, esta representación será objetiva ya que estará basada en los datos extraídos en cada momento del vídeo.

### 3.4. Determinación de las Características

Una vez modelado el problema como la obtención de una evolución del proceso, la tarea más importante es determinar qué características son las que se deben extraer de los vídeos

### 3.4. Determinación de las Características

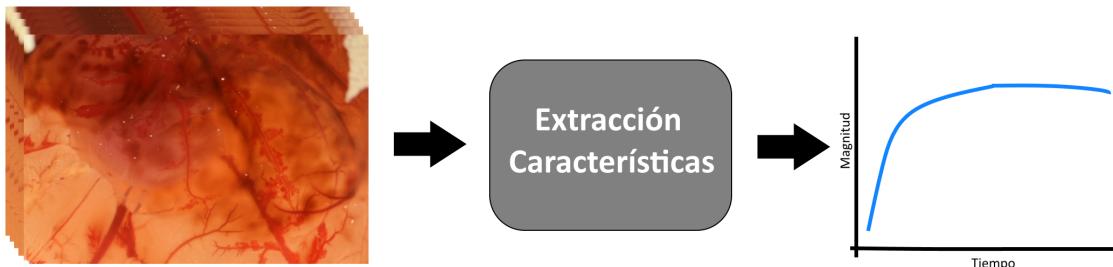


Figura 3.4: Modelo básico del proceso.

y cómo hacerlo. Como humanos, observando un vídeo de una estructura vascular sufriendo una hemorragia y deshaciéndose, es sencillo hacerse una idea (aunque sea subjetiva) de lo que está ocurriendo. Sin embargo, no es tan simple extraer esa información de un conjunto de píxeles mediante técnicas automáticas. Debe tenerse en cuenta además, que cada huevo posee una estructura singular, que el proceso de apertura de la cáscara puede dejar al descubierto distintas porciones del interior, debajo de la membrana corioalantoide. El embrión puede aparecer en el plano, éste además está en movimiento continuo y variable. A esto hay que añadirle que, por desgracia, en muchos casos el método de adquisición de los vídeos no es el más correcto y pueden darse movimientos externos, cambios de iluminación o, peor aún, compresión de los archivos, con cambios de resolución. Todos estos problemas dificultan mucho la tarea de conseguir una evolución clara en el vídeo, que se refiera únicamente a los procesos biológicos que están teniendo lugar y no a ningún factor externo. Con todo esto, debe abordarse tanto la extracción de características correctas y válidas como el método de adquisición del material, a fin de que siguiendo un proceso riguroso se eviten interferencias externas.

En el capítulo dedicado a la implementación de la metodología se abordan en detalle las características que se utilizaron para caracterizar la evolución del proceso. Sin embargo, en esta primera fase de análisis del problema ya se asume la idea intuitiva de utilizar técnicas de segmentación de vasos sanguíneos como una primera aproximación. Analizando los vídeos se puede observar la aparición de más capilares antes del comienzo de la hemorragia. Esto se ve acentuado al comenzar el sangrado, donde los vasos sanguíneos destacan más al haber mayor afluencia de sangre. Teóricamente, obtener una evolución de la parte de la imagen segmentada como estructura vascular debería mostrar un crecimiento acorde con el comienzo de la hemorragia, permitiendo determinar su aparición.

La figura 3.5 muestra las primeras reacciones hasta la hemorragia en una CAM impregnada con NaOH, nótese la aparición progresiva de capilares enrojecidos antes de la salida de la sangre. El cambio de color en el fondo de la imagen está provocado por condiciones mejorables de la iluminación en la adquisición y no es parte de la reacción del huevo.

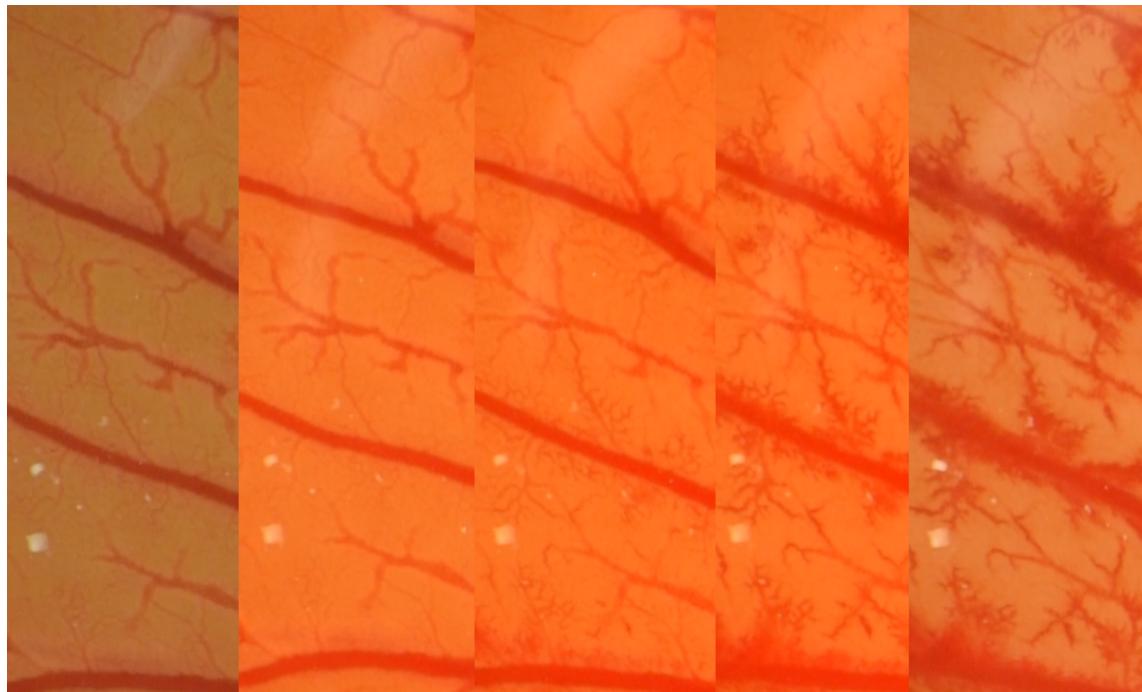


Figura 3.5: Evolución de los capilares en la respuesta a un proceso de irritación.

### 3.5. Metodología

En el momento en el que se cuenta con un modelado del problema y con una idea aproximada de la característica que se quiere obtener de las imágenes, se decide plantear la metodología de análisis de los vídeos. Esto es, el esquema inicial de los pasos que se han de dar para obtener los resultados a partir de las grabaciones. Ha de tenerse en cuenta que obtener esta metodología es el objetivo de este proyecto; en este apartado se presenta una primera aproximación, y esta ha sido refinada y ampliada en cada iteración del proceso.

- **Separación del vídeo en fotogramas equiespaciados:** En esta primera iteración, con intención de simplificar el proceso de analizar cada imagen, se separa la grabación en una serie de fotogramas con un intervalo fijo entre ellos y se almacenan como ficheros de imagen. De esta manera se puede acceder fácilmente a cada uno de los fotogramas tanto con el programa a diseñar como con herramientas externas, y pueden aplicarse técnicas de procesamiento digital de imagen a fotogramas representativos de forma sencilla, para comprobar sus efectos.
- **Mejora de la imagen:** A cada fotograma que se quiera analizar se le aplica una técnica de mejora de la imagen para ayudar al sistema a detectar mejor las características.

- **Extracción de características:** Se aplica una técnica de segmentación (en esta primera aproximación a la metodología, detección de vasos sanguíneos) a cada imagen, obteniendo un dato numérico. Este debería ser representativo de los daños sobre el tejido en cada instante de tiempo.
- **Acumulación de resultados:** Obteniendo para cada fotograma una cifra asociada con su estado en ese instante, se acumulan los resultados en un vector ordenado para su posterior presentación.
- **Presentación de resultados:** Una vez analizados todos los fotogramas de la grabación y obtenido un vector con los datos obtenidos para cada instante, se procede a representar la evolución como una gráfica sobre un eje temporal.



Figura 3.6: Esquema inicial de la metodología a aplicar.



# Capítulo 4

## Implementación de la metodología

En el presente capítulo se mostrarán los pasos que se dieron para utilizar el modelado y la metodología explicados en el análisis del problema. Contendrá una explicación detallada de las herramientas computacionales utilizadas en cada una de las iteraciones, su funcionamiento, sus efectos y los resultados que permitieron obtener. Considérese este capítulo como un compendio de las opciones estudiadas a lo largo del trabajo, cómo se llevaron a cabo y de qué manera pueden ser útiles para el objetivo de este proyecto.

### 4.1. Análisis global por vasos sanguíneos

Contando con un modelo del problema y una metodología básica que aplicar, se pasa a la acción diseñando e implementando un sistema que sea capaz de realizarlos, con el fin de obtener unos resultados que indiquen la utilidad o no de la metodología ideada. En esta primera aproximación se utiliza como única característica determinante del proceso de irritación la detección de vasos sanguíneos. Se busca un vídeo representativo de un proceso de irritación extremo, se descompone en fotogramas para facilidad de uso y se procede a observar la aplicabilidad de técnicas de detección de vasos a las imágenes. Cuando se obtiene un resultado satisfactorio se procede a aplicarlo a la totalidad de la grabación y a analizar si la cronología de resultados es acorde al proceso inflamatorio.

#### 4.1.1. Análisis y diseño

Como fase inicial de la primera iteración, se comienza con buscar una técnica de detección de vasos sanguíneos que tenga aplicabilidad en las imágenes de la membrana corioalantoide. Se opta por utilizar una técnica que utiliza un Filtro Secuencial Alternativo, seguido de una detección de contornos para segmentar. Esta técnica es utilizada para la extracción de características en imágenes de fondo de ojo [12]. Su funcionamiento es sencillo, una vez comprendidas las ideas básicas explicadas en el capítulo de introducción al dominio.

Inicialmente se toma la imagen a todo color, se separa en sus tres componentes para utilizar la verde y se mejora utilizando CLAHE. Tras esto, se aplica un filtro secuencial alternativo con tres ciclos apertura-cierre como el del ejemplo y, con la imagen filtrada

se calcula la diferencia con la componente verde mejorada. A esta imagen diferencia se le vuelve a aplicar CLAHE para mejorar la visibilidad y se umbraliza con un umbral muy bajo. Esto produce una imagen binaria en la que sólo resaltan los objetos cuyos detalles se han perdido en el filtrado.

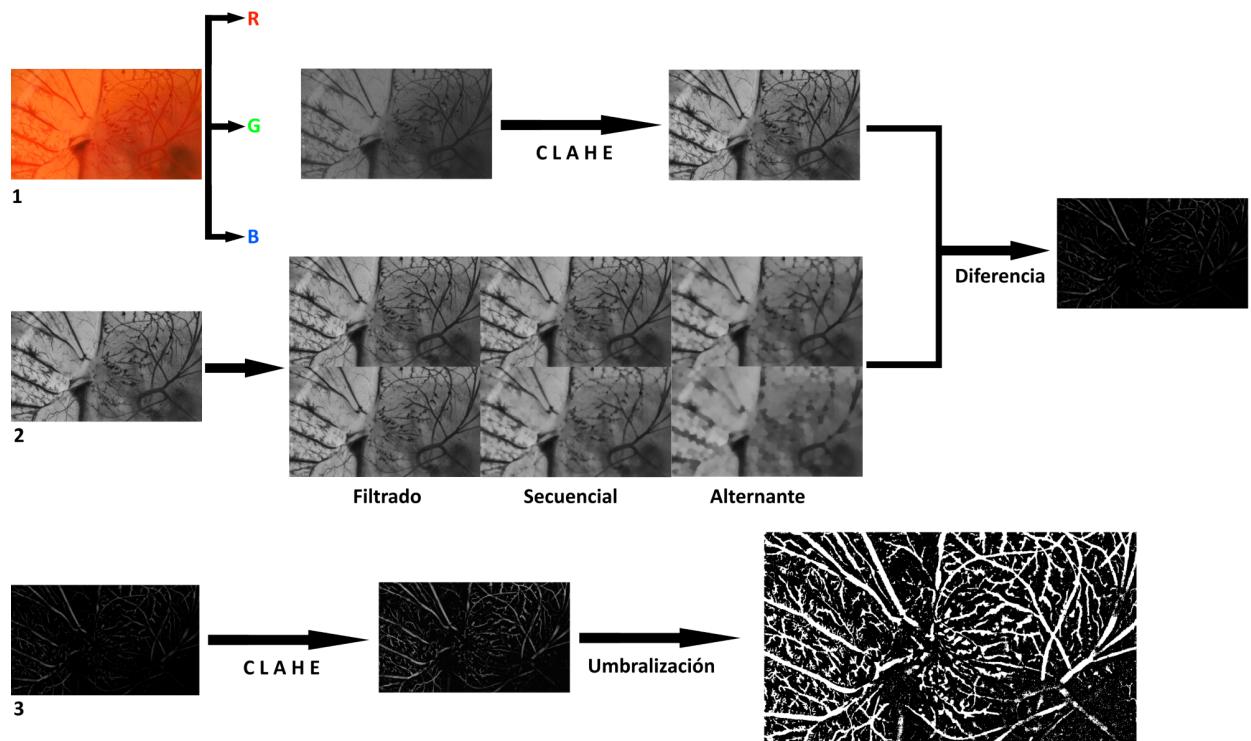


Figura 4.1: Primeros pasos de la segmentación de vasos sanguíneos.

La figura 4.1 muestra este proceso con ejemplos. Se puede observar que la imagen del final de este proceso resalta los vasos sanguíneos, pero también contiene mucho ruido que se ha acentuado con el proceso. Para eliminar este ruido y mantener únicamente la superficie de los vasos sanguíneos se realiza una detección por contornos como último refinado. Como el objetivo es obtener únicamente la ramificación de la estructura vascular, en general conexa, se intentan separar las pequeñas partículas del ruido. Esto se realiza creando una máscara que contiene todos los contornos detectados en la imagen de superficie inferior a un umbral. Esta máscara será toda ella positiva salvo aquellos puntos etiquetados como ruido. Lo único que queda por hacer es eliminar de la imagen todos los puntos que falten en la máscara y umbralizar de nuevo para obtener la estructura vascular de la imagen.

En la figura 4.2 se muestra el resto de este proceso hasta la obtención de la imagen segmentada final, que únicamente contiene los píxeles detectados como vasos sanguíneos. El resultado final comparado con el fotograma original pueden observarse en la figura 4.3.

#### 4.1. Análisis global por vasos sanguíneos

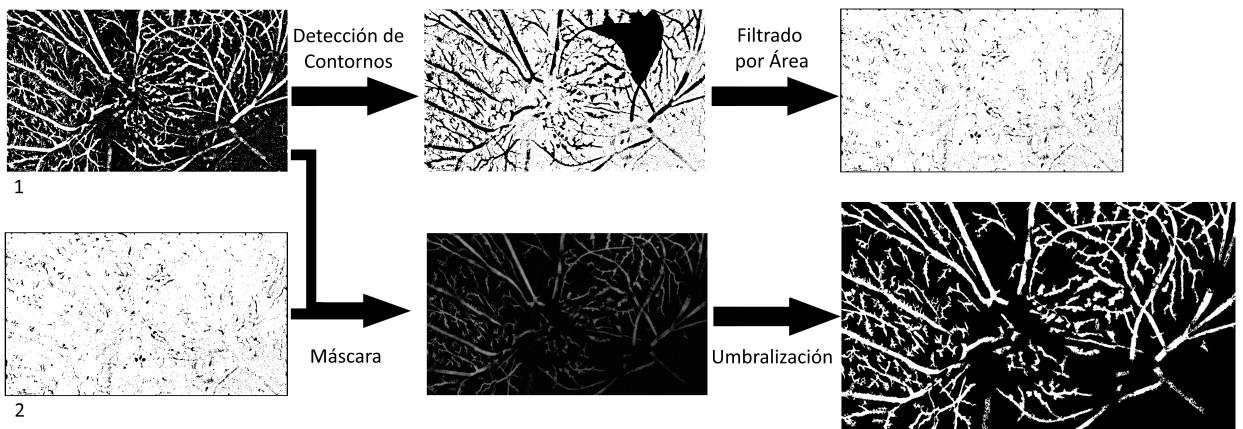


Figura 4.2: Filtrado final de la segmentación de vasos sanguíneos.

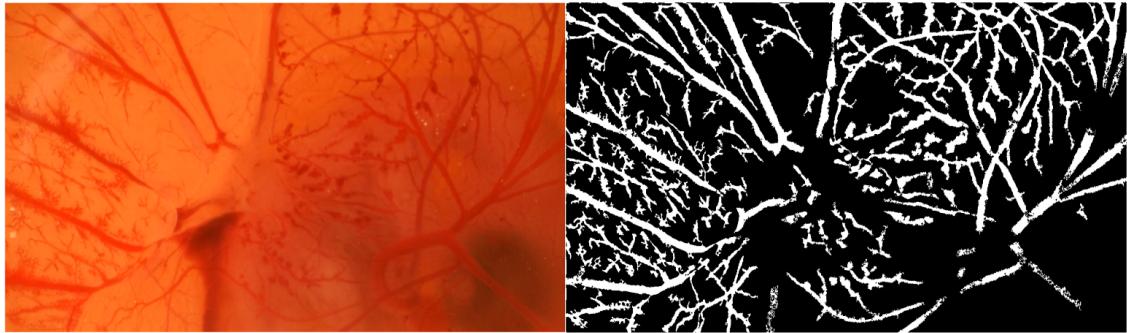


Figura 4.3: Comparativa final de segmentación de vasos sanguíneos.

Esta segmentación no es perfecta pero se aproxima lo suficiente como para percibir los cambios que se producirán según avance el proceso inflamatorio.

En esta primera fase se diseñó una infraestructura básica que permitiera llevar a cabo las pruebas pertinentes y observar los resultados a la vez que fuera flexible para permitir todos los cambios que fueran necesarios para modificar y ajustar cualquier fase del proceso. Para poder desarrollar dicha infraestructura, hubo que elegir un paradigma adecuado para el desarrollo de esta metodología.

Dado que este proyecto está orientado a estudiar la viabilidad de la aplicación de distintas técnicas de visión artificial, se requiere de un entorno de desarrollo flexible, en el que resulte sencillo realizar cambios e implementar funcionalidades complejas. Además, ya que este trabajo está enfocado al análisis de vídeos, se deberá utilizar una librería dedicada al análisis de imagen, que sea capaz de extraer imágenes de los vídeos y realizar transformaciones y operaciones sobre las mismas.

Con estas consideraciones, se decidió desarrollar este trabajo utilizando Python. Python es un lenguaje multi-paradigma. Soporta tanto programación imperativa como orientada a objetos, además de funcional. Se trata de un lenguaje interpretado y usa tipado dinámico. Todo esto lo dota de gran flexibilidad y facilidad de uso para desarrollar técnicas que pueden estar sujetas a cambios y ajustes constantes. Otra gran ventaja de Python para el desarrollo de este proyecto es la gran cantidad de bibliotecas abiertas disponibles para él. Esto incluye la librería de tratamiento de imagen OpenCV, que también resultó de gran utilidad para este trabajo, ya que proporciona la funcionalidad que se requiere para extraer información de los vídeos, analizar y transformar sus imágenes, así como representar los resultados obtenidos después del proceso.

Así, basándonos en la sintaxis y funcionalidad que nos aporta Python, el código para esta primera aproximación resultaría muy sencillo, y puede resumirse en el siguiente pseudocódigo:

```
def analizar_imagen(imagen):

    # Se comienza por separar la imagen en componentes para obtener la verde
    # y a esta se aplica una ecualización de histograma CLAHE.
    verde = imagen[2]
    verde_mejorada = aplicar_clahe(verde)

    # A continuación se realiza un filtro secuencial alternante para obtener
    # las formas de los vasos sanguíneos.
    apertura_1 = apertura(verde_mejorada, EE_pequeno)
    cierre_1 = cierre(apertura_1, EE_pequeno)
    apertura_2 = apertura(cierre_1, EE_mediano)
    cierre_2 = cierre(apertura_2, EE_mediano)
    apertura_3 = apertura(cierre_2, EE_grande)
    cierre_3 = cierre(apertura_3, EE_grande)

    # Tras esto, se calcula la diferencia entre la imagen original y la filtrada
    diferencia = resta(cierre_3, verde_mejorada)
    diferencia_mejorada = aplicar_clahe(diferencia)
    diferencia_umbralizada = umbral_binario(diferencia_mejorada)

    # Como último paso se procede a eliminar el ruido
    mascara = unos[diferencia_umbralizada.forma] * 255
    contornos = encontrar_contornos(diferencia_umbralizada)
    para cnt en contornos:
        si cnt.area <= umbral:
            dibujar_contorno(mascara, cnt)
    contornos_vasos = bitwise_and(diferencia_mejorada, mascara)
    vasos_umbralizados = umbral_binario(contornos_vasos)
    devolver vasos_umbralizados.suma()
```

Aprovechando que OpenCV ya ofrece sus propias funciones para la aplicación de CLAHE, operaciones morfológicas y detección de contornos, únicamente resta aplicar esta función a todos los fotogramas, en cada uno obteniendo una medida de los píxeles identificados como vasos sanguíneos. Una vez repasados todos los fotogramas, se ordenarán las medidas en un eje temporal para mostrar una gráfica representativa de la evolución de los vasos sanguíneos, y por consiguiente, de la reacción de la membrana a la sustancia que se esté probando.

### 4.1.2. Implementación y resultados

La implementación se llevó a cabo utilizando el entorno de desarrollo Spyder con Python 3.6 y OpenCV 3. Para esta primera aproximación el programa desarrollado era muy sencillo y consistía principalmente en una sucesión de imágenes donde poder observar los efectos de la segmentación de los vasos sanguíneos a fin de poder ajustar los parámetros necesarios. En general el ajuste fue sencillo, únicamente hubo que buscar tres tamaños para los círculos utilizados en el filtrado morfológico, un umbral para binarizar las imágenes y otro como tamaño mínimo de los contornos que serían identificados como vasos.

Analizando visualmente las imágenes los parámetros que mejor resultado parecían arrojar, al menos en las pruebas a esta resolución fueron los siguientes:

Radio Pequeño	5 px
Radio Mediano	11 px
Radio Grande	23 px
Umbral Binarización	15
Umbral Tamaño	200 $px^2$

Se aplicaron estas técnicas para producir las imágenes que se han utilizado en este apartado como ejemplo. Para una primera aproximación, los resultados se pueden considerar satisfactorios, ya que la segmentación de vasos sanguíneos parece funcionar correctamente.

La figura 4.4 muestra algunos resultados intermedios de este proceso. Cada imagen original tiene debajo la segmentación de sus vasos. Se puede ver como la pipeta con la que se inocula el tejido no es detectada y como la aparición de nuevos vasos se ve reflejada en la segmentación, así como parte del sangrado. Sin embargo, parece destacable que hacia el final de proceso se detectan menos vasos que al principio.

En la figura 4.5 se puede observar el resultado de contabilizar los píxeles segmentados como vasos sanguíneos a lo largo del tiempo. En este vídeo, la mitad de la duración es metraje de la membrana sin impregnar, lo que se muestra en esa primera fase plana, alrededor de la frame 3100 se añade la sosa cáustica, provocando el valle que se observa en ese punto. Este está causado por la pipeta al pasar y tapar parte de los vasos. Tras esto se observa un rapidísimo crecimiento en el área detectada como vasos sanguíneos seguido de una caída hasta niveles inferiores a los del comienzo.

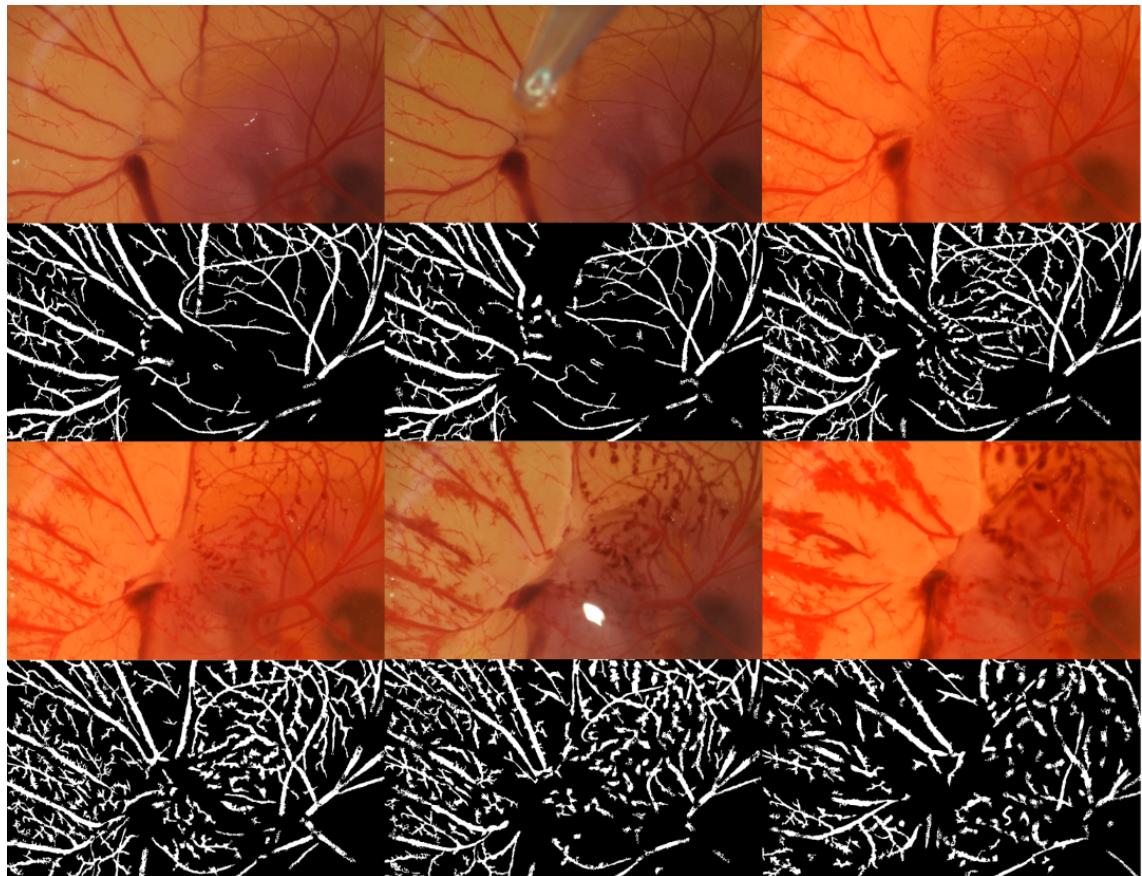


Figura 4.4: Evolución de los fotogramas en un vídeo con detección de vasos sanguíneos.

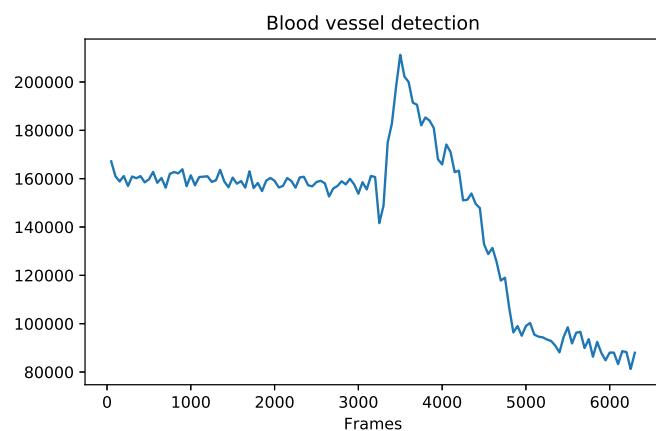


Figura 4.5: Gráfica del resultado de la primera iteración

Hay una razón importante por la que esto ocurre: el uso de filtros morfológicos para detectar vasos sanguíneos pierde efectividad en cuanto los vasos pierden su forma. Es decir,

el profuso sangrado en la superficie de los capilares deja de detectarse como parte del vaso sanguíneo y lo tapa. Esto ocurre porque el filtrado secuencial alternante está pensado para obtener formas sobre un fondo difuso, y las manchas de sangre convierten las formas en difusas, estas pasan el filtro y son separadas de la imagen, produciendo medidas inferiores a las que se obtenían cuando la estructura vascular estaba intacta.

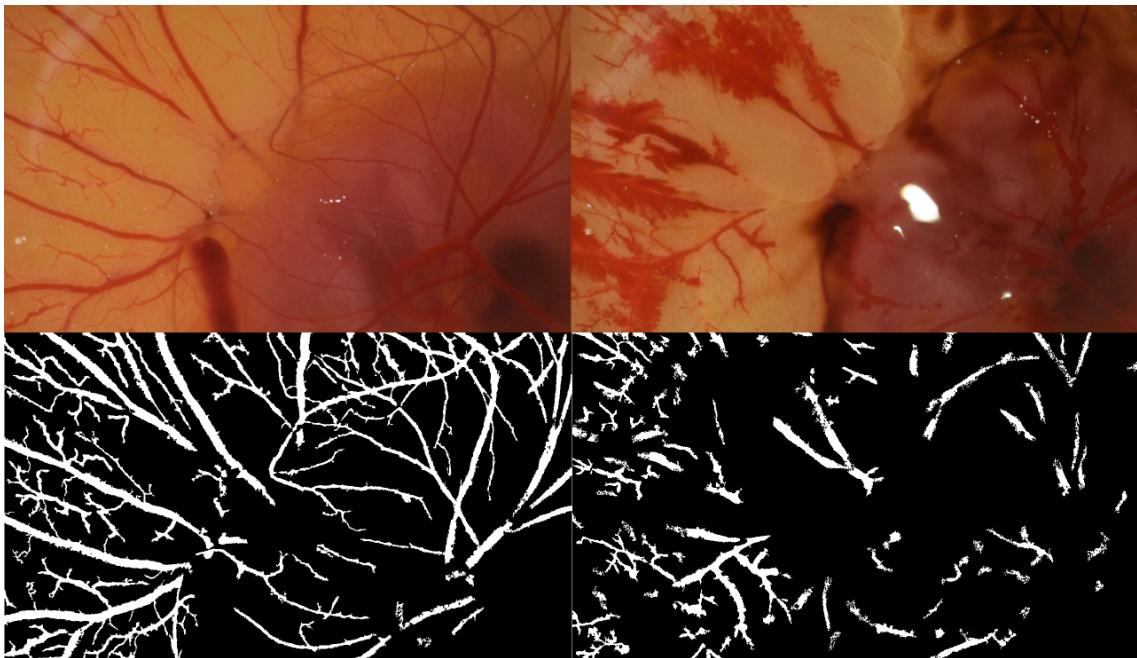


Figura 4.6: Comparación en la segmentación antes y después de la destrucción de la estructura vascular.

Este efecto se puede observar claramente en la figura 4.6, donde se muestra una imagen al comienzo del ensayo y una al final, con sus respectivas segmentaciones. A simple vista se observa que donde han aparecido grandes manchas de sangre se han dejado de detectar los vasos sanguíneos. Así pues, la situación es la siguiente: utilizando una técnica de segmentación de vasos sanguíneos obtenemos una zona sin crecimiento cuando no está ocurriendo nada, un rápido crecimiento al comienzo de la reacción seguido de una caída casi tan rápida hasta niveles inferiores provocada por la distorsión del sangrado.

Es esperable que la primera aproximación utilizando la característica que resulta intuitiva no describa perfectamente el proceso. Sin embargo, a pesar de este curioso fenómeno provocado por el excesivo sangrado, utilizar los vasos sanguíneos parece funcionar bien durante las primeras fases de la reacción, y demuestra no responder a eventos que no sean hemorragia, como se observa en la primera mitad de la gráfica en la figura 4.5.

Esto motiva investigar una aproximación conjunta, en la que no sólo se segmenten los vasos sanguíneos por su forma sino que se utilice algún mecanismo adicional para describir

la reacción. De esta manera debería haber un momento en el que la evolución de estas dos características se cruce, con la detección de vasos sanguíneos en caída y algún otro indicador en crecimiento.

## 4.2. Análisis global conjunto

Tras esta primera iteración del sistema, se procede a buscar una característica adicional para utilizarla en paralelo con la segmentación de vasos sanguíneos y de esta forma complementar la subsegmentación que ocurre al continuar el sangrado. El uso de estas dos características de forma conjunta debería poder describir de forma más completa la reacción de la membrana corioalantoide y crear una mejor representación de los datos que se pueden extraer de los vídeos.

### 4.2.1. Análisis

En el anterior apartado se podía observar que la segmentación de vasos sanguíneos no parece suficiente para modelar el proceso completo de irritación, pero que sí puede ser de utilidad para mostrar las primeras fases y no responde ante la ausencia de hemorragia. Dado que el problema con esta característica aparece en el momento en el que la hemorragia es tan grande que oculta la silueta de los vasos sanguíneos, el paso natural parece buscar una manera de segmentar la aparición de sangre sin utilizar la forma. Una manera de hacer esto es utilizando el color.

Utilizar el color para segmentar estos vídeos conlleva un cierto riesgo ya que, como se ha indicado antes, cada huevo posee una estructura vascular distinta y queda en distinta posición al abrirse. Los colores que se observan en la membrana corioalantoide dependen mucho de la iluminación y de la posición en la que esté el huevo. Cambiará mucho si hay parte de la albúmina directamente debajo o si estamos situados sobre el embrión. A esto hay que sumarle que las condiciones de iluminación en algunos de los vídeos son irregulares, y estos cambios de luz provocan inevitablemente cambios en el color, lo que complica este tipo de aproximación.

Las imágenes 4.7 y 4.8 ilustran este problema de encontrar una forma de segmentar utilizando color cuando este está sujeto a cambios. El problema de las diferencias entre distintas grabaciones puede considerarse menor, ya que encontrando una manera robusta de segmentar que sea capaz de trabajar en todos ellos aunque su resultado no sea perfecto, permitiría igualmente elaborar la evolución a lo largo del tiempo que el trabajo precisa. Esto es, mientras las condiciones de iluminación permanezcan estables en un mismo ensayo,



Figura 4.7: Cambios de color dentro de un mismo vídeo.

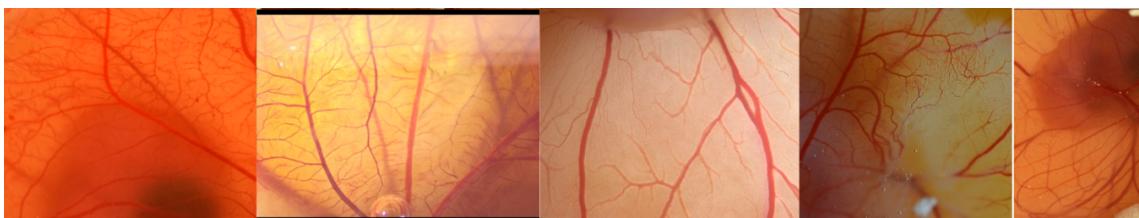


Figura 4.8: Diferencias en color entre distintos vídeos.

extraer la cantidad de sangre por color en un vídeo debería mostrar un crecimiento paralelo al sangrado, al margen de que la segmentación sea perfecta. Sin embargo, las variaciones de luminosidad dentro de una misma grabación suponen un grave problema, ya que los cambios en color pueden afectar a las medidas tomadas y verse reflejados en las gráficas, con crecimientos y caídas que no representan el sangrado real.

Con estas consideraciones, se procede a buscar una manera de segmentar las imágenes en base a su color. Como se ilustraba en el capítulo de introducción al dominio, existen gran cantidad de espacios de color sobre los que descomponer las imágenes para trabajar con ellas. En la anterior iteración se utilizaba la componente verde de *rgb* para comenzar la segmentación por forma ya que en esta componente destacan mucho los vasos sobre el color del fondo. De esta manera su forma queda destacada sobre el fondo y responde bien al filtrado *ASF*. No obstante, en las imágenes, los vasos sanguíneos quedan de un color gris, tirando a oscuro, pero que puede tomar valores en una banda tan amplia que dificulta su umbralización.

Para poder segmentar la sangre utilizando su color se utilizó el espacio *HSV*. Inicialmente, la componente *S* que muestra la saturación. En las imágenes producidas por esta componente, los vasos sanguíneos y la sangre toman valores muy altos, cercanos al blanco, independientemente de las condiciones de iluminación y brillo de la grabación. Esto simplifica mucho el proceso de segmentación, ya que si se consigue una imagen en la que destaque lo suficiente los vasos, únicamente hay que separar los píxeles que superan un cierto valor.

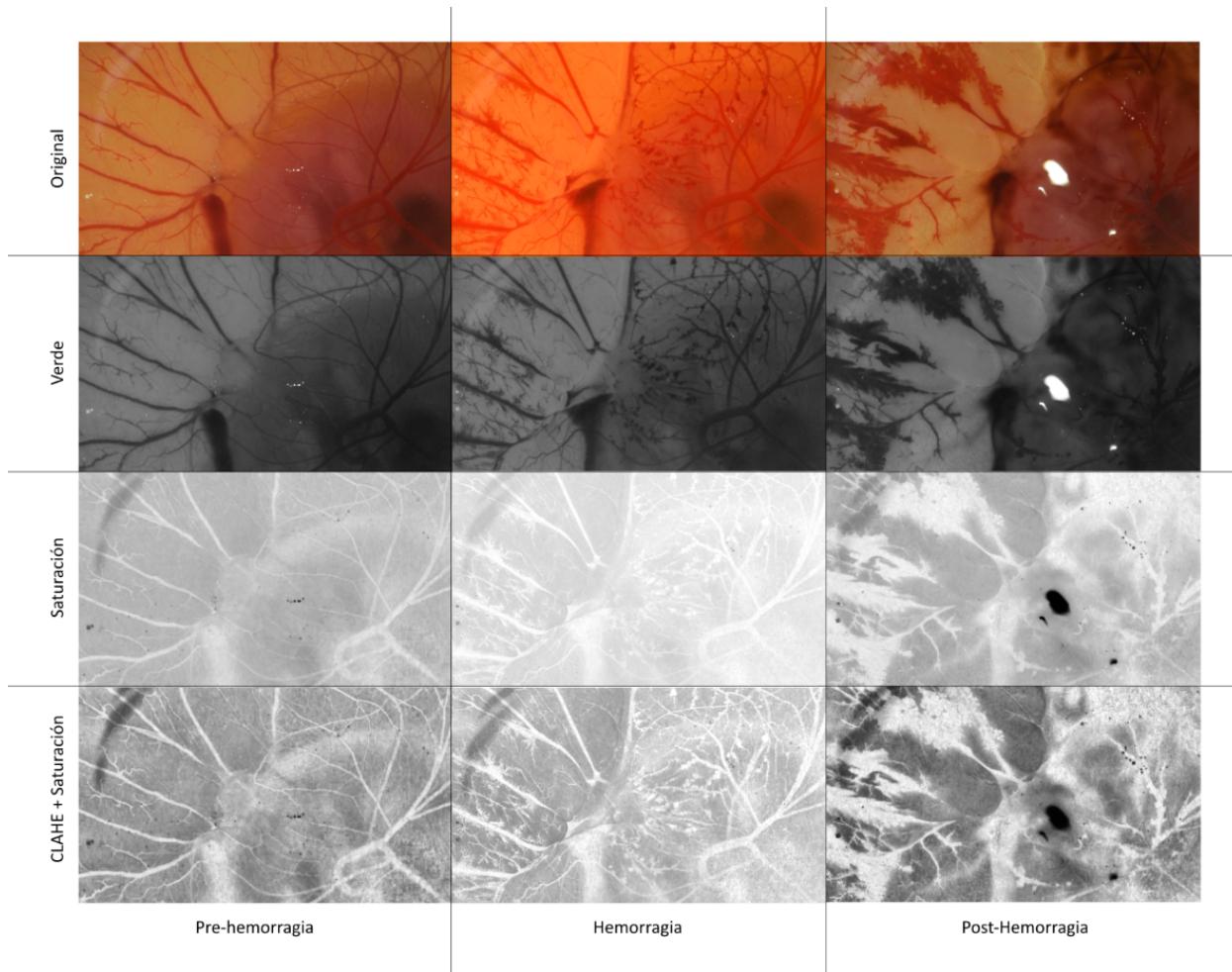


Figura 4.9: Comparativa entre la componente verde y la saturación para segmentar sangre.

Esto puede verse fácilmente en la figura 4.9, donde se muestran las imágenes originales en la primera fila, la componente verde en la segunda, la saturación en la tercera y CLAHE aplicado a la saturación en la última. Nótese que aunque la imagen se aclara un poco en la columna central y se oscurece en la final debido a los cambios de iluminación, lo que tiende a destacar en color blanco es la sangre, y que el oscurecimiento de la parte derecha de la imagen que destaca en la fila del verde es mucho menos pronunciado utilizando saturación.

De esta manera se simplifica mucho la tarea de umbralización. Dado que cada imagen va a estar construida en base al color y las tonalidades pueden variar con distintas iluminaciones, es necesario utilizar algún algoritmo capaz de encontrar un umbral satisfactorio automáticamente. En este trabajo se utilizó el algoritmo de Otsu, explicado en el capítulo de introducción al dominio. Como este algoritmo busca maximizar la diferencia entre las zonas segmentadas, que la sangre destaque en blanco sobre el gris ignorando luces y som-

bras supone una gran ventaja. El resultado de aplicar umbralización se puede observar en la figura 4.10. De forma análoga a la anterior imagen, la primera fila son las imágenes originales, la segunda una segmentación utilizando Otsu sobre la componente verde (post-CLAHE), la tercera la segmentación morfológica de los vasos sanguíneos utilizada en la anterior iteración y la última, la segmentación sobre la componente saturación después de aplicar CLAHE.

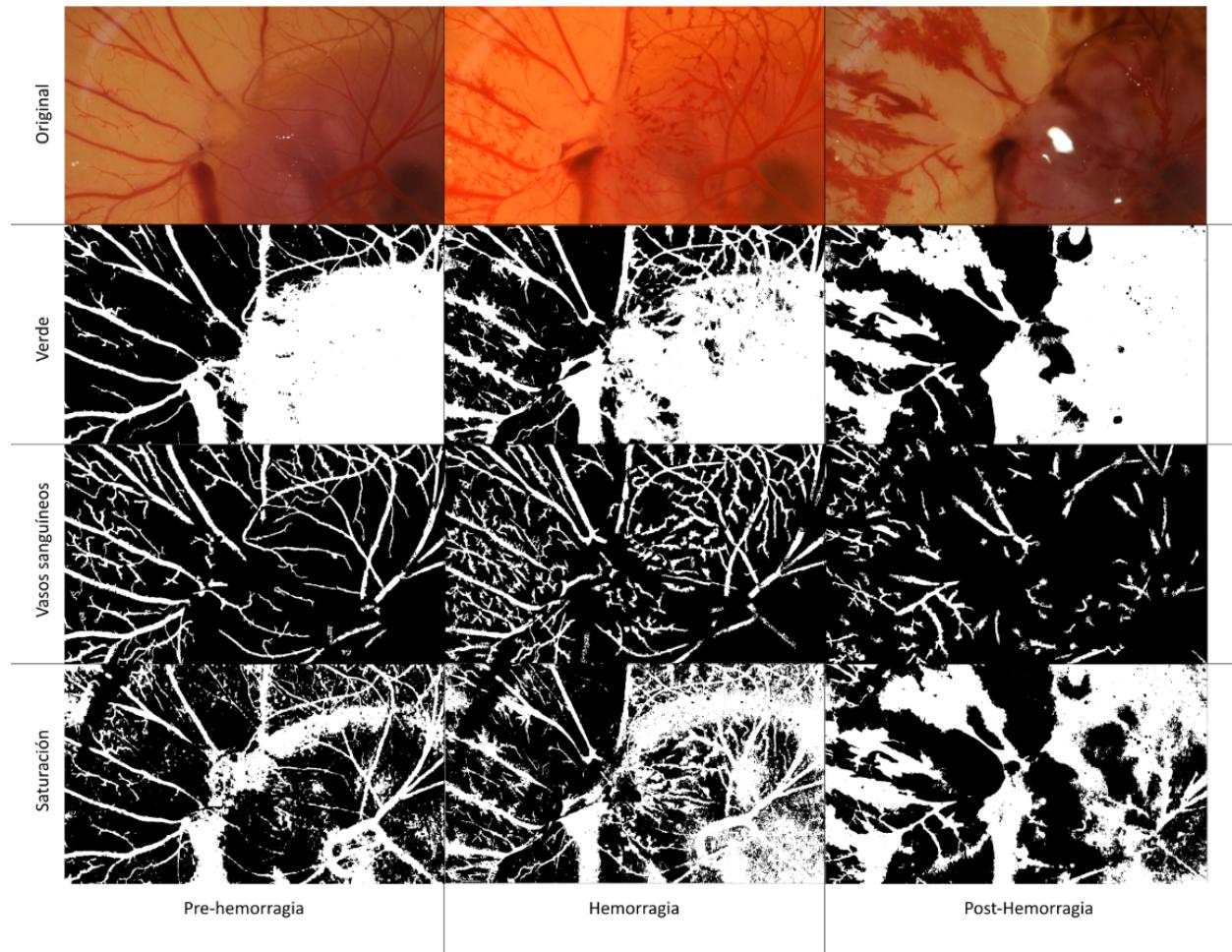


Figura 4.10: Comparativa de resultados de umbralización entre componentes.

A simple vista resulta bastante obvio por qué la componente verde no es una buena candidata para umbralización. El oscurecimiento de la zona derecha de la imagen (provocado por el embrión que se encuentra debajo) se recoge todo como "*del color*" de los vasos sanguíneos, haciendo que media imagen quede etiquetada como sangre. Sin embargo, comparando entre la saturación y la segmentación morfológica, los resultados parecen ser mejores. Si bien existe bastante ruido y una banda de la frontera entre el saco amniótico

queda etiquetada como sangre por su saturación, en la última imagen se ve claramente la sangre segmentada como tal, cuando el tratamiento morfológico pierde la definición de los vasos.

El siguiente paso consiste en aplicar esta técnica (algo rudimentaria) a los vídeos. Inicialmente se aprovechó la infraestructura con la que ya se contaba para aplicarlo a la serie de fotogramas inicial, del vídeo utilizado para crear las imágenes de ejemplo que han aparecido en este capítulo. Los resultados se pueden ver en la figura 4.11. En azul la detección de vasos sanguíneos (de la anterior iteración) y en naranja la nueva detección de sangre por color.

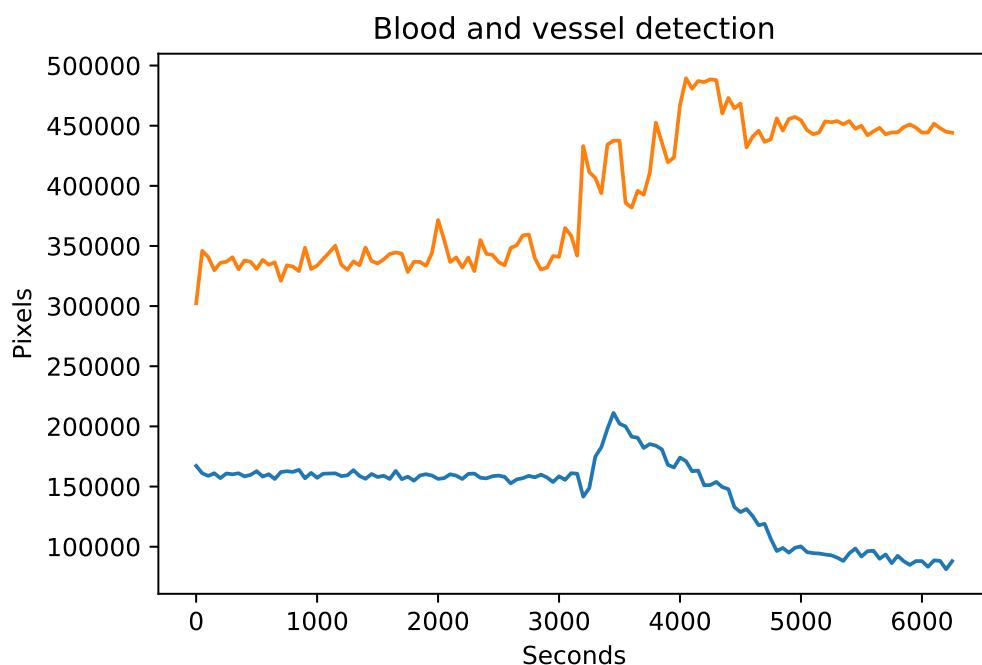


Figura 4.11: Gráfica con ambas evoluciones, en azul los píxeles detectados como vasos sanguíneos, en naranja, los píxeles detectados como sangre.

En primer lugar, llama la atención que la gráfica está desplazada "hacia arriba", esto es porque existe bastante ruido y sobresegmentación, hay algunas partes de la imagen que han sido etiquetadas como sangre cuando no lo son. Lo segundo es que, pese a ser una medida más ruidosa con bastantes picos, sí que exhibe un crecimiento aún cuando la detección por vasos sanguíneos comienza a descender, de acuerdo a lo esperado. Las crestas que muestran durante su crecimiento son provocadas por los cambios de umbral como respuesta a variaciones de iluminación dentro del propio vídeo, como se mencionó anteriormente, y veremos cómo son más pronunciados cuando se refine esta técnica.

### 4.2.2. Refinado

En la anterior sección se mostró que utilizar la componente saturación de la imagen para umbralizar y segmentar la sangre en las imágenes utilizando su color tenía potencial. Los problemas con esta técnica en crudo son el ruido y la sobresegmentación, provocada por algunos brillos. Para mitigar estos problemas, se decide incluir en la técnica la componente H, del inglés hue, matiz. En esta componente, como se avanzaba en el capítulo 2, los vasos sanguíneos aparecen de un color prácticamente negro (aún con la oscuridad de la imagen por encontrarse casi todo en la gama de los rojos).

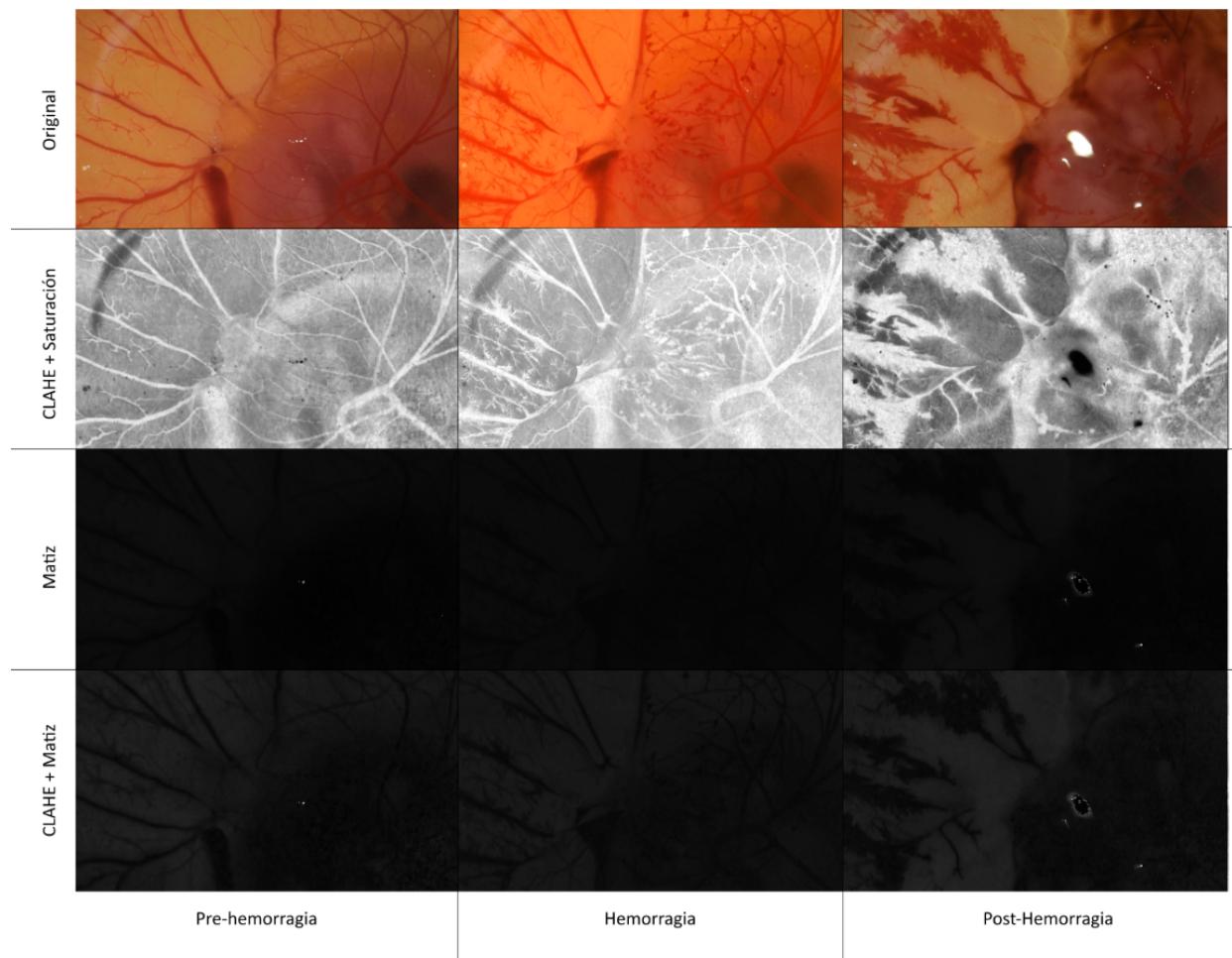


Figura 4.12: Comparación entre las componentes saturación y matiz.

Esto puede verse en la figura 4.12, si es que no resulta demasiado oscura. La segunda fila muestra la componente s, la tercera el matiz y la última el matiz tras aplicar CLAHE. A simple vista puede parecer que es una componente verde oscurecida y, por consiguiente,

con la información más comprimida y peor para utilizar en segmentación. Esto no es así, y la ventaja de esta componente sobre el verde radica en que se ve poco afectada por la luminosidad y el brillo, mientras que el verde tiende a valores altos cuando aumenta la claridad de la imagen, dentro de un mismo matiz.

Con intención de paliar los problemas que surgen utilizando únicamente la componente saturación, se buscó la manera de incorporar el matiz a la técnica como filtro adicional para reducir el efecto de ciertos brillos y sombras. Se consideraron varias aproximaciones, desde conjuntar ambas componentes en una misma imagen monocroma y umbralizar posteriormente a utilizar ambas componentes por separado y unirlas después. Estas se llevaron a cabo experimentalmente de las dos formas descritas a continuación.

En la primera, se tomaron ambas componentes H y S, se les aplicó una mejora de contraste usando CLAHE, se invirtió la componente H, de forma que sus valores bajos se conviertan en altos y se efectuó el producto punto a punto entre ambas imágenes. Es decir, se multiplicó cada pixel de la componente saturación por su equivalente en posición en la componente matiz. De esta manera, teóricamente, los valores altos en una imagen deberían combinarse con los altos en la otra para dar valores muy superiores a los que resulten de multiplicar valores altos en una por bajos en la otra. Posteriormente se reescalán estos valores para poder representar cada pixel con 8 bits y se umbraliza esta imagen resultado utilizando Otsu.

La imagen resultado del producto es la fila inferior de la figura 4.13, con la componente S y la H invertida, respectivamente, en las filas intermedias. No se aprecia demasiada mejoría, hay una reducción del ruido y se disminuye ligeramente el efecto de los brillos. Además, la imagen de en medio, donde hay un cambio fuerte de iluminación, parece tener mucho mejor contraste.

Como segunda aproximación, se decidió mejorar mediante CLAHE y umbralizar ambas componentes de la imagen por separado utilizando Otsu, combinándolas después realizando un AND pixel a pixel. Es decir, cada imagen produce su propia segmentación de la estructura vascular y ambas se combinan tomando los puntos comunes. Esto también debería evitar los brillos y reducir la sobresegmentación que ocurría en la componente S.

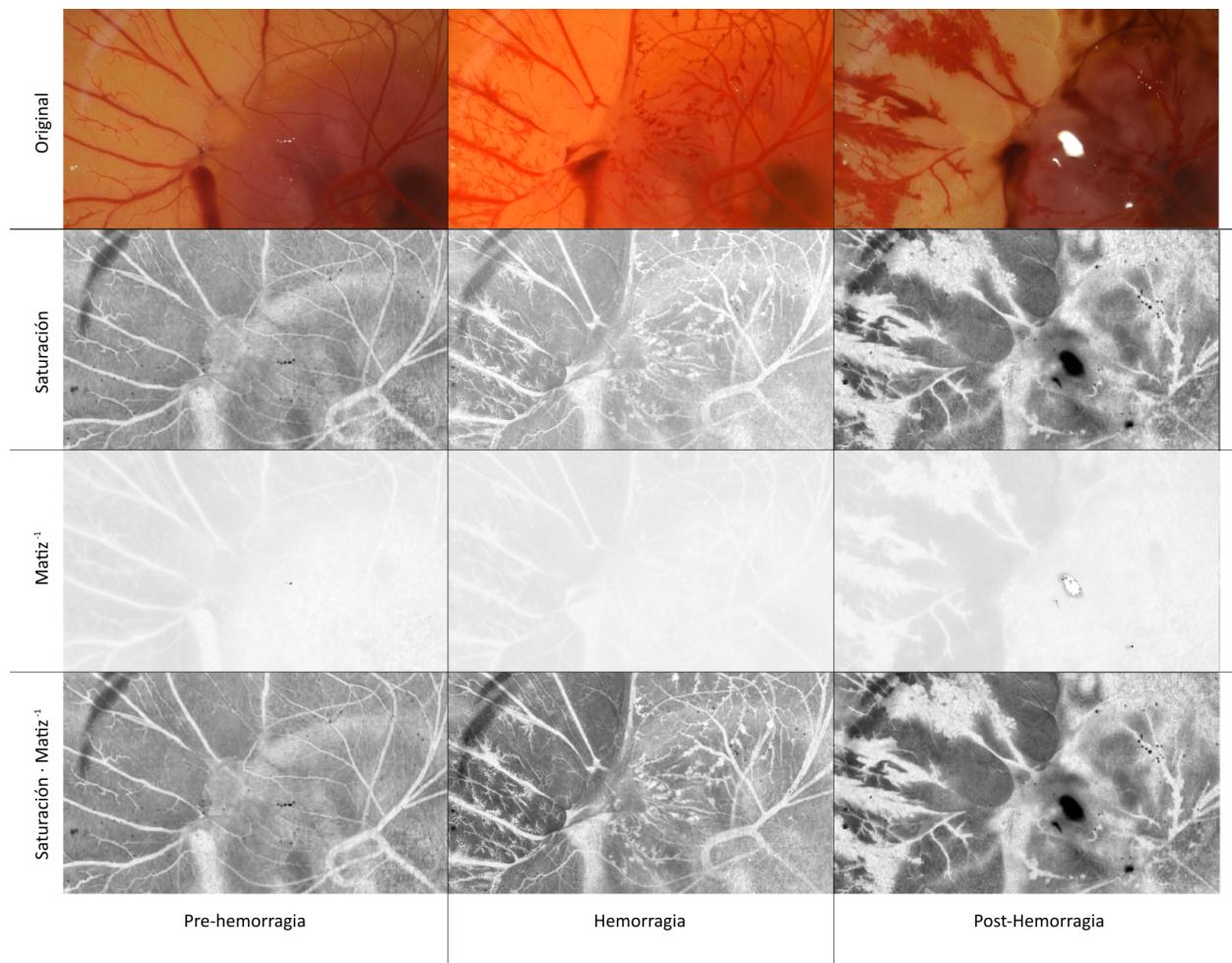


Figura 4.13: Aplicación del producto punto entre las componentes S y H.

Los resultados se pueden observar en la figura 4.14. La segunda y tercera filas son las umbralizaciones de las componentes S y H, respectivamente y la fila inferior el resultado final de aplicar AND pixel a pixel entre ambos. Nótese la considerable reducción de ruido y la desaparición del arco producido por iluminación en la componente S. A continuación, se evaluaron ambas aproximaciones tanto visualmente como de acuerdo a los resultados numéricos obtenidos, y en comparación a el uso de la componente S exclusivamente.

Estos resultados se pueden ver en las imágenes 4.15 y 4.16. Aunque ya en la evaluación visual se observa una reducción importante de la sobresegmentación de la sangre utilizando la segunda aproximación combinada, el resultado de mayor interés destaca en las gráficas. El uso del producto de las componentes previo a la umbralización (gráfica del medio) consigue reducir de forma importante el ruido en la curva, sin embargo la aproximación que umbraliza previamente y luego elige los píxeles segmentados en ambas imágenes produce

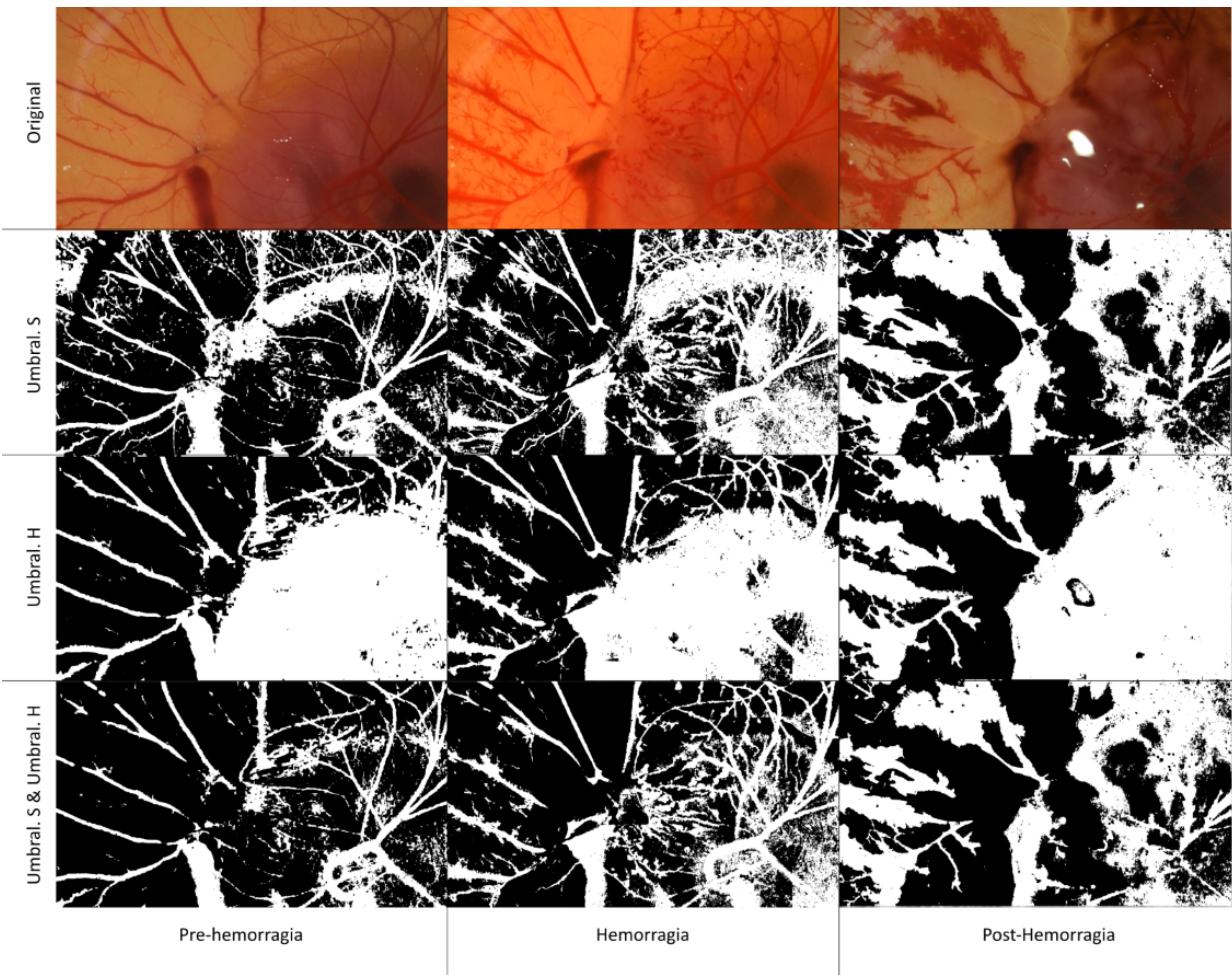


Figura 4.14: Aplicación de AND entre las segmentaciones producidas por las componentes S y H.

resultados mucho más bajos antes de producirse el sangrado y casi igual de altos después de la hemorragia. Esto indica que segmenta casi exclusivamente los píxeles que representan sangre, evitando gran parte de los brillos y detalles que quedan etiquetados como sangrado en las otras dos opciones.

El problema que se aprecia en esta gráfica es el ruido. Este es especialmente pronunciado en la parte plana que precede a la inoculación de la membrana. Tomando esto como siguiente problema a solucionar, se procede a buscar una forma de reducir el ruido producido en la segmentación.

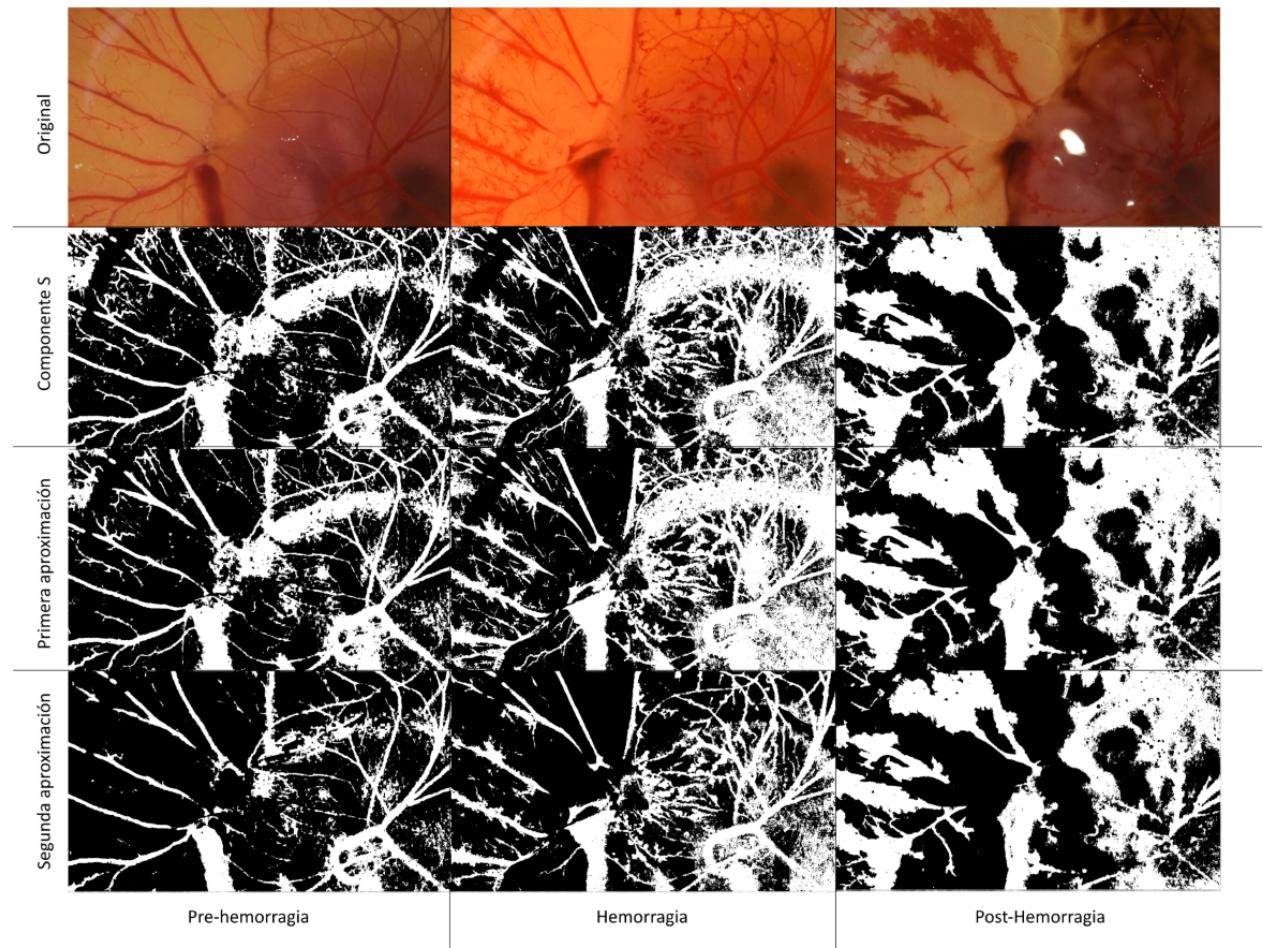


Figura 4.15: Comparación visual de segmentación entre aproximaciones.

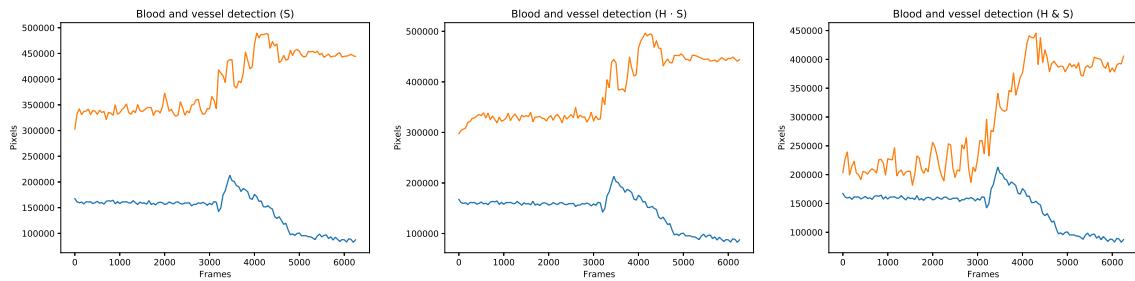


Figura 4.16: Comparación entre las gráficas de las aproximaciones.

### 4.2.3. Reducción de ruido

En la anterior sección se explicaban los pasos que se habían seguido para encontrar una segunda característica que ayudase a modelar el proceso de sangrado producido en los en-

sayos. Una vez hallada una característica satisfactoria, el siguiente paso es reducir el ruido que se produce en las gráficas al utilizarla. Este ruido, en términos generales, está producido por el uso de una umbralización automática. Al usar el algoritmo de Otsu para buscar el umbral óptimo en cada imagen, puede ocurrir que el umbral varíe rápidamente en una sucesión corta de imágenes, en cada una segmentando o no una sección de la imagen. Esto aparece en las gráficas como una sucesión rápida de subidas y bajadas.

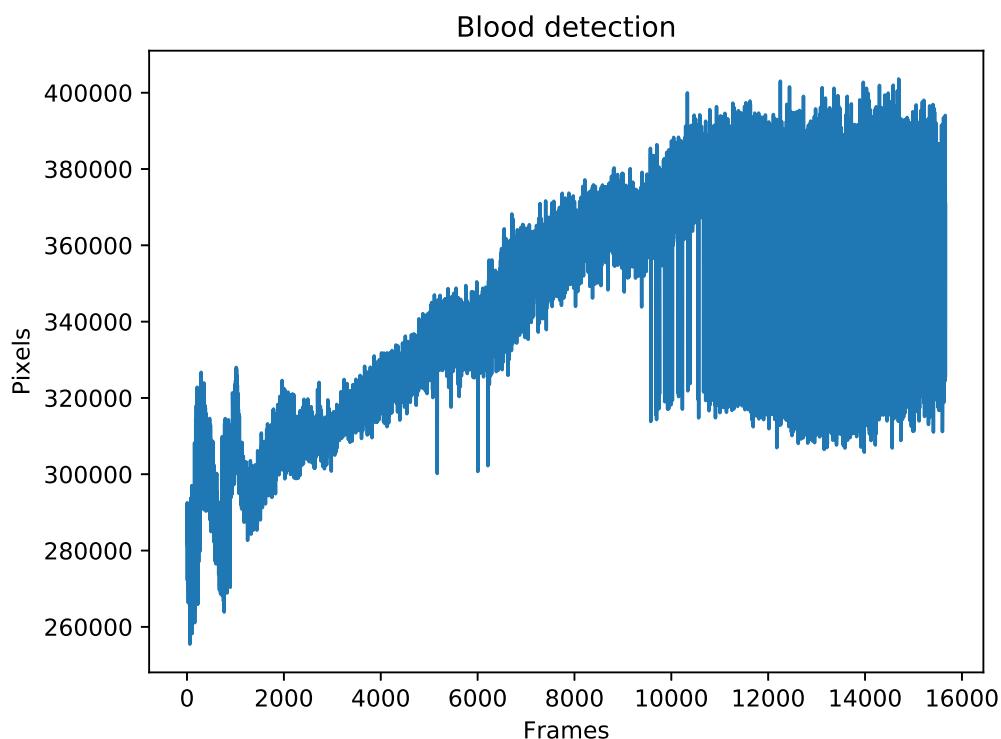


Figura 4.17: Ejemplo del ruido al analizar un vídeo.

La figura 4.17 muestra un ejemplo (extremo) de lo que puede ocurrir al analizar frame a frame un vídeo sin abordar de ninguna forma el ruido. Sería interesante reducir todo lo posible estas variaciones para obtener una gráfica en la que el crecimiento se corresponda únicamente con un aumento en la cantidad de sangre, y no con variaciones automáticas del umbral.

Para abordar esto, se optó por suavizar los cambios en los umbrales, tanto en la componente matiz como en la saturación. Esto se realiza utilizando un vector para cada componente en el que almacenar los umbrales detectados automáticamente, y utilizando la media aritmética del contenido de cada vector, se recalcula el umbral a aplicar a la imagen. Es decir, contando con un vector circular de una longitud determinada, en cada frame se calcula un nuevo umbral automáticamente y se almacena en la siguiente posición del vector.

Después, se calcula el umbral a utilizar como media aritmética de todas las componentes del vector y se aplica a la imagen, obteniendo la imagen resultado segmentada. Así, en la frame  $i$ , el valor calculado automáticamente será almacenado en  $Vector[i \bmod N]$  donde  $N$  es la longitud del vector, y el umbral utilizado para procesar la imagen será:

$$th(i) = \frac{\sum_{j=0}^N Vector[j]}{N} \quad (4.1)$$

Es necesario que el umbral varíe a lo largo del proceso para adaptarse a posibles cambios que se dan en la imagen, al menos a aquellos relacionados con el proceso de irritación. Por lo que no es posible obtener un umbral al principio del vídeo y aplicarlo para el resto de la grabación. No obstante, los cambios en la imagen no se dan en fracciones de segundo, con lo que no es necesario recalcular este umbral demasiado a menudo. Para evitar cálculos innecesarios, se calcula un nuevo umbral cada cierto número de imágenes. Con vídeos grabados a 50 frames por segundo como de los que se dispone, con recalcular el umbral cada 25 imágenes se consiguen dos cálculos por segundo, que es más que suficiente para adaptarse a cualquier cambio que pueda ocurrir.

A mayores, con vídeos a una frecuencia tan alta, no es necesario analizar todas las imágenes para obtener una gráfica significativa, por lo que únicamente se analiza una de cada 5 imágenes. Esto acelera en gran medida el proceso y parece ayudar a la legibilidad de las gráficas. Téngase en cuenta que la gráfica mostrada en la figura 4.17 fue creada analizando todas las frames, mientras que ejemplos previos como las de la figura 4.16 fueron creadas tomando una imagen cada 240 frames.

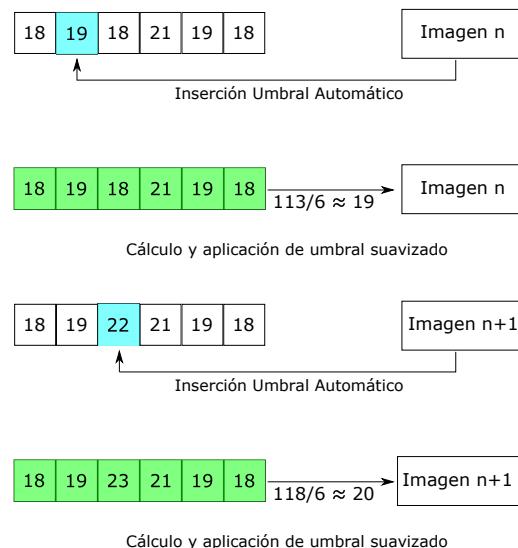


Figura 4.18: Esquema de funcionamiento del suavizado utilizando vectores.

## Capítulo 4. Implementación de la metodología

---

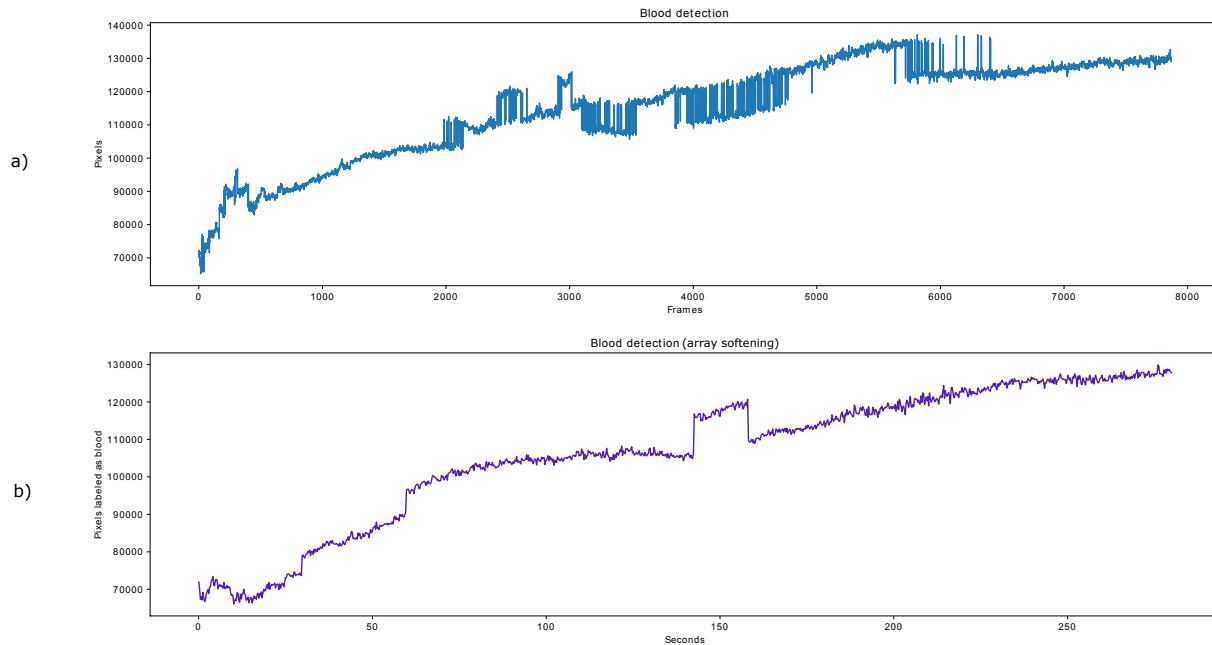


Figura 4.19: Reducción de ruido en un vídeo de control positivo. a) Antes de reducción. b) Tras reducción por suavizado de umbrales.

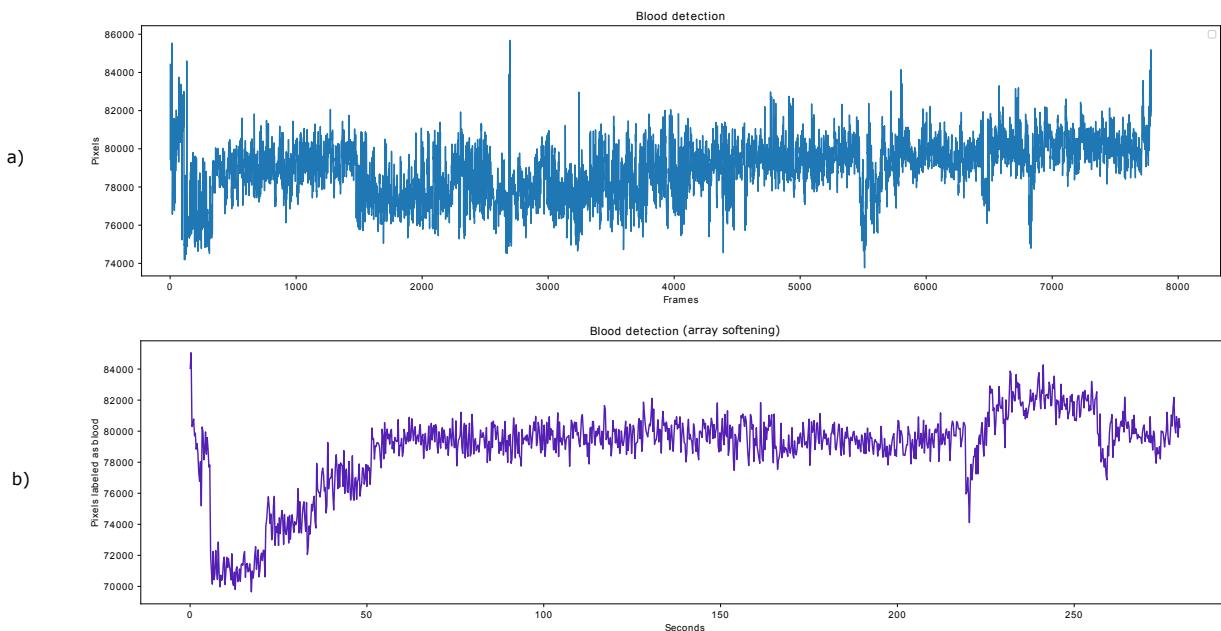


Figura 4.20: Reducción de ruido en un vídeo de control negativo. a) Antes de reducción. b) Tras reducción por suavizado de umbrales.

Las figuras 4.19 y 4.20 muestran, respectivamente, el efecto de la reducción de ruido sobre dos vídeos, en primer lugar un vídeo de control positivo, con un sangrado profuso producido por la inoculación con sosa cáustica ( $\text{NaOH } 0.1\text{N}$ ). En segundo lugar un control negativo, en el que no se produce sangrado. A simple vista hay una importante reducción en el ruido, que permite apreciar mejor la forma de las gráficas. Se produce una disminución clara en las fluctuaciones rápidas sobre fotogramas consecutivos, produciendo una curva más fácil de visualizar y con menos cambios espurios.

No obstante, en la figura 4.19 b), entre los segundos 140-160 se puede observar aún una cresta en la imagen. Ésta está producida por un trozo de la imagen con un valor de gris muy próximo siendo segmentado por un pequeño cambio en el umbral. Es decir, un cambio de umbral de una unidad puede provocar que un área importante de la imagen cuyo valor de gris coincide con el cambio pase a estar segmentado, produciendo esa rápida subida. Lo mismo sucede cuando deja de entrar en el umbral. Este problema está producido en gran medida por utilizar un único umbral para el conjunto de la imagen, haciendo que los cambios locales en una parte de la imagen afecten a cómo se segmentan lugares alejados.

Una forma de mitigar esto es segmentar la imagen por ventanas. De forma análoga a la aplicación de la ecualización adaptativa del histograma, se puede dividir una imagen en secciones o ventanas que umbralizar y segmentar por separado. De esta manera, los cambios que impliquen un aumento o disminución del umbral producidos por algo que está ocurriendo en una parte de la imagen no necesariamente deben implicar un cambio en la forma de umbralizar la esquina opuesta.

En la figura 4.21 se puede observar el resultado de subdividir la imagen en cuartos y utilizar 4 umbrales distintos para segmentar la sangre. En la primera imagen ayuda a apreciar mejor algunos detalles que se perdían en el cuadrante superior izquierdo, además de a reducir el arco brillante que aparece en el cuadrante superior derecho. Si se presta atención al centro de la imagen se pueden apreciar las fronteras de la división. En la imagen intermedia se reduce en gran medida el ruido de la esquina inferior derecha, así como el arco anteriormente mencionado. En la imagen final, posterior al sangrado, no se aprecia gran diferencia. Sigue existiendo una cierta sobresegmentación en la parte derecha.

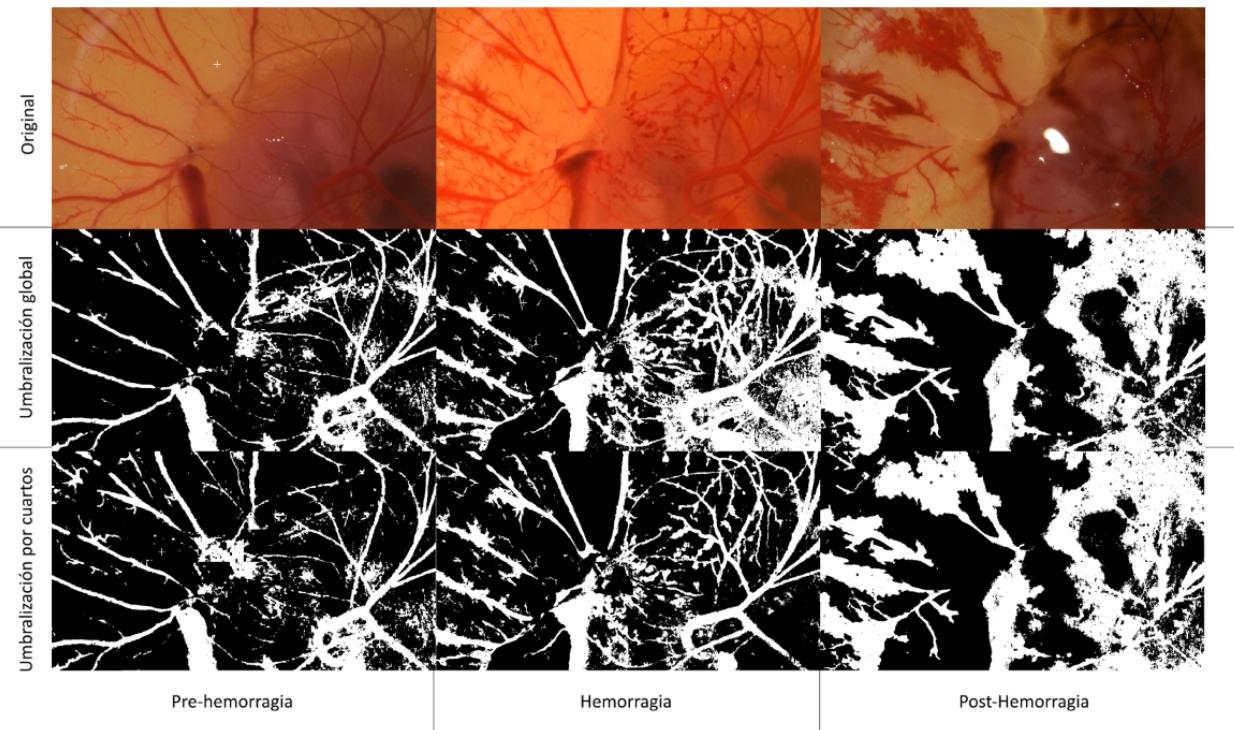


Figura 4.21: Comparación visual entre umbralización global y subdividiendo la imagen.

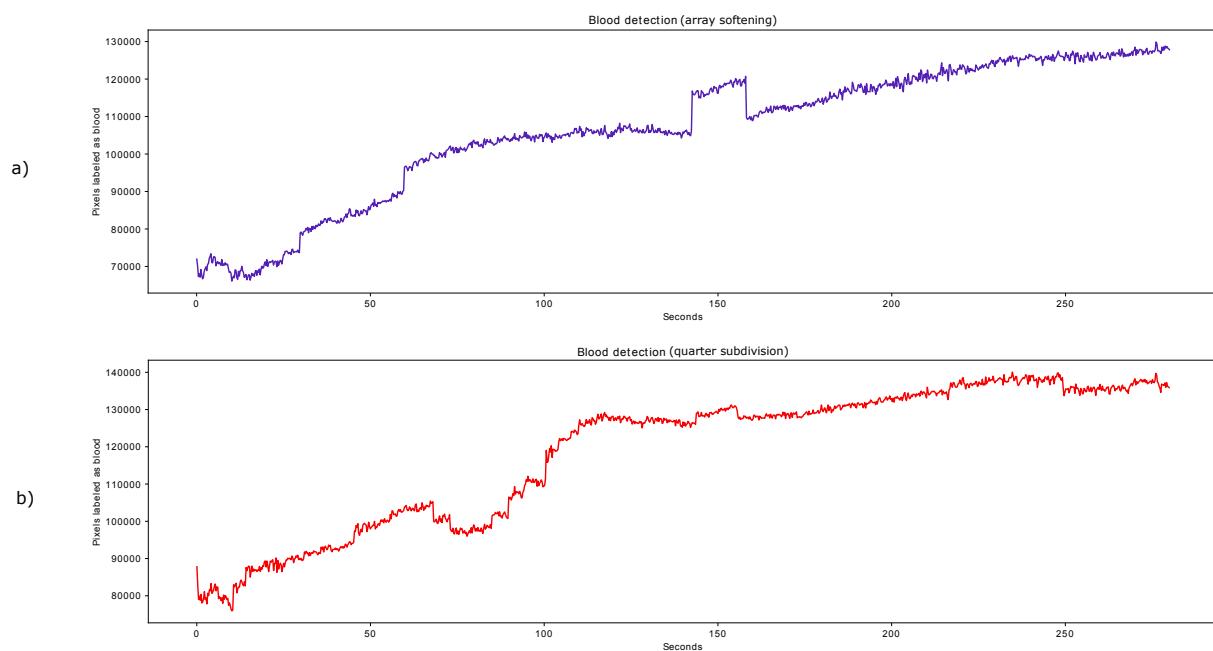


Figura 4.22: Mayor reducción de ruido con subdivisión en control positivo. a) Reducción por suavizado de umbrales. b) Reducción por subdivisión de la imagen y suavizado de umbrales.

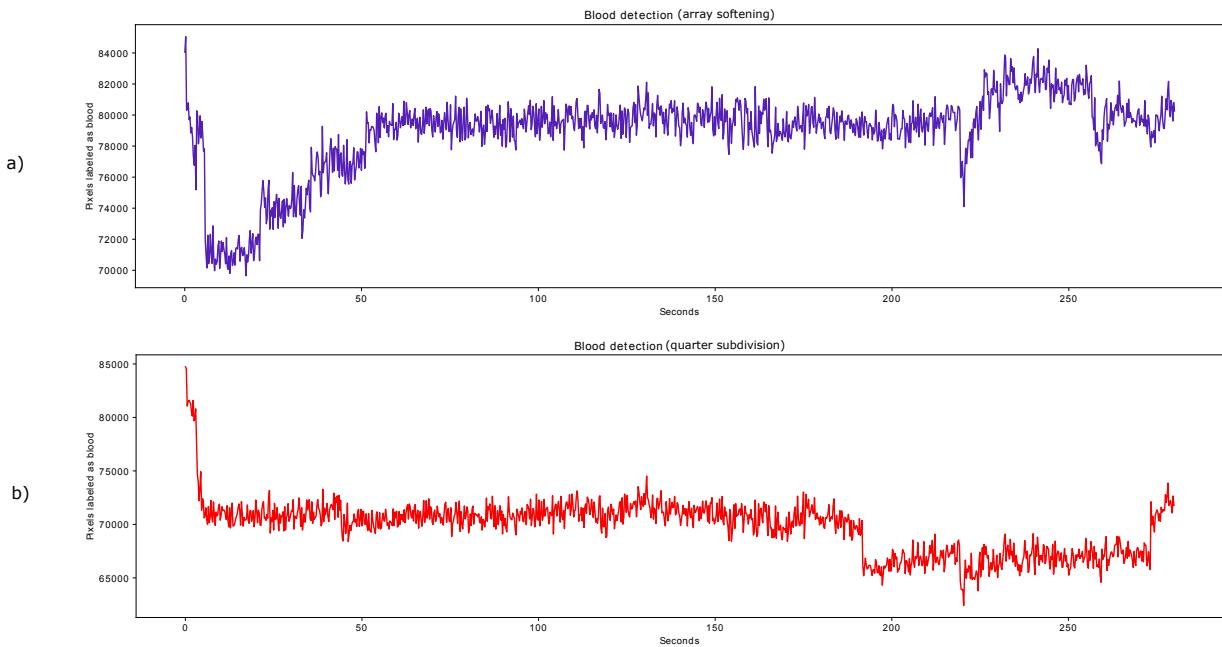


Figura 4.23: Mayor reducción de ruido con subdivisión en control negativo. a) Reducción por suavizado de umbrales. b) Reducción por subdivisión de la imagen y suavizado de umbrales.

Esta técnica ayuda a suavizar parte del ruido no producido por el sangrado en las gráficas, como muestran las figuras 4.22 y 4.23, comparando la anterior aproximación de un único umbral global con ésta. La cresta que aparece entre los segundos 140-160 del control positivo se reduce, y el control negativo toma un aspecto mucho más plano, como debería ocurrir al no haber ningún sangrado (El pico del comienzo está producido por la sombra de una mano al activar la cámara). No obstante, siguen viéndose algunos fenómenos extraños como el que se observa en la figura 4.22 entre los 60 y los 100 segundos.

#### 4.2.4. Validación

Una vez conseguida una cierta reducción del ruido en los resultados, se procede a comprobar qué correlación existe entre las gráficas producidas por estas técnicas y las respuestas de los expertos ante los mismos vídeos. Para ello se contó con la colaboración de 5 expertos procedentes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. También debe agradecérseles a ellos la cesión de los vídeos de los que se dispuso durante todo el desarrollo de este estudio.

Para una mejor validación, habría sido de gran ayuda contar con grabaciones válidas tanto de controles negativos y positivos como de irritantes medios, que se sitúen en alguna franja intermedia entre la sosa cáustica utilizada en los controles positivos y la solución salina de los negativos. Lamentablemente, los vídeos de irritantes medios de los que se disponía en esta fase del desarrollo estaban enormemente comprimidos, con constantes cambios en la resolución de las imágenes a intervalos irregulares.

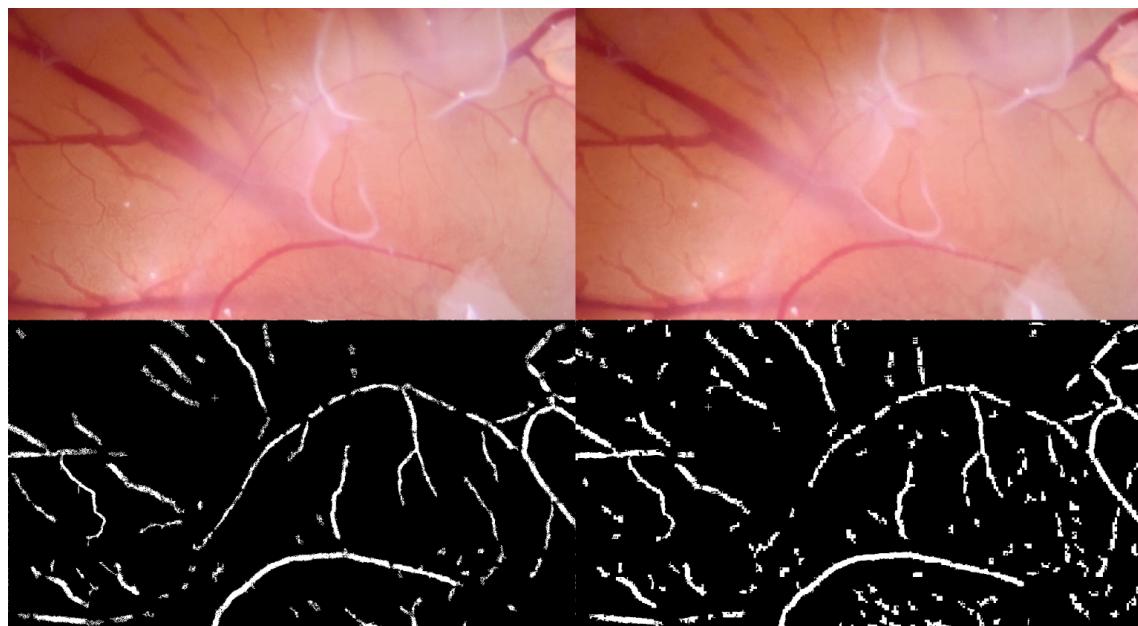


Figura 4.24: Dos fotogramas consecutivos mostrando cambios de resolución, con sus respectivas segmentaciones.

Este tipo de cambios dificultan una buena medida del área segmentada, ya que están sujetos a constantes cambios por fenómenos que nada tienen que ver con la irritación de la membrana. Estos cambios se pueden observar en la figura 4.24. Aunque en los fotogramas originales resulte difícil de apreciar, se distingue especialmente el "pixelado" producido por estos cambios en las imágenes segmentadas. Con estos vídeos descartados al menos temporalmente, se pidió a los expertos que realizasen una evaluación de cuatro de los vídeos de irritante fuerte, sosa cáustica.

La intención de esta petición era tanto tener un marco real en el que encuadrar los datos proporcionados por el sistema como comprender mejor exactamente qué utilizan los expertos para determinar las tres evoluciones anteriormente explicadas, la hemorragia, lisis y posterior coagulación.

## 4.2. Análisis global conjunto

---

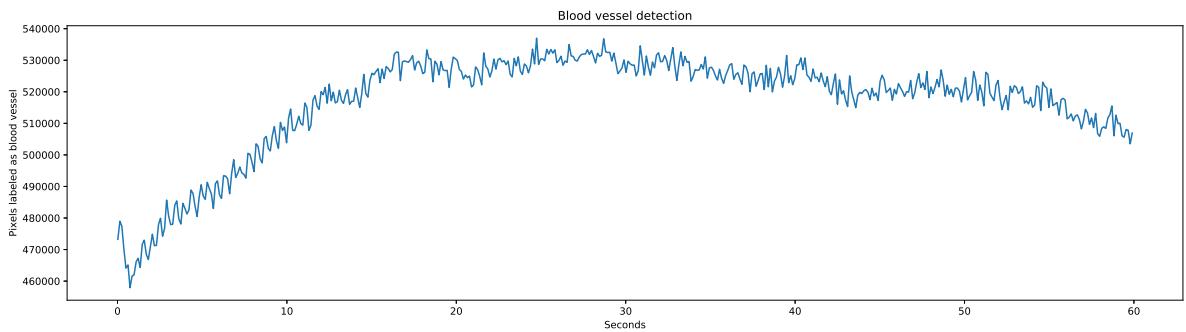


Figura 4.25: Detección de vasos sanguíneos en el primer vídeo.

Cuadro 4.1: Valoraciones de los expertos para el primer vídeo.

	Tiempo hemorragia (seg)	Tiempo lisis (seg)	Tiempo coagulación (seg)	Irritation Score
Experto 1	2	8	42	19,59
Experto 3	2	6	7	20,69
Experto 4	1	5	24	20,22
Experto 5	1	5	18	20,40

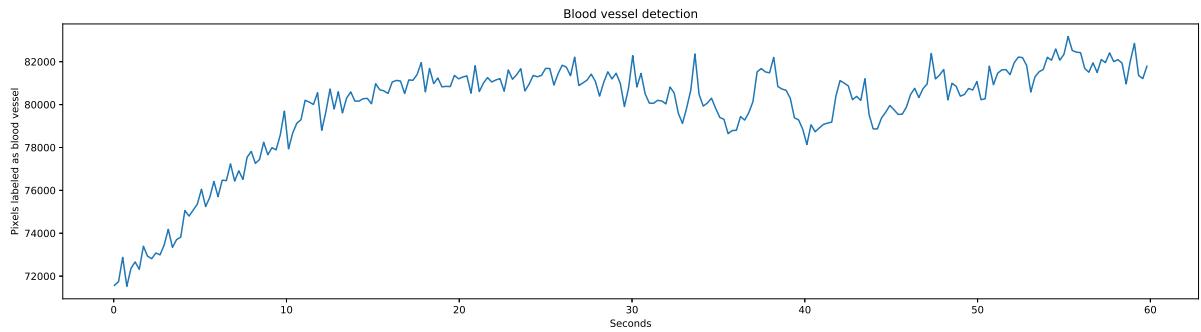


Figura 4.26: Detección de vasos sanguíneos en el segundo vídeo.

Cuadro 4.2: Valoraciones de los expertos para el segundo vídeo.

	Tiempo hemorragia (seg)	Tiempo lisis (seg)	Tiempo coagulación (seg)	Irritation Score
Experto 1	1	3	20	20,38
Experto 2	4	41	81	17,62
Experto 3	2	4	5	20,79
Experto 4	1	2	8	20,77
Experto 5	1	6	12	20,53

## Capítulo 4. Implementación de la metodología

---

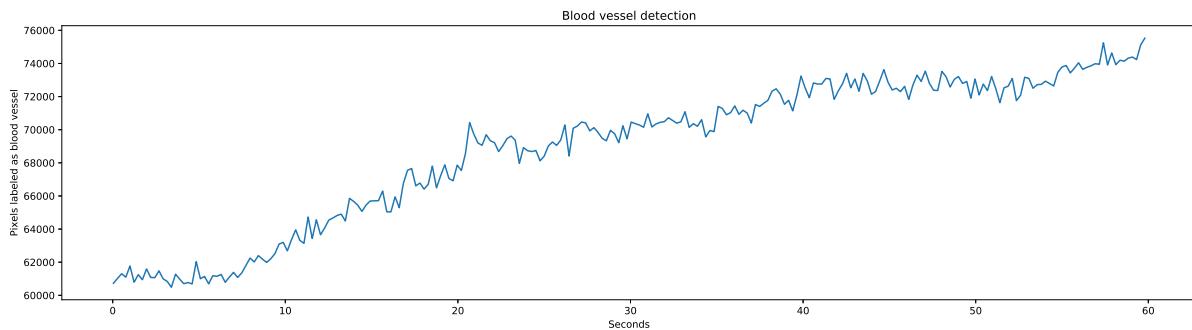


Figura 4.27: Detección de vasos sanguíneos en el tercer vídeo.

Cuadro 4.3: Valoraciones de los expertos para el tercer vídeo.

	Tiempo hemorragia (seg)	Tiempo lisis (seg)	Tiempo coagulación (seg)	Irritation Score
Experto 1	2	7	24	20,15
Experto 2	10	59	91	16,80
Experto 3	2	6	9	20,65
Experto 4	2	4	14	20,52
Experto 5	1	9	13	20,45

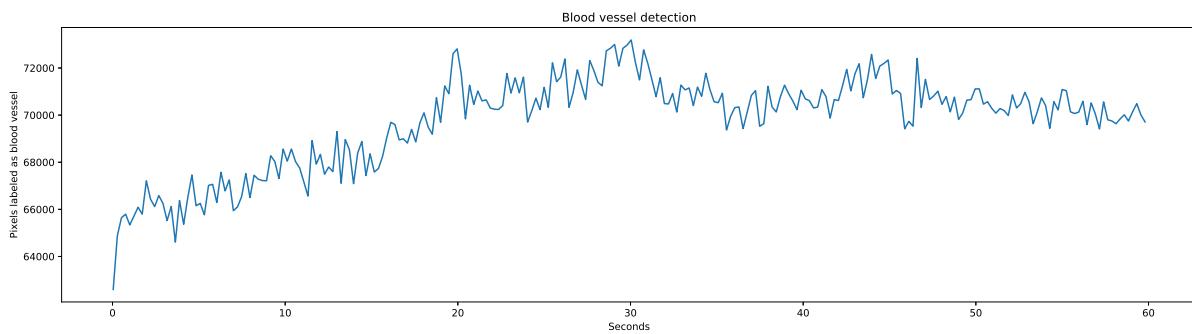


Figura 4.28: Detección de vasos sanguíneos en el cuarto vídeo.

Cuadro 4.4: Valoraciones de los expertos para el cuarto vídeo.

	Tiempo hemorragia (seg)	Tiempo lisis (seg)	Tiempo coagulación (seg)	Irritation Score
Experto 1	1	2	20	20,41
Experto 2	2	10	34	19,78
Experto 3	1	2	4	20,89
Experto 4	1	2	12	20,52
Experto 5	1	2	6	20,83

Las figuras 4.25 - 4.28 muestran las gráficas generadas utilizando estas técnicas para los 4 vídeos evaluados, y los cuadros 4.1-4.4 las evaluaciones realizadas por los expertos sobre estos mismos vídeos. Lo primero que llama la atención al observar las valoraciones de los expertos es la diferencia de criterios. Esta es una de las principales motivaciones de este trabajo, proveer una serie de técnicas que permitan a los expertos trabajar sobre datos más objetivos que una simple evaluación visual. Como se ha mencionado anteriormente, la intención de este proyecto no es proporcionar una herramienta que reemplace a los expertos, sino ayudar a sentar una metodología que auxilie en el desempeño de sus funciones. Esto pasa por mostrarles otra perspectiva de lo que está ocurriendo en las grabaciones, a fin de que puedan disponer de más información para tomar una decisión.

Debido a las importantes diferencias que existen entre las evaluaciones que proporciona cada experto, resulta difícil valorar el sistema punto a punto con cada una de ellas, ya que no hay un resultado más válido que otro y algunas evaluaciones difieren en más de 80 segundos. Sin embargo, los datos que nos proporcionan sí que son de gran utilidad por varios motivos.

El primero es que, para irritantes fuertes como el considerado ( $\text{NaOH}$ ), en la mayor parte de las valoraciones los tres puntos a determinar ocurren antes de la marca de los 30 segundos. Esto significa que los problemas de pérdida de detección de vasos cuando la hemorragia es muy avanzada no suponen un problema tan grave como se consideraba en un principio. Si para cuando la técnica pierde efectividad el proceso puede darse por concluido, esa pérdida carece de importancia. Las figuras 4.25-4.28 muestran los resultados de los primeros 60 segundos y no de los 5 minutos completos (esto es a fin de que sobre el papel se puedan observar mejor los detalles del periodo que resulta de interés). Y en ellos no se llega a deteriorar lo suficiente la estructura vascular como para que la detección de vasos decaiga.

El segundo es que, aunque las evaluaciones sean dispares y hallar un término medio entre ellas carezca de sentido, puesto que las marcas de tiempo son en base a observación visual y algo ocurriendo en el vídeo las habrá motivado, sí que se observa una cierta correlación entre el comportamiento de la curva de las gráficas y las anotaciones de los expertos. En el primer vídeo se observa un rápido crecimiento en los primeros 2 segundos, seguidos de una ralentización hasta los 6-8, donde vuelve a repuntar por la rotura de los vasos provocada por la lisis. Hacia los 15-20 segundos el crecimiento se vuelve a ralentizar coincidiendo con la coagulación. En el segundo vídeo ocurre algo similar, un rápido crecimiento seguido de una ralentización hasta casi parada provocada por la coagulación, coincidiendo relativamente con la evaluación de los expertos. Esto se repite para los otros dos vídeos. En todos los casos hay medidas que no coinciden de ninguna forma con lo observado en las gráficas, pero éstas sí muestran una tendencia similar a las evaluaciones, en términos generales.

Visualizar estas gráficas a la hora de evaluar cada compuesto puede ser de utilidad a los expertos en el desempeño de sus funciones. No tendrían que guiarse únicamente por la observación subjetiva de lo que ocurre en el vídeo, con la consiguiente disparidad, sino que además podrán apoyarse en datos numéricos que, mientras que no pueden por sí solos clasificar un compuesto, sí que permiten observar la información contenida en el vídeo de una manera más objetiva y cómoda.

Con estos resultados considerados satisfactorios, se procede a finalizar esta iteración y comenzar la siguiente, de menor extensión, y en la que se pretende hacer frente a problemas distintos a los abordados anteriormente. Una vez la metodología ha demostrado ser efectiva, resta probarla en material más variado y realizar algunos ajustes para evitar problemas en la adquisición de datos.

### **4.3. Metodología de adquisición y selección de área de interés**

La anterior iteración finalizaba con una validación de los datos obtenidos en comparación con las evaluaciones ofrecidas por expertos de la Universidad de Santiago de Compostela. Esta validación se realizaba en base a vídeos que mostraban la irritación de la CAM producida exclusivamente por sosa cáustica, un irritante fuerte.

Contando con la amable colaboración de los expertos, se procede a obtener más material al que aplicar la metodología, concretamente de irritantes medios, que se sitúen entre los controles positivos y negativos de los que ya se dispone. En esta fase del proyecto, como se ha mencionado con anterioridad, se disponía de vídeos que mostraban algunos irritantes medios. No obstante, debido a problemas en el formato de estos vídeos y en el sistema de adquisición, estos eran poco operativos por cambios en resolución.

Así, con la doble intención de obtener material sobre el que trabajar y de asentar una metodología de adquisición que evite los problemas que afectan a parte del material, se continúa el proyecto abordando el problema de la adquisición.

#### **4.3.1. Adquisición de los datos**

Como se ha mencionado anteriormente, la forma de grabar los vídeos que posteriormente se van a analizar puede afectar en gran medida a los resultados que se obtienen de ellos utilizando herramientas de procesamiento digital de imagen. Para un experto observando una grabación, no supone ningún problema ignorar que la imagen brille más durante unos segundos y menos en los posteriores, sin embargo para un sistema semiautomático como el

#### 4.3. Metodología de adquisición y selección de área de interés

que se desarrolla en este proyecto, movimientos producidos por factores externos y cambios en la luz ambiente pueden provocar distorsiones no deseadas en los datos, y estas pueden ser interpretadas como cambios reales en la evolución del proceso de irritación sin que esto represente la realidad.

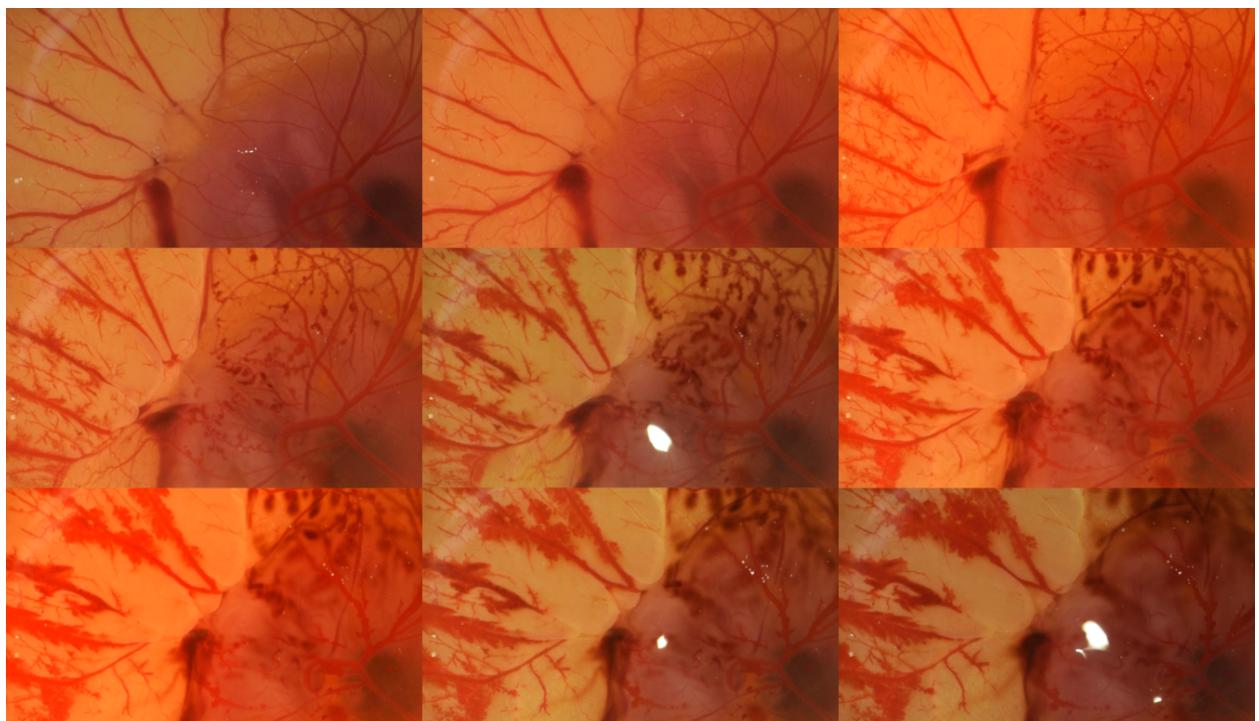


Figura 4.29: Variaciones externas en la iluminación de un vídeo.

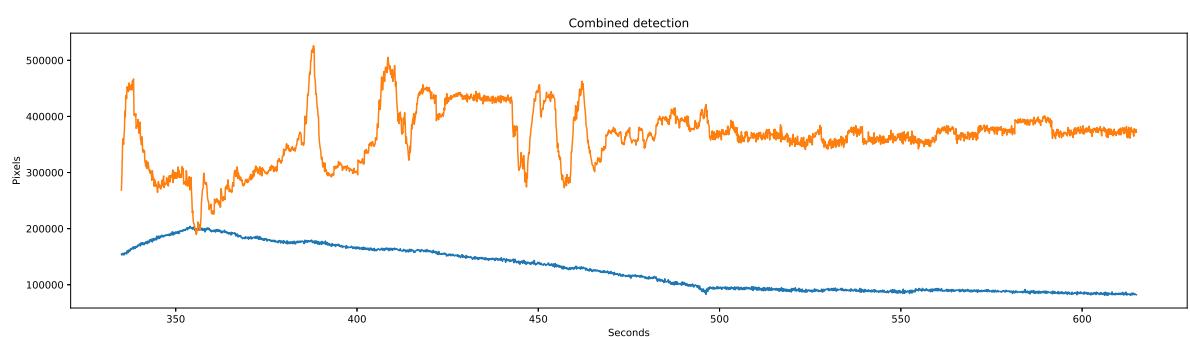


Figura 4.30: Efecto de las variaciones luminosas en los datos. En azul detección de vasos, en naranja detección de sangre.

Estas variaciones pueden apreciarse en la figura 4.29, formada por distintos fotogramas de un mismo vídeo, en la que se puede observar la evolución progresiva del sangrado acompañada por cambios irregulares en el color de la membrana. Esto no está producido por la irritación del tejido, sino por cambios en la luz ambiente. Bien por haber una fuerte componente de luz natural, sujeta a cambios atmosféricos o bien por alguna intervención humana situándose cerca de alguna fuente luminosa, estos cambios se ven reflejados en los datos como muestra la figura 4.30. En ella vemos las gráficas producidas por la detección tanto de vasos (en azul) como de sangre (en naranja). La detección basada en filtros morfológicos, la correspondiente a los vasos sanguíneos, no se ve afectada de forma apreciable por estos cambios. No obstante, para aquella basada en la detección por color, cambios externos en la tonalidad de la imagen provocan subidas y bajadas en la segmentación, ya que está diseñada para reaccionar ante cambios producidos por la propia reacción. Esas subidas y bajadas que se observan en la curva naranja desvirtúan por completo la evaluación por incremento de presencia de sangre, ya que parece que ésta está aumentando y disminuyendo mientras que el sangrado sólo va en aumento, como se puede deducir de la figura 4.29.

Esto constituye el primer problema que se debe abordar, para poder realizar un análisis semiautomático de los vídeos, las condiciones de luminosidad deben ser constantes a lo largo de la grabación, y todos los cambios que se observen deben estar producidos únicamente por la reacción de la membrana corioalantoide.

Otro problema que afecta a algunos de los vídeos de los que se disponía en esta fase, es el movimiento. Este, al margen de poder estar provocado por factor humano (en casos extremos) o por otros objetos situados en la misma superficie sobre la que se efectúa la grabación (como agitadores de laboratorio), pueden estar provocados también por la propia herramienta de adquisición. En el caso de cámaras fotográficas que cuentan con enfoque automático, este puede mover el objetivo para ajustarse a la imagen en mitad de la grabación, produciendo distorsiones en las gráficas. Este efecto puede observarse en la figura 4.31, que muestra el ruido sistemático apreciado en las medidas de la segmentación de vasos sanguíneos en otro vídeo. En este caso las vibraciones son rítmicas y resulta sencillo ignorarlas en un examen visual, pero de suceder de forma irregular podrían interpretarse como cambios reales en el sangrado de la membrana.

Esto debe abordarse también a la hora de realizar las grabaciones. El soporte del equipo debe situarse sobre una superficie estable sin que ninguna vibración externa pueda afectar al vídeo, y en el caso de que el material de adquisición disponga de funciones automáticas que puedan producir movimientos, estas deben estar desactivadas.

### 4.3. Metodología de adquisición y selección de área de interés

---

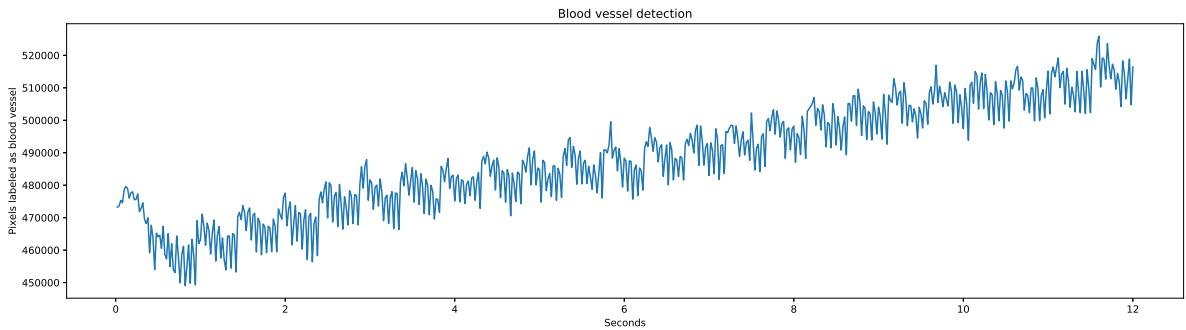


Figura 4.31: Efecto de una vibración externa sobre la segmentación de vasos sanguíneos.

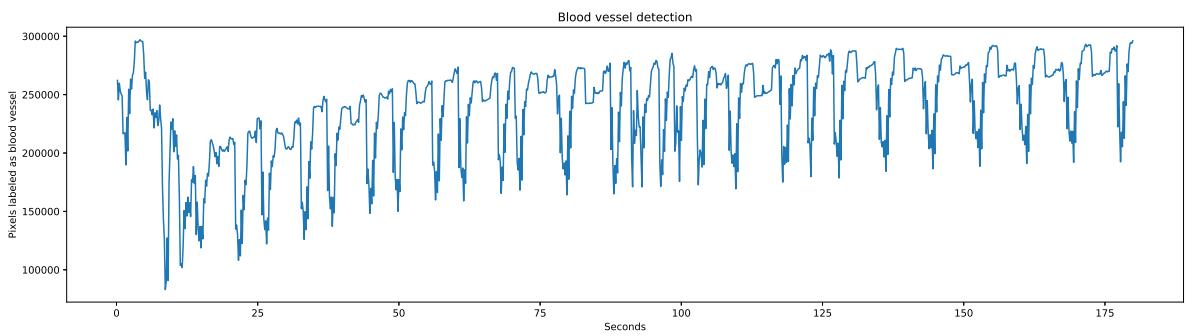


Figura 4.32: Efecto de los cambios de resolución sobre la segmentación de vasos sanguíneos.

El último problema a abordar, y uno relativamente sencillo es la compresión de los ficheros. Como se mostraba en la imagen 4.24, cambios a la resolución o al bitrate en mitad de la grabación pueden producir distorsiones en las gráficas. Estas distorsiones se pueden apreciar en la figura 4.32, donde se observa una serie de subidas y bajadas producidas por los cambios irregulares en la resolución del vídeo. Estos causan repuntes a intervalos distintos que no se pueden evitar ignorando frames a una frecuencia constante y que pueden llegar a camuflar o imitar cambios reales en los vasos sanguíneos.

En consecuencia, se debe utilizar el formato de vídeo que conlleve menor compresión y pérdida de información, no sólo a fin de evitar perder datos sino por eludir tener que lidiar con cambios irregulares sobre la imagen que obedecen a un algoritmo de compresión pensado para la visualización humana y no automática. Esto no implica que todos los vídeos deban ser grabados a máxima resolución, ocupando espacio ingente de forma innecesaria, en general resoluciones alrededor de  $1280 \times 720$  son perfectamente válidas, así como algunas algo menores. Esto no sólo contribuye a un ahorro de espacio sino que también acelera de forma considerable la aplicación de las técnicas sin un coste importante

en pérdida de información. Muy pocos capilares, si es que alguno, se pueden perder en una grabación a esas resoluciones, mientras que aumentar las dimensiones de las imágenes conlleva un aumento potencial (cuadrático) del número de píxeles a analizar. Con el consecuente aumento del tiempo de computación.

Tomando estas consideraciones, se procedió a implantar una metodología de adquisición que permitiera obtener grabaciones libres de los problemas anteriormente mencionados.

- En primer lugar, la iluminación: debe situarse el equipo de grabación en una sala libre de luz natural, iluminado por un foco fijo. La luz debe incidir de la forma más vertical posible sobre la cáscara del huevo para iluminar la membrana de forma directa y evitar las sombras producidas por la cáscara.
- En segundo lugar, la inmovilidad: el equipo debe apoyarse sobre una superficie lo más rígida posible y alejado de cualquier aparato en movimiento que produzca vibraciones indeseables. De no ser parte del material de grabación, el equipo de iluminación deberá estar firmemente sujeto a un soporte de laboratorio y se evitarán piezas sueltas con tendencia a moverse, como las lámparas flexibles.
- En último lugar, el formato: se grabará a resolución de  $1280 \times 720$  píxeles o similar, en un formato con la menor compresión posible. La velocidad en cuadros por segundo no resulta de especial relevancia mientras sea superior a 1.

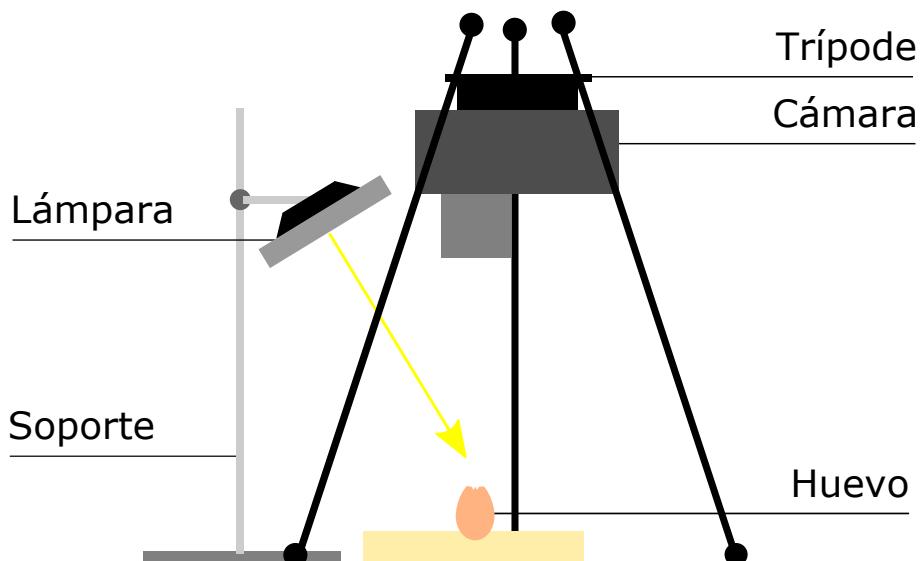


Figura 4.33: Diagrama del equipo utilizado.

Para esta nueva etapa de adquisición de material se utilizó una cámara tipo réflex y una lámpara LED fija sostenida sobre un soporte de laboratorio como muestra el

diagrama de la figura 4.33. En un caso ideal, la iluminación debería provenir del mismo punto desde el que se realiza la grabación, es decir, desde la cámara, y el objetivo de la misma debería contar con una lupa de aumento para encuadrar mayor superficie de la CAM dentro del mismo plano. Aún así, se realizaron las grabaciones de distintos irritantes medios como polisorbato 20 o cloroformo, así como controles negativos con una solución salina y positivos con NaOH. Las grabaciones se realizaron a una resolución de  $1280 \times 720$  a 23 fotogramas/segundo y los ficheros se almacenaron en formato MPEG-4 y la menor compresión posible. El enfoque automático se desactivó y se realizó de forma manual en cada uno de los experimentos.

El desarrollo de estas grabaciones aportó, no sólo los ficheros sobre los que trabajar, sino que a mayores contribuyó a una mejor comprensión del dominio del proyecto, del proceso de preparación de los huevos y de los distintos efectos que tienen los compuestos sobre la membrana. Existen diferencias entre lo que se puede interpretar observando únicamente los vídeos de las reacciones de la membrana y la experiencia de presenciar los experimentos, interactuar con los expertos *in situ* y observar de primera mano el conjunto del proceso.

#### 4.3.2. Evaluación y selección del área de interés

Una vez obtenidos los vídeos, se procedió a analizar la respuesta del sistema ante los mismos. En teoría, habiendo analizado varios controles positivos, las gráficas de los irritantes medios deberían ser similares, únicamente más alargadas en el tiempo. Observando los vídeos, destacó el hecho de que, al no disponer de una lupa de aumento para grabarlos, entraba el embrión en el plano muy a menudo. Esto no supondría un problema de no ser porque este se mueve y produce variaciones en los datos no relacionadas con la irritación. Cuando no entra el embrión en el encuadre, la distorsión puede estar provocada por una burbuja de aire o algo similar.

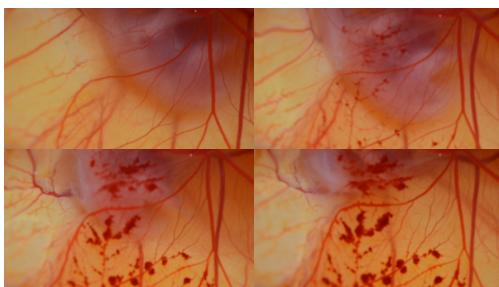


Figura 4.34: Desplazamiento del embrión en el plano.

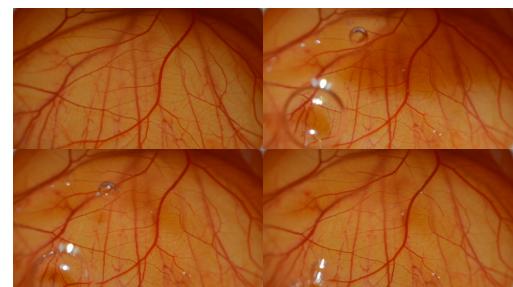


Figura 4.35: Desplazamiento de una burbuja en el plano.

Las figuras 4.34 y 4.35 muestran estos casos. Las variaciones que producen pueden apreciar en un ejemplo claro en la figura 4.36, donde entre los segundos 30 y 40 se observa una disminución de la superficie detectada como sangre.

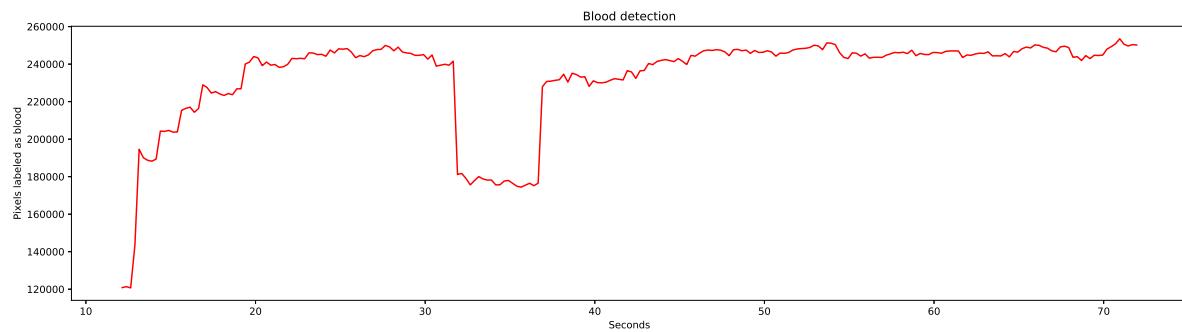


Figura 4.36: Cresta en los datos provocada por la aparición de una burbuja.

Con intención de mitigar este problema, y evitar que algunos ensayos se vean invalidados por problemas similares, se procedió a buscar una solución semiautomática a estas situaciones. Dado que la detección automática de figuras ajenas a la membrana resultaría muy costosa, y más para este trabajo de investigación, se propone permitir al experto elegir qué área del vídeo desea analizar. Si es consciente de que existe un cuerpo extraño en el plano y existe suficiente área de la imagen que no se ve afectada, es posible reducir el área a examinar de las imágenes y centrarse en lo que se le proporcione, en lugar de efectuar un análisis global que puede estar desvirtuado.

Esta razón se une también a otro problema apreciado en el último conjunto de vídeos grabados. Al no disponer de una lupa, parte de la cáscara entra dentro del plano y puede confundir al sistema de segmentación. Dado que el algoritmo de Otsu busca maximizar la diferencia entre las dos zonas segmentadas, este puede detectar la cáscara como una zona muy distinta de la superficie de la membrana, como se muestra en la figura 4.37.

Con esto, se añade al sistema la opción de analizar únicamente un área rectangular determinada, proporcionada por el usuario. Esta opción está disponible en la pequeña aplicación que se ha desarrollado para acompañar este estudio, a fin de ilustrar su utilidad. Ésta dependerá de cada vídeo y cada caso, resulta difícil evaluarla en términos absolutos.

Por un lado, a lo largo de la realización del proyecto ya se habían editado algunos vídeos para evitar que partes de la cáscara aparecieran en el plano desvirtuando el estudio. Esto únicamente supone una simplificación de ese proceso a fin de hacerlo más cómodo al usuario final de la herramienta. Por otro, cuanto menor sea el área a analizar, más fácil es

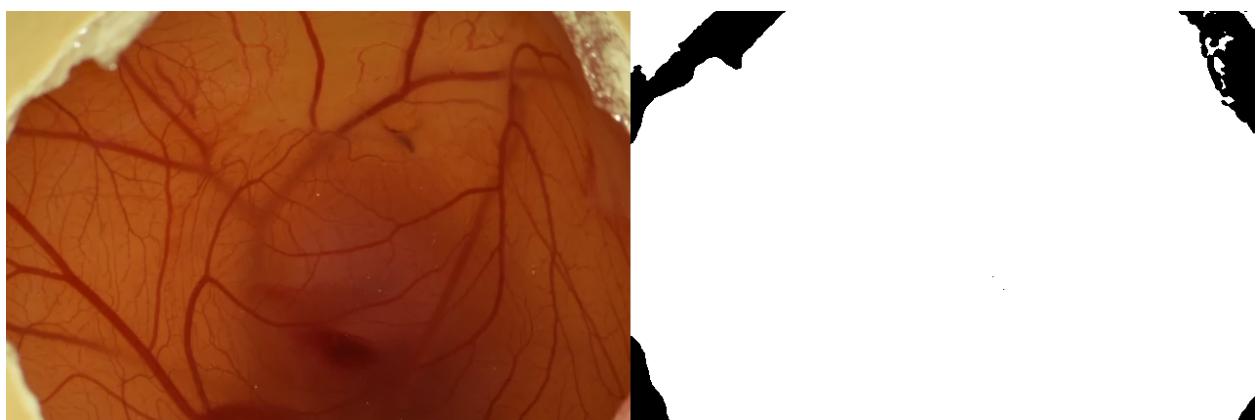


Figura 4.37: Efecto en la segmentación de la aparición de la cáscara en el plano.

que ciertas interferencias reduzcan la validez de los datos extraídos. Esto puede suceder por varias razones:

- El ruido puede acentuarse, ya que al contar con un área menor a analizar, las variaciones producidas por la aparición y desaparición de parte de la estructura vascular obedeciendo a cambios pequeños en los umbrales provocará subidas y bajadas en las curvas que no representan la irritación producida por la sustancia.
- El movimiento puede provocar que una arteria importante entre y salga del plano recortado. Esto en un encuadre amplio carece de mayor importancia ya que se trataría de variaciones pequeñas, pero en caso de utilizar un plano demasiado pequeño, estas variaciones se pueden ver enormemente amplificadas.
- De no escogerse bien el área en base al proceso completo, esta puede sencillamente no ser demasiado representativa de la evolución. Teniendo toda la membrana en el plano, es difícil que algún proceso de irritación pase desapercibido, pero ciertas zonas concretas pueden no mostrar un sangrado tan profuso como el que se produce en el conjunto de la imagen. O pueden producir una curva cuya forma no encaje con lo que realmente ocurre en el vídeo completo.

Por estas razones, se recomienda seleccionar áreas grandes del proceso, y utilizar esta funcionalidad únicamente en casos extremos donde interferencias externas puedan ser fácilmente evitables e invaliden partes pequeñas del área de la imagen. Intuitivamente puede parecer que seleccionar el área de un vaso sanguíneo concreto en un fotograma y aislar su evolución puede mostrar mejor resultado que todo el conjunto con el consecuente riesgo de incluir factores externos, sin embargo, esto no se corresponde con la realidad, y un uso innecesario de esta técnica puede producir resultados inválidos.



# **Capítulo 5**

## **Resultados**

En este capítulo se muestran algunos de los resultados generados por el sistema y sus consecuencias. Una vez validado el sistema, como se realizó en el apartado 4.2.4, se procedió a observar y analizar la correlación que existe entre las distintas sustancias a evaluar, las gráficas que producen y los daños que se pueden observar en las imágenes.

### **5.1. Preliminares**

Antes de proceder a mostrar los fotogramas y gráficas producidas por el sistema, conviene explicar exactamente qué se busca en los mismos, por qué, y de qué utilidad pueden ser estos resultados. Como se ha repetido en varias ocasiones, este trabajo constituye un estudio de la aplicabilidad de técnicas de procesamiento digital de imágenes al experimento HET-CAM. Su principal objetivo es investigar qué técnicas pueden resultar de utilidad y la viabilidad que tienen aquellas seleccionadas. A lo largo del trabajo se ha mostrado el proceso seguido para seleccionar estas técnicas, refinarlas y analizar su efectividad. La extracción automática y temporización de características permite proporcionar a los expertos en este campo una perspectiva alternativa del proceso que sucede en los vídeos. Con ésta, podrán tomar decisiones sobre cómo clasificar un irritante en base a más información que de la que disponen únicamente mediante observación visual de los vídeos.

Lamentablemente, al alcance de este trabajo escapa una clasificación automática de compuestos únicamente por análisis de los vídeos. En ninguna fase de este proyecto se pretende sustituir la figura del experto por un sistema automático que sea capaz de realizar su función. En su lugar, se pretende sentar una metodología que permita ayudar a estos expertos a desarrollar su trabajo de una forma más cómoda y objetiva.

Se han ido mostrando resultados a lo largo de todo el capítulo de implementación de la metodología. No incluirlos junto a las técnicas que los producen sólo generaría confusión y falta de información. La mejor forma de entender por qué se han utilizado las técnicas que se seleccionaron es ver los resultados obtenidos previamente y de qué manera contribuyen a mejorarlos. Este capítulo está dedicado a una visión más global de los resultados obtenidos finalmente y su significado.

## Capítulo 5. Resultados

---

La sección 4.2.4 se podría considerar emparejada con esta, ya que muestra una validación de las gráficas producidas por irritantes fuertes mediante comparación con las evaluaciones proporcionadas por los expertos. Sus resultados podrían haberse incluido en esta sección, pero resultó de gran importancia la temporalidad con la que se realizó, ya que ayudó a entender mejor el proceso que siguen los expertos para realizar su función, por encima de las interpretaciones que se pudieran tener previamente analizando los vídeos. Las tablas de los resultados de esa sección muestran una cierta disparidad de criterios a la hora de asignar un instante a cada una de las fases de la reacción. Esto por un lado muestra la necesidad de una herramienta que aporte datos objetivos del proceso y, por el otro, dificulta la validación estricta de los datos que genera el sistema. No obstante, en las posteriores visitas a la Facultad de Farmacia de la USC y reuniones con el equipo de laboratorio para la grabación de nuevos vídeos, se aprovechó para mostrar estos resultados junto a sus valoraciones a los expertos, quedando estos satisfechos con los datos que produce el sistema.

La utilidad de estas gráficas puede ser interpretada desde varios puntos de vista. Para el alcance de este proyecto, muestran una evolución parametrizada del proceso de irritación de la membrana, o la ausencia del mismo. Esto simplifica el proceso de analizar y etiquetar las distintas fases de la reacción. Con disposición a estudios futuros, la forma de dichas gráficas puede ser ya indicativa del proceso que está ocurriendo en el vídeo. En otras palabras, la forma de las gráficas producidas por distintos compuestos pueden ser generalizadas a patrones, y las curvas obtenidas en ensayos posteriores podrían ser emparejadas con dichos patrones, o encajadas en puntos intermedios que sean representativos de su irritabilidad.

De ser esto posible, deberían detectarse ciertos patrones en las curvas producidas por irritantes medios, distintos de los controles positivos y también de los negativos, que permitan diferenciarse con una simple inspección visual. Para esta fase del proyecto, se habría deseado contar con la perspectiva de los expertos sobre los vídeos de irritantes medios conseguidos en las últimas fases. Valoraciones como las que se muestran en la sección de validación del anterior capítulo pero de este nuevo material y su opinión sobre los datos producidos por la aplicación. Desgraciadamente, debido a retrasos en la obtención de dichos vídeos, los expertos no estaban disponibles durante esta última fase del proyecto, y sólo se pudo validar con ellos la parte referida a los irritantes fuertes.

## 5.2. Fotogramas

En esta sección se muestran algunos fotogramas representativos de los resultados obtenidos. Este estudio propone un uso innovador de las técnicas de visión artificial en el campo de la farmacia, y los resultados intermedios como la detección de ciertas características en las imágenes pueden resultar de tanta utilidad como las curvas de evolución obtenidas a partir de los mismos. Como se mencionaba anteriormente, se han ido mostrando resultados a lo largo de todo el trabajo, así que considérese esta sección como un pequeño compendio de los mismos junto con su significado.

El desarrollo del proyecto partió originalmente de la detección automática de vasos sanguíneos en las imágenes, así que lo natural es comenzar mostrando estos resultados.

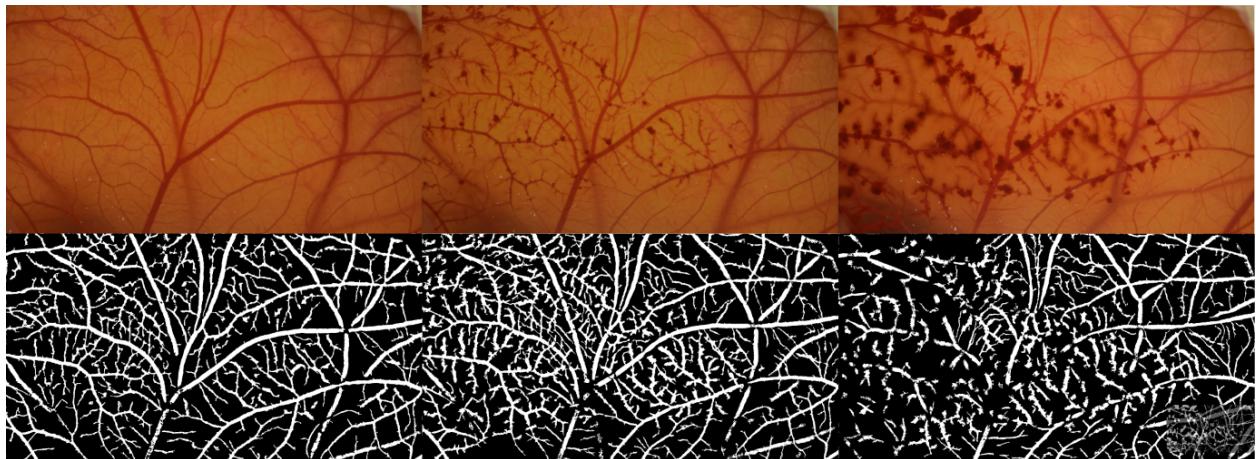


Figura 5.1: Primer ejemplo de detección de vasos.

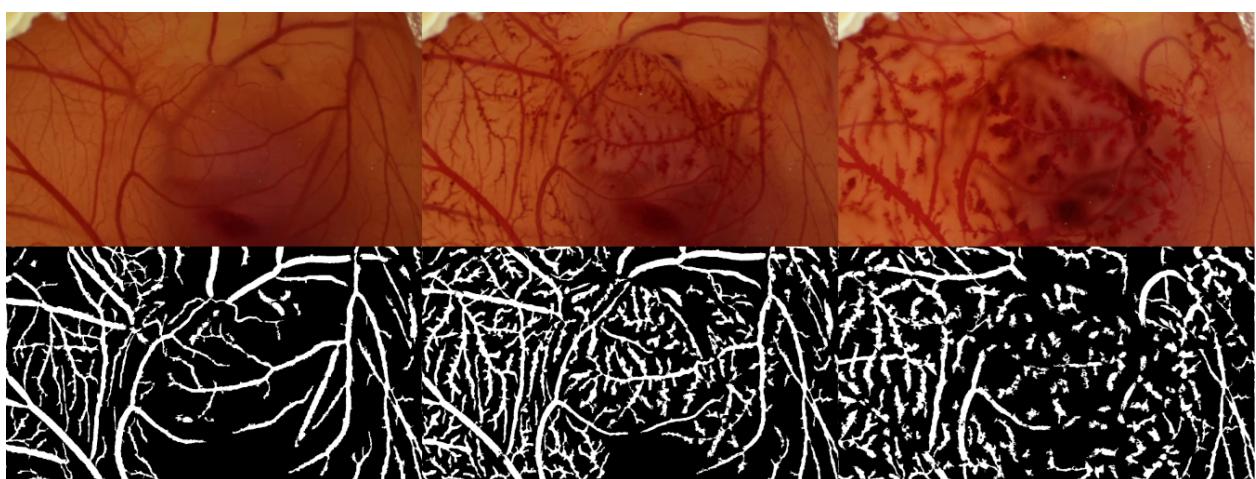


Figura 5.2: Segundo ejemplo de detección de vasos.

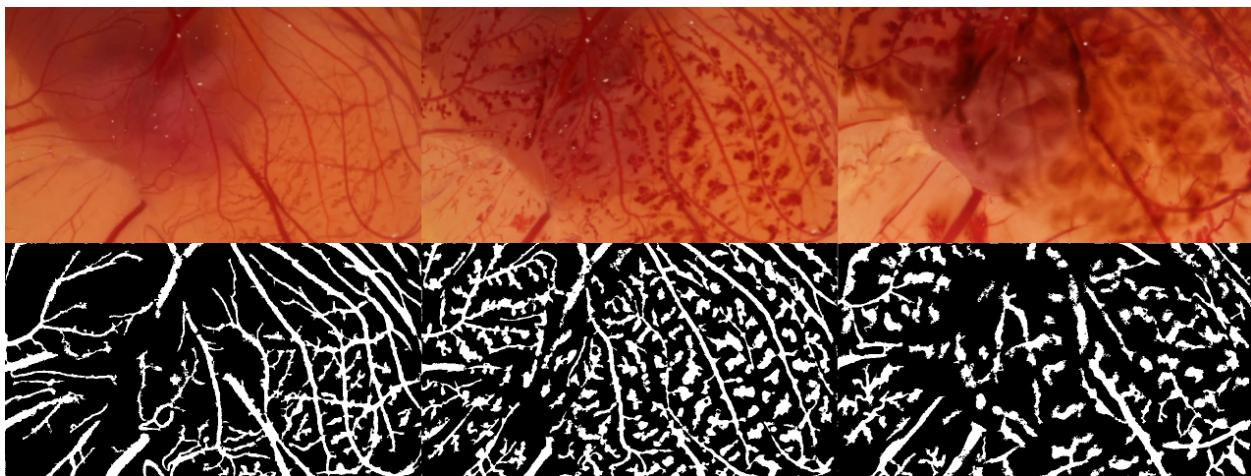


Figura 5.3: Tercer ejemplo de detección de vasos.

Estos se pueden observar en las figuras 5.1-5.3. En ellas se muestran tres fotogramas antes, durante y después de la hemorragia junto con la segmentación automática del sistema. Resulta sencillo apreciar cómo al comenzar a producirse el sangrado, aparecen muchos más vasos sanguíneos que parecían ocultos en la primera columna. Esto es indicativo del proceso de irritación y significa una buena segmentación por parte de la herramienta. También puede apreciarse, como se ha indicado anteriormente, la pérdida de efectividad de esta técnica cuando el sangrado sobrepasa unos ciertos límites. Cuando la destrucción de los vasos sanguíneos provoca la pérdida de su forma, esta segmentación deja de detectar gran parte de la estructura vascular ya que se basa en información morfológica para funcionar.

Así, la columna derecha de las imágenes muestra menos imagen detectada como vasos sanguíneos pese a que el sangrado sólo ha aumentado. Esto, como se ha indicado anteriormente, motiva la búsqueda de una característica que supla esta detección, a fin de describir mejor el proceso de irritación. No obstante, merece la pena mencionar que esta pérdida de efectividad suele ocurrir mucho después de que los expertos hayan etiquetado la última fase del proceso. Sin embargo, ya que la motivación de este estudio es ofrecer información objetiva de lo que ocurre en el vídeo, sigue resultando de interés contar con una segunda característica que modele la reacción. Ambas características pueden combinarse para obtener una mejor descripción de lo que ocurre, ayudar a separar procesos distintos y asemejar reacciones parecidas.

Así, la segunda característica que se escogió fue la detección de sangre por su color en lugar de su forma. La idea es que ésta muestre un crecimiento paralelo a la detección morfológica que, aunque pueda ser menos detallado en las fases iniciales, seguirá creciendo aún cuando la detección de vasos comience a caer, en caso de darse una hemorragia muy pronunciada.

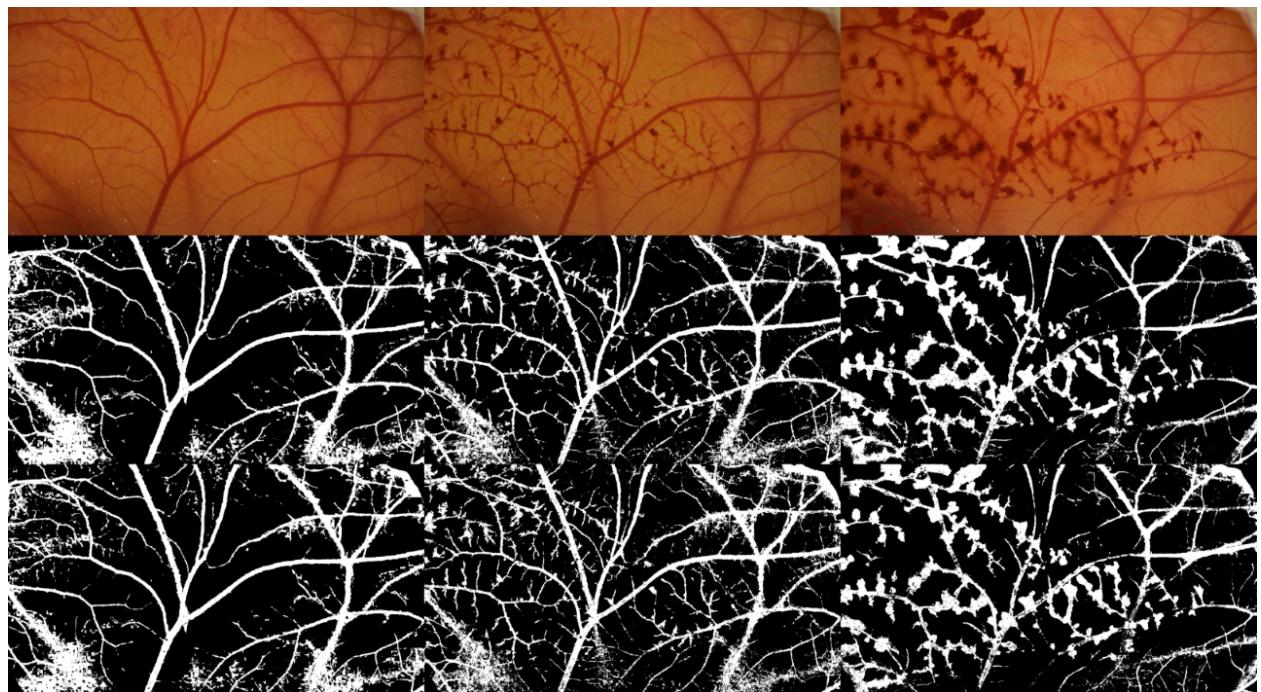


Figura 5.4: Primer ejemplo de detección de sangre.



Figura 5.5: Segundo ejemplo de detección de sangre.

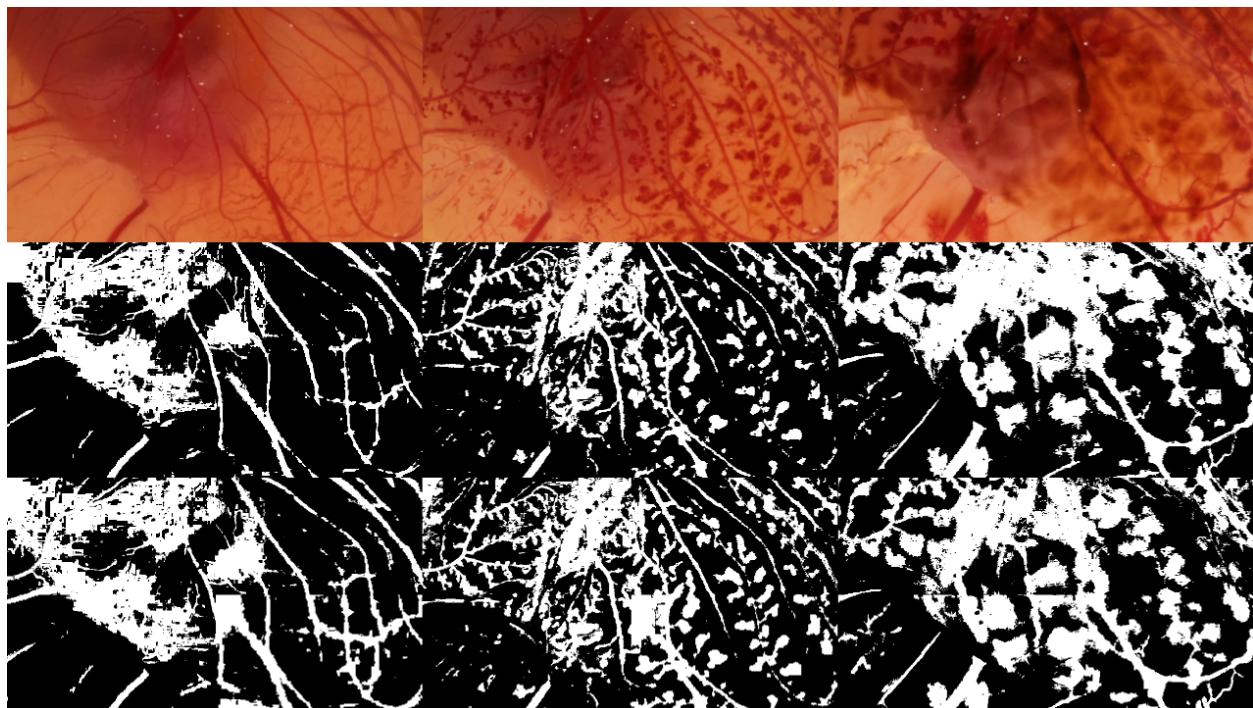


Figura 5.6: Tercer ejemplo de detección de sangre.

Las imágenes 5.4-5.6 muestran esta detección de sangre en base a componentes de color. En la fila intermedia se realiza en base a una umbralización global, mientras que la fila inferior muestra los resultados correspondientes a subdividir la imagen en cuartos y aplicar cuatro umbrales distintos. Esto produce una mejor segmentación de la sangre ya que se adapta mejor a diferencias entre las distintas partes de las imágenes, como se aprecia en la figura 5.6. Este vídeo incluye parte de la bolsa amniótica del embrión, lo que provoca que la umbralización global se desvíe y detecte peor la sangre en la imagen.

Esta subdivisión puede realizarse en porciones menores, a riesgo de que la umbralización se desvirtúe con alguna anomalía. Un ejemplo de esto es el que se observa en la figura 5.5. En esta grabación, parte de la cáscara del huevo aparece en el plano en la esquina superior izquierda. Utilizando una umbralización global de la imagen, no se produce mayor pérdida de detalle, ya que constituye una porción despreciable de la imagen. Sin embargo es muy fácil apreciar sus efectos sobre un umbral con una muestra más pequeña, en la que la cáscara conforma una proporción mayor. Esto destaca la importancia de obtener imágenes lo más limpias posibles de agentes externos, y de aportar a los usuarios una manera de corregir defectos en los vídeos como la mencionada en la sección 4.3.2.

Esto también dota a ambas segmentaciones de su cierta utilidad. La global es más robusta, mientras que subdividir las imágenes puede proporcionar mayor sensibilidad.

Esto hace que ninguna se sitúe sobre la otra en términos de utilidad, y se prefiere facilitar al usuario de la posibilidad de atender a una o a otra.

En conjunto, la utilidad de estas características depende, como es natural, del material base utilizado. Vídeos de mayor calidad, con ausencia de interferencias o agentes externos, producen segmentaciones más claras que aquellos con presencia de cáscaras, burbujas, desenfoque o movimiento. Aún poniéndose en los peores casos, como el de la figura 5.5, estas técnicas proporcionan una segmentación satisfactoria, y combinándolas, suplen sus carencias permitiendo la obtención de información objetiva del proceso.

El objetivo final de este proceso es la obtención de una evolución a lo largo del tiempo, que muestre los cambios que suceden en la imagen de una forma rápida, sencilla y al margen de interpretaciones subjetivas. Así, utilizando esta segmentación en cada fotograma de las grabaciones se obtienen las gráficas que se ilustran en la sección siguiente.

### 5.3. Representación de las evoluciones

Esta sección está dedicada a mostrar los resultados finales de la aplicación de las técnicas explicadas con anterioridad. Una vez segmentadas las imágenes de los vídeos, se recogen los datos y se presentan en forma de evolución de los píxeles segmentados respecto del tiempo. Esto nos permite obtener tres gráficas por cada vídeo. Una muestra la detección de los vasos sanguíneos por medios morfológicos, y las otras dos la detección de sangre por análisis de color. Una más robusta y la otra más detallada. En combinación deberían permitir a los expertos ajustar de forma más objetiva los eventos que ocurren en cada grabación.

Además, la forma de estas gráficas puede ser indicativa del tipo de sustancia con la que se ha inoculado la membrana y, aunque por el momento carezca de rigor clasificar los vídeos automáticamente en base a la forma de estas curvas, sí que pueden servir para mostrar una perspectiva más intuitiva de la reacción de la CAM.

Algunas de estas gráficas se mostraban en la sección 4.2.4 junto con la evaluación realizada por los expertos. Es conveniente consultarla antes que este apartado, ya que explica de forma sencilla cómo interpretar estas evoluciones.

## Capítulo 5. Resultados

---

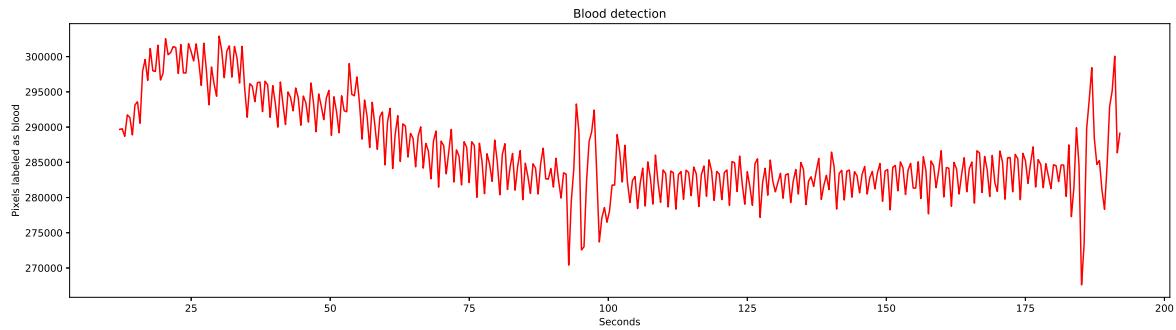


Figura 5.7: Ejemplo 1 de detección de sangre en control negativo.

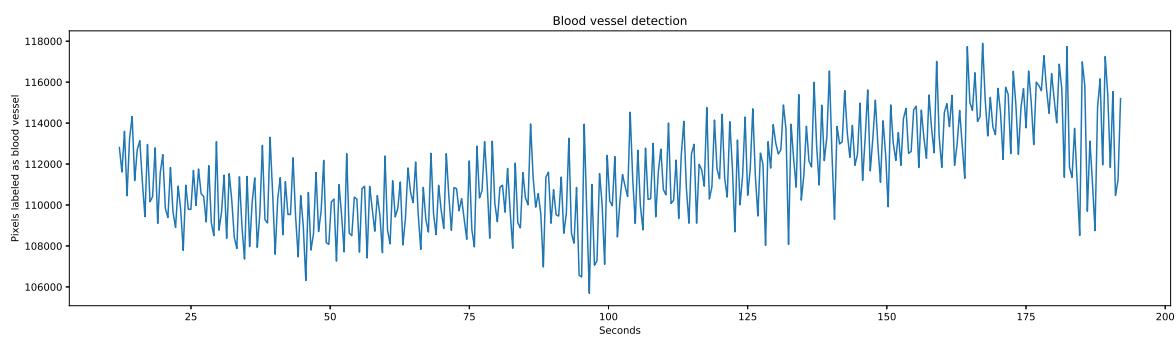


Figura 5.8: Ejemplo 1 de detección de vasos sanguíneos en control negativo.

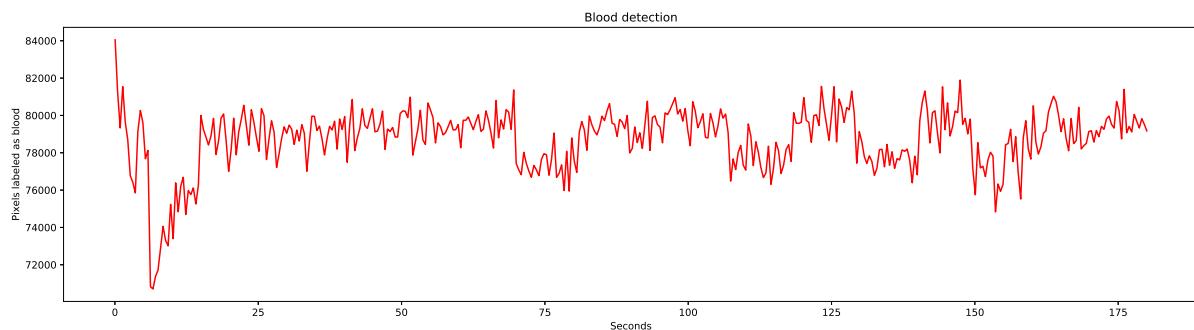


Figura 5.9: Ejemplo 2 de detección de sangre en control negativo.

### 5.3. Representación de las evoluciones

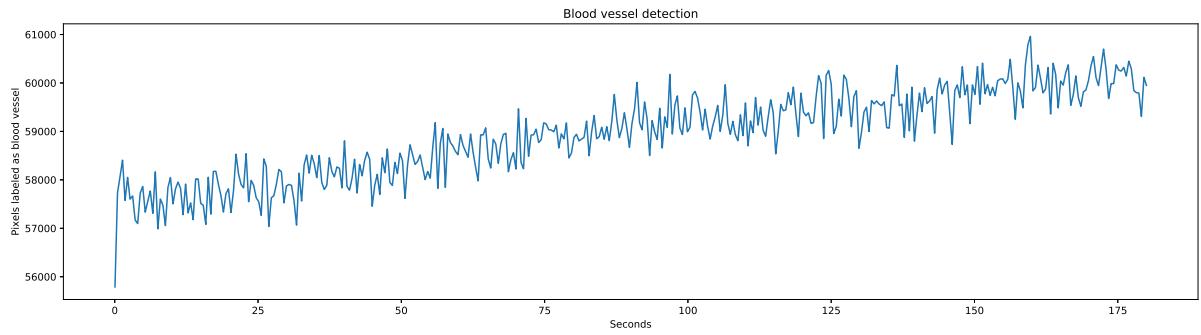


Figura 5.10: Ejemplo 2 de detección de vasos sanguíneos en control negativo.

Las figuras 5.7-5.10 corresponden a la detección de sangre (en rojo) y vasos sanguíneos en dos controles negativos. En estos ensayos únicamente se ha añadido una solución diluida de NaCl a la membrana y se observa muy poca evolución en las gráficas. Existe un cierto crecimiento en algunas y algunos cambios debidos a un cierto ruido, pero en general este se debe a la escala de la gráfica. En las siguientes figuras se muestran los resultados de controles positivos, a fin de poder contrastar.



Figura 5.11: Ejemplo 1 de detección de sangre en control positivo.

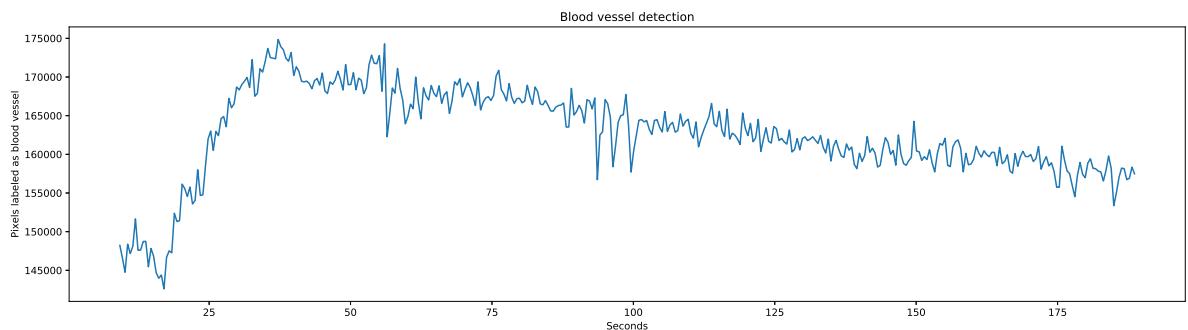


Figura 5.12: Ejemplo 1 de detección de vasos sanguíneos en control positivo.

## Capítulo 5. Resultados

---

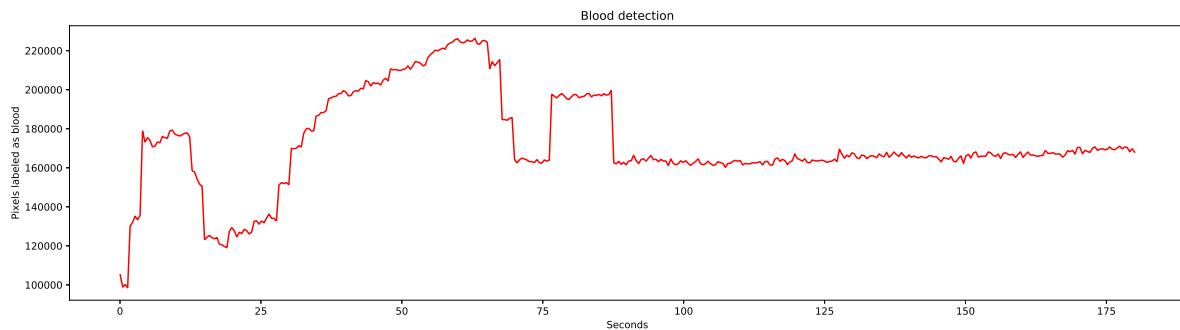


Figura 5.13: Ejemplo 2 de detección de sangre en control positivo.

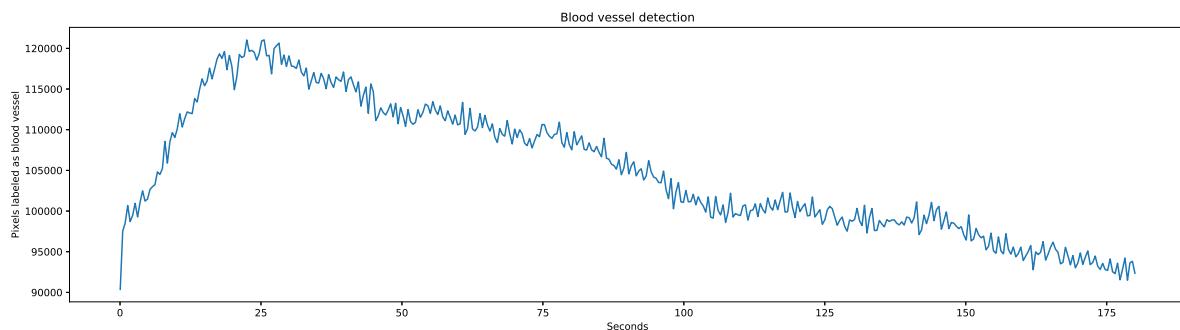


Figura 5.14: Ejemplo 2 de detección de vasos sanguíneos en control positivo.

Observando las figuras 5.11-5.14 se puede distinguir fácilmente la diferencia con los controles negativos. Existe una clara evolución, especialmente distingible en la detección de vasos sanguíneos. Ésta está caracterizada por un rápido crecimiento seguido de una caída progresiva en la detección de vasos sanguíneos que se combina con crecimiento en la detección de vasos sanguíneos. Estas gráficas son producidas por inoculación con disoluciones 0.1N de NaOH (sosa cáustica). Y son también distinguibles de aquellas producidas por irritantes medios como los mostrados a continuación.

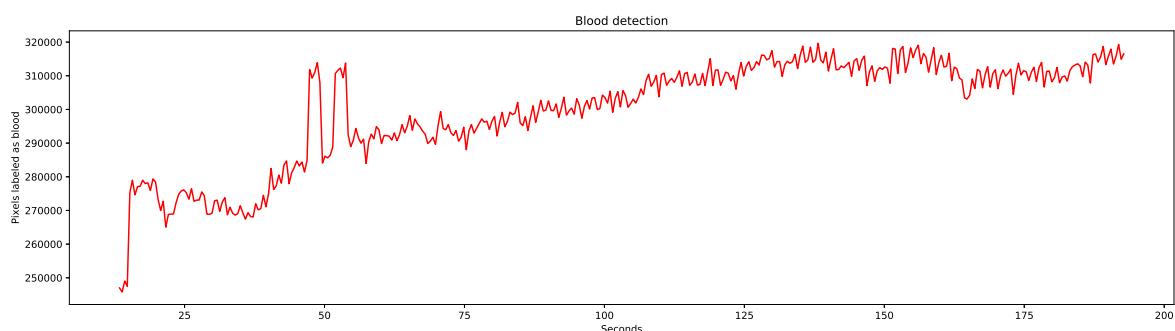


Figura 5.15: Ejemplo de detección de sangre en un ensayo con polisorbato 20.

### 5.3. Representación de las evoluciones

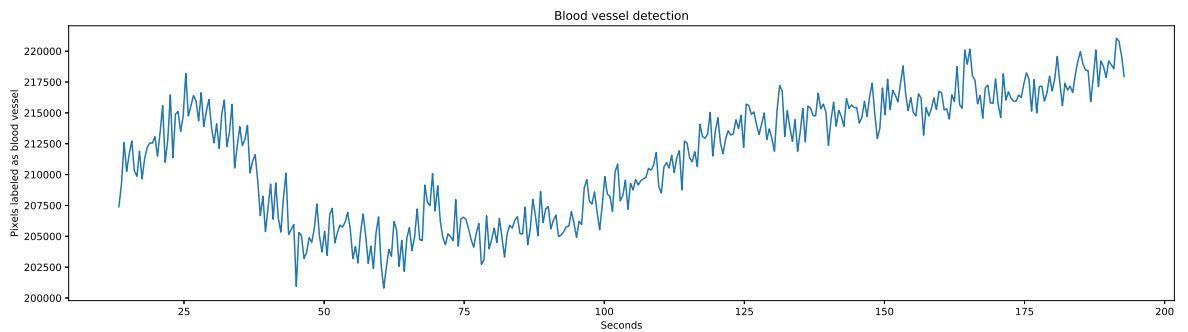


Figura 5.16: Ejemplo de detección de vasos sanguíneos en un ensayo con polisorbato 20.

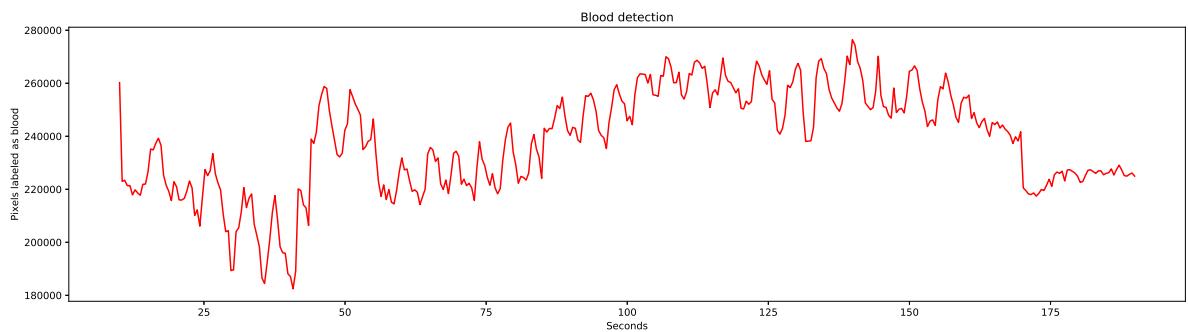


Figura 5.17: Ejemplo de detección de sangre en un ensayo con cloroformo.

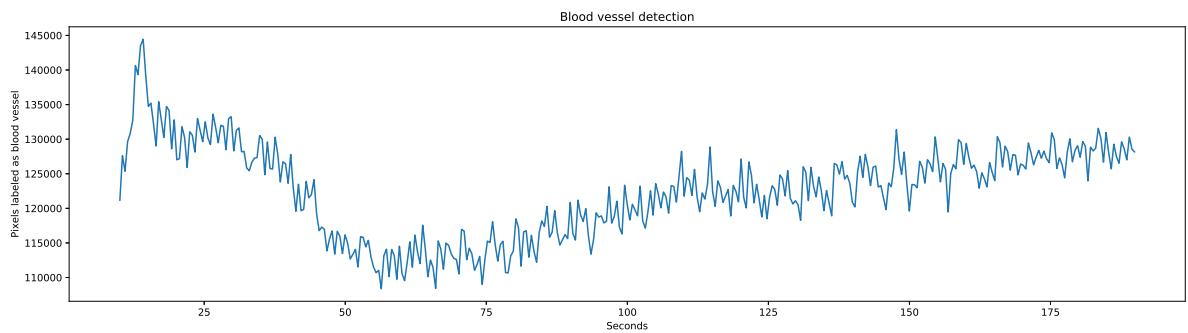


Figura 5.18: Ejemplo de detección de vasos sanguíneos en un ensayo con cloroformo.

Las figuras 5.15 y 5.16 muestran, respectivamente, la detección de sangre y de vasos sanguíneos en un vídeo de un ensayo para evaluar la toxicidad de tween20 (polisorbato 20). De forma análoga, las figuras 5.17 y 5.18 muestran su equivalente en un ensayo con cloroformo. Ambas son sustancias medianamente irritantes, y de sus gráficas se pueden extraer similitudes y contrastes con los controles positivos.

## Capítulo 5. Resultados

---

En primer lugar, en la representación de vasos sanguíneos vemos un crecimiento mucho menor que utilizando sosa cáustica, seguido de una caída parecida a la producida por el sangrado profuso de los irritantes fuertes, aunque esta en realidad está provocada por la lisis. Tras esto, hacia los segundos 75 se aprecia un crecimiento por la continuación del sangrado, mucho menor que el de los controles positivos, y que no existe en esta fase en sus gráficas. Este sangrado también se puede ver en las gráficas de la detección de sangre, a partir del segundo 40.

La diferencia de escala entre todas estas gráficas es considerable, aquí se presentan ajustadas para poder obtener una vista más detallada de las evoluciones, sin embargo sólo observando los picos producidos por el ruido se aprecia una gran diferencia de escala entre el crecimiento que producen los irritantes fuertes y los medios.

Además, el aspecto de estas gráficas confirma la intuición de que compuestos similares producirán evoluciones parecidas. La presencia de factores externos como la orientación del huevo, aparición del embrión en el plano, diferencias entre estructuras vasculares de distintos huevos y demás sigue produciendo artefactos en las gráficas, que las dotan de diferencias e impiden una mayor facilidad para la automatización de este proceso o una posible omisión del análisis visual del vídeo. Sin embargo, estos resultados son más que satisfactorios a la hora de mostrar las diferencias que existen entre las reacciones que provocan distintos compuestos.

Así, mientras que en los controles positivos ocurre una reacción tan rápida que resulta difícil apreciar la hemólisis, existe una fase bien diferenciable en los ensayos con irritantes medios de caída de la detección no provocada por la rotura de los vasos.

La observación de estas gráficas, en conjunto con la evaluación visual de los vídeos puede ayudar en gran medida a los expertos a llegar a conclusiones menos subjetivas sobre lo que ocurre en las grabaciones. Una sencilla evaluación visual de estas evoluciones puede permitir obtener un marco de referencia de qué momentos del vídeo es interesante inspeccionar, evitando así el tedio de analizar la totalidad del metraje desde una base inicial.

# Capítulo 6

## Aplicación

Con intención de mostrar la utilidad de las técnicas estudiadas a lo largo de este proyecto se desarrolló una pequeña aplicación con una interfaz gráfica sencilla que permita a los usuarios analizar los vídeos en conjunto con las curvas de resultados que proporcionan los sistemas de detección de vasos sanguíneos y de sangre. Este capítulo está dedicado a explicar la estructura y funcionamiento de dicha aplicación.

### 6.1. Análisis

Esta aplicación deberá servir como una interfaz de uso entre los expertos y las técnicas de detección desarrolladas en el proyecto. Con esta motivación en mente, interesa que resulte sencilla de utilizar y compatible con distintos entornos de trabajo. La idea es simple, el usuario escoge un vídeo que desee analizar, selecciona un punto inicial en la grabación, posterior al paso de la pipeta con la sustancia a evaluar y que servirá como segundo 0 para el análisis. Tras esto, configurará ciertos parámetros que considere necesarios y, si se requiere, seleccionará un área de interés a analizar exclusivamente, para evitar presencia de agentes externos en el plano. Una vez configurada la operación, se procederá a procesar el vídeo y mostrar los resultados. El objetivo es que el usuario sea capaz de visualizar lo que está ocurriendo en la grabación junto a las gráficas de resultados, de forma que pueda dirigirse rápidamente a los picos o valles en las curvas y observar lo que muestra el vídeo en ese instante. De esta forma, podrá tomar nota rápidamente de los instantes en los que considere que comienzan las fases de hemorragia, lisis y coagulación basándose no solamente en la observación visual, sino también en datos objetivos.

De esta forma, además de aportar la funcionalidad de permitir al usuario observar los resultados del análisis, la aplicación debe cumplir los siguientes requisitos no funcionales:

- **Usabilidad:** La aplicación debe ser intuitiva y sencilla de utilizar. Ya que su motivación es ayudar a los expertos a analizar los vídeos más cómodamente, no debe convertirse en un estorbo en su trabajo ni requerir de una gran inversión en tiempo para aprender a utilizarla.

- **Compatibilidad:** Dado que se trata de una herramienta destinada al uso en el lugar de trabajo por parte de los expertos, debe ser compatible con diversos entornos.
- **Interactividad:** Esta aplicación está destinada a mostrar un punto de vista alternativo al análisis visual subjetivo de los videos, así, debe procurar mostrar al usuario la información de forma gráfica y fácilmente interpretable, y permitirle seleccionar cómodamente qué es lo que desea ver.
- **Estabilidad:** El sistema debe evitar cierres inesperados, y recuperarse de posibles errores que puedan ocurrir durante su ejecución.

Tomando lo anterior en consideración, se procede a diseñar una pequeña aplicación que cumpla estos requisitos.

## 6.2. Diseño

Antes de proceder al desarrollo de la aplicación, conviene realizar una fase de diseño en la que se decida tanto la estructura que esta va a tener como el aspecto que va a mostrar al usuario. Este paso es de vital importancia para un correcto desarrollo, ya que no sólo ayuda a estructurar el proceso de implementación, sino que también contribuye a detectar problemas antes de que estos se den en las siguientes fases.

A estas alturas del desarrollo del proyecto, ya se habían diseñado, implementado y probado las técnicas que resultaban de interés para el estudio. Estas habían sido recopiladas en forma de librería que permitiera importar sus funciones para utilizarlas en distintas aplicaciones, principalmente, para realizar las pruebas y obtener resultados que analizar durante toda la fase de implementación de la metodología. Esta librería, como se indicaba en el capítulo de implementación de la metodología, había sido desarrollada en Python, junto con su implementación de la librería de visión artificial OpenCV. Esto condiciona parte del diseño, ya que resulta sencillo utilizar directamente la biblioteca implementada a lo largo del estudio en su lenguaje y crear una aplicación con su interfaz que permita aplicar sus funciones.

### 6.2.1. Estructura

Para el desarrollo de esta aplicación se decidió estructurar el sistema en base al patrón Modelo-Vista-Controlador, o *MVC*. Este patrón de arquitectura software permite separar la interfaz con la que interactúa el usuario de la lógica de datos que está ocurriendo detrás.

Con esto se desacoplan las distintas partes del sistema y se permite una mejor separación de conceptos.

Como su propio nombre indica, está formado por las siguientes partes:

- **Vista:** La vista es la parte del programa con la que el usuario interactúa. Ésta es la encargada de mostrar al usuario los datos de forma visual y recoger las acciones que realiza el usuario para comunicárselas al controlador.
- **Controlador:** Esta es la parte central de la arquitectura, que separa la vista del modelo, desacoplando la representación gráfica de los datos de las operaciones que se realizan con ellos en la capa interna. Su función es recibir las peticiones del usuario que determinan cómo manipular el modelo, recibir las respuestas de esta parte y actualizar la vista de forma correspondiente.
- **Modelo:** El modelo forma la parte interna de la estructura, y es dónde ocurre el procesamiento de los datos. Únicamente atiende peticiones que realice el controlador y devuelve los datos correspondientes, sin importarle la forma de la que vayan a ser presentados al usuario. En el caso de este trabajo, el modelo es el que utiliza la librería de segmentación de irritación para procesar los vídeos y devolver los resultados extraídos.

Su estructura simplificada se muestra en la figura 6.1. Así, el usuario únicamente interactúa con la vista. Esta genera eventos correspondientes a las acciones que realiza el usuario sobre la interfaz. Estos eventos lanzan operaciones en el controlador, que actúa como corresponda. En algunos casos actualizará la vista para continuar con la ejecución, en otras obtendrá datos que enviar al modelo, configurando u ordenando ejecutar el análisis que sea pertinente realizar. El modelo recibirá estos datos y peticiones y efectuará las operaciones correspondientes, enviando los datos procesados al controlador para que este actualice la vista y el usuario los pueda observar.

Así, el modelo consistirá en una clase con la funcionalidad necesaria para efectuar el análisis de ficheros de vídeo, procedimientos que configuran parámetros relacionados con dicho análisis y funciones que devuelven los datos que requiera el controlador.

El controlador contará con funciones que atiendan cada uno de los eventos que se puedan lanzar desde la vista, formas de convertir los datos producidos por la librería de visión por computador a un formato mostrable en la interfaz y funciones que modifiquen, configuren y realicen peticiones al modelo en base a las intenciones que el usuario muestra en la interfaz.

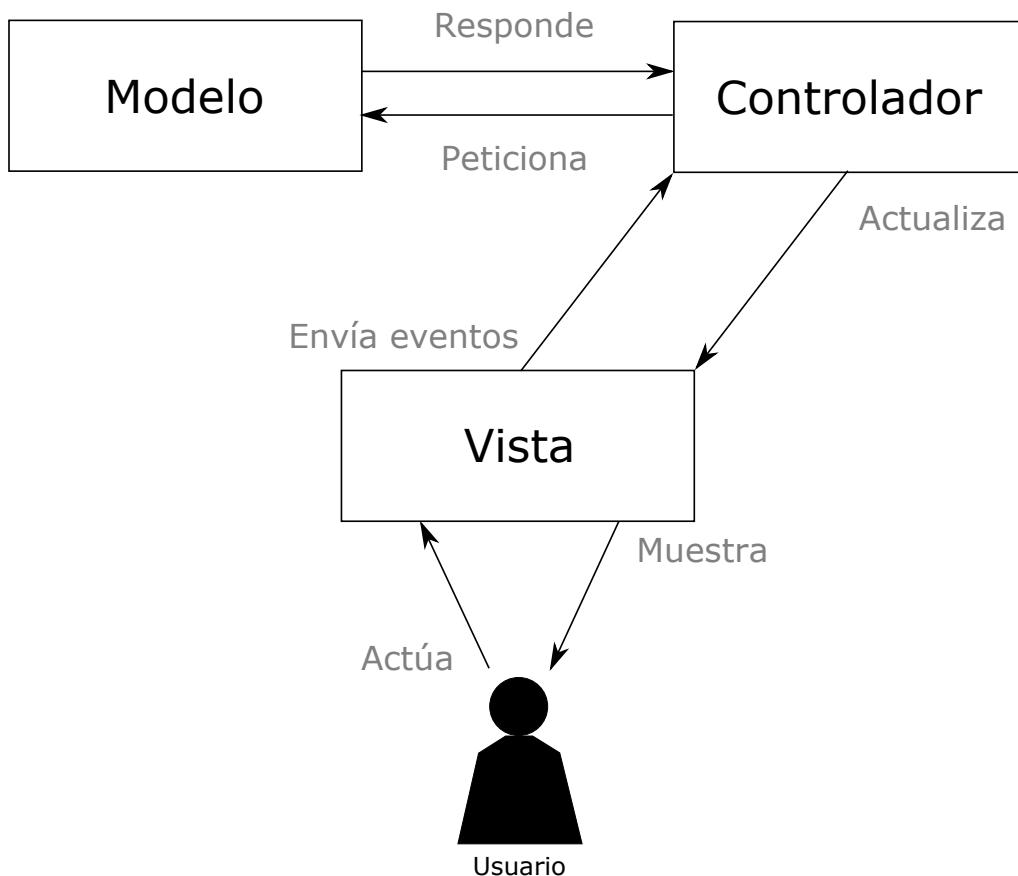


Figura 6.1: Diagrama del patrón *MVC*.

La vista constará de una serie de ventanas, cada una de ellas con información para el usuario y diferentes opciones para que este interactúe. Los eventos que genere el usuario sobre la interfaz llamarán a funciones del controlador y este utilizará diversos procedimientos de la vista para actualizarla y mostrar las ventanas pertinentes y las imágenes que representen los datos generados por el modelo, convenientemente transformados a un formato visible.

Con esto se consigue que la generación de los datos que resulten de interés al usuario, aquellos extraídos de procesar los vídeos, no dependa de la forma de representarlos en pantalla al mismo. Así, modificaciones sobre la interfaz gráfica no afectarán de manera alguna a la forma en la que se realiza el análisis. Esto compatibiliza la librería implementada a lo largo del proyecto con esta aplicación, con ella actuando sencillamente como interfaz para el usuario y aplicando las técnicas que éste quiera utilizar sin que este se tenga que preocupar por detalles de implementación. Una representación sencilla de la estructura de la aplicación es la que se muestra en la figura 6.2.

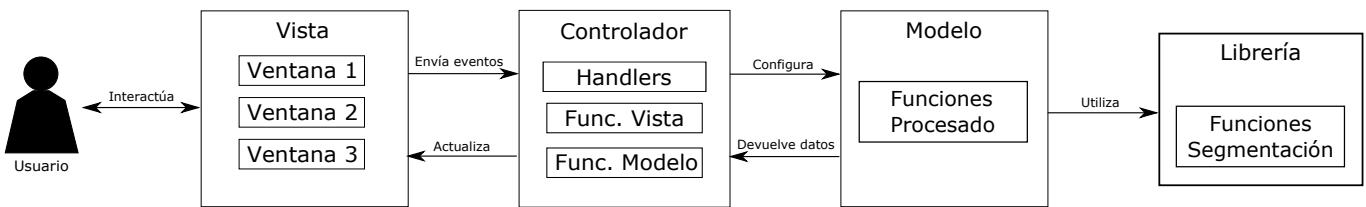


Figura 6.2: Diagrama simplificado de la estructura del sistema.

### 6.2.2. Interfaz

Una vez establecida la estructura base de la que va a constar la aplicación, debe diseñarse el aspecto que presentará la interfaz con la que interactuará el usuario. El diseño de una interfaz es tan importante como su implementación, o más, a fin de que ésta sea sencilla de utilizar, cómoda y visualmente agradable.

Dado que el proceso de segmentación de los vídeos es considerablemente lineal, y para evitar confusión a la hora de utilizar la aplicación, se diseñó el uso de la herramienta como una serie de pasos consecutivos, cada uno de ellos permitiendo al usuario elegir cómo prefiere que se realice el procedimiento, antes de proceder al procesado del vídeo y posterior ilustración de los resultados. Los pasos a realizar en una ejecución normal serían los siguientes:

- **Paso I - Selección de fichero:** El usuario selecciona el fichero de vídeo que desea analizar. Para esto se le presenta una ventana en la que pulsar un botón para elegir el archivo que se procesará.
- **Paso II - Elección de instante inicial:** El usuario elige el instante inicial de la grabación. Dicho instante debe coincidir justo después de inocular la membrana CAM con el reactivo a evaluar. Con este fin, se le muestra al usuario una ventana que contiene un fotograma del vídeo, así como una barra correspondiendo a la duración del vídeo. El usuario moverá el slider sobre la barra o clicará en un punto para mostrar en el fotograma ese instante en el vídeo. Normalmente los expertos suelen anotar el tiempo de la grabación equivalente al instante 0, así que pueden seleccionarlo directamente o explorar el vídeo para ajustarlo como prefieran.
- **Paso III - Configuración:** Ahora el usuario podrá, si así lo desea, cambiar varios parámetros de la configuración del proceso. Parámetros como la duración máxima a analizar del vídeo (en algunos casos puede interesar procesar únicamente los primeros segundos de la grabación en caso de que la reacción haya sido especialmente agresiva), la frecuencia con la que tomar medidas del vídeo (no analizar todas las imágenes

produce gráficas con menor ruido y acelera enormemente el procesado, al coste de cierta resolución temporal sólo importante en caso de intervalos de adquisición muy largos). También se permite al usuario configurar el suavizado de umbrales de la segmentación de vasos sanguíneos y si desea que dicha segmentación se realice en base a la imagen global o si prefiere subdividirla en cuartos.

Para ello, se proporciona al usuario una ventana con distintos campos en los que introducir los parámetros que utilizar. Dicha ventana contendrá parámetros por defecto como la duración estándar de un ensayo HET-CAM (5 minutos) o parámetros de suavizado que hayan mostrado buenos resultados en las fases previas del estudio. De esta forma el usuario no tendrá que perder demasiado tiempo en caso de querer ejecutar un análisis rápido. Además, se le permite realizar un paso opcional de selección de área a analizar si así lo prefiere.

- **Paso III.A - Selección del área de interés (opcional):** Si el usuario así lo desea, puede elegir un área rectangular menor dentro de la imagen sobre la que realizar el análisis. Este paso no es necesario, ya que por defecto se analizará la totalidad de la imagen, pero puede resultar de utilidad en caso de que parte de la cáscara del huevo aparezca sobre el plano, o el experto decida que quiere dejar parte de la membrana fuera del plano o centrarse en cierta zona. La utilidad de este paso depende de cada vídeo y caso concreto, es por ello que es opcional.
- **Paso IV - Procesado del vídeo:** Una vez el usuario ha configurado el análisis a su gusto, o utilizado las opciones por defecto, comienza el procesado del vídeo. Este paso carece de acción alguna por parte del usuario, quién únicamente tendrá que esperar a que el proceso se complete. Para ayudar a estimar la duración restante del proceso se mostrará una barra de progreso que se actualizará según avance el análisis dentro del margen inicial y duración establecidos.
- **Paso V - Interacción con los resultados:** Tan pronto como se complete la etapa de procesamiento del vídeo, se mostrarán sus resultados al usuario. A fin de que tenga la capacidad de evaluar conjuntamente la información del vídeo con los datos numéricos extraídos por la herramienta, se mostrará una ventana que contendrá el fotograma actual del vídeo, junto con las imágenes producidas por extracción de ambas características, vasos sanguíneos y sangre. En combinación con estos fotogramas se mostrarán también las gráficas dibujadas con los datos numéricos obtenidos. Al usuario se le proporcionará una barra con un slider como la del paso II. Éste podrá moverla para desplazarse por la duración del periodo analizado del vídeo, mostrando tiempo 0 en el instante inicial marcado y terminando al concluir la duración especificada. Al mover la barra, se actualizarán los fotogramas para mostrar

dicho punto en el tiempo a fin de que el usuario pueda determinar exactamente qué ocurría en ese instante del vídeo. Además, se indicará también en las gráficas en qué instante del vídeo se encuentra, para que el usuario pueda determinar la tendencia de la evolución respecto a lo que ha ocurrido antes y después, y así poder interactuar de forma dinámica con los resultados, una forma más cómoda que únicamente observando las figuras y buscando su equivalencia con los vídeos utilizando los ejes.

Para diseñar la interfaz de la aplicación a la que este capítulo se dedica se utilizaron una serie de prototipos que mostrasen aproximadamente el aspecto del que se pretendía dotar a la misma. Estos prototipos fueron generados utilizando Balsamiq Mockup 3.5.

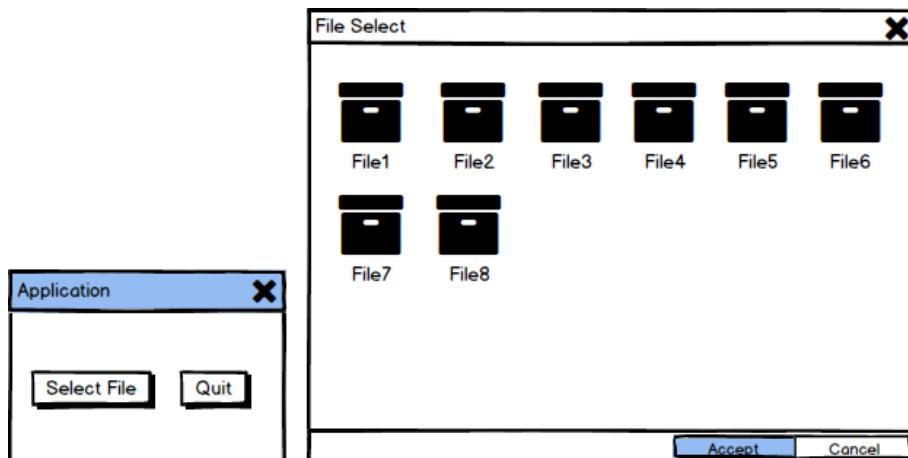


Figura 6.3: Prototipo de selección de fichero.

La figura 6.3 muestra una aproximación a cómo sería la selección de fichero. Estas ventanas carecen de la menor complejidad. El usuario únicamente tiene que pulsar el botón de seleccionar fichero para que se abra una ventana del explorador de ficheros, desde ahí sólo deberá navegar hasta el archivo de vídeo que quiera procesar y seleccionarlo.

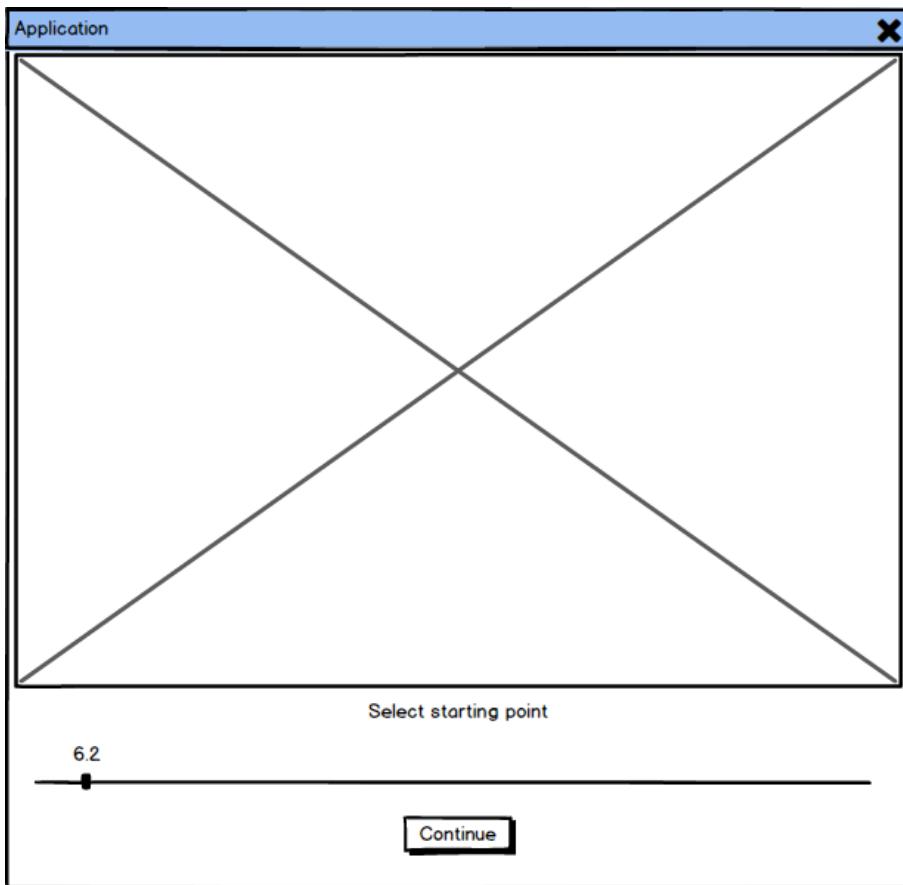


Figura 6.4: Prototipo de elección de instante inicial.

Como lo siguiente que debe hacer el usuario es elegir un instante inicial, se le presentará una ventana como la de la figura 6.4. En ella el usuario únicamente tendrá que ajustar el slider hasta que esta marque el primer instante tras la inoculación de la membrana y clicar en continuar para proseguir en el proceso.

A continuación el usuario puede configurar a su gusto las opciones del procesado, o utilizar los valores por defecto. A fin de que pueda realizar esta configuración aparecerá una ventana como la que se muestra en la figura 6.5. Como se ha explicado anteriormente, aquí el usuario podrá especificar la duración del ensayo de ser esta mayor o menor que los 300 segundos por defecto. También podrá especificar un mayor o menor intervalo de frames descartadas entre cada una muestrada, un mayor o menor suavizado de los umbrales utilizados en la segmentación de sangre y si desea subdividir la imagen al utilizar esta técnica. Aquí el proceso se ramifica. De elegir procesar el vídeo le aparecerá una sencilla barra de progreso representando el avance del procedimiento antes de mostrarle los resultados.

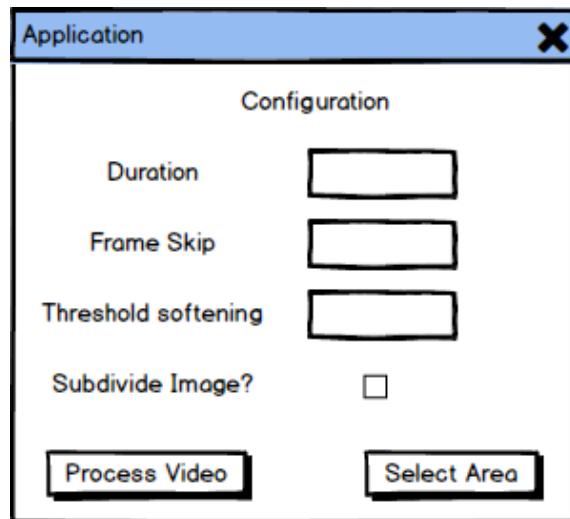


Figura 6.5: Prototipo de ventana de configuración.

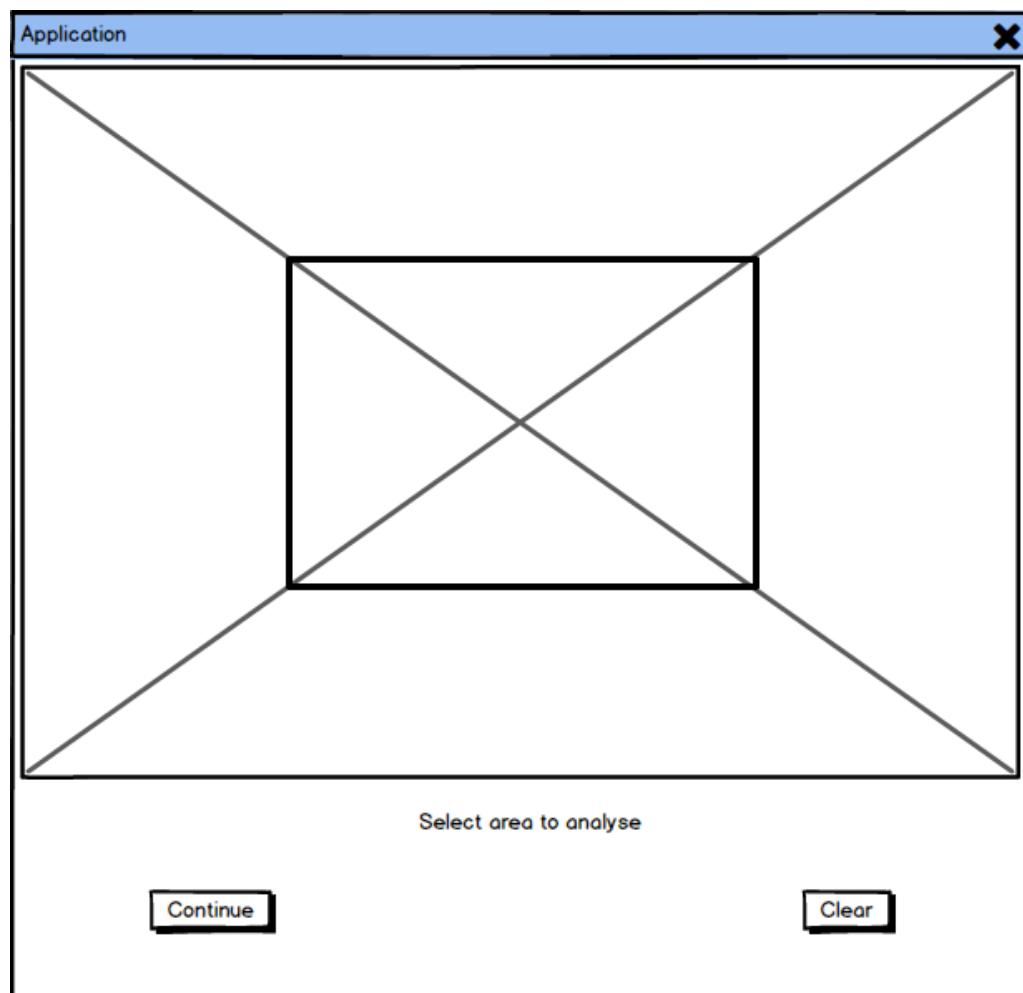


Figura 6.6: Prototipo de ventana de selección de área de interés.

## Capítulo 6. Aplicación

---

De elegir seleccionar área, al usuario se le mostrará una ventana como la de la figura 6.6. En esta se podrá seleccionar un área rectangular de la imagen representando el área que se quiera analizar. En la ventana aparecerá el primer fotograma del metraje que se va a analizar y el usuario, clicando y arrastrando, podrá indicar las dos esquinas del rectángulo del área en la que se quiera centrar. Cuando lo haga, se pintará el rectángulo que ha escogido. A mayores, hay dos botones en esta ventana, uno sirve para continuar con el área seleccionada, el otro permite eliminar la selección realizada y reiniciar al conjunto de la imagen.

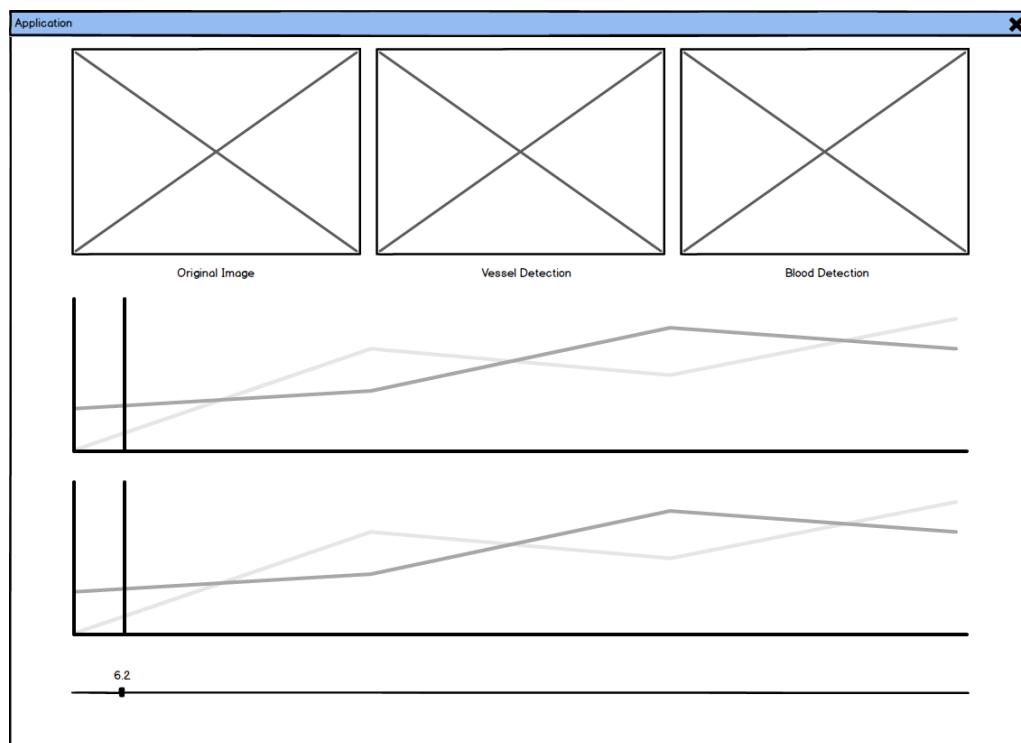


Figura 6.7: Prototipo de ventana de resultados.

Tanto si se elige un área o se utiliza la imagen global, tras procesarse el vídeo, se muestra al usuario una ventana de resultados como la que aparece en la figura 6.7. Aquí podrá mover el slider inferior para seleccionar el instante que quiera observar en el vídeo. Hacer eso actualizará los fotogramas para mostrar tanto la imagen original como ambas segmentaciones en las tres imágenes superiores. Esto, además, actualizará las gráficas para que muestren el lugar actualmente seleccionado.

## 6.3. Implementación

Una vez realizado el diseño de la aplicación, contamos con un modelo de la estructura que debe tener el programa y de cómo debe ser la interfaz que se muestra al usuario. Con esto se procede a implementar el sistema de acuerdo al diseño establecido.

### 6.3.1. Material para el desarrollo

Como se adelantaba en la sección de diseño, este proyecto se desarrolló por completo utilizando Python, a fin de aprovechar la flexibilidad y facilidad de implementación que aporta este lenguaje, junto a la funcionalidad que pone a nuestra disposición la librería de visión por computador OpenCV. Esto conforma la base software sobre la que se asienta el proyecto, y dado que lo que se pretende es de dotar a la librería desarrollada a lo largo del trabajo de una interfaz gráfica que permita la interacción de los expertos con la misma, se procede a buscar una biblioteca gráfica que permita implementar la aplicación. Teniendo en cuenta que el modelo de la misma es bastante sencillo, que debe ser compatible con cualquier sistema del que dispongan los expertos, ligera y fácil de utilizar, se optó por implementarla usando TkInter.

TkInter consiste en un binding de la librería gráfica Tcl/Tk para Python. Se la considera la biblioteca de interfaz gráfica estándar de Python. Viene incluida en el paquete de instalación estándar de Python para Windows y en la mayoría de los destinados a distribuciones de Linux que lo soporten y macOS. Esto evita tener que incluir la librería con la instalación de la aplicación, y le confiere soporte y compatibilidad en gran número de entornos de trabajo. Esto, además por de ser una biblioteca considerablemente ligera, la convierte en la elección de este trabajo para desarrollar la aplicación.

Así pues, el software utilizado en la implementación de la aplicación fue:

- **Lenguaje:** Python 3.5.5 Anaconda Distr.
- **Gestor de paquetes:** Conda 4.4.10
- **Librería de visión por computador:** OpenCV 3.1.0
- **Librería de interfaz gráfica:** TkInter 8.6
- **Librería de segmentación:** BloodSeparationLib desarrollada durante el proyecto.
- **Sistema Operativo:** Windows 7 Home Premium SP1

Que se ejecutó en un ordenador de sobremesa con los siguientes componentes:

- **CPU:** Intel Core i5-4690k @4.5GHz
- **GPU:** NVIDIA GeForce GTX 770 2GB
- **RAM:** 8GB DDR3-SDRAM @799MHz
- **SSD:** Samsung 850 EVO 500GB

### 6.3.2. Codificación

Una vez decidida la librería que se iba a utilizar, se procedió a la programación de la interfaz. Se desarrollaron las clases necesarias y se probaron de forma individual.

En primer lugar se implementó el modelo utilizando para ello la biblioteca de segmentación de vasos y de sangre que se desarrolló a lo largo del trabajo. Esta contiene las funciones necesarias para extraer información de los vasos sanguíneos y de la sangre detectada en imágenes. El modelo fue creado en base a las funciones que se utilizaron para probar la utilidad de las distintas técnicas de segmentación, y se encarga de la extracción de fotogramas de los vídeos, aplicación de las funciones de la librería de segmentación y expedición de los datos extraídos. Un diagrama sencillo de esta clase se puede observar en la figura 6.8.

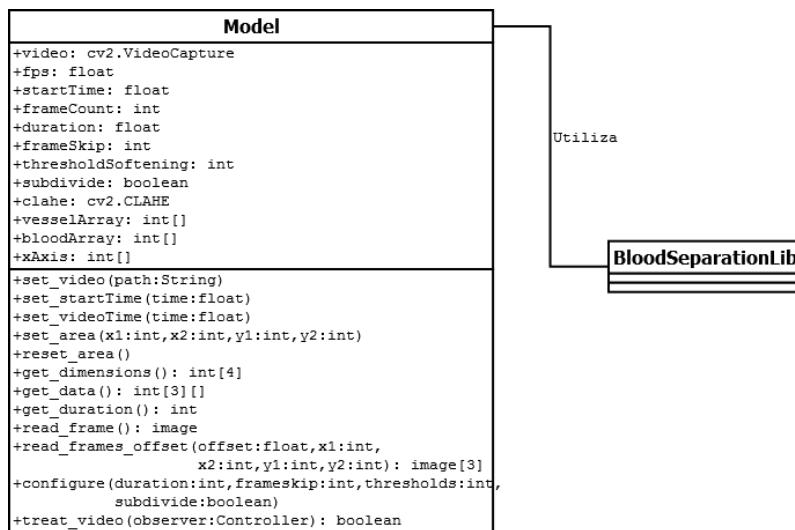


Figura 6.8: Diagrama de la clase modelo.

A continuación se desarrollaron de forma conjunta la vista y el controlador. La primera contiene las ventanas que muestra al usuario, junto con funciones para mostrarlas u ocultarlas, funciones para cambiar las imágenes que se muestran y formas de informar al usuario de posibles errores. El controlador contiene los handlers para cada evento que

ocurra en la vista, y maneja las operaciones que sea necesario mantener con el modelo. La figura 6.9 muestra un diagrama simplificado de la aplicación después de desarrollar estas dos clases.

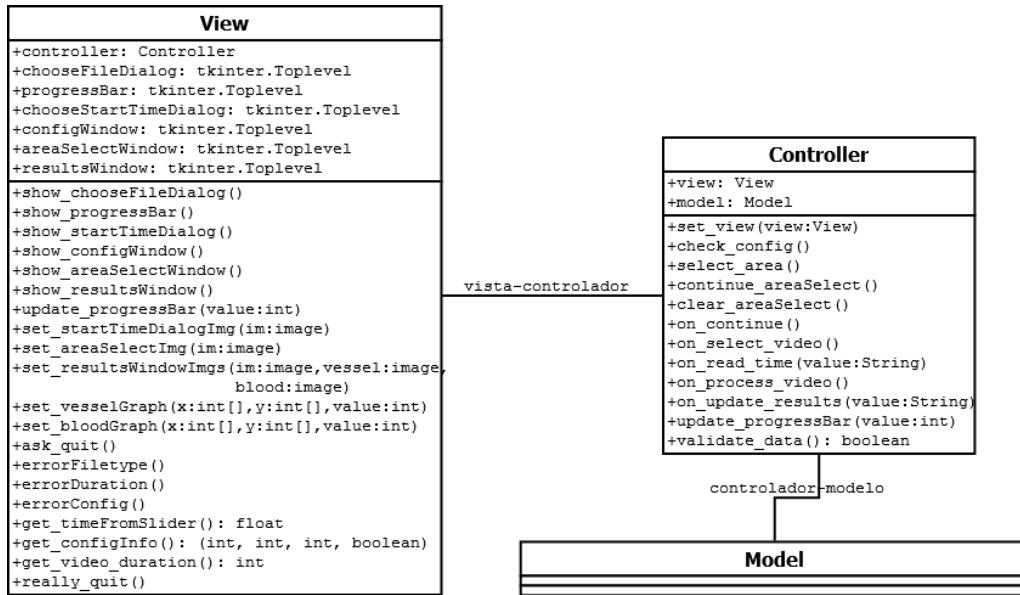


Figura 6.9: Diagrama de las clases vista y controlador.

Con la aplicación desarrollada, se muestran a continuación algunas de las ventanas que se encontrará el usuario. Nótese que al utilizar esta biblioteca gráfica, TkInter, para la implementación de la interfaz de usuario, el aspecto de algunos widgets puede variar entre sistemas operativos, sin embargo su funcionalidad no se verá afectada. Las imágenes que se añaden a continuación muestran el aspecto de la aplicación ejecutándose en Windows 7.

En la figura 6.10 aparece la ventana correspondiente a la elección del instante 0 a partir del cual iniciar el análisis. Lo que aparece en la imagen es la membrana corioalantoide enfocada y parte de la pipeta desenfocada en mitad del plano. Moviendo el slider inferior el usuario puede desplazarse hasta el momento en el que la pipeta desaparezca del plano y pulsar continuar para proseguir con la ejecución. La idea de utilizar un slider está motivada por dos razones. En primer lugar, es una forma sencilla de desplazarse por una pista de vídeo sin tener que esperar a que este transcurra con los tradicionales botones de *play* y *pausa*. Algunas de las grabaciones no muestran el comienzo del ensayo hasta bien entrados los 6 minutos, y además, los expertos en ocasiones suelen tomar nota del comienzo del experimento, esto les permite llegar directamente a la parte de interés. También podría conseguirse con un cuadro de texto en el que introducir el instante y que el vídeo se situara directamente en el momento indicado, pero esto puede provocar distintos errores

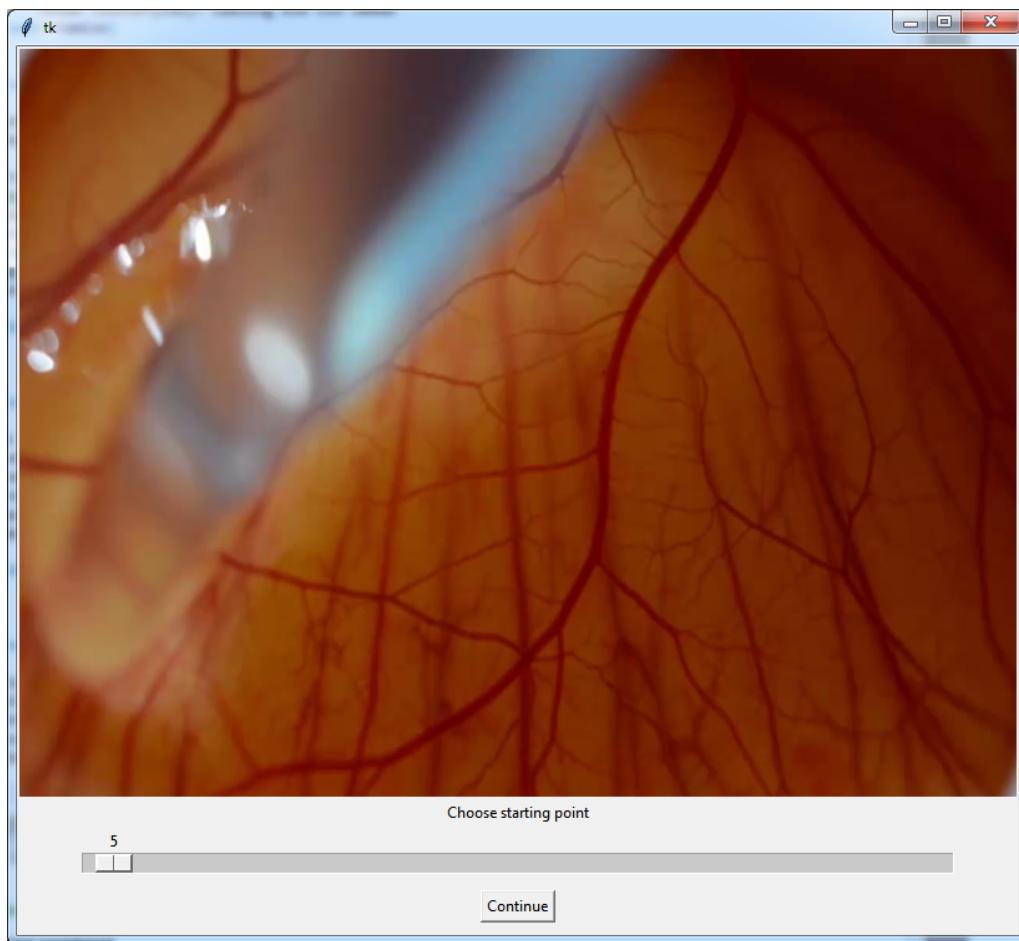


Figura 6.10: Vista final de la elección de instante inicial.

de formato, de datos incorrectos, situarse fuera de los límites del vídeo, etc. Ésta es la segunda razón detrás de utilizar un slider para buscar el instante inicial en el ensayo.

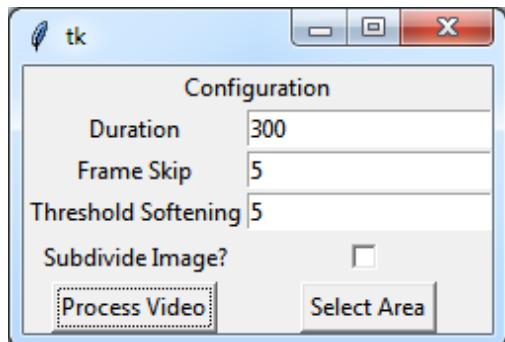


Figura 6.11: Vista final de la ventana de configuración.

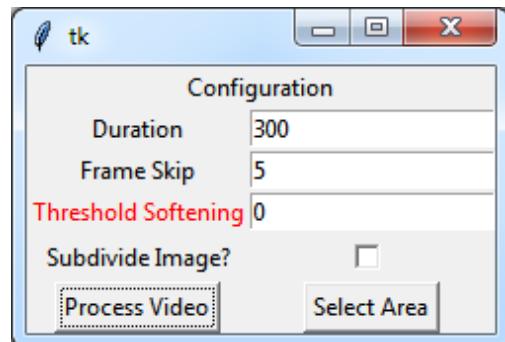


Figura 6.12: Ejemplo de un error de configuración.

Lo siguiente que verá el usuario es la ventana de configuración, como lo que muestra la figura 6.11. Aquí aparecerán unas opciones por defecto que hayan demostrado ser robustas y proporcionado buenos resultados durante el estudio, junto con la duración predeterminada de un ensayo HET-CAM y la opción de subdividir la imagen si el usuario desea utilizar la funcionalidad asociada. Si se pulsa el botón de procesar vídeo, comenzará directamente el análisis del mismo. Si pulsa el botón de seleccionar área, se le llevará a la ventana de selección de área de interés. En ambos casos, antes de proceder los datos son validados, para evitar que datos erróneos produzcan errores de ejecución. De haber algún problema para validarlos, el campo que contenga un error se mostrará en rojo, indicando al usuario la existencia de un problema y que debe introducir un dato válido. En este punto no se coteja la duración máxima del vídeo, y de haberse escogido analizar una duración que, junto con el instante inicial, superan los límites de la grabación, se informará al usuario durante el análisis y se mostrarán los datos relativos al área que sí se pudo analizar.

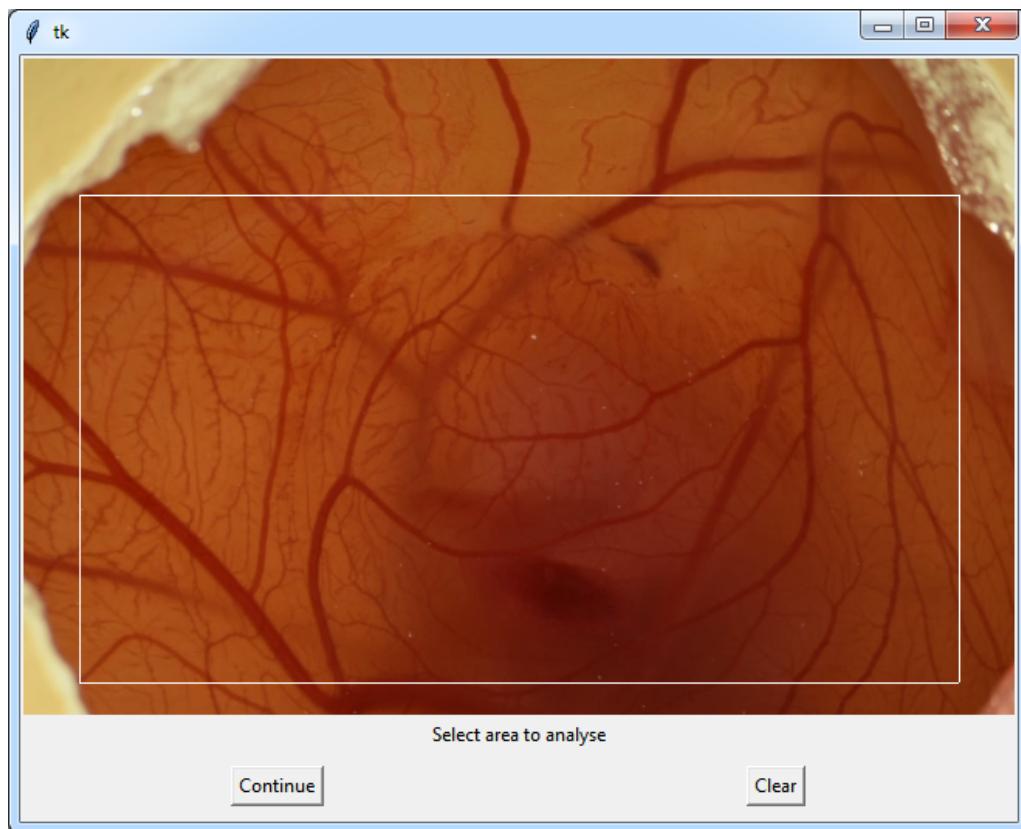


Figura 6.13: Vista final de la selección del área de interés.

De haberse escogido la selección de área, al usuario se le presentará una ventana como la de la figura 6.13. En ella, arrastrando con el ratón, podrá escoger la zona rectangular de la imagen que prefiera, de forma análoga a una herramienta de selección en cualquier

otra aplicación. Esto le permite, si así lo desea, centrar el análisis en una parte concreta de la imagen o evitar agentes externos como la cáscara dentro del plano que se muestra en la imagen. Esto evita que los ensayos en los que se den este tipo de problemas tengan que ser editados o, peor aún, descartados. El botón clear reinicia el área de interés al conjunto global de la imagen. De pulsarse continuar se comenzará el procesado del vídeo de acuerdo a los parámetros indicados.

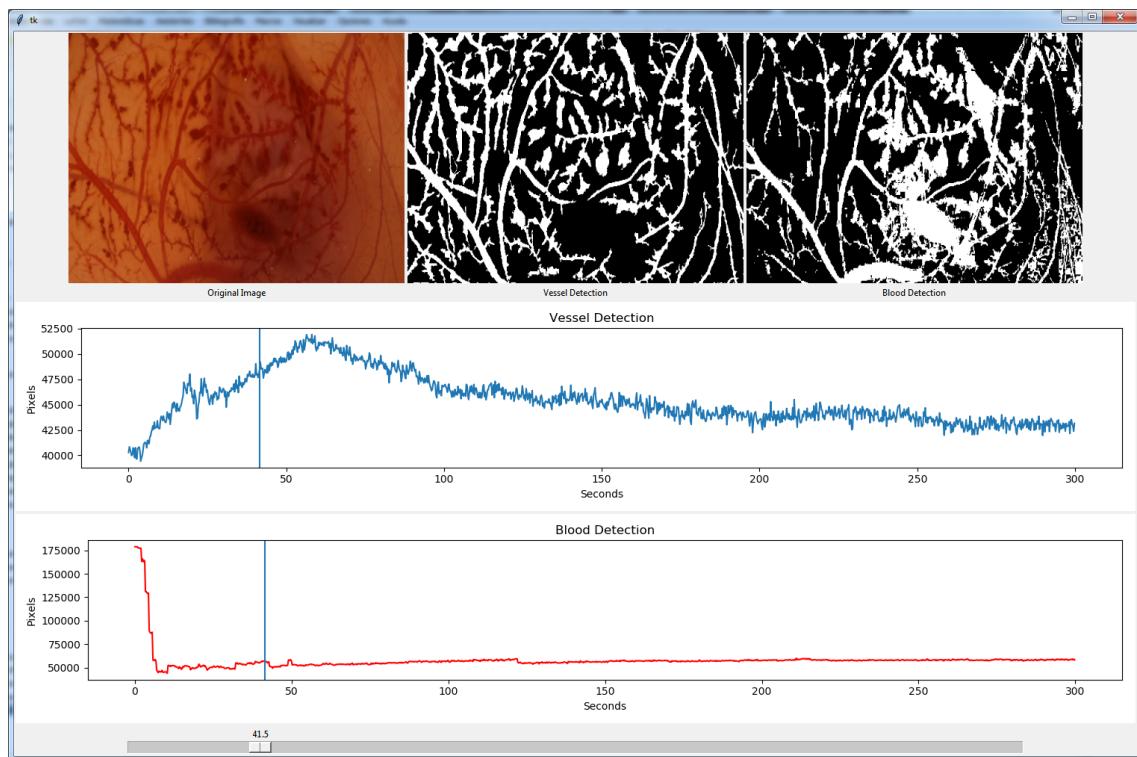


Figura 6.14: Vista final de la ventana de resultados.

Tanto si el usuario ha decidido seleccionar un área de interés como si no, se le mostrará una sencilla barra de progreso indicando el avance del procesamiento del vídeo. Una vez se completa, aparecerá la ventana final del programa, mostrando los resultados como ilustra la figura 6.14. Aquí aparecen las tres imágenes correspondientes a la imagen global o al área de interés si se seleccionó (estas imágenes corresponden al área seleccionada en la figura 6.13). La primera imagen muestra el original, tal y como se ve en el vídeo. La segunda muestra los vasos sanguíneos segmentados en la imagen y la tercera la sangre detectada. Moviendo el slider de la parte inferior se puede desplazar la vista a los distintos instantes del vídeo, haciendo que se muestren las imágenes correspondientes.

Debajo de estas imágenes se muestran las dos gráficas, correspondientes a la detección de vasos, en azul, y sangre, en rojo. La detección de vasos muestra la ya explicada

evolución de los vídeos con un sangrado profuso, y la detección de sangre muestra el efecto de no escoger correctamente el instante inicial, la pipeta produce lecturas incorrectas en la curva al comienzo del ensayo. La barra vertical que se muestra en estas gráficas corresponde al instante de tiempo en el que se sitúa el slider y, en consecuencia, con las imágenes. Así, el usuario puede examinar qué es lo que se veía en el vídeo en los instantes que muestran grandes cambios en la gráficas y determinar cuándo se producen las tres fases de interés al estudio.

## 6.4. Guía de uso

A continuación, se expone un breve manual con las instrucciones de uso de la herramienta, junto con una explicación de los efectos de las opciones de configuración.

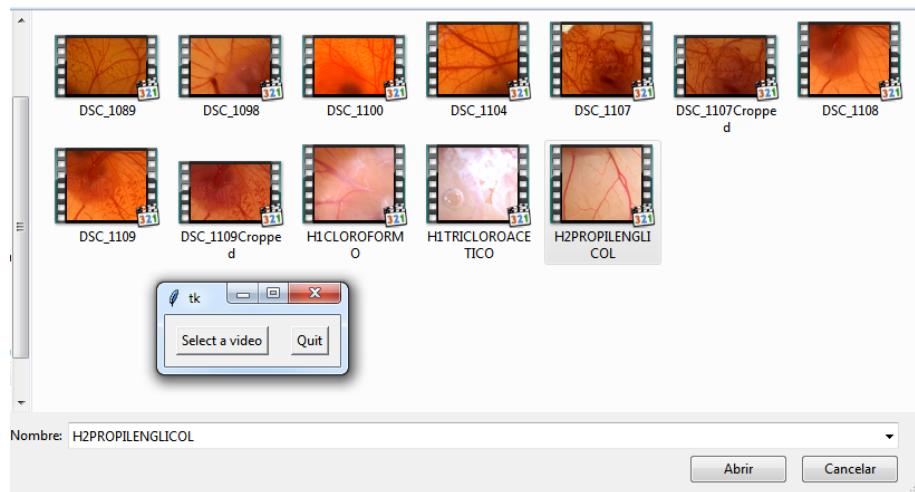


Figura 6.15: Selección de fichero.

En primer lugar, el usuario debe escoger un fichero para analizar. Pulsando el botón de seleccionar vídeo le aparecerá un diálogo con el explorador de ficheros, dependiendo de su sistema operativo, para que escoja un archivo de vídeo. Esta aplicación soporta ficheros en formato .avi, .mp4 y .MOV. Estos son los formatos más comunes en los que se encuentran los ensayos HET-CAM realizados en laboratorio, y cuentan con un buen soporte por parte de la librería de visión por computador OpenCV.

A continuación, como se indicaba en la figura 6.10, el usuario deberá escoger el instante inicial. Debido a la biblioteca gráfica TkInter, los controles del slider pueden resultar algo extraños. Para desplazarlo basta con clicar sobre el selector con el botón izquierdo del ratón y arrastrar hasta la posición deseada. Si se pulsa el mismo botón sobre la barra

donde no está el selector, éste se desplazará una posición hacia el lugar dónde se haya clicado. De ser más adelante, el selector avanzará, y al revés. Si se pulsa el botón derecho del ratón sobre la barra, el selector se colocará exactamente en el punto indicado. Esto permite viajar directamente al punto que resulte de interés.

Después llegan las opciones de configuración. Éstas pueden resultar un tanto confusas sin más explicación, así que conviene repasar sus efectos sobre el proceso de análisis. En primer lugar, la duración. Éste es el parámetro más sencillo ya que únicamente determina la duración en segundos del procesado, a contar desde el punto inicial marcado en el anterior paso. La duración predeterminada es de 300 segundos, equivalente a un ensayo HET-CAM normal, en el que sólo se tienen en cuenta las fases de sangrado ocurridas antes de los 5 minutos.

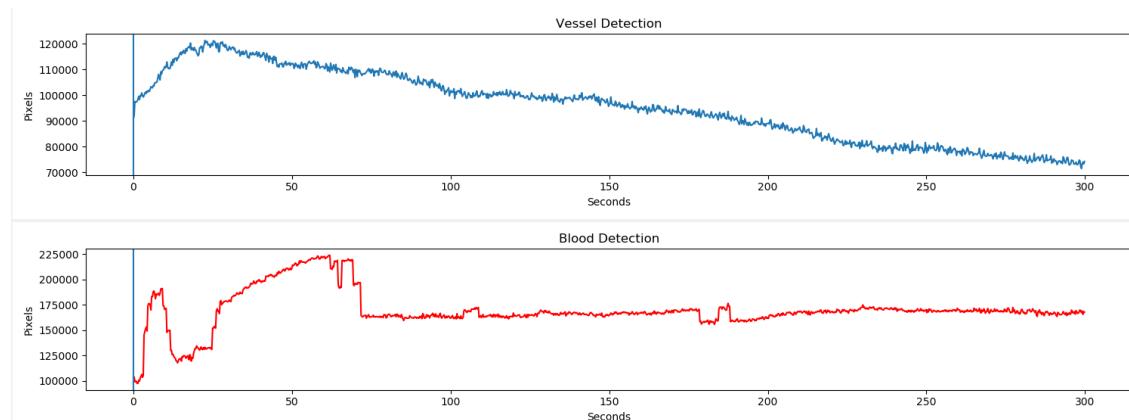


Figura 6.16: Resultados utilizando la configuración por defecto de la herramienta.

De preferirse un análisis en un tiempo más corto o más largo, por alguna razón, sólo hay que especificarlo en su cuadro correspondiente. Esta duración deberá ser mayor de 0 segundos y, para un correcto funcionamiento, no superior a la duración restante del vídeo, tras la selección del instante inicial. De no cumplirse esto último, se mostrarán igualmente los resultados correspondientes a la parte del vídeo que existe. Un análisis más corto siempre será más rápido de ejecutarse, en casos en los que se sepa que el sangrado en el vídeo es muy prominente.

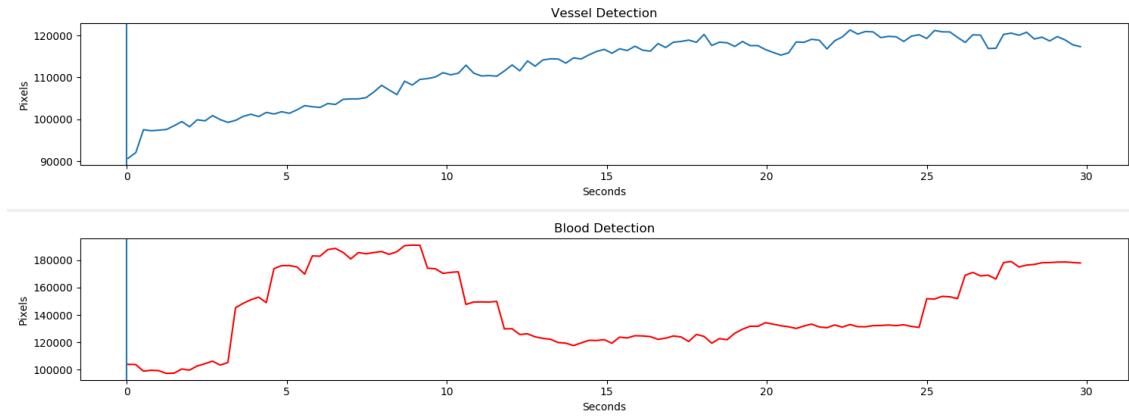


Figura 6.17: Resultados reduciendo la duración del ensayo.

La figura 6.16 muestra el resultado de un vídeo con todas las opciones por defecto, se aprecia la evolución común de un ensayo con sosa. En la figura 6.17 se puede comprobar el efecto de reducir la duración del ensayo a los primeros 30 segundos. Las gráficas muestran únicamente los resultados de la duración especificada. Esto puede resultar de ayuda a evaluar vídeos en los que se produce una reacción especialmente violenta, en los que gran parte de la reacción ocurre en los primeros segundos. Aquí se puede observar, en la gráfica en azul, cómo tras un rápido crecimiento, comienza a darse coagulación hacia los 18 segundos.

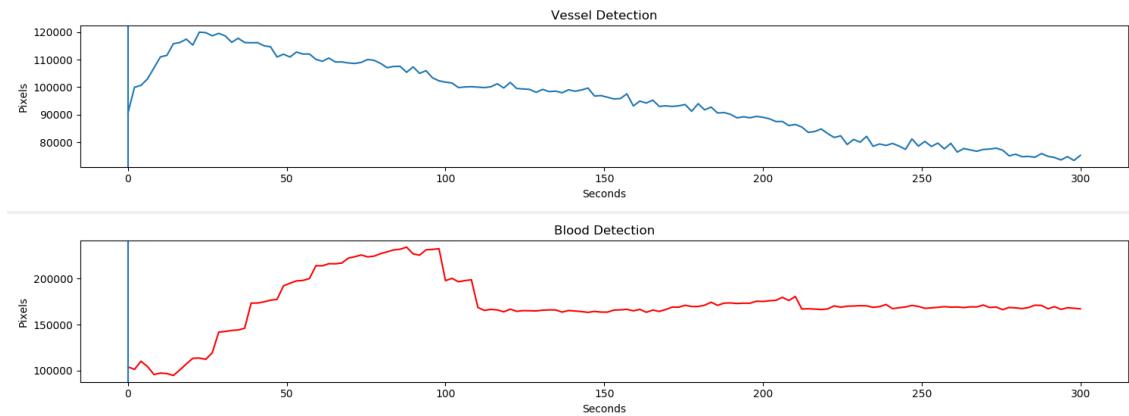


Figura 6.18: Resultados aumentando el salto de frames.

La siguiente opción que podrá cambiar el usuario es el salto de frames. Este número indica la cantidad de imágenes que se ignoran entre cada muestra que se toma del vídeo. Ya que con vídeos a una frecuencia de refresco alta, es innecesario evaluar cada frame, esto sólo contribuye a aumentar el ruido en la gráfica, producido por minúsculos cambios que

no representan la evolución real. Este número puede aumentarse o reducirse hasta 0. Un aumento no muy elevado, puede contribuir a suavizar la curva, evitando parte del ruido, y a realizar un análisis más rápido. Sin embargo, aumentar demasiado este parámetro puede hacer que se ignoren cambios importantes en el vídeo. El uso de este parámetro depende de la frecuencia de refresco del vídeo original. En general, no tiene por qué modificarse, pero se le presenta al usuario la posibilidad si así lo desea. La figura 6.18 muestra el efecto de aumentar el salto de frames sobre el mismo vídeo a lo largo de toda la duración. Nótese cómo se preserva parte de la forma de las gráficas y se suavizan los saltos de la correspondiente a la sangre. Esto no afecta a la resolución que se obtiene en la visualización de las imágenes junto a sus resultados en la última ventana.

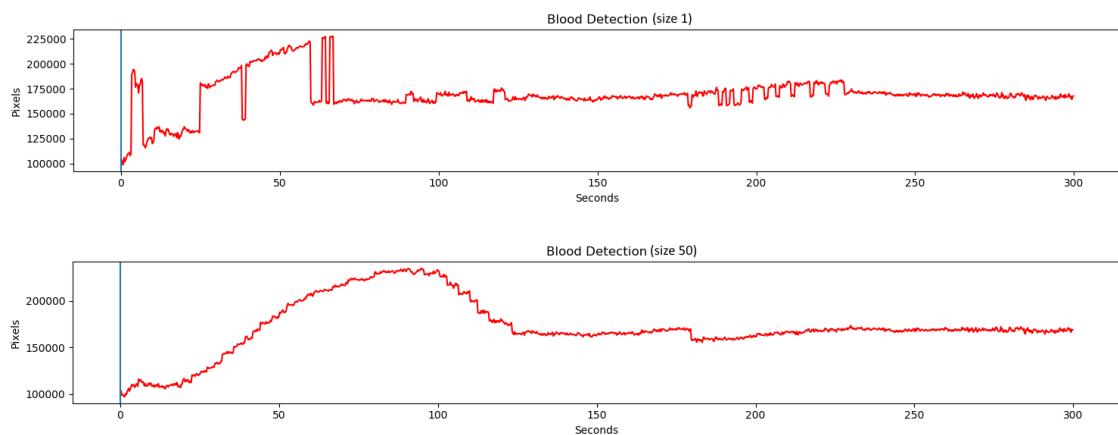


Figura 6.19: Efectos de modificar el suavizado de umbrales.

Las siguientes dos opciones únicamente afectan a la detección de sangre. En primer lugar, se permite al usuario modificar el suavizado de umbrales para esta segmentación. Ésta utilidad está explicada en la sección 4.2.3 de reducción de ruido. Básicamente, determina la longitud los vectores que contienen los umbrales utilizados para la segmentación de sangre por color. Como en cada iteración se realiza una media sobre los últimos umbrales utilizados, modificar esta longitud afecta a la velocidad con la que los umbrales se adaptan a los cambios en la imagen. Valores muy bajos proporcionan una mayor sensibilidad a los cambios, con el consiguiente ruido y saltos en la gráfica. Un valor más alto produce una curva con crecimiento más suave al coste de un mayor tiempo de reacción a ciertos cambios que se producen en la membrana. Esto es más sencillo de entender observando la figura 6.19. En ella se muestra, en la parte superior, el resultado de utilizar un suavizado nulo (longitud de vectores 1). En la parte inferior un suavizado con longitud 50. En este caso, un suavizado mayor produce una curva mucho más sencilla de interpretar. Sin embargo esta opción debe utilizarse con cuidado, ya que puede enmascarar sucesos en los vídeos

de ser demasiado grande. Además, ya que depende del número de tomas que se realizan sobre la imagen, hay que tener en cuenta la frecuencia de refresco del vídeo y el salto de frames que se haya escogido, ya que sus efectos se acumulan. Como es obvio, esta longitud no puede ser inferior a 1.

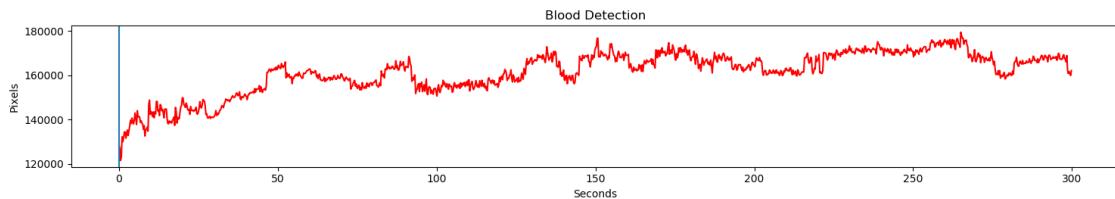


Figura 6.20: Resultados con subdivisión de imágenes.

Esto nos deja por cubrir la última opción de configuración, la subdivisión de imágenes. Esta técnica también se explicaba en la sección 4.2.3, hacia el final. Como se indicaba, en caso de vídeos de gran calidad y sin presencia de agentes externos, subdividir la imagen en cuartos previo al análisis puede producir resultados con mayor sensibilidad, a riesgo de que alguno de los umbrales se desvíe por presencia de dichos agentes, como se observaba en la figura 5.5. Si se quiere utilizar esta funcionalidad, únicamente hay que activar la casilla correspondiente y continuar con la ejecución. La figura 6.20 ilustra el resultado de aplicar esta subdivisión al vídeo utilizado en estos ejemplos.

Así, las opciones de configuración se pueden resumir en el siguiente cuadro:

Cuadro 6.1: Tabla de restricciones y efectos de las opciones de configuración.

Opción	Valor mínimo	Valor por defecto	Efecto
Duración	1	300	Afecta a la duración de la parte del vídeo a procesar.
Salto de Frames	0	5	Afecta a cuantas frames se ignoran entre imágenes analizadas.
Suavizado de Umbrales	1	5	Afecta a la velocidad de adaptado del umbralizado de sangre.
Subdivisión	Falso	Falso	Activa la subdivisión de imágenes en segmentación de sangre.

Una vez configurada la ejecución puede seleccionarse un área concreta de la imagen en la ventana correspondiente. La selección se realiza en base al área contenida entre que se pulsa el ratón y se suelta. Es decir, se debe pulsar en un lugar para marcar una esquina del área, arrastrar hasta donde se quiera situar la esquina opuesta y soltar. No importa el orden en el que se pulsen las esquinas, esto es puede arrastrarse en diagonal de izquierda a derecha, arriba abajo, al revés o cualquier combinación. También puede arrastrarse hasta

fueras del plano, si se quiere abarcar la imagen hasta sus límites por alguno de los bordes. Pulsar el botón clear o clicar sobre la imagen sin abarcar nada reiniciará los límites para que contengan el conjunto de la imagen.

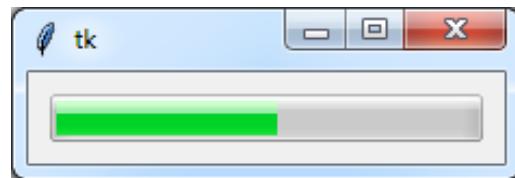


Figura 6.21: Progreso del procesado del vídeo.

Tras esto comenzará el procesado del vídeo. La barra que se muestra indica el progreso de forma intuitiva. Este progreso está basado en el punto inicial y duración especificadas, así que mostrarán el avance de acuerdo a los parámetros que da el usuario y no la duración total del vídeo. Puede observarse el aspecto de la barra de progreso en Windows 7 en la figura 6.21. Una vez se complete el procesado, se mostrará la ventana de resultados, como se ha enseñado antes. Los controles del slider selector del vídeo son los mismos que en el paso de selección del instante inicial. Clicar y arrastrar con el botón izquierdo o pulsar directamente con el botón derecho a dónde se quiere desplazar.

## Capítulo 7

# Conclusiones y líneas futuras

Una vez completados el trabajo de investigación pertinente y el desarrollo de la aplicación para acompañarlo, conviene realizar un repaso del proyecto, los resultados que se han obtenido y la significación de los mismos. Además, también corresponde realizar una valoración de los trabajos futuros que se pueden realizar sobre este mismo campo. Este capítulo está destinado a cumplir estos cometidos y concluir el trabajo.

### 7.1. Conclusiones

A lo largo de esta memoria se han explicado las distintas fases de la que ha constado este trabajo, se han razonado las motivaciones que llevaron la investigación de las distintas técnicas y se ha ilustrado su funcionamiento y aportaciones a fin de mejorar el proceso HET-CAM.

Para comenzar, conviene destacar la utilidad de este trabajo. Se trata de una investigación innovadora en el campo del desarrollo de fármacos y se ha demostrado que es capaz de arrojar resultados satisfactorios que ayudan a obtener una perspectiva objetiva sobre los ensayos realizados en el laboratorio. El trabajo expone tanto una serie de técnicas de procesamiento digital de imagen que resultan de utilidad a la hora de analizar los vídeos de los procedimientos experimentales como una metodología completa de trabajo desde la fase de adquisición de material hasta la extracción de resultados. Todo el procedimiento resulta de gran importancia para dotar de rigor a los ensayos, ya que si se obtiene un material de calidad y sin presencia de factores externos, se pueden obtener resultados mucho más claros de los que extraer conclusiones.

Conviene recordar que no existe en la literatura suficiente información de la aplicación de las ciencias de la computación a un ensayo como es HET-CAM, y que esta investigación se ha realizado partiendo de técnicas que resultan de utilidad en otros campos como la angiografía ocular. Ha sido necesario investigar múltiples técnicas de visión por computador, conjuntar herramientas y desarrollar funcionalidades que se adapten a este campo con sus particularidades y problemática asociada.

Se han explicado y demostrado también las motivaciones detrás de realizar este estudio y proporcionar a los expertos una metodología capaz de facilitar su trabajo y de asentar unas bases objetivas sobre las que realizar sus funciones de forma cómoda y a la vez rigu-

rosa. Como se ha mencionado en múltiples ocasiones, la finalidad de este trabajo no era obtener una herramienta capaz de sustituir el criterio de los expertos, sino desarrollar una metodología de trabajo objetiva que complemente sus conocimientos con una nueva perspectiva sobre los datos a analizar. El desarrollo de la pequeña herramienta que acompaña este trabajo se realizó para obtener una forma sencilla de compatibilizar a los expertos con las técnicas investigadas en este proyecto.

En el capítulo 4, dedicado a la implementación de la metodología, se dedica un apartado a ilustrar la validación de los resultados obtenidos por estas técnicas. En él se muestran tanto las curvas que devuelven como las evaluaciones realizadas por los expertos para ensayos con sangrados pronunciados. Observando las valoraciones de los mismos, destaca que pueden diferir en sus criterios debido a cuestiones subjetivas. Esta es una de las principales motivaciones de este trabajo, y probablemente su mayor aportación al campo sea el sentar una metodología rigurosa de análisis que evite dichos factores subjetivos y permita a los expertos llegar a mejores consensos y a dotar de mayor rigor a sus valoraciones.

No obstante, este estudio no está carente de limitaciones, en primer lugar su alcance. Dado que se parte de una ausencia de precedentes en la aplicación de técnicas de procesado de imagen a este ensayo, el trabajo ha tenido que desarrollarse desde la base, en lugar de asentarse sobre estudios previos en este campo. Esta es otra de las motivaciones de este proyecto, sentar las bases necesarias para un estudio posterior que sea capaz de avanzar mucho más en el desarrollo de técnicas asociadas y de evolucionar esta metodología a fin de incrementar su utilidad. Esto limita en gran medida los resultados finales que se pueden obtener a estas alturas de la investigación.

Partiendo de la base dispuesta en este estudio, se pueden añadir nuevas técnicas que resulten de utilidad en este campo, además de refinar las ya expuestas a fin de que resulten más robustas y presenten resultados más fácilmente interpretables.

Con todo, corresponde dar las gracias otra vez al equipo de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela por su amable colaboración, por haber cedido la totalidad del material relativo a los vídeos de HET-CAM y por proveer tanto sus valoraciones sobre algunos de los vídeos como su validación de los resultados obtenidos por la metodología, que calificaron de gran utilidad e interesante futuro.

## 7.2. Líneas futuras

Dado que este trabajo constituye un primer estudio de la aplicabilidad de las técnicas de visión artificial al ensayo HET-CAM y consta de un limitado alcance, existen múltiples

oportunidades para continuar la investigación que se ha comenzado y para mejorar las técnicas expuestas.

En primer lugar, un refinado de las técnicas desarrolladas a lo largo de este proyecto puede resultar en una mejora de los resultados que obtienen. Se ha demostrado que la modificación de los distintos parámetros que utilizan afecta en gran medida a la calidad de los resultados, proporcionando curvas más suaves, con menor ruido y que representen de forma más fiable la realidad de lo que ocurre en los ensayos. Además, como se ha ilustrado a lo largo del trabajo, las técnicas pueden combinarse de forma que se complementen y suplan las carencias propias de cada una, como la detección por color cobra mayor protagonismo cuando la morfológica pierde efectividad. Estas combinaciones pueden realizarse por separado, como mostrar los resultados de la detección de vasos y de sangre o en conjunto, como las umbralizaciones en las componentes matiz y saturación permiten una segmentación más fiable de forma combinada que por separado. Esto abre la puerta a encontrar nuevas técnicas que permitan mejorar todo este procedimiento, tanto en combinación con las existentes como de forma independiente.

En segundo lugar, un estudio en mayor profundidad de los resultados permitiría facilitar aún más el etiquetado de las fases en las gráficas. De igual manera que se identifica un cierto umbral de sangrado cuando la detección de sangre en crecimiento sobrepasa la caída de la segmentación de vasos al perder esta su efectividad, se pueden parametrizar distintas condiciones que permitan una identificación orientativa de las tres fases del sangrado. Con esto el trabajo de los expertos se vería facilitado en mayor medida ya que dispondrían de una mejor orientación sobre los puntos clave del ensayo.

En tercer lugar, como se ha mencionado anteriormente, y en especial en el capítulo dedicado a los resultados, la forma que adoptan las gráficas obtenidas por estas técnicas es indicativa de la naturaleza del compuesto empleado. Esto es, la evolución de los irritantes de unas características es comparable a la de sustancias similares y distingible de la de compuestos más alejados en el espectro de irritación. Utilizando técnicas de clasificación e inteligencia artificial, podría realizarse una caracterización de los compuestos por similitud en los resultados obtenidos, evitando limitarse necesariamente a la fórmula basada en los tres hitos y permitiendo una clasificación de los compuestos en base a su evolución. Ésta parece más representativa de los daños que causa una sustancia que la información que pueden aportar tres únicos puntos en el tiempo valorados subjetivamente.

Por último, y en especial teniendo en cuenta las limitaciones de las que adolece la herramienta desarrollada en este proyecto, se podría desarrollar un sistema más complejo que, contando con el resto de avances posibles mencionados en esta sección, permita la clasificación automática o semiautomática de compuestos, liberando a los expertos de la

mayor parte de su carga de trabajo. En ella, disponiendo de una base de datos de los compuestos y sus características, se permitiría el análisis en bloques de ensayos de cada compuesto. Contando con suficiente redundancia en el material y un espectro amplio de sustancias causando distintos tipos de lesiones, se podría analizar el daño que causa cada compuesto y clasificarlo en base a sus resultados viendo dónde encaja con el resto. De una librería completa de irritantes puede tanto extraerse información sobre nuevos compuestos como estudiarse con mayor precisión y alcance cómo se producen ciertas reacciones sobre nuestro tejido.

# Bibliografía

- [1] K. R. Wilhemus. The draize eye test. *Survey of Ophthalmology*, 45(6):493–515, 2001.
- [2] N. P. Luepke and F. H. Kemper. The het-cam test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*, 24(6-7):495–496, 1986.
- [3] Ezekiel J. Emanuel. The solution to drug prices. *The New York Times*, September 2015.
- [4] Patrycja Nowak-sliwinska, Tatiana Segura, and M.Luisa Iruela-Arispe. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17(4):779–804, October 2014.
- [5] Reji Bhuvanendran Rema, Karthick Rajendran, and Malathi Ragunathan. Angiogenic efficacy of heparin on chick chorioallantoic membrane. *Vascular Cell*, 4(1):8, April 2012.
- [6] Christian Peifer and Gerd Danhardt. A novel quantitative chick embryo assay as an angiogenesis model using digital image analysis. *Anticancer research*, 24(3a):1545–1551, May 2004.
- [7] J.S. Guy. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. *Methods in Molecular Biology*, 454, 2008.
- [8] Bernard Fried and Louis T. Stableford. Cultivation of helminths in chick embryos. *Advances in Parasitology*, 30:107–165, 1991.
- [9] Kiran Verma, Jingsheng Gu, and Erica Werner. Tumor endothelial marker 8 amplifies canonical wnt signaling in blood vessels. *PLoS ONE*, 6(8), 2011.
- [10] P.Budai, I.M.Somtyay, L.E.Várnagy, and T.Varga. Het-cam test for predicting ocular irritation potential. *Toxicology Letters*, 78(1):23, August 1995.
- [11] Spielmann H, Kalweit S, Liebsch M, Wirnsberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger HG, Pape W, and Steiling W. Validation study of alternatives to the draize eye irritation test in germany: Cytotoxicity testing and het-cam test with 136 industrial chemicals. *Toxicol In Vitro*, 7(4):505–510, July 1993.
- [12] A. Biran, P. S. Bidari, A. Almazroa, V. Lakshminarayanan, and K. Raahemifar. Blood vessels extraction from retinal images using combined 2d gabor wavelet transform with local entropy thresholding and alternative sequential filter. *2016 IEEE Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering (CCECE)*, pages 1–5, October 2016.

## BIBLIOGRAFÍA

---