



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Desarrollo y optimización de métodos para el contaje de
colonias en ensayos clonogénicos.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Hidalgo Blasco, Ayelén

Tutor/a: Rodrigo Bort, Miguel

Cotutor/a externo: Fuster Martínez, Nuria

Director/a Experimental: Esperante Pereira, Daniel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Agradecimientos

“ A mi familia, por su amor y apoyo incondicional,
A mis amigos, por las risas y la motivación que me hacía falta,
A mis tutores, por sus consejos y orientación,

Con todo mi cariño y agradecimiento,
Gracias. ”

Resumen

El uso de las terapias contra el cáncer basadas en hadrones es un creciente campo de I+D, que ha demostrado en algunos casos, importantes ventajas físicas, radiológicas y clínicas en comparación con las técnicas convencionales de radioterapia con rayos-X. Desde hace un tiempo se estudia su uso combinado con nanopartículas. Se pretende evaluar si estas pueden tener un efecto potenciador en la eficacia de la radioterapia. Para caracterizar el efecto de las nanopartículas en combinación con la radiación, los ensayos más utilizados son los clonogénicos. Estos ensayos son una de las técnicas fundamentales en la investigación de nuevos tratamientos, ya que evalúan la capacidad de proliferación de las células al formar colonias. Sin embargo, los resultados parecen ser controvertidos y dependientes de los métodos que se utilicen para cuantificar las colonias.

En este trabajo se utilizaron imágenes de placas de pocillos en distintas condiciones, incluyendo la presencia de nanopartículas de oro y dosis variables de radiación. El propósito principal de este proyecto ha sido mejorar la detección automática de colonias, incrementando su exactitud y eficacia. Para ello, se utilizaron técnicas avanzadas de preprocesamiento y análisis de imágenes, como operaciones morfológicas y la técnica de *watershed*. Esta última ha sido fundamental para la segmentación, permitiendo separar algunas de las colonias solapadas que son difíciles de contabilizar. Además, se ha desarrollado una interfaz intuitiva que posibilita modificar parámetros, ver los resultados de diversas formas y corregir los recuentos de colonias, lo que simplifica la obtención de resultados más precisos.

A lo largo del proyecto, se optimizaron los parámetros del algoritmo para obtener los mejores resultados posibles. Se ha mostrado que, aunque cuantificar la eficacia del algoritmo es complejo debido a la subjetividad inherente en el análisis manual de colonias, los resultados obtenidos fueron comparables a los de ImageJ, el estándar de oro para la contabilización de colonias, alcanzando una exactitud de segmentación del 92 %. No obstante, se identificaron varias limitaciones, como las dificultades para separar colonias muy solapadas y la variabilidad biológica que añade incertidumbre, observándose anomalías en algunas muestras.

Este trabajo ha aportado un nuevo algoritmo implementado en una herramienta útil y práctica para el conteo y segmentación de colonias celulares en ensayos clonogénicos, mejorando la automatización del proceso y proporcionando una base sólida para futuras mejoras en este campo.

Palabras clave: ensayos clonogénicos, radioterapia, cáncer, *watershed*, colonias celulares.

Resum

L'ús de les teràpies contra el càncer basades en hadrons és un creixent camp de R+D, que ha demostrat en alguns casos importants avantatges físics, radiològics i clínics en comparació amb les tècniques convencionals de radioteràpia amb raigs-X. Des de fa un temps se n'estudia l'ús combinat amb nanopartícules. Es pretén avaluar si poden tenir un efecte potenciador en l'eficàcia de la radioteràpia. Per caracteritzar l'efecte de les nanopartícules en combinació amb la radiació, els assaigs més utilitzats són els clonogènics. Aquests assaigs són una de les tècniques fonamentals en la investigació de nous tractaments, ja que avaluen la capacitat de proliferació de les cèl·lules en formar colònies. Tot i això, els resultats semblen ser controvertits i dependents dels mètodes que s'utilitzen per quantificar les colònies.

En aquest treball es van utilitzar imatges de plaques de pouets en diferents condicions, incloent-hi la presència de nanopartícules d'or i dosis variables de radiació. El propòsit principal d'aquest projecte ha estat millorar la detecció automàtica de colònies, incrementant-ne l'exactitud i l'eficàcia. Per fer-ho, es van utilitzar tècniques avançades de preprocessament i anàlisi d'imatges, com ara operacions morfològiques i la tècnica de *watershed*. Aquesta última ha estat fonamental per a la segmentació, permetent separar algunes de les colònies solapades que són difícils de comptabilitzar. A més, s'ha desenvolupat una interfície intuïtiva que possibilita modificar paràmetres, veure els resultats de diverses maneres i corregir els recomptes de colònies, cosa que simplifica l'obtenció de resultats més precisos.

Al llarg del projecte, es van optimitzar els paràmetres de l'algorisme per obtenir els millors resultats possibles. S'ha mostrat que, tot i quantificar l'eficàcia de l'algorisme és complex a causa de la subjectivitat inherent a l'anàlisi manual de colònies, els resultats obtinguts van ser comparables als d'ImageJ, l'estàndard d'or per a la comptabilització de colònies, aconseguint una exactitud de segmentació del 92%. Tot i això, es van identificar diverses limitacions, com les dificultats per separar colònies molt solapades i la variabilitat biològica que afegeix incertesa, observant-se anomalies en algunes mostres.

Aquest treball ha aportat un nou algorisme implementat en una eina útil i pràctica per al comptatge i la segmentació de colònies cel·lulars en assaigs clonogènics, millorant l'automatització del procés i proporcionant una base sòlida per a futures millores en aquest camp.

Paraules Clau: cultiu clonogènic, radioteràpia, càncer, *watershed*, colònies cel·lulars.

Abstract

The use of hadron-based cancer therapies is a growing field of R&D, which has demonstrated, in some cases, important physical, radiological and clinical advantages compared to conventional X-ray radiotherapy techniques. Its use in combination with nanoparticles has been studied for some time. The aim is to evaluate whether these can have an enhancing effect on the effectiveness of radiotherapy. To characterize the effect of nanoparticles in combination with radiation, the most used assays are clonogenic. These assays are one of the fundamental techniques in the research of new treatments, since they evaluate the proliferation capacity of cells when forming colonies. However, the results appear to be controversial and dependent on the methods used to quantify the colonies.

In this work, images of well plates under different conditions were used, including the presence of gold nanoparticles and variable doses of radiation. The main purpose of this project has been to improve automatic colony detection, increasing its accuracy and efficiency. To do this, advanced image preprocessing and analysis techniques were used, such as morphological operations and the watershed technique. The latter has been fundamental for segmentation, allowing us to separate some of the overlapping colonies that are difficult to count. Additionally, an intuitive interface has been developed that makes it possible to modify parameters, view results in various ways, and correct colony counts, making it easier to obtain more accurate results.

Throughout the project, the algorithm parameters were optimized to obtain the best possible results. It has been shown that, although quantifying the effectiveness of the algorithm is complex due to the subjectivity inherent in manual colony analysis, the results obtained were comparable to those of ImageJ, the gold standard for colony counting, achieving a segmentation accuracy of 92 %. However, several limitations were identified, such as difficulties in separating highly overlapping colonies and biological variability that adds uncertainty, with anomalies observed in some samples.

This work has provided a new algorithm implemented in a useful and practical tool for counting and segmenting cell colonies in clonogenic assays, improving the automation of the process and providing a solid basis for future improvements in this field.

Key words: clonogenic essays, radiotherapy, cancer, watershed, cell colonies.

Índice general

Resumen	III
Índice general	IX
I Memoria	1
1 Introduccion	3
1.1 Cáncer	3
1.2 Radioterapia y protonterapia como tratamiento oncológico	5
1.2.1 Radioactividad y radiaciones ionizantes	5
1.2.2 Tipos de radiación ionizante	6
1.2.3 Interacción con la materia	7
1.2.4 Técnicas de radioterapia por haz externo: Radioterapia convencional vs. Protonterapia	8
1.2.5 Efectos de la radiación a nivel celular	10
1.3 Nanopartículas de oro	11
1.4 Ensayos de clonogenicidad	12
1.5 Contexto y motivación del proyecto	14
2 Objetivos	17
3 Marco teórico	19
3.1 Estado del arte de los métodos de conteo de colonias en ensayos clonogénicos	19
3.2 Análisis y procesamiento de imágenes	21
3.2.1 Umbralización e iluminación de fondo	22
3.2.2 Ecuilización adaptativa del histograma	24
3.2.3 Análisis morfológico	26
3.2.4 Dilatación y erosión	27
3.2.5 Apertura y cierre	27
3.2.6 Transformada de Watershed	28

4	Materiales	31
4.1	Hardware y software	31
4.1.1	Hardware	31
4.1.2	Software	32
4.2	Imágenes	32
5	Métodos	35
5.1	Diagrama de flujo de trabajo	35
5.2	Búsqueda del algoritmo final. Problemas encontrados y soluciones implementadas	36
5.3	Descripción del algoritmo de detección y conteo de colonias en ensayos clonogénicos	42
5.3.1	Obtención de regiones de interés (ROI)	42
5.3.2	Preprocesamiento	44
5.3.3	Detección de pocillos vacíos o saturados	45
5.3.4	Segmentación y conteo de colonias	46
5.4	Diseño y desarrollo de la interfaz	50
5.4.1	Diseño	51
5.4.2	Desarrollo	55
6	Resultados	57
6.1	Resultados del preprocesamiento	57
6.1.1	Mejora del contraste	57
6.1.2	Umbralización	59
6.2	Predicción de vacíos y saturados	61
6.3	Conteo de colonias. Comparación con el método manual y el programa ImageJ	64
7	Conclusiones	69
II	Presupuesto	71
	Bibliografía	77
III	Apéndices	83
A	Alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030	85
B	Manual de usuario de la interfaz gráfica	87

Parte I

Memoria

Capítulo 1

Introducción

1.1 Cáncer

En condiciones fisiológicas las células humanas se dividen y multiplican de forma constante. Las células que están envejecidas o dañadas mueren y son reemplazadas por estas células nuevas que surgen de la división celular. El número de células, por tanto, está determinado por un balance homeostático entre la muerte de las células agotadas y la proliferación o generación de las nuevas. En consecuencia, una tasa particular de proliferación/muerte debe mantenerse equilibrada con el fin de conservar un tamaño y remodelación constante del tejido [1].

Para que todo ocurra de forma conveniente, las células están destinadas a morir en un tiempo prefijado genéticamente. Esto es lo que se conoce como muerte celular programada o proceso de apoptosis, acuñado en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie [2].

Cuando los mecanismos que regulan la apoptosis fallan, este equilibrio se altera y puede desencadenar en diferentes patologías. En concreto, la resistencia a la apoptosis por algunas células es uno de los factores que contribuyen a la formación de tumores.

En este contexto, el término cáncer se refiere a la enfermedad por la cual algunas células se multiplican sin control e incluso pueden diseminarse a otras partes del cuerpo [3]. Esto es debido a que las células cancerosas ignoran las señales de apoptosis, es decir, pierden la capacidad de morir. Además, su complejidad reside en que no se trata de una única enfermedad, sino que con este término se engloban un conjunto de más de cien tipos distintos, cada uno con sus propias características, factores de riesgo y opciones de tratamiento [4].

La importancia del cáncer radica en su impacto significativo en la salud pública mundial. Es una enfermedad que no discrimina por edad, género o procedencia y es responsable de millones de fallecimientos anuales. Además, se está observando un aumento progresivo de casos durante los últimos años. La International Agency for Research on Cancer (IARC) estimó que aproximadamente se diagnosticaron 18,1 millones de casos nuevos de cáncer en 2020 en el mundo y que, para el 2040, se estima que estas cifras aumenten hasta aproximadamente los 28 millones

[5]. En España, según los cálculos de la Red española de Registros de Cáncer (REDECAN), se estima que en 2024 aumentarán los casos un 2,6 % respecto al año anterior, alcanzando aproximadamente los 286.664 casos diagnosticados [6]. Estos datos siguen el ritmo de años anteriores que se observan en Figura 1.1, donde se muestran las cifras de nuevos casos por año según la Asociación Española contra el Cáncer.

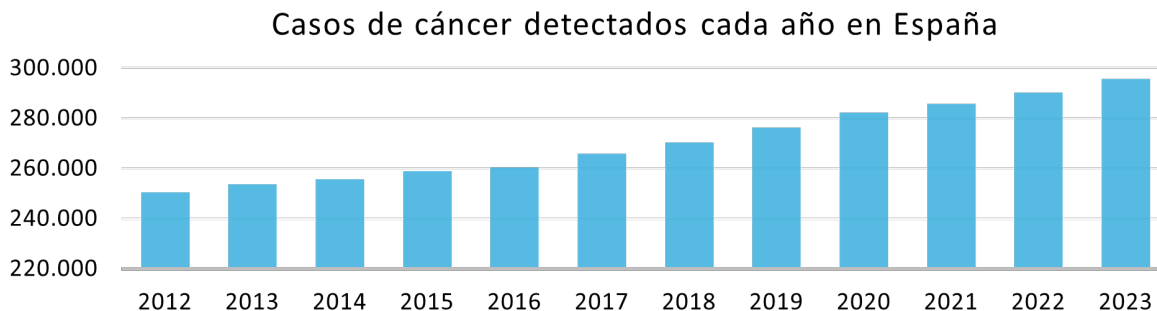


Figura 1.1: Casos de cáncer detectados nuevos por año en España. Fuente: Asociación Española Contra el Cáncer [7].

En este contexto, debido a su incidencia y prevalencia y la carga que representa para las personas y los sistemas de salud, el estudio y el tratamiento del cáncer es fundamental. Los avances en la investigación biomédica y los diagnósticos tempranos han mejorado significativamente las tasas de supervivencia para muchos tipos de cáncer, sin embargo, todavía se necesita una mayor comprensión y desarrollo de terapias más efectivas.

La estrategia principal contra el cáncer se basa en erradicar las células dañadas o células cancerosas para detener su multiplicación. Para ello existen diferentes tipos de tratamientos que se pueden clasificar en tres grupos según su alcance [8]:

- Terapias locales: dirigidas específicamente al lugar donde se encuentra el tumor. Por ejemplo, entran en esta clasificación las cirugías de extirpación de tumores.
- Terapias locoregionales: afectan al tumor y a áreas cercanas a éste como ganglios regionales linfáticos. Son útiles para cánceres que se han diseminado localmente pero no a otras partes del cuerpo. Un ejemplo de este tipo es la radioterapia.
- Terapias sistémicas: afectan a todo el cuerpo. Se utilizan sobre todo para cánceres que se han diseminado corporalmente, también llamados metastásicos. Se incluyen tratamientos como la quimioterapia, inmunoterapia o terapias dirigidas.

En los siguientes apartados se desarrollará únicamente la radioterapia y los conceptos físicos necesarios para entender como funciona, debido a su relación con el presente trabajo final de máster.

1.2 Radioterapia y protonterapia como tratamiento oncológico

La radioterapia es una de las técnicas más importantes utilizadas contra la enfermedad del cáncer. En España, de todas las nuevas personas diagnosticadas con esta enfermedad, aproximadamente el 60 % necesitará de radioterapia [9]. Además, debido al envejecimiento y aumento de la población se prevé que para el 2025 la demanda se incremente en un 25 % respecto a 2020 [9].

Esta técnica, también llamada terapia de radiación, es un tratamiento utilizado contra el cáncer cuya finalidad es provocar la muerte celular cancerosa a través de la utilización de elevadas dosis de radiaciones ionizantes [10]. Su propósito principal es curar el cáncer, pero muchas veces tiene otra finalidad fundamental basada en detener o decelerar su crecimiento, con el objetivo de paliar síntomas derivados del crecimiento local del tumor o los producidos por las lesiones metastásicas.

La radioterapia se basa en principios físicos, químicos y biológicos que permiten dirigir energía ionizante hacia las células malignas. Para comprender mejor este proceso, es esencial explorar la naturaleza de la radiación, sus interacciones con la materia, cómo se cuantifica una dosis recibida y cuáles son los mecanismos que provocan en la célula.

1.2.1 Radioactividad y radiaciones ionizantes

La radioactividad es un proceso natural por el cual un núcleo atómico inestable pierde energía a través de la emisión de radiación. Esta radiación puede ser emitida en forma de ondas electromagnéticas de alta energía o bien, en forma de partículas subatómicas [11].

En cuanto a las ondas electromagnéticas, estas tienen una naturaleza dual, comportándose tanto como ondas continuas y como partículas discretas llamadas fotones [12]. Esta dualidad onda-corpúsculo implica que, las ondas electromagnéticas pueden describirse como una u otra forma en función del contexto. Por ejemplo, al considerar la interferencia y la difracción, es más sencillo definir las como ondas, mientras que, en la interacción con átomos y moléculas, es más sencillo estudiar su comportamiento como partículas.

Las radiaciones electromagnéticas se diferencian entre ellas por su frecuencia. A mayor frecuencia de la radiación, mayor será su energía. En la Figura 1.2 se muestra este concepto con el espectro electromagnético. Este se define como el conjunto de todas las diferentes ondas electromagnéticas en función de sus longitudes de onda o frecuencias. Por tanto, según la cantidad de energía que transporten, las ondas se pueden clasificar en dos grupos: radiaciones ionizantes o radiaciones no ionizantes.

Las radiaciones ionizantes son aquellas que tienen energía suficiente como para producir la ionización de los átomos de la materia que atraviesan, es decir, para arrancar o liberar electrones [14]. Este tipo de radiaciones transfiere toda o parte de su energía a los átomos cuando interactúan con la materia. Esto provoca ionización y/o excitación de los átomos o moléculas, lo cual las altera o daña a su paso, especialmente en el caso de tejidos biológicos [14]. Un ejemplo de radiación de este tipo son los rayos X, que se usan comúnmente en tratamientos de radioterapia. En contrapartida, las radiaciones no ionizantes no tienen esta capacidad. En este grupo se engloban algunas ondas como las ondas de radio o todo el espectro de radiación de luz visible por el ojo humano.

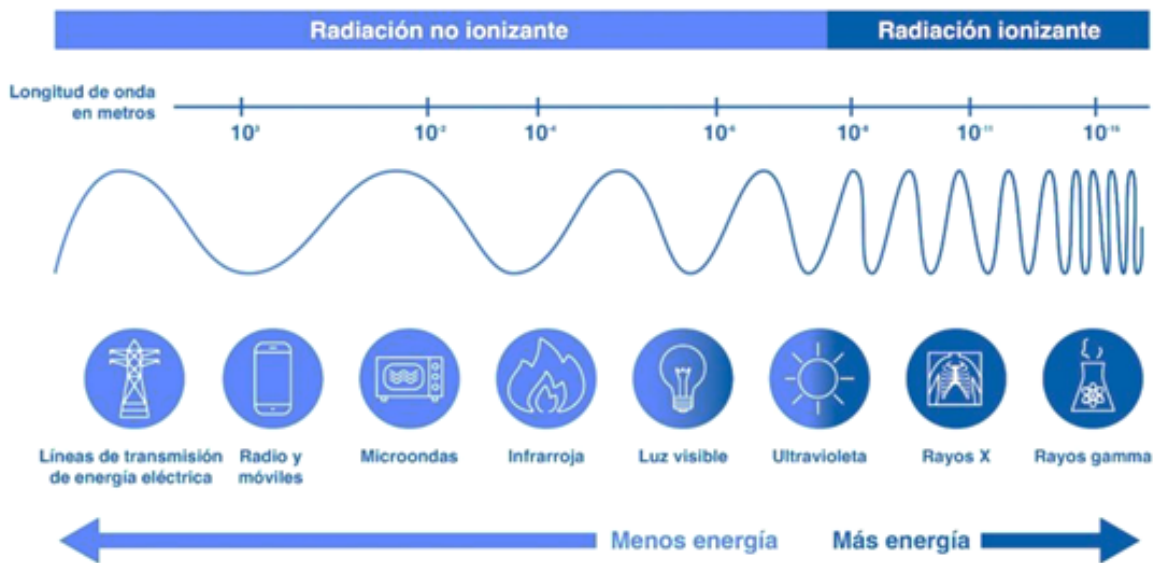


Figura 1.2: Espectro electromagnético. Fuente: [13].

Por otro lado, en cuanto a las radiaciones emitidas en forma de partículas subatómicas, estas siempre son radiaciones ionizantes, pues en todos los casos son capaces de producir la ionización y por tanto afectar a la materia que atraviesan [14].

1.2.2 Tipos de radiación ionizante

La transformación radioactiva de un núcleo puede producir tres tipos de radiación ionizante: alpha, beta y gamma. Las dos primeras son de naturaleza más bien corpuscular (emisión de partículas) y la última es electromagnética.

La emisión de partículas alfa ocurre en la desintegración de núcleos radioactivos pesados. El núcleo es grande e inestable y, por ello, se deshace de protones. La regla del emparejamiento establece que las partículas son más estables por pares, por lo que, en lugar de emitir solo protones se emiten conjuntamente la misma cantidad de neutrones [15]. La partícula resultante de esta emisión se denomina partícula alfa y se trata de un núcleo de Helio 4 (formado por dos protones y dos neutrones).

Estas partículas son las más pesadas y por tanto la radiación más ionizante, pero, sin embargo, la menos penetrante de las tres [14]. Esto se debe a que pierden toda su energía en distancias muy cortas y no son capaces de atravesar mucho más allá de la primera capa de la piel. Este tipo de radiación es perjudicial para el humano cuando la sustancia que la emite entra por una de las vías principales, es decir, se ingiere o inhala.

Por otro lado, las partículas emitidas beta tienen menos masa que las alfa y, por tanto, son menos ionizantes, pero más penetrantes, son capaces de atravesar uno o dos centímetros de tejido vivo produciendo quemaduras en la piel [16]. Se trata de electrones (carga negativa) o positrones (carga positiva). La emisión beta negativa (electrón) ocurre cuando el núcleo tiene un exceso de neutrones, que se convierten en protones, liberando un electrón para compensar la carga. Por

otro lado, se produce la emisión beta positiva (positrón) cuando el núcleo presenta un exceso de protones, convirtiéndolo en un neutrón y emitiendo una carga positiva.

Finalmente, los rayos X y rayos gamma son ondas electromagnéticas formadas por fotones, los cuales no poseen ni masa ni carga eléctrica [14]. Son altamente penetrantes y pueden atravesar la totalidad del cuerpo humano, pero pueden ser parados con varios centímetros de un material denso o un muro grueso de hormigón. Debido a esto, esta radiación puede ser perjudicial para el organismo, pues lo penetra ionizando átomos de las células a su paso.

1.2.3 Interacción con la materia

Al interaccionar la radiación con la materia puede producir en ella algún efecto. Las características de la radiación (carga eléctrica, energía y masa) y el tipo de material sobre el que se incide determinarán el tipo de efecto que produce. Estos mecanismos de interacción con la materia serán diferentes para fotones (rayos X y rayos gamma) que para partículas cargadas, como electrones y protones.

Los procesos fundamentales de la interacción de fotones son [17]:

- El Efecto Fotoeléctrico: se produce cuando un fotón interactúa con un átomo neutro y cede toda su energía a uno de los electrones del átomo. Este electrón, conocido como fotoelectrón, es expulsado del átomo con una energía cinética equivalente a la diferencia entre la energía del fotón incidente y la energía de enlace del electrón en el átomo. La vacante creada en la capa electrónica es ocupada por otro electrón de una capa más externa, y este proceso puede resultar en la emisión de un rayo X característico o de un electrón Auger.
- El Efecto Compton: se produce cuando un fotón de mayor energía choca contra un electrón y, en este caso, parte de su energía la cede al electrón, que sale dispersado; y el fotón con energía restante (menor de la inicial) se desvía hacia otro lado.
- La Producción por Pares: se produce por un fotón de elevada energía. Este es absorbido por el núcleo y desaparece generando un electrón y un positrón que son expulsados del átomo. El positrón, al combinarse con un electrón de la materia, se aniquilará formándose dos fotones gamma iguales que viajan en sentidos opuestos.

En cuanto a las partículas cargadas, estas interactúan de forma más intensa que los fotones debido a su masa y carga eléctrica, y van perdiendo energía cinética debido a las interacciones entre su campo eléctrico y los campos de los electrones del material que atraviesan. La interacción de estas partículas con la materia se denomina colisiones y es el origen último de todos los efectos que las radiaciones ionizantes tienen sobre la materia. Existen tres tipos principales de colisiones [10] [17]:

- Colisión elástica: la energía cinética y el momento de la partícula se conservan. La partícula al colisionar prácticamente no cesa energía, por lo que conserva su energía cinética casi al completo y solo se desvía de su trayectoria.
- Colisión inelástica: la energía cinética y el momento de la partícula no se conservan. La partícula incidente invierte parte o toda su energía en arrancar un electrón del átomo incidido, por lo que lo ioniza. El electrón que sale despedido también podrá seguir ionizando o excitando a otros átomos.

- Colisión radiativa: en el caso de partículas del tipo electrón, si este, en vez de colisionar, pasa lo suficiente cerca de otro electrón o del núcleo, perderá una gran parte de su energía cinética que se emite en forma de fotones (radiación electromagnética). A esta radiación resultante se la conoce como radiación de frenado o Bremsstrahlung.

Para comprender mejor cómo interactúan estas partículas cargadas con la materia, es fundamental introducir los conceptos de transferencia lineal de energía (LET, por sus siglas en inglés) y poder de frenado [17].

La transferencia lineal de energía se refiere a la cantidad de energía que la partícula deposita en el material por unidad de longitud recorrida. En el contexto biológico, se podría interpretar como la cantidad de daño que una partícula deja a su paso. La LET es una magnitud microscópica utilizada mucho en biología para cuantificar el daño celular. El poder de frenado es la cantidad de energía que pierde la partícula por unidad de longitud recorrida. Se trataría, así pues, de la capacidad del material o medio para frenar la partícula.

Una LET alta indica que la partícula deposita una gran cantidad de energía a una distancia corta, lo que resulta en un alto grado de ionización en un volumen de tejido pequeño. Dado que la energía se distribuye de manera más localizada, esto puede resultar en daños más concentrados y graves. Por ejemplo, las partículas alfa, debido a su mayor masa y carga, tienen una LET mucho más alta que los electrones o los fotones, lo que las hace particularmente destructivas a nivel celular.

En conclusión, el resultado de todas estas interacciones es la ionización o excitación del átomo con el que interactúan y de los átomos adyacentes debido a los electrones secundarios y fotones dispersados. Esta ionización puede causar daños directos en el ADN y otras estructuras celulares, lo que es fundamental para el efecto terapéutico de la radioterapia, ya que induce la muerte de las células cancerosas mediante la ruptura de sus moléculas esenciales.

1.2.4 Técnicas de radioterapia por haz externo: Radioterapia convencional vs. Protonterapia

Existen tres tipos principales de técnicas de radioterapia por haz externo según la naturaleza de haz que se emplee: fotones, electrones o hadrones (protones o iones pesados como el Carbono (C_6^+)).

La radioterapia convencional utiliza haces de fotones para tratar el cáncer. Los fotones son producidos mediante un acelerador lineal (LINAC). En este dispositivo, se aceleran electrones a altas velocidades y luego se hacen chocar con un material objetivo (generalmente tungsteno), generando así los rayos X de alta energía (fotones) [10]. Estos fotones penetran en el cuerpo y entregan energía a lo largo de su trayectoria, dañando el ADN de las células cancerosas y provocando su muerte.

Uno de los beneficios de la radioterapia convencional es su capacidad para tratar tumores en diferentes partes del cuerpo con precisión y eficacia. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes es que los fotones también depositan energía en los tejidos sanos anteriores y posteriores al tumor, lo que puede causar efectos secundarios en los mismos. Por tanto, aunque no existen efectos adversos graves, la principal limitación de la radioterapia convencional es la dosis de radiación no deseada que se distribuye a los tejidos sanos circundantes. Esto puede llevar a efectos secundarios como inflamación, fibrosis, y daño a órganos cercanos al sitio del tumor [18].

En este contexto, la protonterapia surge como posible solución para reducir la dosis de radiación en órganos situados en la cercanía del tumor a tratar. Esta técnica se basa en utilizar haces de protones acelerados a altas energías en lugar de los haces de fotones. El haz de protones en este caso se produce mediante un acelerador de partículas, como un ciclotrón o un sincrotrón.

Finalmente, la radioterapia con haz de electrones se utiliza para tratar tumores poco profundos o superficiales debido a que los electrones depositan casi toda su energía en las primeras capas de profundidad de la piel. Este tipo de radioterapia, por tanto, tiene su aplicación en el tratamiento de linfomas cutáneos y afecciones superficiales de la piel [19].

La diferencia de distribución de dosis de los diferentes haces se puede contemplar en la Figura 1.3. Se representa la dosis relativa a diferentes profundidades, y se observa lo que se venía comentando anteriormente: los haces de fotones administran la dosis en las primeras capas superficiales, por otro lado, con los haces de fotones se administra la dosis en un amplio abanico de longitud, afectando a todas las células del cuerpo que atraviesa; en contrapartida, el haz de protones tiene un pico principal donde se concentra la mayor parte de energía depositada, también llamado pico de Bragg [17]. De esta forma, se minimiza la radiación distribuida a las zonas ajenas a ese pico.

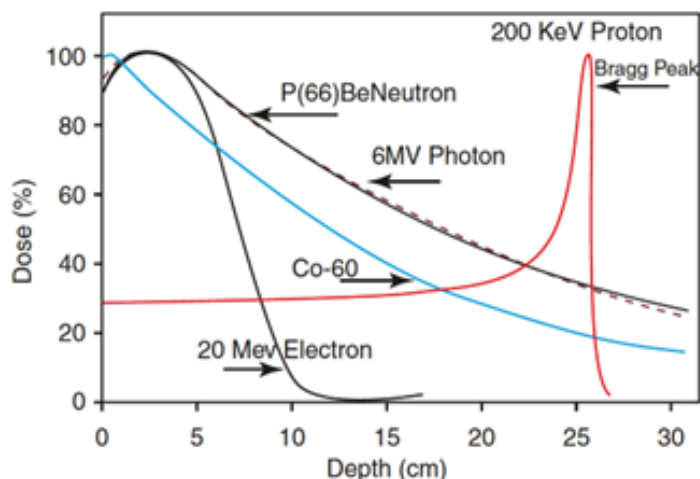


Figura 1.3: Comparativa de la profundidad de la dosis administrada por diferentes tipos de radiación. Fuente: [17].

Haciendo que el pico de Bragg caiga en la profundidad deseada se consigue minimizar la radiación y, por tanto, los posibles efectos secundarios a las zonas adyacentes de tejido sano. La profundidad a la que se encuentre este pico de Bragg dependerá de la energía del haz de protones.

1.2.5 Efectos de la radiación a nivel celular

Como se comentó en el Apartado 1.2.3, cuando la radiación interacciona con la materia produce ionizaciones y excitaciones de los átomos a su paso. Cuando la materia con la que interacciona son células, la radiación ionizante interactúa de diferentes maneras, provocando efectos que varían dependiendo del tipo y la energía de la radiación. Los blancos principales de la radiación en las células incluyen el ADN, las proteínas, las membranas del núcleo y otros orgánulos, pero el daño más significativo ocurre en el ADN.

Una alteración en el ADN podrá suceder de forma directa o indirecta. El daño directo se produce cuando la radiación causa la ionización directa de la molécula, sin embargo, el daño más comúnmente causado por los tipos de radiación empleados en radioterapia es el indirecto. Este daño indirecto ocurre cuando la radiación ioniza las moléculas de agua que rodean el ADN, generando radicales libres muy reactivos. Este efecto indirecto es el responsable del 70 % del daño al ADN [20].

Así pues, cuando una célula es expuesta a radiación ionizante se genera una serie de procesos en el tiempo [21] [22]:

1. Fase física: cuando la radiación ionizante atraviesa el cuerpo, excita átomos y moléculas a su paso (huella). En el caso de los electrones, las liberaciones de energía están muy separadas, por lo que incluso si la huella atraviesa el ADN, es poco probable que se produzcan daños. Sin embargo, la huella dejada por una partícula alfa es tan densa que se liberará suficiente energía para destruir su función si pasa a través del ADN o incluso cerca de él. Como consecuencia de este proceso se forman diferentes moléculas de agua ionizadas o excitadas.
2. Fase química: como las células están compuestas en su gran mayoría por agua, esta es la que absorbe la mayor parte de la energía. Debido a la presencia de un electrón no apareado en su capa de valencia más externa, estas especies moleculares, conocidas como radicales libres, son sustancias químicas extremadamente inestables. Los radicales de agua, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), como el hidroxilo (OH) y el hidrógeno (H), tienen la capacidad de estabilizarse mediante reacciones de oxidación-reducción con otras moléculas presentes en el entorno. Es en este momento cuando interactúan con el ADN (entre otras moléculas), generando roturas en sus enlaces químicos. Por otro lado, la radiación en el citoplasma de la célula también ioniza el agua generando radicales. Algunos de estos radicales pueden unirse formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), moléculas de agua o hidrógeno; pero la situación más grave ocurre cuando se producen hidronio (HO) y cationes de hidrógeno II en el agua, lo que causa envenenamiento celular.
3. Fase biológica: en esta fase se engloban todos los procesos subsiguientes que son demasiados para describirlos aquí [23] [24]. Entre estas respuestas biológicas se encuentra la reparación del daño del ADN que comienza segundos tras la exposición. Las células con lesiones muy graves morirán mientras que las que contengan daños potencialmente malignos intentarán reparar estos daños. Si la célula consigue reparar de forma correcta el ADN, sobrevivirá, en caso contrario entra en muerte celular.

En conclusión, la interacción de la radiación ionizante con las células provoca una cadena compleja de eventos que pueden culminar en la reparación exitosa del ADN, la muerte celular o la aparición de mutaciones genéticas. La comprensión detallada de estas interacciones y sus consecuencias

biológicas es esencial para mejorar las técnicas de radioterapia y desarrollar tratamientos más efectivos y seguros.

1.3 Nanopartículas de oro

Un radiosensibilizador, también conocido como radiopotenciador, es un agente o sustancia que aumenta la sensibilidad a la radioterapia de las células cancerosas [25]. Estos agentes pueden ser químicos, biológicos o físicos y actúan amplificando el daño que la radiación ionizante produce en las células tumorales mientras minimizan el impacto en los tejidos sanos. Al mejorar la sensibilidad de las células objetivo a la radiación, los radiosensibilizadores permiten una dosis de radiación más baja para obtener el mismo efecto terapéutico, reduciendo así los efectos secundarios adversos.

Estudios actuales han demostrado que los nanomateriales de alto número atómico (Z) pueden ser utilizados como radiosensibilizadores [22]. En este contexto, las nanopartículas de oro (AuNPs), han emergido como un enfoque prometedor para mejorar la efectividad de la radioterapia en el tratamiento del cáncer debido a sus propiedades singulares [26] [27].

En primer lugar, su elevado número atómico (Z) aumenta la absorción de radiación ionizante. En el caso de las nanopartículas de oro es de $Z = 79$. Este efecto se debe a que la existencia de mayor número o densidad de electrones presentes en un átomo genera campos eléctricos más fuertes y, por tanto, aumenta la probabilidad de interacción con fotones o iones incidentes. Esta mayor absorción produce un mayor número de electrones secundarios. En la Figura 1.4 se puede observar cómo al interactuar los fotones incidentes con las AuNPs generan una cascada de electrones, que dañarán a las células adyacentes.

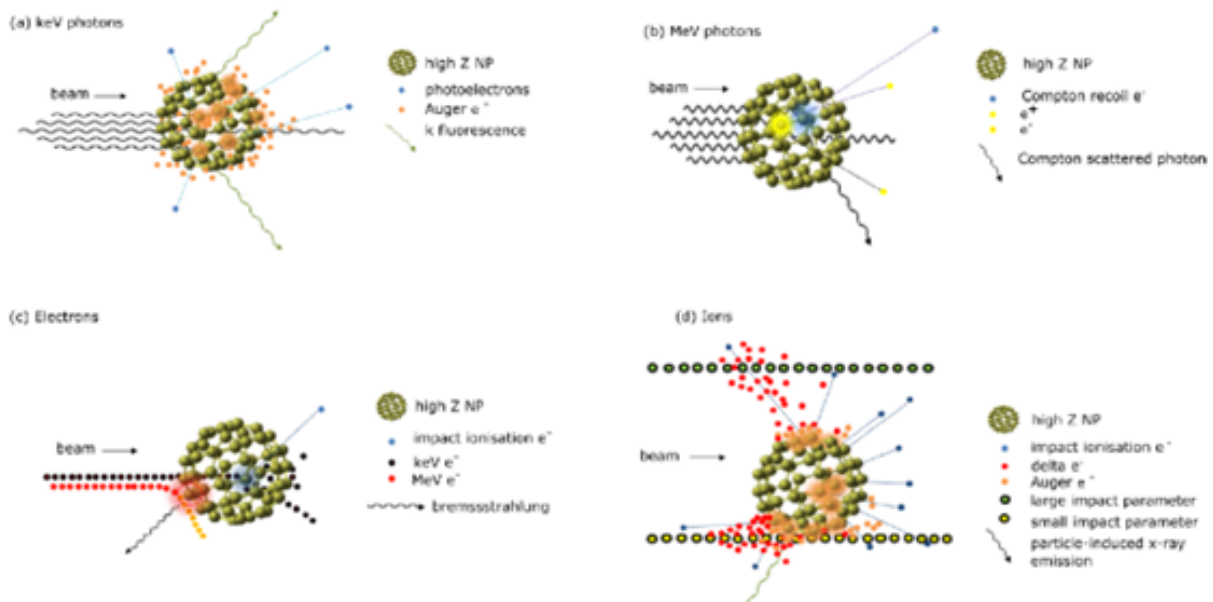


Figura 1.4: Interacciones inelásticas con una nanopartícula de oro. a) Fotones incidentes de keV. b) Fotones incidentes de MeV. c) Electrones incidentes. d) Iones incidentes. Fuente: [27].

Además, las AuNPs pueden convertir la energía de la radiación en calor que también es una forma de causar daño a las moléculas cercanas, aumentando así el efecto citotóxico de la radioterapia [22] [28].

En segundo lugar, se destaca la facilidad de funcionalización de estas. Las superficies de las AuNPs pueden ser modificadas con diversas biomoléculas, como anticuerpos y péptidos, para dirigir las específicamente a las células cancerosas. Esta funcionalización aumenta la acumulación de nanopartículas en el tumor y mejora la selectividad del tratamiento [22] [27].

En tercer lugar, su proceso de síntesis es sencillo y permite generarlas con multitud de formas y tamaños. Normalmente son producidas por reducción de algún precursor del oro, como por ejemplo el ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) [29]. Mediante el uso de distintos agentes reductores los iones Au^{3+} se reducen a átomos neutros, generando partículas nanométricas. Además, el tamaño se puede diseñar para optimizar la penetración en el tumor específico.

En cuanto a su toxicidad, se trata de un tema altamente complejo que se encuentra en estudio actualmente. En general, se puede concluir que la toxicidad depende de la forma de la nanopartícula, su tamaño, la concentración, la funcionalización de la superficie, el nivel de dosis o el tipo de síntesis [29] [30]. Debido a esto, existen muchos estudios contradictorios respecto al tema, por lo que es necesario de estudios futuros para determinar qué opciones son las más seguras.

En conclusión, las nanopartículas de oro presentan características muy interesantes que, combinadas con las técnicas de radioterapia actuales, tienen el potencial de mejorar los tratamientos de cáncer. Por este motivo, es necesario investigar su efectividad, así como su toxicidad con el fin de maximizar los beneficios terapéuticos y minimizar los riesgos para los pacientes.

1.4 Ensayos de clonogenicidad

Las células tienen una capacidad indefinida de proliferar tras una exposición radiológica. Aquellas que consiguen mantener esta capacidad lo suficiente como para mostrar pruebas de crecimiento macroscópico, se considera que han sobrevivido a la radiación. Por otro lado, las células que, aunque hayan sufrido varias divisiones celulares no hayan tenido un crecimiento significativo se considera que han muerto.

La técnica más empleada para estudiar y contabilizar este crecimiento macroscópico de las células, y de esta forma analizar la eficacia de un tratamiento radiobiológico, es el ensayo clonogénico, originado por Puck y Marcus en 1956 [31]. Se trata de una prueba crucial para evaluar la capacidad de proliferación de las células y obtener información acerca de su capacidad de supervivencia.

El proceso de estos ensayos [32] se basa en, en primer lugar, preparar las células cultivándolas en un medio adecuado hasta obtener una cantidad suficiente. Posteriormente, se utiliza una enzima como la tripsina para despegar las células del recipiente donde se han cultivado, se cuenta la densidad de células y se siembra la cantidad deseada en la placa de cultivo que se va a utilizar para el ensayo. Se siembran a baja densidad para garantizar que cada colonia que crecerá proviene de una sola célula. A continuación, las células sembradas se exponen al tratamiento de interés, como radiación o agentes quimioterapéuticos. Las placas se incubarán durante un período de tiempo (generalmente entre 11-13 días) para permitir la proliferación y la formación de colonias de células sobrevivientes. Después de la incubación, las colonias se tiñen con un colorante específico para

que sean más fáciles de ver y contabilizar bajo un microscopio. Finalmente, se calcula el número de colonias formadas y se compara con un control no tratado para determinar la fracción de supervivencia, un indicador importante de la capacidad de proliferación de las células después del tratamiento. En la Figura 1.5 se muestra el proceso de un ensayo clonogénico.

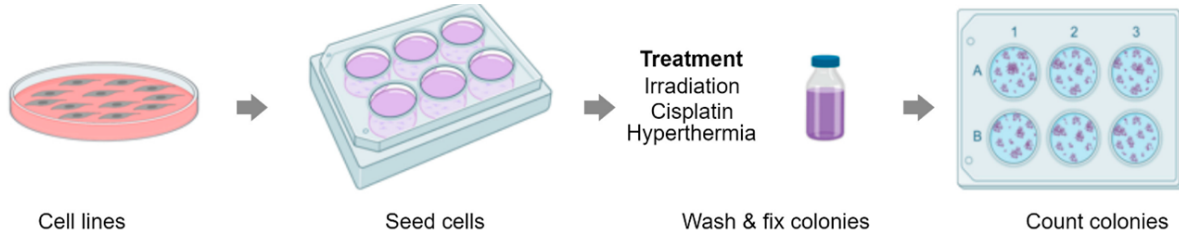


Figura 1.5: Proceso de los ensayos clonogénicos. Fuente: [33]

El objetivo principal de los ensayos clonogénicos es evaluar la eficacia de varios tratamientos anticancerígenos mediante la determinación de qué porcentaje de células tumorales sobrevive después de la exposición a un agente terapéutico. Estos ensayos también son cruciales para evaluar la sensibilidad de diferentes líneas celulares a la radiación, lo que es esencial para ajustar las dosis de radioterapia y maximizar el daño a las células tumorales mientras se minimiza el impacto en las células sanas. Además, también son de utilidad para la investigación de la resistencia de las células cancerosas a ciertos medicamentos, lo que permite el desarrollo de nuevas formas de tratar dicha resistencia.

Cabe tener en cuenta que incluso en la ausencia de radiación no todas las células serán capaces de formar colonias. La fracción de supervivencia (SF, de sus siglas en inglés), se calcula entonces dividiendo el número de colonias formadas entre la eficiencia de plantación (PE, de sus siglas en inglés), siendo esta última el porcentaje de colonias formadas sin recibir ninguna dosis de radiación. Las Ecuaciones 1.1 y 1.2 corresponden a la PE y SF respectivamente, además en la Figura 1.6 se puede observar un ejemplo de lo comentado. Finalmente, la curva de supervivencia mostraría la fracción de células supervivientes en función de la dosis de radiación recibida.

$$PE = \left(\frac{\text{Número de colonias formadas sin dosis}}{\text{Número de colonias sembradas}} \right) \quad (1.1)$$

$$SF = \left(\frac{\text{número de colonias con dosis obtenidas}}{\text{número de células sembradas}} \right) \times \frac{1}{PE} \quad (1.2)$$

En el contexto de la radioterapia y la investigación con nanopartículas de oro, los ensayos clonogénicos son especialmente relevantes. Las nanopartículas de oro, con su capacidad de mejorar la efectividad de la radioterapia, requieren una evaluación exhaustiva de su impacto en las células tumorales y sanas. Estos ensayos permiten determinar no sólo la eficacia de las nanopartículas como radiopotenciadores, sino también evaluar cualquier posible toxicidad asociada con su uso.

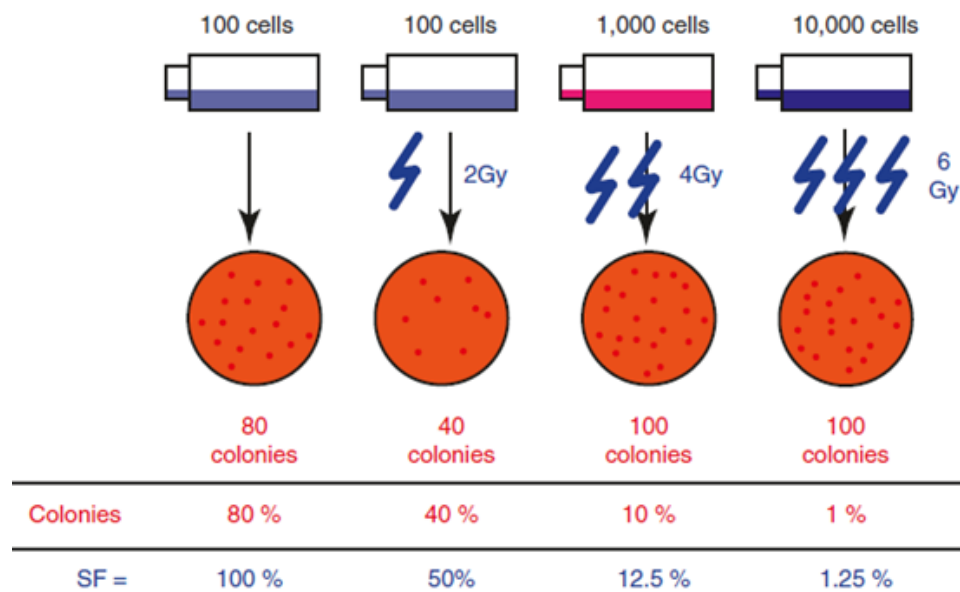


Figura 1.6: Ejemplo ilustrativo sobre el cálculo de la eficiencia de siembra y la fracción de supervivencia en un ensayo clonogénico. Fuente: [17].

1.5 Contexto y motivación del proyecto

El cáncer es una de las principales enfermedades que ataca a personas de todo el mundo en la actualidad. Las radiaciones ionizantes se utilizan como estrategia de diagnóstico y terapia de los pacientes y, en concreto, la radioterapia es uno de los tratamientos más empleados con este fin. A pesar de sus amplias ventajas, la exposición a la radiación ionizante también tiene efectos negativos en la salud debido a la dosis inevitable de radiación que llega a los tejidos sanos. A lo largo de las últimas décadas, la investigación a nivel mundial se ha enfocado en desarrollar métodos para maximizar la eficacia de la radioterapia y disminuir esta dosis proporcionada a los tejidos no tumorales envolventes.

Recientemente, los novedosos avances en nanotecnología han permitido la fabricación de nanoproduitos que tienen potencial para utilizarse en este tipo de tratamientos. En concreto, las nanopartículas de oro han emergido como prometedores radiosensibilizadores. Estas nanopartículas pueden mejorar la absorción de radiación en las células tumorales, aumentando así el daño inducido por la radiación y potenciando los efectos terapéuticos. Sin embargo, la implementación de AuNPs en el ámbito clínico se enfrenta a varios desafíos. A pesar de sus beneficios potenciales, existen preocupaciones respecto a su toxicidad y a la no comprensión completa de su mecanismo exacto de sensibilización, lo que genera problemas en la planificación del tratamiento de radioterapia. Es decir, se requiere una comprensión detallada de su interacción con las células tumorales y la radiación, lo cual es fundamental para desarrollar tratamientos seguros y efectivos.

En este contexto, los ensayos clonogénicos son herramientas esenciales para evaluar la efectividad de los tratamientos de radiación. Estos ensayos permiten medir la capacidad de las células para sobrevivir y formar colonias después de la exposición a la radiación, proporcionando una medida directa de la radiosensibilidad celular. Sin embargo, uno de los principales desafíos en el campo de la radiobiología es la falta de métodos estandarizados para el conteo de colonias en los ensayos

clonogénicos. Actualmente, no existen directrices claras ni referencias estándar, lo que resulta en una variabilidad significativa en los resultados obtenidos por diferentes laboratorios.

Por otro lado, el conteo de colonias en los ensayos clonogénicos puede realizarse de forma manual por expertos o mediante métodos automáticos. Los métodos manuales requieren de la pérdida de mucho tiempo para la persona que debe contar imagen por imagen y para grandes volúmenes de datos esto es casi imposible. Además, tienen un punto subjetivo, lo que induce variabilidad, pues depende del experto que está analizando la muestra y la fatiga visual que presente. En adición, de forma visual no se pueden aplicar criterios cuantitativos, como cuantificación de tamaños o formas con parámetros de circularidad, excentricidad, etc. Por otro lado, los métodos automáticos, aunque prometedores, aún no han alcanzado la precisión necesaria para ser considerados completamente fiables.

En este contexto, la motivación del presente proyecto de final de máster es desarrollar y validar un método automático para el conteo de colonias en ensayos clonogénicos. Se espera que el desarrollo de métodos estandarizados y automatizados no solo mejore la reproducibilidad de los experimentos, sino que también facilite la implementación clínica de tecnologías emergentes, ayudando en la lucha contra el cáncer.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo final de máster es desarrollar un método de detección y contaje automático de colonias celulares en ensayos clonogénicos de células irradiadas con nanopartículas de oro, así como de una interfaz que garantice su facilidad de uso. Para ello, se implementarán técnicas de análisis y segmentación de imágenes de forma que se consiga una herramienta útil y fiable para automatizar este proceso. Se pretende que esta herramienta ayude a optimizar los análisis, aumentando la flexibilidad de uso e incluso mejorando los resultados del programa estándar de oro actual, ImageJ.

Para lograr esto, se plantean una serie de objetivos secundarios:

1. Realizar una revisión de la literatura para obtener información acerca del estado del arte actual de las técnicas de radioterapia y de las posibles limitaciones que poseen.
2. Investigar sobre las técnicas actuales de detección y contaje de colonias en los ensayos clonogénicos.
3. Diseño de un algoritmo de segmentación adecuado para obtener correctamente las colonias celulares. El algoritmo será construido mediante técnicas de procesamiento de imágenes.
4. Obtener los parámetros y características de cada colonia y organizar los mismos para su correcto post-procesamiento.
5. Desarrollar los métodos adecuados para el filtrado de colonias en base a su tamaño y características morfológicas.
6. Diseñar e implementar una interfaz visual que permita a los investigadores utilizar la herramienta de forma eficiente y sencilla. La interfaz deberá ser intuitiva y con parámetros configurables, además deberá permitir visualizar los resultados y procesar lotes de imágenes.
7. Validar y comparar los resultados con métodos existentes. Se realizarán pruebas comparativas entre la herramienta diseñada y los resultados obtenidos por ImageJ y otros métodos manuales.

8. Analizar los problemas encontrados, extraer las conclusiones y plantear posibles mejoras de cara a futuros trabajos.

Capítulo 3

Marco teórico

3.1 Estado del arte de los métodos de contaje de colonias en ensayos clonogénicos

Como se ha comentado hasta ahora, los ensayos clonogénicos son la prueba más utilizada actualmente para la investigación de diferentes terapias, entre ellas, la radioterapia. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para realizar el contaje de las colonias obtenidas en estos ensayos. A continuación, se detallan los principales enfoques utilizados, sus ventajas e inconvenientes.

El método tradicional de contaje de colonias es el contaje a mano. Este método implica una inspección visual y el conteo manual por un experto de las colonias formadas en la placa de cultivo. Entre las ventajas se encuentran que es un método simple y directo, sin embargo, presenta varios inconvenientes significativos. En primer lugar, añade un error de subjetividad, pues está sujeto a la interpretación personal del investigador, lo que conlleva a variaciones entre investigadores. En segundo lugar, requiere de un cierto tiempo, especialmente cuando deben analizarse grandes cantidades de muestras. De este modo se consume tiempo del investigador que podría estar empleando para otras tareas más importantes. Finalmente, el factor humano asociado a la fatiga también puede afectar en el proceso, ya que tras varios contajes de placas seguidos el cansancio va aumentando y la precisión y fiabilidad disminuyen. Además, de este modo no se pueden aplicar criterios estándar de filtrado como pueden ser el tamaño o forma de las colonias.

Debido a estos problemas la búsqueda de métodos automáticos y precisos ha sido un tema creciente en los últimos años, impulsado también por el aumento de experimentos en el campo de la radiobiología y, por tanto, del número de datos (imágenes y placas que analizar).

Actualmente, el software considerado estándar de oro para el contaje de colonias celulares en ensayos clonogénicos es ImageJ. ImageJ es una herramienta de procesamiento de imágenes de código abierto desarrollada por el National Institutes of Health (NIH) que está orientada sobre todo hacia el ámbito de la salud. La principal ventaja de ImageJ radica en su flexibilidad, ya

que, gracias a su API, sus funciones se pueden editar mediante macros, scripts y, especialmente, plugins programables en Java. Por tanto, algunas de sus ventajas frente al método manual son: automatización, pues permite el conteo de las colonias mediante algoritmos de procesamiento; reproducibilidad, se elimina la variabilidad entre observadores ya que se trabaja con algoritmos estandarizados; y flexibilidad, al poder programar nuevas macros o plugins se pueden personalizar el procesamiento para intentar mejorar los resultados.

Estudios que han utilizado ImageJ para el conteo de colonias incluyen trabajos en diversos campos de la biomedicina, destacamos su utilidad en la investigación de la evaluación de radiosensibilizadores. Por ejemplo, en el estudio de Kumar Maurya [34], se desarrolló un programa a través de ImageJ llamado ColonyCountJ que proporciona varios parámetros como el área de las colonias o tamaño promedio, entre otras. Además, se trata de una interfaz interactiva donde el usuario no requiere de conocimientos profundos de programación para utilizarlo. De forma similar se tiene otro plugin para ImageJ denominado ColonyArea y desarrollado en el estudio de Guzman et al. [35], así como una macro desarrollada por Choudhry [36] llamada Cell Colony Counting. Estos estudios se han completado demostrando su precisión y velocidad frente al método manual y otros métodos automáticos existentes. Sin embargo, los mayores desafíos de estas técnicas siguen siendo la variabilidad de morfología de colonias, el solapamiento de muchas de ellas donde la detección de bordes suele fallar y otras distracciones como manchas de tinte en la muestra o motas de polvo.

Finalmente, cabe destacar que se está investigando en nuevas técnicas de conteo con algoritmos mediante visión por computador y aprendizaje automático (*Machine Learning* y *Deep Learning*). En el estudio reciente de Zhang [37] se introdujo el CFUCounter, un software que emplea aprendizaje automático para el conteo de unidades formadoras de colonias (CFU). Este sistema combina umbralización adaptativa, segmentación por agrupamiento (DBSCAN) y algoritmos de transformación *watershed* para identificar y contar colonias en imágenes digitales. El uso de técnicas de aprendizaje automático mejora la robustez frente a variaciones en la iluminación y el tamaño de las colonias, superando así algunas limitaciones de ImageJ.

En otros estudios como el de Shi-Jian Liu et al. [38] o Muhammed Talo [39], también se han utilizado otras técnicas de aprendizaje profundo como redes neuronales convolucionales (CNN) o aprendizaje por transferencia.

La problemática principal de estas técnicas reside en que se necesita grandes volúmenes de datos para entrenar los modelos correctamente, lo que requiere etiquetar miles de imágenes de forma perfecta para asegurar que los datos introducidos para el entrenamiento son de calidad. Sin embargo, han mostrado un gran potencial para contar colonias, así que una de las vías de investigación actual es recabar y segmentar imágenes para conseguir una amplia base de datos para entrenarlos.

En resumen, a pesar de los últimos avances en los métodos de conteo todavía existen diferentes desafíos. Las imágenes complejas con variabilidad de morfología de colonias y las diferencias de calidad afectan en gran medida a la precisión de los métodos automáticos. Además, debido a que los resultados todavía no son lo suficientemente precisos sigue siendo necesaria la intervención humana para ajustar parámetros y verificar resultados.

Este proyecto tiene como objetivos abordar este problema, contribuyendo a la mejora de la precisión del conteo.

3.2 Análisis y procesamiento de imágenes

Una imagen digital es una función de dos dimensiones $I(x,y)$ donde x e y son coordenadas espaciales e I representa la intensidad de la imagen en ese punto [40]. Es decir, de forma simplificada, una imagen digital es una matriz bidimensional formada por filas y columnas, donde cada casilla tiene un valor que corresponde al nivel de intensidad en ese lugar. Estas casillas se denominan píxeles y son los elementos base de cualquier imagen.

Las imágenes pueden contener uno o varios canales de color. El caso más sencillo corresponde a las imágenes en escala de grises. Estas tienen píxeles que pueden tomar un valor entero entre 0 y 255, donde 0 representa el negro absoluto y 255 el blanco. Las imágenes RGB, por otro lado, asignan tres valores a cada píxel, igualmente entre 0 y 255 pero para cada uno de los canales de color. Estos tres canales se combinan para producir el color resultante en cada píxel. Por ejemplo, el color blanco en una imagen RGB se representará como [255, 255, 255], es decir, intensidad máxima para el canal rojo, verde y azul. Por otro lado, el color rojo se representará como [255, 0, 0].

En este contexto, se define el procesamiento de imágenes digitales como el conjunto de técnicas y métodos que sirven para manipular y modificar las imágenes mediante el uso de algoritmos informáticos. El procesamiento de imágenes se utiliza para dos propósitos principales: mejorar o modificar una imagen y extraer información relevante de la misma. Algunas de las principales etapas que suele tener este proceso son:

- Preprocesamiento: incluye técnicas como mejorar la calidad de la imagen, eliminar ruido o aumentar el contraste. Es una etapa enfocada en preparar la imagen para facilitar su posterior análisis.
- Segmentación: consiste en dividir la imagen en segmentos o regiones a partir de algoritmos. Se utiliza cuando se quiere detectar alguna región o clasificar partes de una imagen.
- Extracción de características: basada en identificar y medir características relevantes de la imagen como formas o patrones específicos.
- Clasificación y análisis: estas características mencionadas pueden ser utilizadas para obtener información útil de la imagen, que permita su clasificación o obtención de parámetros interesantes.

El presente apartado tiene como objetivo cubrir algunas de las técnicas de procesamiento empleadas en este trabajo, con el fin de comprender su funcionamiento. Las técnicas que se incluyen a continuación son la umbralización, el procesamiento morfológico, la ecualización del histograma adaptativo y la transformada *watershed*. Cada una de estas técnicas ha sido utilizada en alguna parte del proceso del análisis de las imágenes para la identificación de las colonias.

3.2.1 Umbralización e iluminación de fondo

La umbralización o, en inglés *thresholding*, es una operación básica. Una umbralización tiene como entrada una imagen en escala de grises o RGB y produce como salida una imagen binaria, es decir, solo compuesta por valores 0 y 1 en sus píxeles. Funciona introduciendo un valor umbral o *threshold* a partir del cual todos los píxeles con intensidad superior se saturarán a 1 y todos los píxeles con intensidad inferior a 0. En la Figura 3.1 se muestra un ejemplo.

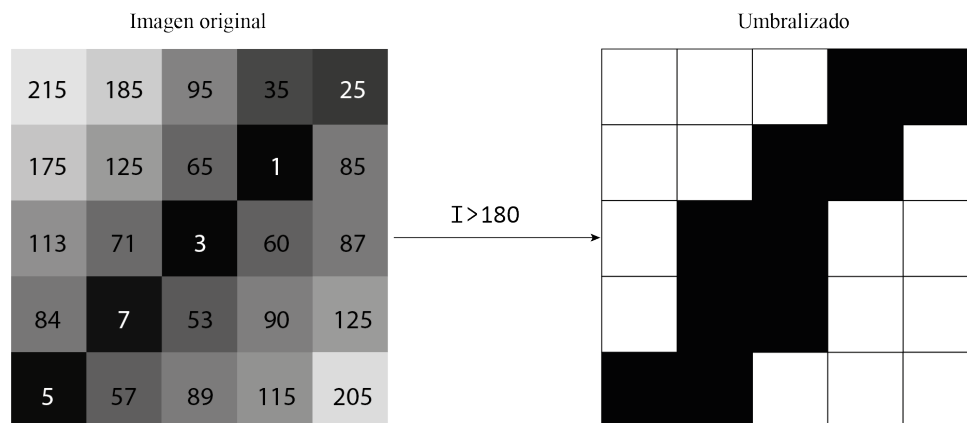


Figura 3.1: Ejemplo de umbralización global para un valor de umbral de 180. A la izquierda imagen original; a la derecha la imagen de salida umbralizada. Fuente: elaboración propia.

Este método se conoce como umbralización global, pues el mismo valor umbral se aplica para todos y cada uno de los píxeles. Sin embargo, en algunos casos este método puede ser demasiado simple. En estas situaciones es más ventajoso utilizar umbrales locales. A esto se lo conoce como umbralización adaptativa y es la técnica que se ha empleado en este trabajo.

La umbralización adaptativa se basa en utilizar un valor umbral para cada píxel en función de los valores de intensidad vecinos al mismo. Por lo tanto, el umbral adaptativo parte de la premisa de que la luminosidad puede variar en la imagen, pero se puede suponer que es aproximadamente uniforme en un vecindario local suficientemente pequeño [40]. El vecindario se define como una submatriz de la principal de tamaño $N \times N$ y el tamaño del mismo influirá en el resultado.

Algunos de las ventajas de utilizar un umbral local frente a uno global son:

- Adaptación a la variación del contraste o la iluminación en la imagen, así como diferentes texturas que aparezcan en la misma. Esta adaptabilidad es útil para imágenes que no poseen unas condiciones de iluminación uniformes, como es el caso de las imágenes con las que se ha trabajado en este TFM.
- Preservación de mayor número de detalles que se perderían con algunos umbrales globales.

Sin embargo, cabe destacar que el método global es más simple y también rápido, por tanto, la elección de uno u otro dependerá de la situación en concreto.

Una de las formas de obtener un umbral local es calculando la iluminación de fondo promedio. Este método se basa en obtener el promedio por ventanas de píxeles vecinos, visto de otra forma, los valores de umbrales locales serían los valores de un filtro promedio sobre la imagen. La forma más simple de hacerlo es la siguiente:

1. Se toma una ventana de tamaño fijo $N \times N$ alrededor de un píxel de la imagen.
2. Se calcula el promedio de todos los valores de intensidad dentro de esa ventana. El valor resultante es el valor umbral para el píxel central de la ventana.
3. Si el valor del píxel es mayor o menor a este umbral se clasifica como 1 o 0 respectivamente.
4. Se desplaza la ventana a un píxel adyacente y se repiten los pasos anteriores.
5. El proceso acaba cuando la ventana se ha desplazado recorriendo toda la imagen.

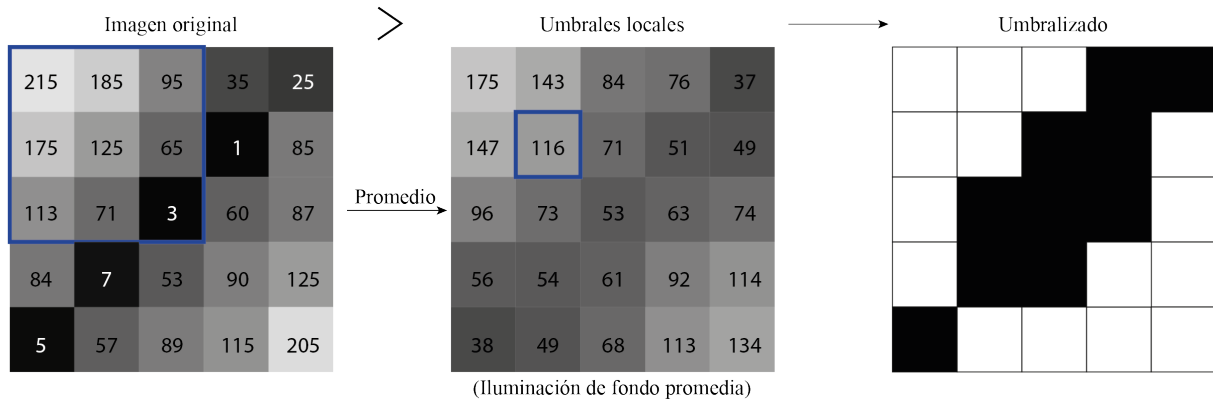


Figura 3.2: Ejemplo de la Figura 3.1 pero con umbralizado local a través de la obtención de la iluminación de fondo promedio. Fuente: elaboración propia

Otro método más eficiente para calcular la iluminación de fondo promedio y utilizarla para el umbralizado de la imagen es calcular la integral de la imagen. Este método propuesto por Bradley y Roth en 2007 [41] consiste en lo siguiente:

1. Cálculo de la integral de la imagen: para cada píxel (x, y) en la imagen, la imagen integral $I(x, y)$ se calcula como la suma de todos los valores de intensidad de los píxeles a la izquierda y arriba del píxel (Ecuación 3.1, donde $f(x, y)$ es la intensidad del píxel original)

$$I(x, y) = f(x, y) + I(x - 1, y) + I(x, y - 1) - I(x - 1, y - 1) \quad (3.1)$$

2. Cálculo del promedio de cada ventana: una vez calculada la imagen integral, se puede calcular rápidamente el promedio de intensidad en una ventana $N \times N$ alrededor de cada píxel (x, y) . La suma de los píxeles dentro de la ventana se calcula según la Ecuación 3.2. Donde (x_1, y_1) y (x_2, y_2) son las esquinas superior izquierda e inferior derecha de la ventana. El promedio será esta suma entre el número de elementos de la ventana.

$$\text{sum} = I(x_2, y_2) - I(x_2, y_1 - 1) - I(x_1 - 1, y_2) + I(x_1 - 1, y_1 - 1) \quad (3.2)$$

3. Aplicar el umbral: para cada píxel, se compara su valor de intensidad con el promedio calculado de su ventana. Si el valor del píxel es $t\%$ (sensibilidad) menor que el promedio, se clasifica como negro (0); de lo contrario, se clasifica como blanco (1).

En la Figura 3.3 se representa este método.

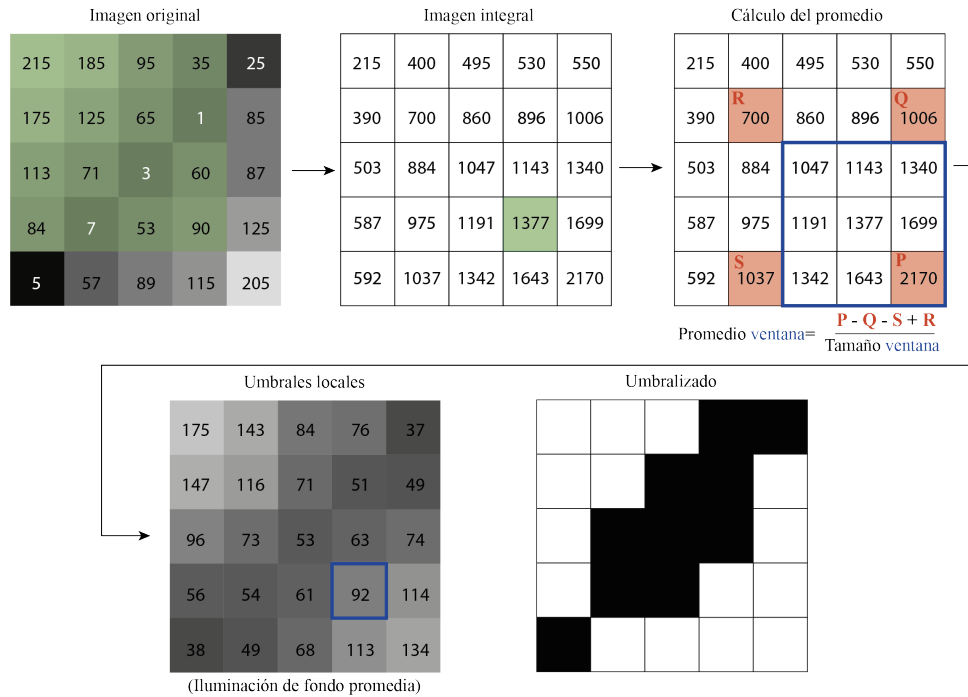


Figura 3.3: Ejemplo de la Figura 3.1 pero con umbralizado local a través de la obtención de la iluminación de fondo promedia mediante la imagen integral. Fuente: elaboración propia.

Utilizar el método de la integral tiene sus ventajas ya que, para imágenes grandes, es más eficiente pues evita la necesidad de recalcularse la suma de los valores de los píxeles para cada posición de la ventana, lo que se traduce en mayor velocidad y eficiencia computacional.

3.2.2 Ecuación adaptativa del histograma

Un histograma de una imagen es un gráfico que representa la frecuencia de aparición de los diferentes valores de intensidad en la misma. Si se normaliza el histograma, se puede ver como una función de densidad de probabilidad de que un valor de píxel determinado ocurra dentro de la imagen [40]. Un simple vistazo al histograma nos da información sobre la distribución de blancos y negros. En la Figura 3.4 se muestra un ejemplo.

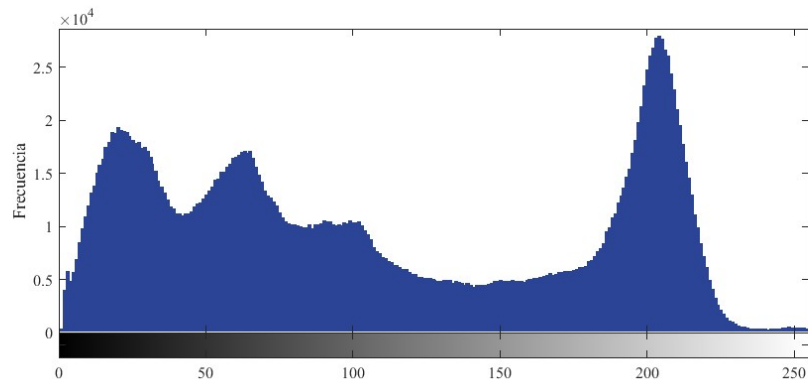


Figura 3.4: Ejemplo de histograma de una imagen. De izquierda a derecha se presenta la frecuencia de píxeles con valores de intensidad para cada nivel de gris. Fuente: elaboración propia.

Una de las utilidades que tiene el histograma es utilizarlo para la mejora del contraste de una imagen. Una forma de maximizar el contraste y destacar los detalles es con una ecualización del histograma.

La ecualización del histograma, por tanto, es una técnica de procesamiento de imágenes que busca modificar el contraste global de la imagen ajustando la distribución de intensidad de los píxeles. Esta técnica tiene las siguientes fases [40]:

1. Cálculo del histograma de la imagen.
2. Cálculo del histograma acumulativo: se trata de la suma acumulativa de los elementos del histograma.
3. Normalización del histograma acumulativo: se normaliza para que los valores de intensidad vuelvan a encontrarse entre 0 y 255.
4. Mapeo de las intensidades: a cada píxel original se le atribuye el nuevo valor de intensidad obtenido en la normalización del histograma acumulativo.

El resultado de la ecualización se muestra en un ejemplo en la Figura 3.5.

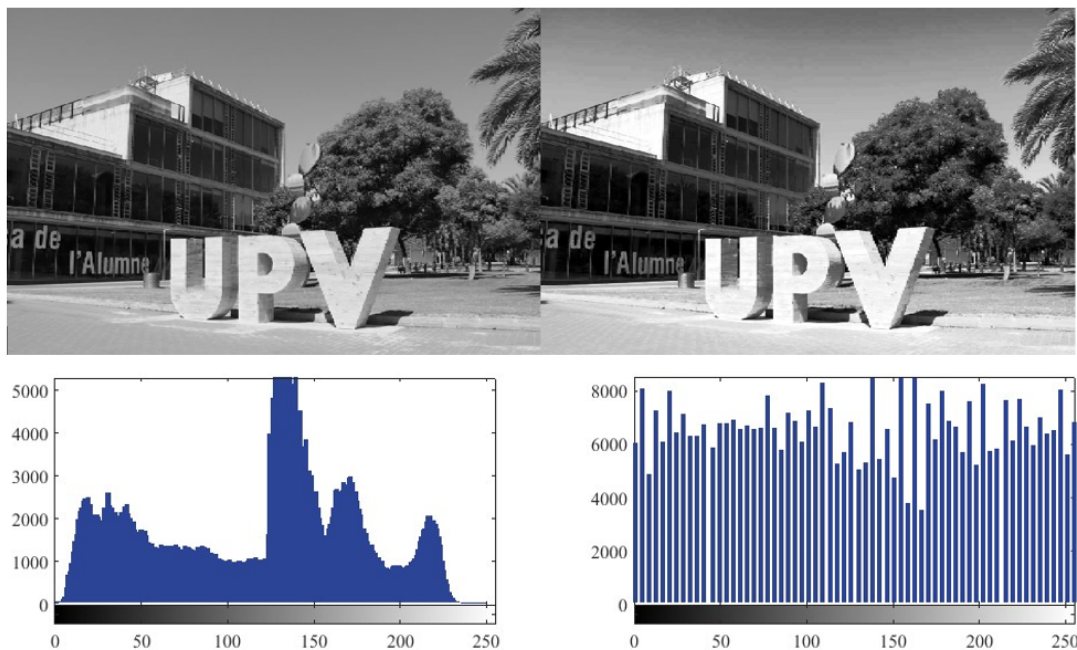


Figura 3.5: A la izquierda imagen original con su histograma respectivo. A la derecha el resultado de la ecualización del histograma y el efecto que tiene sobre el mismo. Fuente: elaboración propia.

Del mismo modo que ocurría con la umbralización, este método explicado ahora es una técnica global, pero en ocasiones será más beneficioso utilizar una técnica local. Aquí nace la ecualización adaptativa del histograma, cuyo funcionamiento es parecido. Simplemente la diferencia radica en que ahora se divide la imagen original en ventanas y se hace la ecualización para cada ventana por separado.

3.2.3 Análisis morfológico

Una de las técnicas más empleadas en procesamiento de imágenes es el análisis morfológico. Este método de análisis de imágenes se basa en la forma o estructura de los objetos presentes en una imagen. Se utiliza principalmente para el preprocesamiento y el postprocesamiento de imágenes, como la eliminación de ruido, la separación de elementos individuales y la identificación de formas.

En el procesamiento morfológico se trabaja con una estructura denominada elemento estructurante (SE). Este elemento estructurante es una pequeña matriz que se mueve a través de la imagen para aplicar diferentes operaciones morfológicas.

Las operaciones morfológicas se pueden aplicar a imágenes de todo tipo, pero el uso principal de la morfología, y del que se hablará en este apartado, es para procesar imágenes binarias. En una imagen binaria se considera que el valor 1 corresponde a píxeles de primer plano u objeto, mientras que el valor 0 corresponde al fondo. Bajo este enfoque, el efecto del procesamiento morfológico se limita a identificar qué píxeles que representan el primer plano se convierten en fondo y cuáles del fondo se transforman en primer plano [40].

Un elemento estructurante es una matriz rectangular de píxeles binaria. El elemento estructurante puede tener diferentes tamaños y formas. El píxel central del SE se coloca encima del píxel en consideración de la imagen. La vecindad de ese píxel está determinada por aquellos píxeles de la imagen que se encuentran debajo de aquellos píxeles del SE que tienen el valor 1. Esto se ilustra en la Figura 3.6.

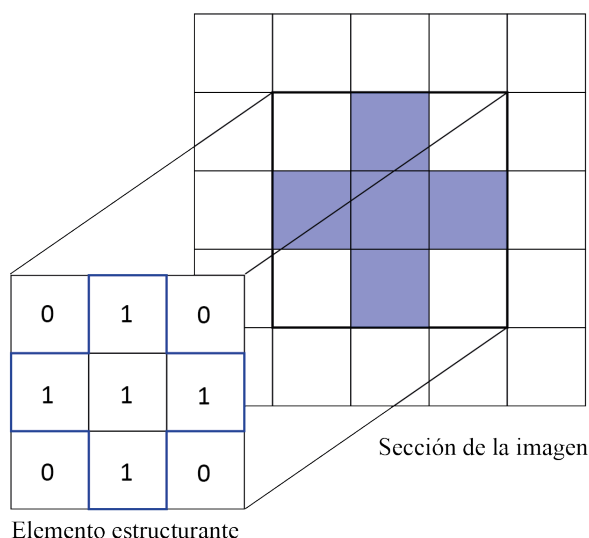


Figura 3.6: Elemento estructurante superpuesto sobre una sección de la imagen. Fuente: elaboración propia.

Gran parte del trabajo de esta técnica es encontrar el tamaño y forma del elemento estructurante adecuado para que se adapte a la función que se tiene en mente.

3.2.4 Dilatación y erosión

Los operadores morfológicos más simples son la dilatación y la erosión. Todo el resto de operaciones morfológicas se pueden definir en base a estas.

La erosión es una operación morfológica que reduce las regiones blancas de una imagen binaria. Se puede imaginar como un proceso que “corroe” los bordes de las regiones blancas (píxeles de primer plano). El proceso consiste en deslizar el elemento estructurante sobre la imagen. En cada posición, el píxel central del elemento estructurante se mantiene en 1 solo si todos los píxeles bajo el elemento estructurante también son 1; en caso contrario, se establece en 0.

Por otro lado, la dilatación es la operación opuesta a la erosión. En lugar de reducir, expande las regiones blancas de la imagen. En este caso, se desliza el elemento estructurante sobre la imagen y el píxel central del elemento estructurante se establece en 1 si al menos uno de los píxeles bajo el elemento estructurante es 1.

Ambas técnicas se muestran en la Figura 3.7 y sus principales diferencias así como sus posibles usos se resumen en la Tabla 3.1.

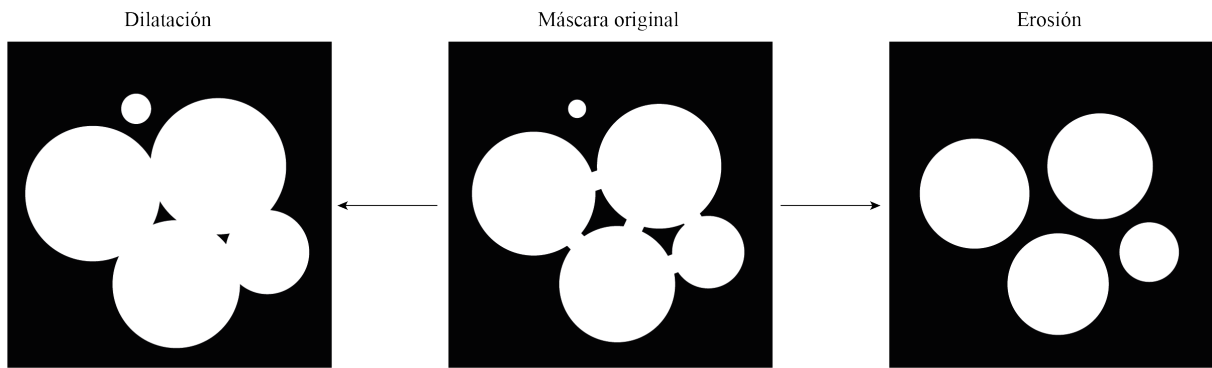


Figura 3.7: Ejemplo de una dilatación y erosión. Fuente: elaboración propia.

DILATACIÓN	EROSIÓN
Dilata zonas blancas	Erosiona zonas blancas
Hace más gruesas las figuras	Hace más finas las figuras
Si los objetos están juntos puede unirlos	Si los objetos son pequeños pueden desaparecer
Reduce/elimina agujeros	Si los objetos tienen istmos estrechos pueden partirse
Los entrantes estrechos son rellenados	Los salientes estrechos son eliminados

Tabla 3.1: Resumen de características y diferencias entre dilatación y erosión.

3.2.5 Apertura y cierre

Las operaciones de apertura y cierre son combinaciones de erosión y dilatación.

En primer lugar, la apertura consiste en aplicar una erosión seguida de una dilatación. Con esto se consigue primero eliminar pequeños objetos o salientes y luego dilatar para preservar el tamaño de los objetos principales. Una aplicación es eliminar objetos pequeños o finos no deseados.

En segundo lugar, el cierre consiste en aplicar primero la dilatación seguida de una erosión. Con esta operación se consigue rellenar y cerrar pequeños huecos en los objetos sin alterar en gran medida su tamaño inicial.

La elección del tamaño del elemento estructurante es el parámetro más importante. En la apertura, la erosión con este elemento garantiza la eliminación de cualquier objeto más pequeño que el mismo. Luego al dilatar con el mismo elemento estructurante se devuelve los objetos supervivientes a sus dimensiones originales. Sin embargo, la apertura no mantendrá exactamente la forma de los objetos primarios excepto en situaciones muy simples. En términos generales, cuanto más grande sea el tamaño del objeto estructurante y mayor sea la disparidad de forma entre el objeto estructurante y el objeto, mayor será el error en la forma restaurada. Para solucionar esto existen métodos mejorados de las aperturas y cierres, denominados aperturas y cierres por reconstrucción.

La apertura por reconstrucción es una transformación morfológica que permite restaurar los objetos que sobreviven a una erosión a su forma original. Para ello se necesita dos imágenes, la máscara o imagen original y el marcador. El proceso es el siguiente:

1. Erosión inicial para eliminar los pequeños objetos no deseados.
2. Se toma la imagen erosionada como imagen marcador.
3. Se dilata iterativamente la imagen de marcador limitada por la máscara original siempre y cuando la imagen resultante en cada paso sea el resultado de la operación lógica AND (intersección) entre la imagen del marcador y la máscara. Así, la máscara limita el marcador y evita que se muestren píxeles de primer plano que no estaban en la imagen original.

Cuando la imagen generada después de una iteración es idéntica a la imagen resultante de la iteración previa, significa que la dilatación ya no tiene más efecto y todos los objetos que resistieron la erosión inicial han sido recuperados completamente. En este momento el proceso se considera terminado.

El proceso es similar para el cierre por reconstrucción, pero intercambiando la erosión primera por una dilatación y luego erosionando hasta reconstruir la imagen.

3.2.6 Transformada de Watershed

Una operación muy habitual en el análisis de imágenes es la segmentación. Segmentar consiste en dividir una imagen en diferentes regiones de píxeles. A cada región se le asigna una etiqueta o *label*. Se trata de un proceso por el cual se asignan píxeles a la misma región cuando comparten ciertas características. Esta técnica es útil para localizar objetos y límites en imágenes.

Un método de los más utilizados en la actualidad para segmentar imágenes es la transformada de *watershed*. Su uso se debe a que permite separar objetos que están en contacto, una de las operaciones de procesamiento más difíciles.

Watershed se basa en considerar la imagen como un relieve topográfico. El nivel de gris indica la altura de ese relieve. Si el nivel de gris es muy alto tendrá una altura muy grande, mientras que para intensidades bajas próximas al negro estaremos hablando de valles. Por tanto, se definen:

- Valles: mínimos locales (oscuro)

- Cimas: máximos locales (claro)

El funcionamiento del algoritmo se puede explicar de forma sencilla con una analogía. Imaginemos que se genera un agujero en cada mínimo local y que toda la topografía se inunda desde abajo, subiendo el agua por los agujeros. En el momento en el que se junta el agua de un valle y otro se construye una presa para evitar que las aguas se mezclen. Estas presas o líneas son las fronteras de separación *watershed lines*. En la Figura 3.8 se observa una representación de este proceso.

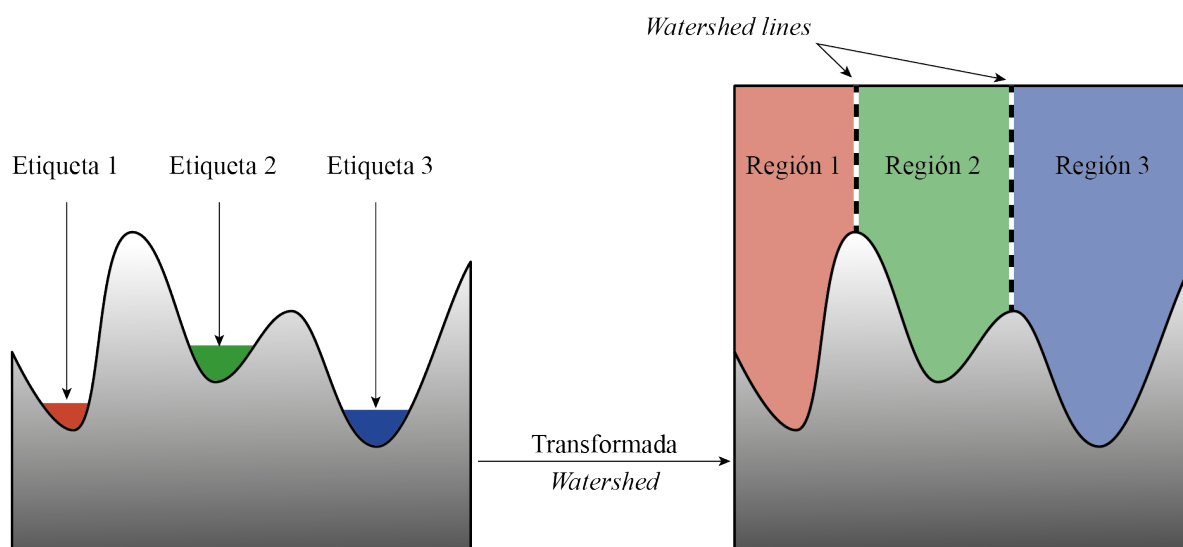


Figura 3.8: Proceso de inundación y obtención de las etiquetas de segmentación en el algoritmo watershed. Fuente: elaboración propia.

Por tanto, como resultado se obtienen tantas regiones como mínimos locales. Sin embargo, esto genera un gran problema al trabajar con las imágenes de grises, la sobresegmentación. Este fenómeno se debe a la existencia de muchos mínimos locales (debidos al ruido).

Para solucionar esto existen diferentes técnicas, en concreto explicaremos la transformada *watershed* con marcadores. La idea para mejorar el algoritmo es seleccionar previamente unos puntos llamados marcadores que se utilizarán como inicio de la inundación. El proceso es el siguiente:

1. Se eligen unos marcadores de primer plano o objeto que se trata de una máscara binaria donde los blancos son puntos o regiones de puntos encima de los objetos. Esto se puede hacer de forma manual o automática mediante otros métodos como la erosión que hemos visto anteriormente.
2. Del mismo modo, se eligen unos marcadores de segundo plano o de fondo. Por ejemplo, una forma sencilla es con una dilatación del negativo de la imagen. De forma que en blanco queden las zonas que seguro son fondo.
3. Se impone como mínimos a la imagen original la imagen de marcadores, siendo esta la combinación de ambos marcadores. A esto se lo denomina función de segmentación.
4. Se aplica el *watershed* sobre la función de segmentación.

De esta forma se aumenta el control sobre qué regiones se segmentan y ayuda a reducir la sobresegmentación enfocando el proceso en las áreas de interés.

Capítulo 4

Materiales

4.1 Hardware y software

4.1.1 *Hardware*

Antes de llevar a cabo un proyecto como el presente TFM es esencial conocer las características internas del hardware con el que se trabaja. El desarrollo y ejecución de técnicas avanzadas de procesamiento de imágenes requieren una infraestructura de hardware robusta que permita la manipulación eficiente de archivos de imágenes pesados. El hardware juega un papel fundamental en el rendimiento de los algoritmos, afectando a la velocidad con la que se pueden realizar las operaciones, es decir, a los tiempos de procesamiento.

El equipo utilizado para el presente TFM se trata de un Asus Zenbook UX3402ZA y presenta las características resumidas en la Tabla 4.1.

Procesador	Intel Core i7 de 12th Generation y 2.10 GHz
Memoria RAM	16 GB
Disco dura	512 GB SSD
Sistema operativo	Windows 11 Home de 64 bits
Tarjeta gráfica	Intel Iris Xe Graphics

Tabla 4.1: Especificaciones del ordenador empleado para el proyecto.

4.1.2 Software

El software principal empleado ha sido MATLAB® v.R2024a de The MathWorks Inc. (Massachusetts, EE.UU). Se ha utilizado para generar el código y los algoritmos para conseguir el procesamiento y segmentación de las imágenes, así como para el desarrollo de la interfaz visual. Para ello ha sido necesaria la librería Image Processing Toolbox . Además, se ha trabajado con la aplicación interna de MATLAB App Designer, como apoyo para la programación de la interfaz visual. Esta app permite añadir los componentes interactivos de forma sencilla y tener una previsualización de la aplicación que se está desarrollando. En la Figura 4.1 se muestra App Designer en el proceso de creación.

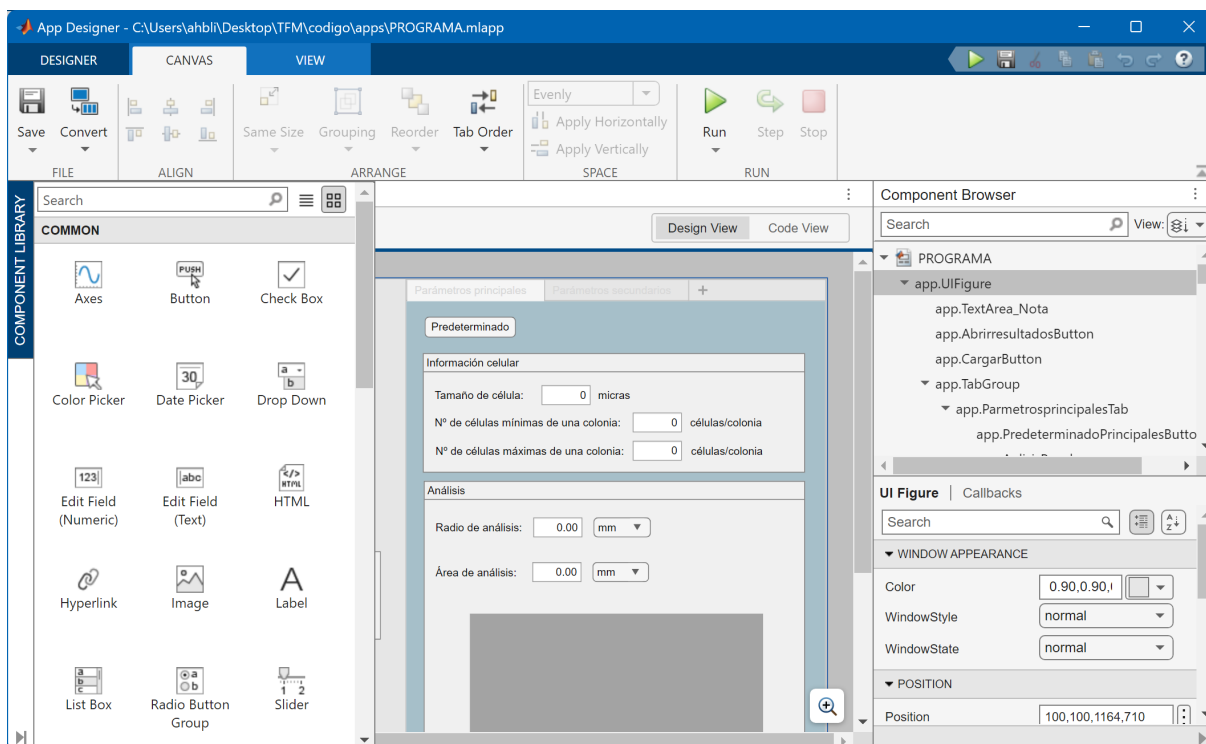


Figura 4.1: Interfaz de App Designer de MATLAB®, empleada como apoyo para el diseño y desarrollo de la interfaz creada para acompañar el código del presente TFM.

4.2 Imágenes

Las imágenes utilizadas para el desarrollo de este TFM han sido proporcionadas por el Instituto de Física Corpuscular (IFIC), instituto mixto de la Universitat de València y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Estas imágenes son fotografías de placas de 6 pocillos donde han sido sembradas e irradiadas células, algunas con nanopartículas de oro y otras no. Se presentan en formato .tif con una resolución de 1200 ppp, esto supone un tamaño aproximado para cada una de ellas de 45 MB.

En total se obtuvieron 131 imágenes de las cuales:

- 124 imágenes de experimentación, donde se han sembrado los pocillos 1 y 6 (el primero y último). En este caso, el primero se irradia y el último no, sirviendo éste de control. Se irradia a dosis de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 grays.
- 7 imágenes adicionales que corresponden a controles, donde los 6 pocillos se han sembrado y ninguno ha sido irradiado.

En las Tablas 4.2 y 4.3 se detalla la cantidad de cada tipo de imágenes.

	Imágenes de control	Imágenes de experimento	TOTAL
Con nanopartículas	2	70	72
Sin nanopartículas	5	54	59
TOTAL	7	124	131

Tabla 4.2: Cantidad de imágenes de control y experimento con y sin nanopartículas.

	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy	5 Gy	6 Gy
Con nanopartículas	12	13	13	13	12	12
Sin nanopartículas	8	8	8	8	8	8

Tabla 4.3: Cantidad de imágenes de experimento con y sin nanopartículas irradiadas a diferentes grays.

Finalmente, las imágenes para su correcta identificación se han definido con una nomenclatura específica. El primer número y letra corresponden a la repetición y tanda del experimento. Si aparece una ‘G’, indica que esa muestra ha sido irradiada y la dosis vendrá marcada por el número que precede a esta letra. Si aparece ‘NP’ significa que se han utilizado nanopartículas. Por último, los números posteriores los inserta el escáner con el que se toman las imágenes, pero no contienen ninguna información relevante para el análisis. En la Figura 4.2 se muestra un ejemplo.

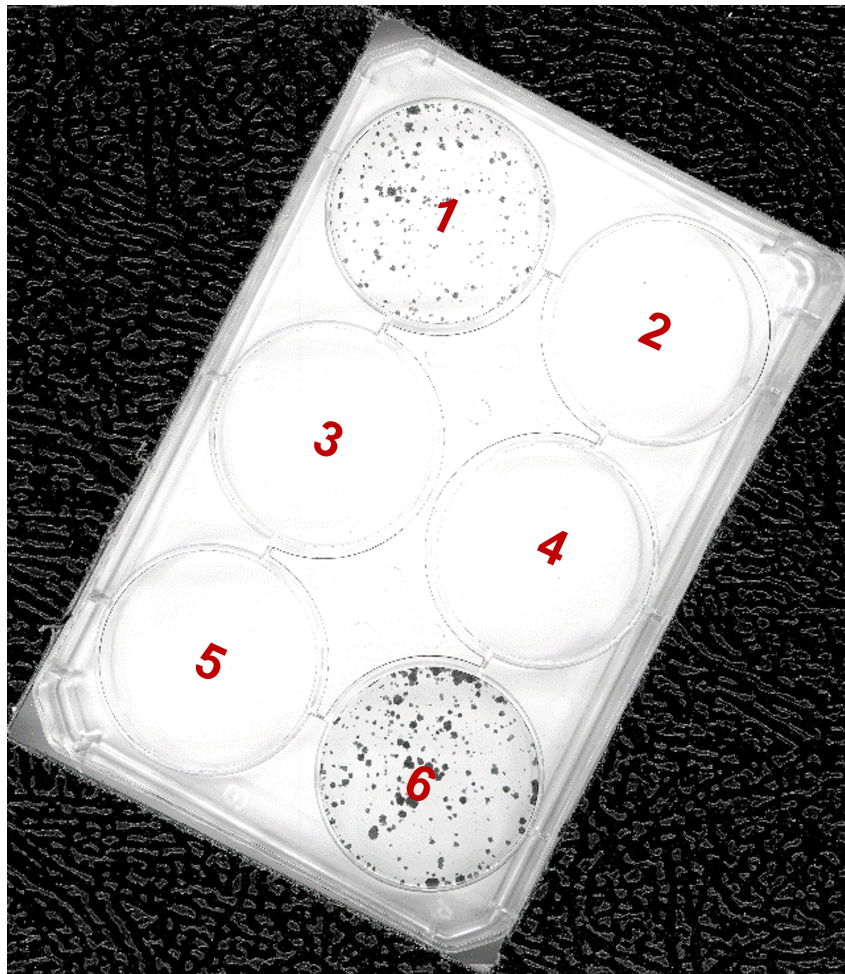


Figura 4.2: Ejemplo de imagen con nombre de archivo 1_C_1G030.tif, ejemplo correspondiente a la tanda 1C, irradiada con 1 Gy y que no contiene nanopartículas. El pocillo 1 será el irradiado con 1 Gray, mientras que el 6 no está irradiado y se utiliza de control.

5.1 Diagrama de flujo de trabajo

Para analizar cada una de las imágenes se necesita seguir una serie de pasos que incluyen diferentes procedimientos. En la Figura 5.1, se muestra el diagrama de flujo para realizar esta tarea. Además, el algoritmo de conteo diseñado también estará formado por una serie de fases cada una de estas con una finalidad. La Figura 5.2 representa el diagrama de flujo en este caso.

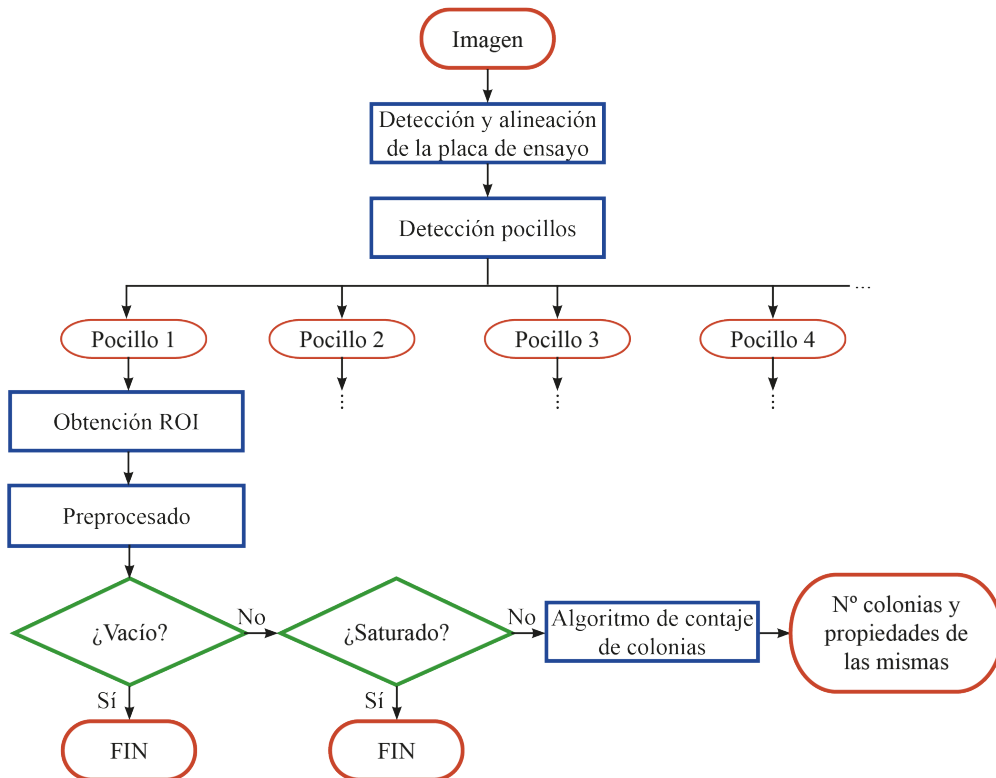


Figura 5.1: Diagrama de flujo del análisis de las imágenes. Fuente: elaboración propia.

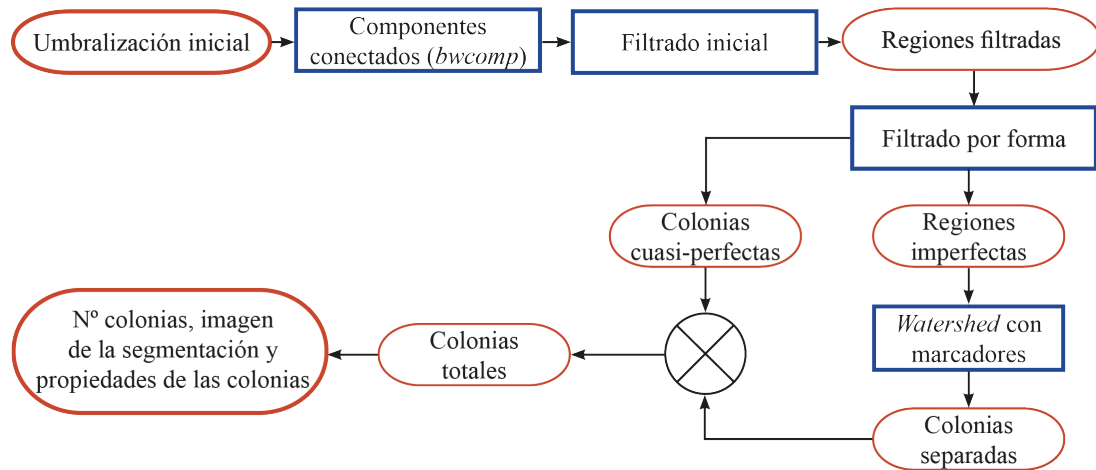


Figura 5.2: Diagrama de flujo del algoritmo generado en el presente TFM para el conteo de colonias. Fuente: elaboración propia.

Este apartado tiene como objetivo explicar el procedimiento seguido hasta encontrar el algoritmo, explicar la metodología, explicar detalladamente el mismo, así como el desarrollo de la interfaz.

5.2 Búsqueda del algoritmo final. Problemas encontrados y soluciones implementadas.

Durante el desarrollo del algoritmo para el conteo y segmentación de colonias, se enfrentaron diferentes desafíos que requerían mejoras y cambios hasta encontrar las soluciones óptimas. A continuación, se describen los principales problemas encontrados y cómo fueron solucionados hasta la obtención del método final que se explicará en el apartado posterior.

En primer lugar, para obtener el mejor método de mejora del contraste se probó con tres técnicas: el ajuste de contraste manual, la ecualización del histograma y la ecualización adaptativa del histograma.

- Ajuste de contraste manual: Este método consistió en ensanchar la parte del histograma donde había más información, lo que resultaba en una mejor apariencia visual. Sin embargo, debido a su naturaleza manual, dependía de cada muestra analizada y se alejaba del objetivo automático que se buscaba en este trabajo.
- Ecualización del histograma: Este método proporcionaba malos resultados debido a que las imágenes contenían valores muy extremos, es decir, muy cercanos al blanco o al negro, sin valores intermedios.
- Ecualización adaptativa del histograma: Aunque no alcanzaba la calidad visual del ajuste manual, generó buenos resultados y se eligió porque se adaptaba a diferentes muestras, alineándose con nuestro objetivo de automatización.

En la Figura 5.3 se representan los resultados de los tres métodos de contraste para una muestra.

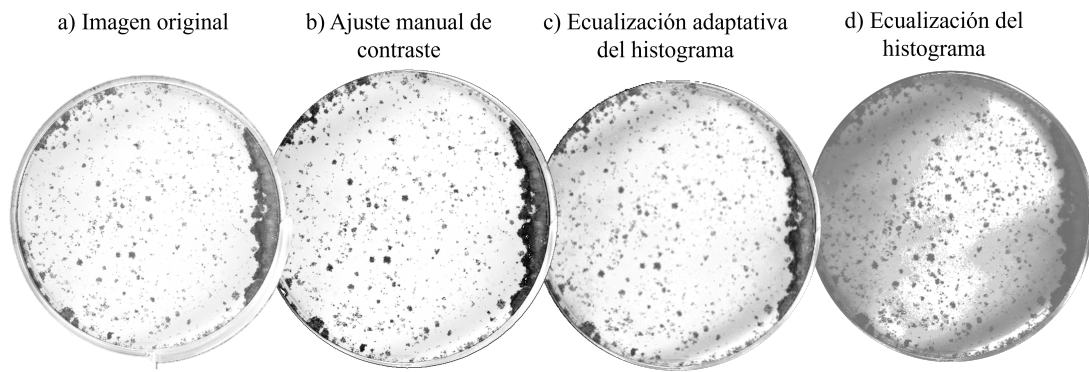


Figura 5.3: Diferencias en el contraste de una muestra para el ajuste manual de contraste, la ecualización del histograma y la ecualización adaptativa del histograma.

En cuanto a la umbralización, inicialmente se intentó realizar una umbralización global. Sin embargo, al igual que con el contraste manual, la calidad de los resultados era muy dependiente de la muestra, y se perdía mucha información debido a las diferencias de iluminación en distintas partes de la imagen. Por este motivo, se optó por implementar una umbralización local, utilizando la iluminación de fondo promedio de la imagen como umbral local. De esta forma se tiene en cuenta las diferentes luminosidades en distintas zonas de la imagen, además sirve para eliminar algunas sombras que podrían molestar en el análisis, como las líneas diagonales visibles en la parte superior e inferior de la muestra original de la Figura 5.3.a.

No obstante, el uso de la iluminación de fondo presentó un problema: la difuminación de los bordes. Esto es debido a que, el fondo negro, que es la zona que no pertenece al pocillo, en la unión con el mismo crea zonas de alto contraste que no es real, generando desviaciones en el promedio de la iluminación. Como resultado, al aplicar la umbralización con esta iluminación de fondo, se perdían colonias en los bordes del pocillo.

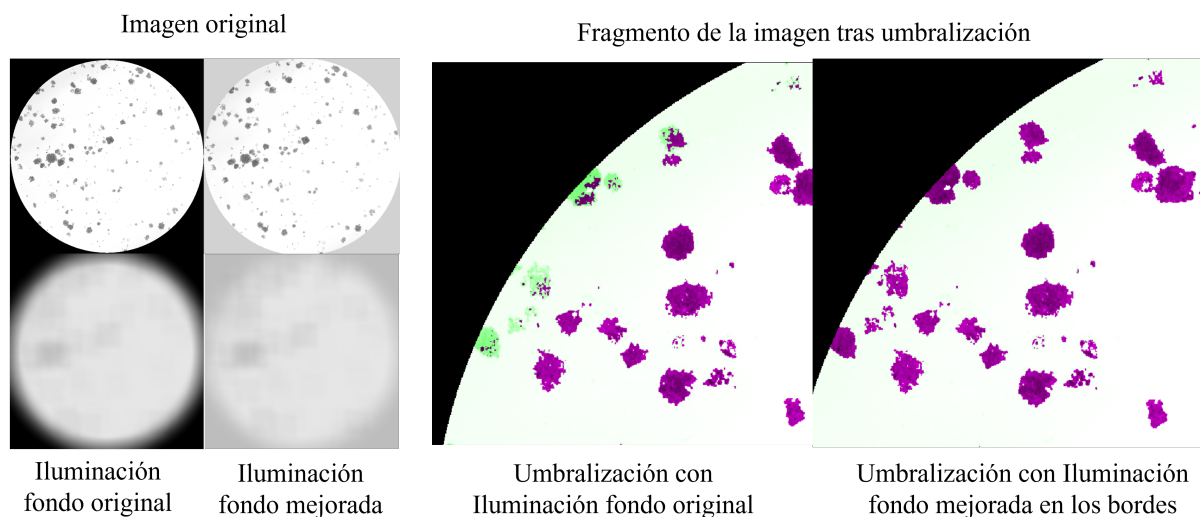


Figura 5.4: Ejemplo de la umbralización con la iluminación de fondo mejorada. A la izquierda las iluminaciones de fondo en casa caso; a la derecha un fragmento de la imagen umbralizado superpuesto sobre la original para cada caso. En morado se presenta las zonas que se mantienen y en verde las que se pierden al umbralizar.

Para solucionar este problema, se modificó la imagen de recorte sustituyendo el negro del fondo por el valor promedio de la iluminación de fondo. A partir de esta nueva imagen, se volvió a calcular la iluminación de fondo. Esta modificación suavizó los bordes, permitiendo conservar las colonias situadas en los límites del pocillo (Figura 5.4).

En cuanto a la parte de detección y conteo de colonias, inicialmente se consideró la idea de probar con técnicas de *machine learning*, en concreto el *clustering*. Tras analizar múltiples algoritmos de *clustering* con diferentes parámetros de entrada se observó que ninguno de ellos presentaba resultados satisfactorios y se descartó estas técnicas para el presente problema.

Técnica de clustering	Parámetros probados	Features
DBSCAN	Epsilon = [0.1, 0.07, 0.06] Minpts = [20, 50]	Coordenadas x e y de cada píxel Nivel de gris de cada píxel
Clustering jerárquico	Cutoff = 5 y Método = "Ward" Cutoff = 5 y Método = "average"	Coordenadas x e y de cada píxel Nivel de gris de cada píxel
Mean shift	Bandwidth = [0.06, 0.07, 0.1]	Coordenadas x e y de cada píxel Nivel de gris de cada píxel

Tabla 5.1: Técnicas de clustering probadas, con los parámetros correspondientes.

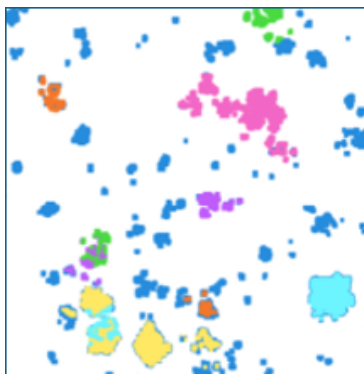


Figura 5.5: Resultado de clustering con DBSCAN con Epsilon de 0.06 y Minpts de 50, para un fragmento de una muestra.

Seguido a esto se probó con el análisis de componentes conectados. Dada una máscara binaria (como la que se obtiene tras la umbralización, encontrar los componentes conectados se trata de encontrar conjuntos de píxeles adyacentes (blancos), separados de otros por zonas negras. A cada componente se le asigna un identificador y se obtienen las coordenadas de los píxeles que lo forman y con ello, multitud de características de ese elemento como el área, perímetro, circularidad, etc. Teniendo toda esta información, se consiguió detectar componentes en las imágenes de pocillos (posibles colonias) y filtrar por área para eliminar pequeñas células muertas o pelos que pueda haber en la muestra y no corresponden a colonias.

Sin embargo, la principal limitación de esto es cuantificar correctamente las colonias solapadas. Dos colonias solapadas formarán parte del mismo componente, lo que lleva a una cuantificación incorrecta. Además, puede que al filtrar por filtros de circularidad o excentricidad nos carguemos sin querer más de una colonia. En la Figura 5.6, se puede ver el resultado para este método.

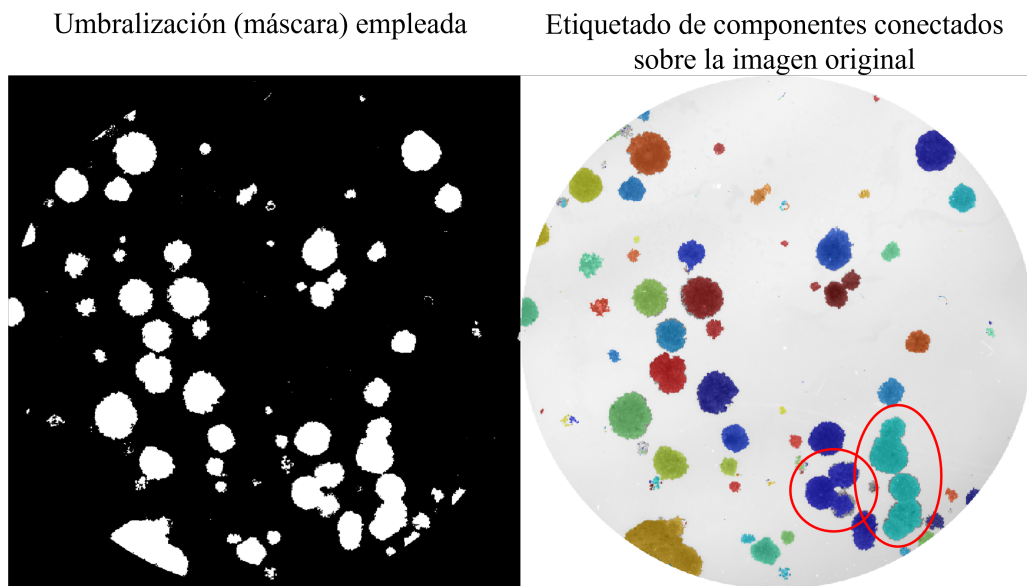


Figura 5.6: Ejemplo de detección de componentes conectados. Se encuentran señaladas agrupaciones de colonias conectadas que se detectan como un solo elemento.

Investigando estudios actuales sobre métodos para la segmentación de colonias o células, se observó que el método más empleado para separar elementos solapados en segmentaciones es la técnica de *watershed*. Sin embargo, al aplicar este método directamente, los resultados obtenidos no eran satisfactorios, ya que tendía a sobresegmentar o subsegmentar las colonias debido a su sensibilidad a variaciones en la intensidad de la imagen (Figura 5.7). Por esta razón, se investigaron alternativas y se descubrió que, para aplicaciones más complejas, se utiliza el *watershed* con marcadores (explicado en el Apartado 3.2.6). Esta variación mejora significativamente los resultados ya que permite guiar el proceso de segmentación y evitar la sobresegmentación.

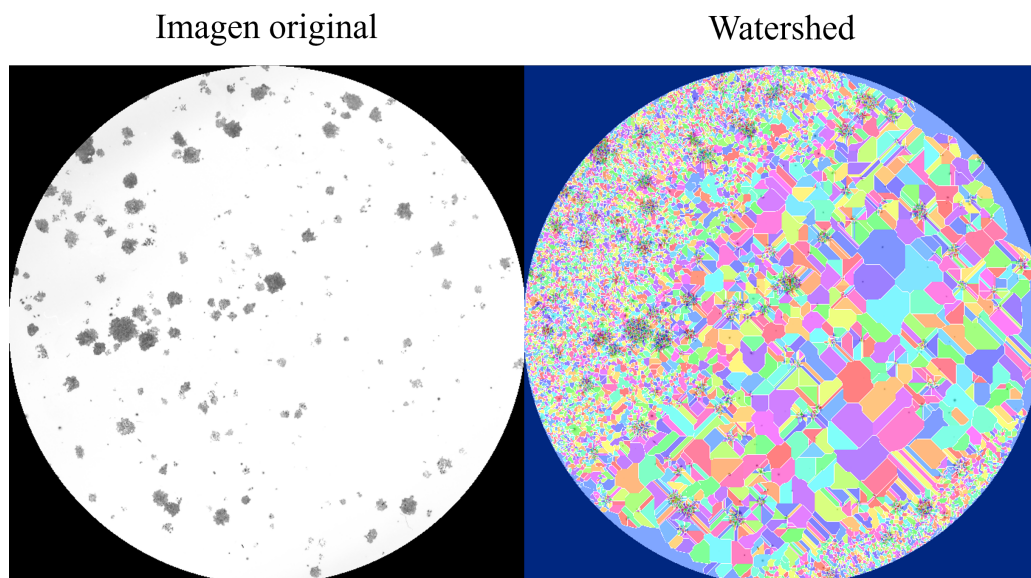


Figura 5.7: *Watershed* sobre la imagen original.

Llegados a este punto, se probaron diversas combinaciones de imágenes de fondo y objeto para identificar la configuración que mejor se adaptara a la segmentación precisa de colonias. En concreto, se probó todas las combinaciones posibles resumidas en la Tabla 5.2.

Nº	Imagen Base	Marcador Fondo	Marcador Objeto
1	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Umbralizado de la transformada de la distancia
2	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Máximos regionales de la transformada de la distancia
3	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Mínimos regionales de la apertura y cierre por reconstrucción de la imagen
4	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Mínimos extendidos de la imagen
5	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Mínimos extendidos de la h-minima de la imagen
6	Imagen de grises	Dilatación del fondo	Puntos de menor intensidad
7	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Umbralizado de la transformada de la distancia
8	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Máximos regionales de la transformada de la distancia
9	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Mínimos regionales de la apertura y cierre por reconstrucción de la imagen
10	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Mínimos extendidos de la imagen
11	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Mínimos extendidos de la h-minima de la imagen
12	Imagen de grises	Esqueleto SKIZ	Puntos de menor intensidad
13	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Umbralizado de la transformada de la distancia
14	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Máximos regionales de la transformada de la distancia
15	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Mínimos regionales de la apertura y cierre por reconstrucción de la imagen
16	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Mínimos extendidos de la imagen
17	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Mínimos extendidos de la h-minima de la imagen
18	Gradiente de la imagen	Dilatación del fondo	Puntos de menor intensidad
19	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Umbralizado de la transformada de la distancia

Nº	Imagen Base	Marcador Fondo	Marcador Objeto
20	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Máximos regionales de la transformada de la distancia
21	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Mínimos regionales de la apertura y cierre por reconstrucción de la imagen
22	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Mínimos extendidos de la imagen
23	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Mínimos extendidos de la h-minima de la imagen
20	Gradiente de la imagen	Esqueleto SKIZ	Máximos regionales de la transformada de la distancia

Tabla 5.2: Combinaciones probadas para las diferentes técnicas de obtención de los marcadores e imagen de base utilizada.

Se analizaron todas las combinaciones para una muestra concreta y se visualizaron los resultados de la segmentación. La combinación que aparentó ofrecer mejores resultados fue la N°2. En la Figura 5.8 se observa el proceso del *watershed* con marcadores para esta técnica.

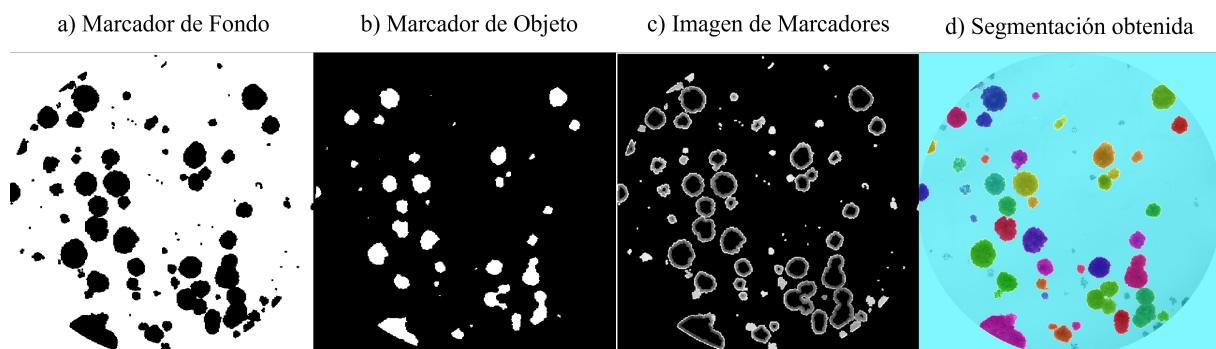


Figura 5.8: a) Marcador de Fondo: las zonas no pertenecientes a colonias están marcadas en blanco. b) Marcador de Objeto: las zonas pertenecientes a colonias están marcadas en blanco. c) Imposición de la imagen: se combinan los marcadores de fondo y de objeto como mínimos en la imagen original de grises. d) Segmentación obtenida utilizando esta imagen de marcadores.

La imagen de marcadores sufre una erosión para poder generar separaciones entre colonias solapadas y obtener un marcador para cada una de ellas. Sin embargo, esto también generaba un problema pues el mismo tamaño de erosión para todas hace que algunas se separen bien, pero otras no se lleguen a separar porque son bastante más grandes, y otras directamente desaparezcan al ser más pequeñas. Para la segmentación de la Figura anterior, se muestran a continuación en la Figura 5.9 unos ejemplos de cada caso.

Este problema sugería que el tamaño del elemento estructurante para la erosión debería ser variable y dependiente del tamaño de cada colonia. Tras probar con varias regiones concretas, adaptando el elemento estructurante de la erosión y observando que los resultados eran mejores, se intentó implementar esto a la imagen en global.

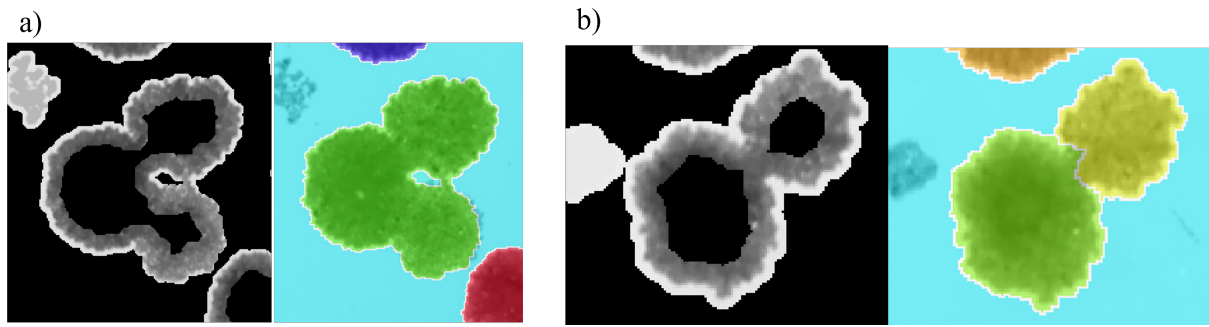


Figura 5.9: a) Colonias que no han podido ser separadas. Además, se observa en la esquina izquierda superior una colonia que ha desaparecido por la erosión. b) Colonias que sí han podido ser separadas.

Para ello, finalmente, el algoritmo final combinará varias técnicas: la obtención de los componentes conectados de la imagen, filtrarlos para solo obtener los que corresponden a colonias solapadas y a estas aplicar *watershed* individualmente con el tamaño del elemento estructurante adaptado. Todo el algoritmo final se explica detalladamente en el apartado siguiente.

5.3 Descripción del algoritmo de detección y conteo de colonias en ensayos clonogénicos

5.3.1 Obtención de regiones de interés (ROI)

Para poder analizar correctamente los pocillos se debe separar entre la zona que corresponde a los mismos y el resto de la imagen que no incluye información relevante. Como se observa en la Figura 5.10, las imágenes de las placas de ensayo se obtuvieron con una inclinación de varios grados, lo cual hizo necesario realizar un paso previo para alinear las placas adecuadamente antes de proceder con la detección de los pocillos.

Detección y alineación de la placa de ensayo

Para abordar la inclinación de las placas, se implementó un algoritmo que incluyó los siguientes pasos:

En primer lugar, se obtuvo una máscara del rectángulo de la placa mediante una umbralización simple. Esta máscara se perfeccionó para limpiar el fondo y las imperfecciones interiores del rectángulo obtenido. Esto se hizo mediante una apertura y un relleno de huecos.

Una vez se tiene la máscara en forma de rectángulo que contiene la placa, se obtuvo las propiedades de este con la función *regionprops*. En concreto, la propiedad empleada fue 'Orientation' que corresponde al ángulo existente entre el eje x y el eje mayor de la elipse que contiene la región. Sabiendo el ángulo de inclinación, se procedió a rotar la máscara y la imagen original con el mismo.

Finalmente, se recortó la imagen original mediante el *BoundingBox* de la máscara. El *BoundingBox*, es el rectángulo más pequeño que contiene la región.

Tras este procedimiento se obtiene la imagen de la placa de ensayo alineada y recortada, tal y como se observa en la Figura 19.

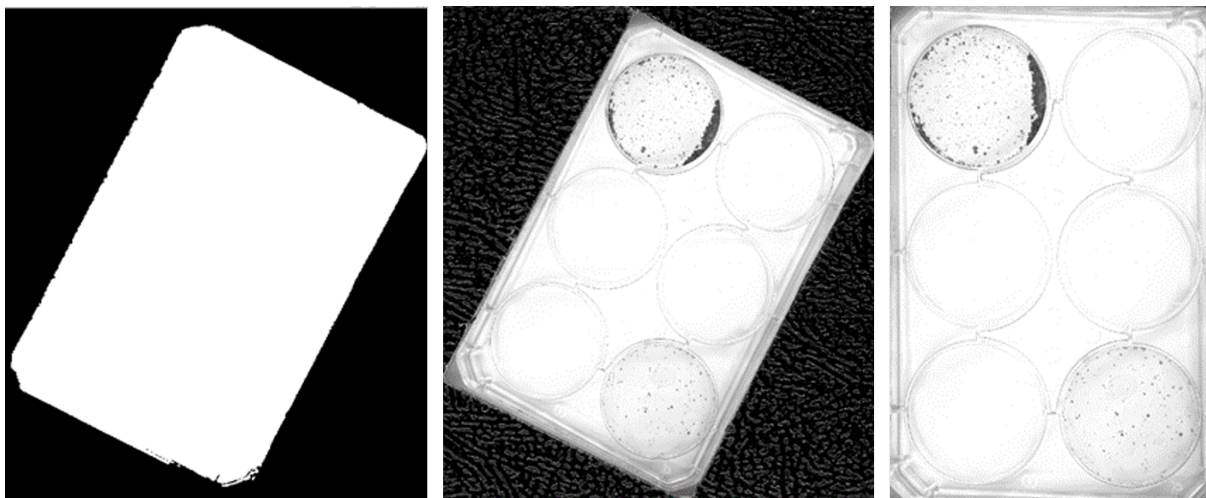


Figura 5.10: Ejemplo de detección y alineación de la placa de ensayo. A la izquierda la imagen original. En el centro la máscara obtenida tras eliminar su perfeccionamiento. A la derecha el recorte y alineado final de la placa de ensayo.

Detección del pocillo y obtención de la región de interés

Para la detección de los pocillos, se dividió la imagen en tantas columnas y filas como la distribución de pocillos en la placa, en este caso, dos columnas y tres filas. De esta forma, se obtiene un recorte de cada pocillo.

Para detectar solo la región dentro de la circunferencia (donde están sembradas las células) se utilizó la función *imfindcircles* de MATLAB. Esta función detecta círculos en una imagen y para su funcionamiento, necesita una serie de parámetros que se deben ajustar para maximizar su precisión, estos son:

- Intervalo de radios ([750 850]): Se proporciona un rango de radios aproximados para las circunferencias a detectar. Este intervalo se obtuvo mediante un análisis previo de las dimensiones de los pocillos en la placa de ensayo y fue de 750 a 950 píxeles.
- Polaridad del objeto ('ObjectPolarity', 'dark'): Se especifica que los pocillos son más oscuros que el fondo de la imagen. Esto ayuda a la función a distinguir entre los pocillos y el resto de la imagen.
- Sensibilidad ('Sensitivity', 1): Se establece una sensibilidad alta para asegurarse de detectar los pocillos correctamente. La sensibilidad controla el umbral de detección de los bordes, con un valor de 1 que indica máxima sensibilidad.

La función *imfindcircles* utiliza la transformada de Hough. La idea básica es transformar el problema de la detección de una forma en un espacio de parámetros, donde la búsqueda de la forma se simplifica. Para un círculo, los parámetros son el centro del círculo (a, b) y el radio r . Cada punto de la imagen (x, y) vota por todos los posibles centros de los círculos que podrían pasar por ese punto. Estos votos se registran en un espacio de acumulación. Los picos en el espacio de acumulación indican los círculos más probables con ciertos centros y radios.

Con esta técnica, se obtiene el centro y el radio del pocillo. Sin embargo, existen ciertas imperfecciones en los bordes de este, donde tienden a acumularse células, por este motivo, la zona de interés (ROI) se definirá con un radio más pequeño. Específicamente, el ROI será el radio detectado menos un cierto valor ajustable. Esta reducción del radio garantiza que solo se analice la región central del pocillo, evitando las inconsistencias en los bordes.

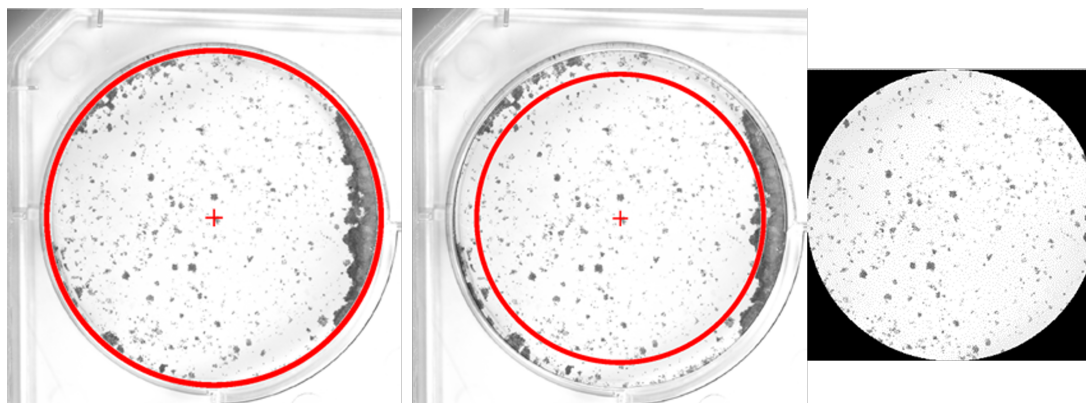


Figura 5.11: Ejemplo de detección del pocillo y obtención de la región de interés. A la izquierda detección del pocillo con la transformada de Hough. En el centro, reducción de 2,5mm de radio para eliminar los bordes. A la derecha, ROI obtenida.

5.3.2 Preprocesamiento

El preprocesamiento de las imágenes es una etapa crucial para mejorar su calidad y facilitar el análisis posterior. En este apartado, se describe el ajuste de contraste y la umbralización aplicadas a las ROIs.

El primer paso desarrollado se trata del ajuste de contraste, con la finalidad de maximizar la diferencia entre blancos y negros, es decir, entre fondo y colonias respectivamente. Se ha utilizado una técnica llamada ecualización adaptativa del histograma (descrita en el Apartado 3.2.2) que ajusta el contraste de la imagen de manera local en diferentes regiones. Para ello se ha hecho uso de la función *adaphisteq* de MATLAB con un tamaño de ventana de 10x10.

Tras el ajuste de contraste, el siguiente paso es la umbralización, convertir la imagen en una imagen binaria. En este caso, se utilizó la umbralización adaptativa mediante la obtención de los umbrales locales por la iluminación de fondo del pocillo (descrita en el Apartado 3.2.2). El principal problema de calcular la iluminación de fondo, como se ha comentado en el apartado anterior, es que, debido a la eliminación de restos de la placa no pertenecientes a la ROI en la sección anterior, estos huecos externos en las esquinas de la imagen se representan como valores 0, que corresponden a color negro (Figura 5.11.c). Por tanto, al calcular el promedio en la iluminación de fondo, esto influía en los bordes de la ROI, provocando una mala umbralización posterior. Para solucionar esto, se añadió un paso intermedio. El procedimiento seguido se describe a continuación:

1. Obtención de la imagen de iluminación de fondo.
2. Cálculo de la media de la iluminación de fondo de la imagen.

3. Reemplazo de los 0s exteriores de la imagen original (imagen tras el contraste) con la media de la iluminación de fondo. De esta forma se suaviza el borde de la ROI con la zona exterior.
4. Cálculo nuevamente de la media de la iluminación de fondo de la imagen modificada. Con esto se obtiene la imagen de umbrales locales.
5. Umbralización adaptativa con los umbrales mencionados.

Tras esto se consigue la umbralización de la ROI. Que se perfecciona haciendo un complemento de la imagen para obtener las colonias en blanco y un relleno de huecos para eliminar pequeñas regiones de píxeles negros contenidos en las mismas.

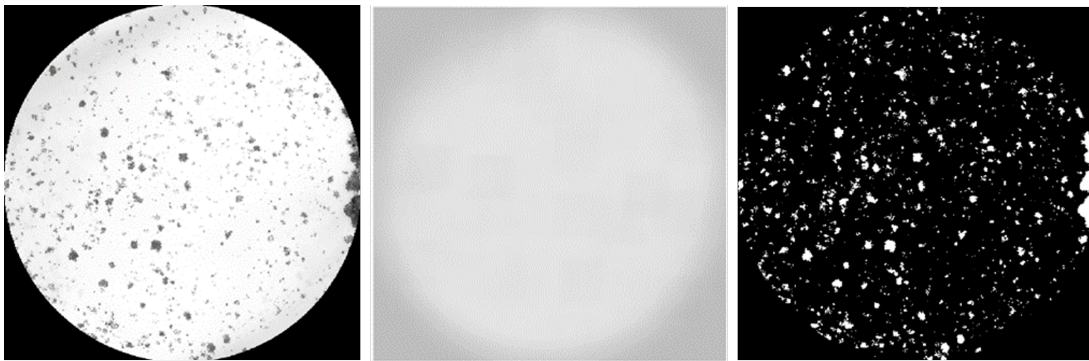


Figura 5.12: Ejemplo de aumento de contraste a la izquierda, umbralización final en el centro e iluminación de fondo empleada a la derecha.

5.3.3 *Detección de pocillos vacíos o saturados*

Para favorecer la automatización del proceso se implementó algoritmos para intentar discernir entre pocillos vacíos o saturados de los normales.

- Pocillos vacíos: se consideraron vacíos los pocillos que no fueron utilizados para el ensayo, es decir, en los que se habían sembrado células.
- Pocillos saturados: se consideró que un pocillo está saturado cuando existe una sobre pigmentación en el pocillo o una acumulación anormal que no permite distinguir las colonias.

Para evaluar la fiabilidad del algoritmo de detección de estos casos, se dividieron las imágenes en dos grupos: uno de entrenamiento y otro de prueba (Tabla 5.3). Este enfoque permite ajustar un umbral utilizando el conjunto de entrenamiento y evaluar su rendimiento en un conjunto independiente de imágenes no vistas previamente, lo que proporciona una medida de su fiabilidad.

	Imágenes entrenamiento	Imágenes prueba
Definición	Imágenes que se utilizaron para calcular diferentes parámetros y obtener el umbral que diferencie entre grupos	Imágenes que se utilizaron para validar la fiabilidad de la clasificación según los umbrales obtenidos. Estas imágenes fueron seleccionadas a mano con la intención de que representen la totalidad de los casos posibles.
Nº imágenes	118	10

Tabla 5.3: División de las imágenes utilizada.

Para encontrar este umbral, las características calculadas sobre las imágenes fueron:

- Valor más probable de la iluminación de fondo: se calculó la iluminación de fondo de las ROIs y se obtuvo el valor más probable como el bin del histograma con la mayor frecuencia.
- Porcentaje de píxeles oscuros respecto a claros: se estableció un umbral de 150 para definir píxeles oscuros y se calculó el porcentaje de píxeles en la región de interés que tienen un valor de intensidad menor que el umbral.
- Métricas de similitud: se comparó con un pocillo de referencia vacío y se calcularon dos métricas.
 - Error cuadrático medio (MSE): mide la diferencia promedio al cuadrado entre los valores de intensidad de los píxeles correspondientes en las dos imágenes.
 - Índice de Similitud Estructural (SSIM): mide la similitud percibida entre las dos imágenes, considerando cambios en la luminancia, contraste y estructura.

Se calculó todas estas características para las imágenes de entrenamiento y, en base a aquellas que mejor separaban entre grupos, se diseñó un umbral diferente para discernir entre vacíos-utilizados y normales-saturados. Posteriormente, se evaluó con estos umbrales las imágenes de prueba y se obtuvieron métricas de clasificación para medir la fiabilidad de los mismos.

5.3.4 Segmentación y conteo de colonias

Las regiones iniciales se identificaron mediante componentes conectados utilizando la función *bwconncomp* de MATLAB. Como se ha comentado, el análisis de componentes conectados se trata de encontrar conjuntos de píxeles adyacentes (blancos) en una máscara binaria, separados de otros por zonas negras. A cada componente se le asigna un identificador y se obtienen las coordenadas de los píxeles que lo forman. Esta función permitió etiquetar las regiones conectadas en la imagen binarizada. En la Figura 5.13.a) se observa la etiquetación y superposición de los componentes conectados para una muestra.

Tras identificar las regiones, se utilizó la función *regionprops* para obtener una serie de características de cada una. Se trata de una función muy completa que incluye propiedades como el área, longitud de los ejes menor y mayor, orientación, número de Euler, circularidad, solidez, etc.

Con estas propiedades, se filtró y eliminó las regiones muy pequeñas, ya que se considera que no corresponden con colonias y simplemente se tratan de células o agrupaciones de células muertas.

Esto se hizo definiendo un área mínima para las colonias, eliminando las regiones menores a la misma. El área mínima viene definida por el tamaño de célula y el número de células que se consideren por colonia. En la Tabla 5.4, se resumen los valores empleados para cada caso.

De todas las regiones obtenidas, se filtraron y seleccionaron aquellas cuyas propiedades de solidez y excentricidad eran inusuales. La solidez es la relación entre el área del componente y el área de su envolvente convexa, es decir, el rectángulo que la contiene. Por otro lado, la excentricidad es una medida de cuánto de alargada es esta región. Se trata de la división entre la distancia focal y la longitud del eje mayor de la elipse que envuelve la región. Las colonias muy irregulares tendrán una solidez baja y una excentricidad alta.

De esta forma, se separaron las regiones iniciales en dos grupos:

- Regiones cuasi-perfectas: Regiones con formas circulares y poco excéntricas, consideradas como colonias individuales bien formadas (Figura 5.13.b).
- Regiones irregulares: Regiones con formas irregulares que requerían un análisis más detallado. Estas regiones probablemente correspondían a colonias superpuestas o mal definidas (Figura 5.13.c).

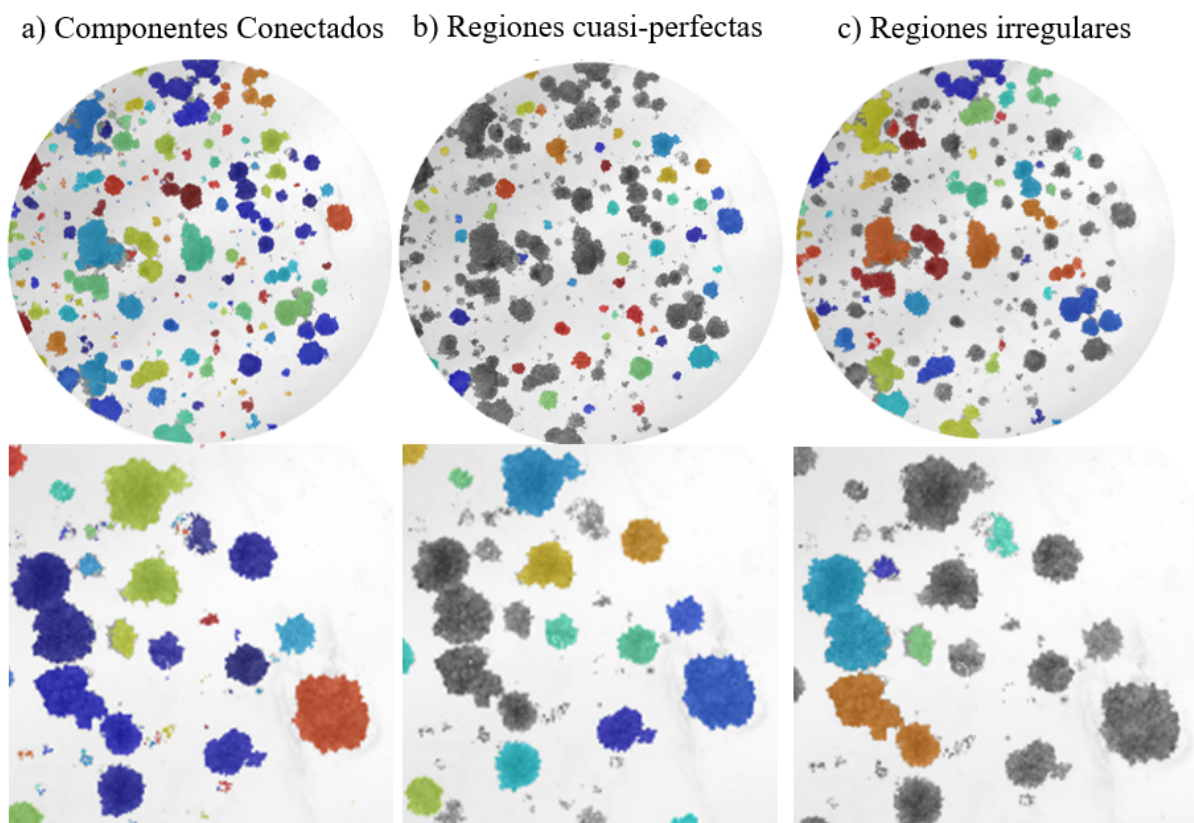


Figura 5.13: Ejemplo de imagen analizada. a) Regiones iniciales correspondientes a los componentes conectados de la umbralización. b) Regiones cuasi-perfectas. c) Regiones irregulares a analizar.

Para analizar el segundo grupo de regiones y conseguir discernir entre las diferentes colonias que forman una región, se utilizó la técnica de *watershed* con marcadores. El procedimiento seguido para cada región fue:

1. Región actual: se obtiene una de las regiones irregulares como el fragmento de imagen que contiene a esa región. Concretamente se extrae:
 - I. *ImgRegion*: fragmento de imagen de grises que contiene la región
 - II. *ImgRegionContraste*: fragmento de imagen preprocesada con aumento de contraste que contiene la región.
 - III. *BWRegion*: fragmento de imagen umbralizada que contiene la región.
2. Marcador de Objeto (colonias): se obtiene la imagen binaria cuyo objetivo es marcar en blanco los centros o lugares contenidos en las colonias. Una marca o semilla por colonia.
 - I. Transformada de la distancia de *BWRegion*: La transformada de la distancia mide la distancia de cada píxel al píxel más cercano que pertenece al fondo (píxel negro). Mide la distancia de cada píxel al píxel más cercano del fondo.
 - II. Máximos regionales de la transformada de la distancia: se identifican los máximos locales de la transformada de la distancia, que corresponden a los puntos donde el valor de la transformada de la distancia es mayor que en cualquier vecindario adyacente, indicando los puntos más alejados de los bordes de las colonias, que idealmente serán los centros de las colonias.
 - III. Erosión con tamaño del elemento estructurante adaptada al tamaño del fragmento de la imagen que contiene la región: en concreto el elemento estructurante queda definido con un radio del 5 % del tamaño del fragmento de la imagen.
 - IV. Erosión con elemento estructurante línea: se obtiene la orientación de la región y se genera un elemento estructurante en forma de línea de 2 % del largo del tamaño del fragmento de la imagen y orientación perpendicular a la de la región. De esta forma se intenta partir regiones alargadas.
3. Marcador de Fondo: se obtiene una imagen binaria que en blanco señala los lugares con alta probabilidad de ser fondo.
 - I. Dilatación de *BWRegion*: se ensanchan las regiones
 - II. Complemento del resultado: se obtiene en blanco el fondo.
4. Imagen de marcadores: se combinan las imágenes Marcador de Objeto y Marcador de Fondo.
5. Imposición de mínimos: se modificada *ImgRegion* imponiendo como mínimos la Imagen de Marcadores. El resultado de esto se llama función de segmentación y permitió que el algoritmo de *watershed* segmentara las regiones basándose en estos marcadores.
6. *Watershed*: se aplicó el algoritmo de *watershed* sobre la función de segmentación para separar las colonias de interés.

Las regiones segmentadas se combinaron en una imagen final. Las regiones cuasi-perfectas se añadieron a la imagen final sin necesidad de un análisis adicional. Se creó una imagen etiquetada que incluía todas las regiones segmentadas.

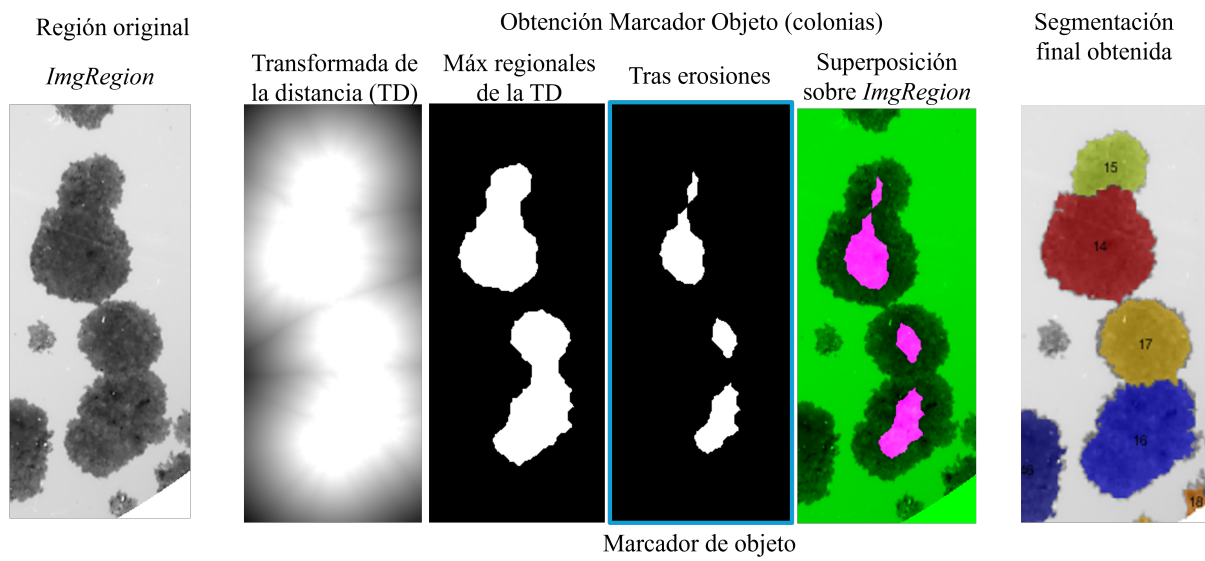


Figura 5.14: Ejemplo de obtención de la imagen Marcador de Objeto para una región particular.

A continuación, se hizo una nueva depuración o filtrado, para eliminar posibles regiones pequeñas obtenidas erróneamente mediante *watershed*. En este caso se aseguró que todas las regiones tuvieran el área mínima predefinida y una longitud de eje menor adecuada, para eliminar posibles pelos o líneas marcadas como regiones.

Finalmente, se obtuvo nuevamente las propiedades de todas las colonias finales con la función *regionprops*.

Los parámetros utilizados en toda esta etapa se resumen en la Tabla 5.4.

ROI	px	Mm²
Área seleccionada	1322439	592.5
Información de las colonias		Valor
Radio célula		10 micras
Número mínima de células por colonia		50
Filtros de depuración de colonias	Valor mínimo	Valor máximo
Área mínima colonia	220 px	Inf
Solidez	0.6	1
Excentricidad	0	0.97
Filtros para obtener las regiones irregulares	Valor mínimo	Valor máximo
Circularidad	0	0.5
Excentricidad	0.8	1
Área	600 px	Inf
Erosiones previas al watershed	Tipo	Tamaño
Elemento estructurante erosión general	'disk'	5 % Tamaño de ImgRegion
Elemento estructurante erosión por orientaciones	'line'	2 % Tamaño de ImgRegion

Tabla 5.4: Resumen de parámetros principales del algoritmo.

5.4 Diseño y desarrollo de la interfaz

Una interfaz de usuario (UI) es el medio a través del cual los usuarios interactúan con un sistema informático. En el contexto de este trabajo final de máster, la UI es crucial para facilitar la interacción con el software desarrollado para la segmentación y conteo de colonias celulares, además de mejorar la visualización de resultados. De esta forma, se permite que el usuario sin conocimientos de programación o del código pueda igualmente manejar el análisis a su gusto. El diseño y desarrollo de la UI se realizó utilizando MATLAB App Designer, una herramienta de desarrollo que permite crear aplicaciones con una interfaz gráfica intuitiva.

MATLAB App Designer proporciona un entorno para construir aplicaciones con componentes interactivos como botones, menús desplegables, ventanas, gráficos y tablas, entre otros. Cada componente tiene una serie de funciones llamadas *callbacks* que se programan para realizar tareas específicas ante acciones específicas.

5.4.1 Diseño

El programa desarrollado en este TFM se ha estructurado en dos aplicaciones (apps) principales que interactúan entre sí: App de Inicio y App de Resultados.

Aplicación de Inicio

Esta aplicación permitirá al usuario importar imágenes y configurar los parámetros necesarios para el análisis. La app incluirá las siguientes funcionalidades:

- Importación de Imágenes: se permitirá al usuario elegir una carpeta de archivos de la que se extraerán las imágenes para el análisis.
- Configuración de los parámetros: en diferentes paneles laterales, se encontrarán los diferentes parámetros configurables para realizar el análisis.
- Ejecución del Análisis: tras importar las imágenes y configurar los parámetros se iniciará el proceso de análisis y conteo de las colonias. El análisis se realizará con el algoritmo desarrollado en el apartado anterior.

En cuanto a la importación, se hará a través de un botón en un panel lateral. Este botón abrirá el explorador de archivos permitiendo elegir una carpeta del equipo, en la cual se encuentran las imágenes que se quieren analizar. Además, se incluye un panel de información inicial, donde se puede visualizar la ruta de la carpeta seleccionada, el nombre, el número de imágenes que se van a analizar y las extensiones de archivo de las mismas (Figura 5.15).

Información	
Ruta:	C:\Users\lahbli\Desktop\TFM\Datos\Octubre2023
Nombre de la carpeta:	Datos\Octubre2023
Nº de imágenes:	131
Extensiones:	.jpg, .tif

Figura 5.15: Parte de la interfaz correspondiente a la importación de archivos y visualización de la información general.

Por otro lado, existen tres paneles principales de parámetros configurables. En primer lugar, el panel de elección de pocillos (Figura 5.16). En este se podrá configurar la detección de los pocillos a analizar. En el modo manual se podrá elegir manualmente los pocillos que se han utilizado y, por tanto, evitar coste computacional extra descartando desde el inicio los pocillos no utilizados o vacíos. Además, se podrá elegir cuál de los pocillos ha sido irradiado. En contrapartida, en el modo automático se analizarán todos y cada una de las muestras contenidas en las placas de ensayo y, mediante el algoritmo de detección de vacíos desarrollado y explicado en el Apartado 5.3.3, se determinará cuáles son los vacíos y se descartarán en el resumen de resultados finales. Cabe destacar, que serán analizados igualmente y en la app posterior de Resultados podrán ser visualizados e incluidos en los resultados si el usuario así lo desea.

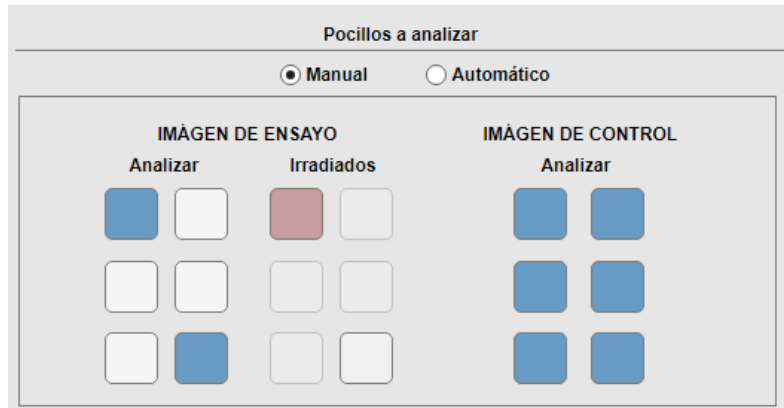


Figura 5.16: Representación del panel Pocillos a analizar.

En segundo y tercer lugar, se encontrarán los paneles de Parámetros principales y Parámetros secundarios. En el primero se encontrará las características configurables más comunes y generales, como el área del pocillo que se quiere analizar, u otros como la información acerca del tamaño de células y colonias. Además, se podrá ver una previsualización del área de ROI seleccionada. Por otro lado, los parámetros secundarios son relativos a las diferentes etapas del análisis y recogerán desde umbrales de binarización hasta tamaño de ventanas de análisis o las opciones de filtrado. En general no se recomienda modificar los secundarios, pues han sido estudiados para obtener la combinación óptima para los mejores resultados.

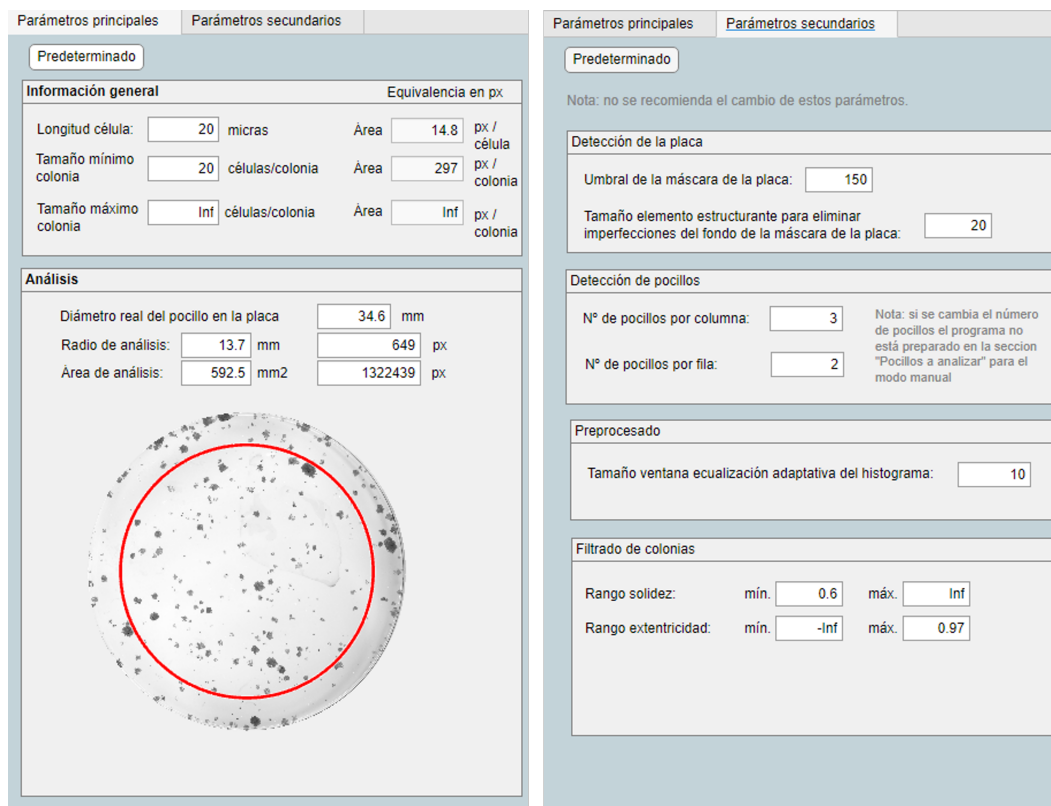


Figura 5.17: Panel Parámetros Principales y Panel Parámetros Secundarios de la UI diseñada.

Finalmente, mediante un botón se inicia el análisis de las imágenes importadas, que abrirá una barra de carga donde se visualizará el progreso y, tras su finalización, se habilitará el botón de abrir los resultados. Este botón conecta con la App de Resultados, que se presenta a continuación.

Aplicación de Resultados

Una vez que el análisis en la primera aplicación se ha completado, se abre la App de Resultados. Esta permite al usuario:

- Visualizar el resumen de Resultados del Análisis: visualización general de los resultados, así como de las gráficas supervivencia.
- Visualizar individualmente cada muestra: lista de detalles de cada muestra individualmente, así como de cada fase de su proceso de análisis.
- Recalcular los resultados: modificando la detección de pocillos individuales de forma manual.
- Exportar Datos: descargar un fichero con los resultados seleccionados.

Toda esta información se organizará en tres ventanas principales: Resumen, Lista Detallada y Pocillo.

La ventana Resumen contendrá información general del análisis, como el número de pocillos de cada tipo que se han analizado, el tiempo de procesamiento total o los parámetros principales introducidos. Además, esta ventana contendrá dos gráficos de supervivencia, uno para las muestras con nanopartículas y otro para las muestras sin nanopartículas. Así de forma global se pueden ver los resultados para toda la tanda de imágenes seleccionadas.

Por otro lado, la ventana Lista Detallada es la que se observa en la Figura 5.18. En este se tendrá una tabla de todos los pocillos analizados con sus características principales, entre ellas el número de colonias contabilizadas. También se incluirá a la derecha las imágenes del pocillo seleccionado, para ver de forma visual de que muestra se trata.

Finalmente, la ventana Pocillos (Figura 5.19) contendrá toda la información individual de cada pocillo, desde la etapa de preprocesamiento hasta al conteo, centrándose sobre todo en esta última. Se podrá ver todas las propiedades de las colonias en una tabla adyacente a la imagen de segmentación final. Además, se podrá retocar la segmentación añadiendo o quitando regiones si es necesario.

Resumen Lista detallada Pocillo

Lista detallada de los pocillos

ID	Nº Colonias	Gy	NP	Vacio	Saturado	Utilizar	Área media	Área total	% Área	Nombre de la im
1_A_2G_P1	11	2	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	414.8182	4563	0.3448	1_A_2G043.tif
1_A_2G_P6	32	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	596.2188	19079	1.4419	1_A_2G043.tif
1_A_5GNP_P1	55	5	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.1855e+03	65203	4.9278	1_A_5GNP028.tif
1_A_5GNP_P6	24	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	542.9583	13031	0.9848	1_A_5GNP028.tif
1_B_5G_P1	70	5	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	739.0714	51735	3.9098	1_B_5G040.tif
1_B_5G_P6	8	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	381.3750	3051	0.2306	1_B_5G040.tif
1_C_3G_P1	116	3	0	0	1	<input type="checkbox"/>	1.9963e+03	231572	17.5006	1_C_3G032.tif
1_C_3G_P6	14	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	674.2143	9439	0.7133	1_C_3G032.tif
1_C_6G_P1	71	6	0	0	1	<input type="checkbox"/>	2.1714e+03	154166	11.6514	1_C_6G035.tif
1_C_6G_P6	20	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	454.9500	9099	0.6877	1_C_6G035.tif
2_B_4G_P1	0	4	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	NaN	0	0	2_B_4G135.tif
2_B_4G_P6	8	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	662.5000	5300	0.4006	2_B_4G135.tif
2_C_3G_P1	128	3	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2.5055e+03	320703	24.2377	2_C_3G128.tif
2_C_3G_P6	63	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.9365e+03	121998	9.2202	2_C_3G128.tif
3_C_2G_P1	160	2	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	987.6125	158018	11.9425	3_C_2G055.tif
3_C_2G_P6	103	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.1689e+03	120394	9.0990	3_C_2G055.tif
4_B_2GNP_P1	5	2	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	547	2735	0.2067	4_B_2GNP087.tif
4_B_2GNP_P6	4	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	471	1884	0.1424	4_B_2GNP087.tif
CONTROL2_...	51	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2.5544e+03	130275	9.8458	CONTROL2_500N
CONTROL2_...	79	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3.2637e+03	257833	19.4854	CONTROL2_500N
CONTROL2_...	56	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	4.9129e+03	275120	20.7927	CONTROL2_500N
CONTROL2_...	49	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	5.9287e+03	290505	21.9541	CONTROL2_500N
CONTROL2_...	89	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3.6653e+03	326215	24.6529	CONTROL2_500N
CONTROL2_...	75	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	5.5452e+03	415893	31.4319	CONTROL2_500N

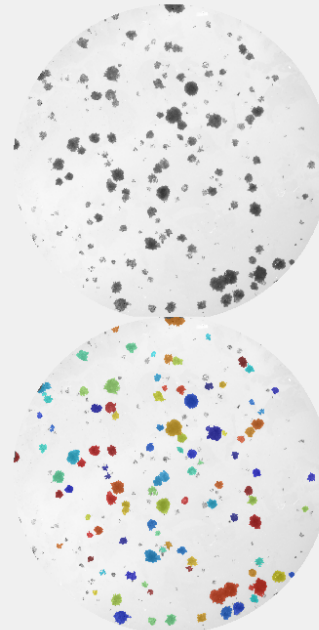


Figura 5.18: Ventana Lista Detallada de la app Resultados.

Resumen Lista detallada Pocillo

Pocillo

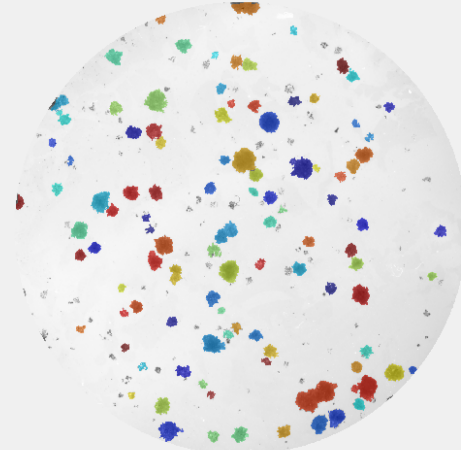
3_C_2G_P6

Información general

ID	Imagen	Gy	NP	Vacio	Saturado	Utilizar	Nº colonias
3_C_2G_P6	3_C_2G055.tif		0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	103

Conteo de ...
Análisis de ...
Preprocesado

Colonias encontradas



Nº	Area	Circularidad	Excentricidad	Solidez
57	2235	0.6545	0.3665	0.8859
58	1653	0.5642	0.5210	0.8769
59	489	0.5578	0.7143	0.8640
60	739	0.7723	0.5375	0.9237
61	1385	0.6760	0.4590	0.8964
62	462	0.6077	0.5644	0.8446
63	2524	0.6142	0.6845	0.8785
64	899	0.7020	0.5213	0.9202
65	1293	0.6008	0.5202	0.8713
66	810	0.7281	0.4761	0.8843
67	350	0.5302	0.6525	0.8578
68	1427	0.5262	0.6802	0.8292
69	677	0.7090	0.6287	0.8955
70	351	0.7946	0.5522	0.9335
71	610	0.7838	0.5428	0.9104
72	2731	0.6859	0.4734	0.9286
73	398	0.6124	0.5539	0.8671
74	1501	0.5425	0.5181	0.8514
75	935	0.5428	0.3114	0.8618
76	945	0.6457	0.6306	0.8686
77	507	0.7766	0.7924	0.9354
78	663	0.6408	0.6658	0.8828
79	2699	0.7593	0.3372	0.9359

Visualizar Visualizar el índice de colonia Volver a la imagen de segmentación global Volver

Descargar informe

Figura 5.19: Ventana Pocillos de la app Resultados.

Finalmente, se podrá descargar los informes de resultados mediante un botón.

5.4.2 Desarrollo

Desarrollar la interfaz se basa en programar las múltiples funciones y callbacks de los componentes de la misma y conectar toda la información entre ellos y la app.

Funciones y callbacks principales

En cualquier app se encuentra la Startup Function (*startupFcn*) y la Delete Function (*delete*). La primera se ejecuta automáticamente cuando se inicia la aplicación. Con ella se inicializa las variables necesarias, se configura el estado de la interfaz y se prepara cualquier dato inicial requerido. En cuanto a la Delete Function esta se llama cuando la aplicación se cierra, sirve para realizar tareas de limpieza y liberar recursos.

A continuación, se describen otras de las funciones más importantes de cada app. En primer lugar, en la App de Inicio:

- *obtenerParametros(app)*: recoge los valores de todos los parámetros de los diferentes paneles en el instante que es llamada y los organiza en una estructura de datos para que luego sean accesibles.
- *mmToPx(app, value, imgResolution)* y *pxToMm(app, value, imgResolution)*: funciones convertoras de milímetros a píxeles y viceversa. Serán necesarias para calcular distancias en las imágenes. Necesitan el valor de entrada que se quiere transformar y la resolución de la imagen.
- *ImportarButtonPushed(app, event)*: *callback* que se ejecuta al presionar el botón Importar. Se elige una carpeta del equipo que se procesa para leer todos los archivos de su interior y filtrarlos por imágenes. Además, se obtiene la información principal de las mismas y se guarda en una estructura de datos.
- *CargarButtonPushed(app, event)*: *callback* que se ejecuta al presionar el botón de cargar. Es una de las funciones más importantes, pues es la que ejecuta el algoritmo de análisis de las imágenes y, durante el mismo, va guardando todos los datos en unas estructuras de datos organizadas, para que luego sean fácilmente accesibles.
- *AbrirResultadosButtonPushed(app)*: *callback* que se llama una vez realizado el análisis desde el botón Abrir Resultados. Su función es llamar a la app Resultados.

Por otro lado, en la app Resultados se encuentran estas funciones clave:

- *tablaResultados(, InfoImagenes, Resultados)*: convierte todas las estructuras de datos generadas en la primera app en una tabla que es más fácilmente manejable y accesible. En cada fila se encontrará la información de un pocillo diferente.
- *actualizarTabListaDetallada(app, row)* y *actualizarTabPocillo(app, row)*: cuando se elija visualizar o analizar un pocillo diferente se llama a estas dos funciones que actualizan toda la información de las tablas e imágenes de las ventanas Lista Detallada y Pocillo.
- *TablaPocillosDoubleClicked(app, event)*: *callback* que se llama cuando se produce un doble click en un elemento de la tabla de la ventana Lista Detallada. Principalmente, recoge la información de esa fila y actualiza la figura adyacente para visualizar el pocillo actual.

Organización de la información y conexión de las aplicaciones

Como se ha comentado, la información se organiza en estructuras de datos en la primera app y en la segunda se convierten a una gran tabla o base de datos.

La App de Inicio recoge la información y tras el análisis llama a la App de Resultados adjuntándole unos argumentos de entrada. Estos argumentos de entrada son:

- *Resultados*: estructura con todos los resultados de cada fase del análisis de cada imagen y pocillo. En la Figura 5.20 se representa la organización de esta estructura compleja.
- *Params*: estructura con los datos de parámetros utilizados para el análisis.
- *ImgsInfo*: estructura con la información de las imágenes utilizadas para el análisis.

Con esta metodología se asegura una comunicación eficaz entre ambas aplicaciones, facilitando el análisis y la visualización de los resultados de manera intuitiva y eficiente.

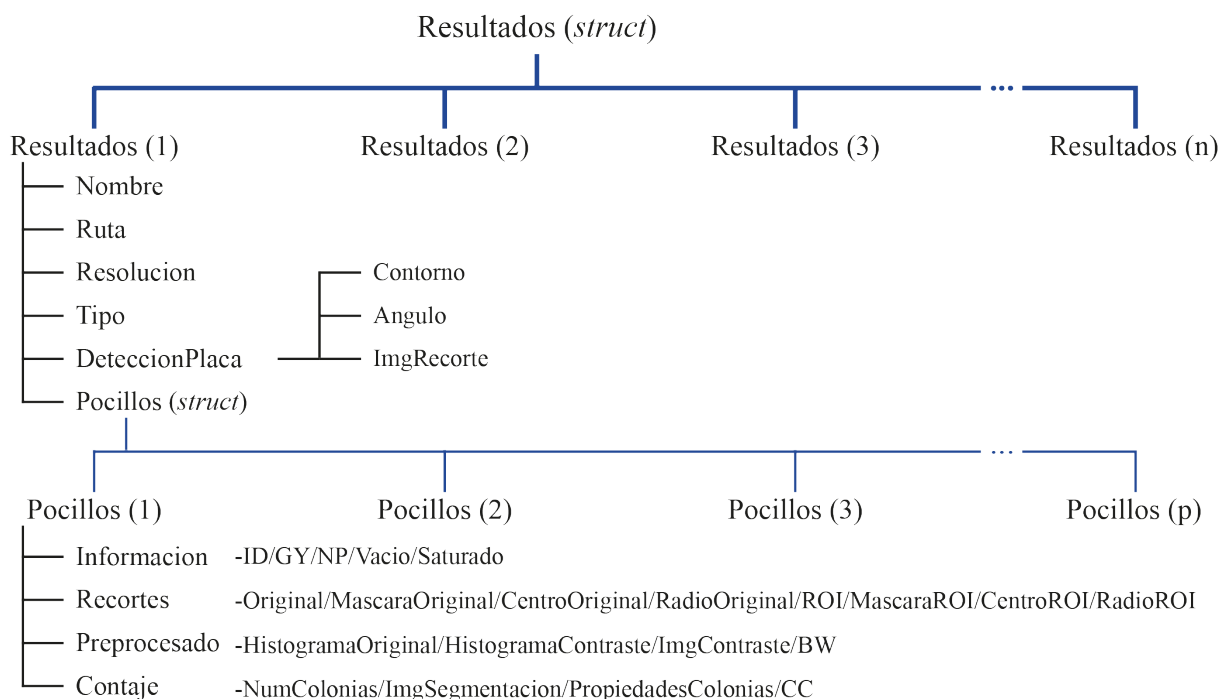


Figura 5.20: Esquema representativo de la estructura Resultados.

Resultados

6.1 Resultados del preprocesamiento

6.1.1 Mejora del contraste

Para mejorar el contraste de las imágenes se utilizó la ecualización del histograma adaptativo. A continuación, se presentan los resultados obtenidos. En la Figura 6.1 se muestra un ejemplo

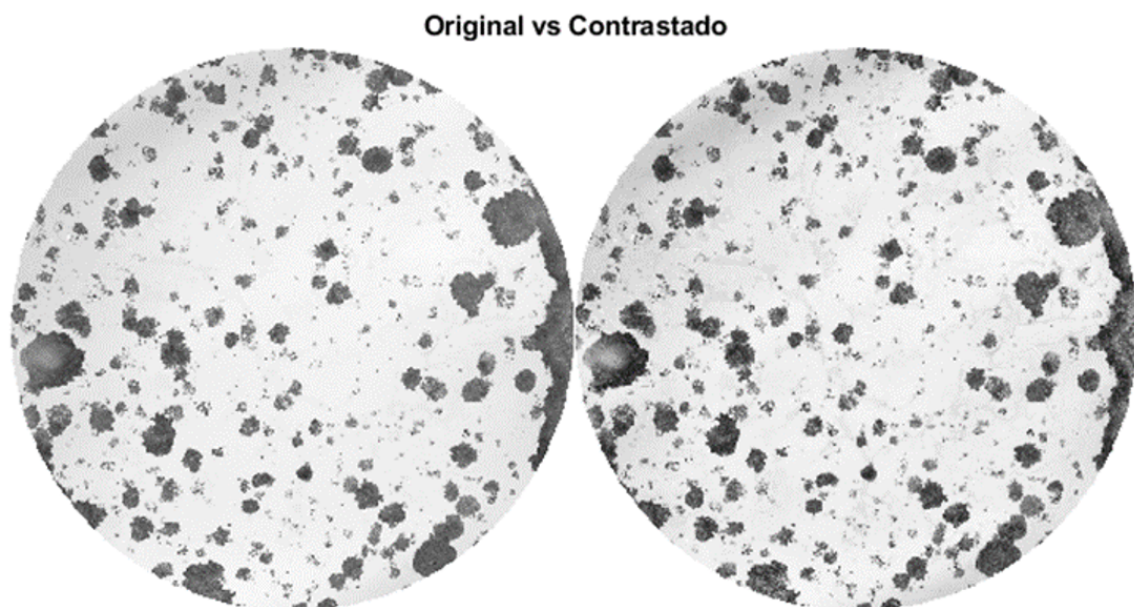


Figura 6.1: Ejemplo de pocillo original a la izquierda y tras el aumento de contraste por ecualización adaptativa del histograma a la derecha.

de una muestra antes y después del aumento de contraste. La diferencia entre blancos y negros

(fondo y colonias) se incrementa levemente permitiendo aumentar el detalle. La imagen a la derecha muestra un contraste mejorado, permitiendo que las colonias sean más distinguibles.

Visualizando los histogramas de la misma imagen (Figura 6.2) se observa que se consigue aumentar el rango de valores oscuros (colonias), es decir, estirar o suavizar la curva en ese tramo. Esto es la causa del aumento de contraste en los mismos.

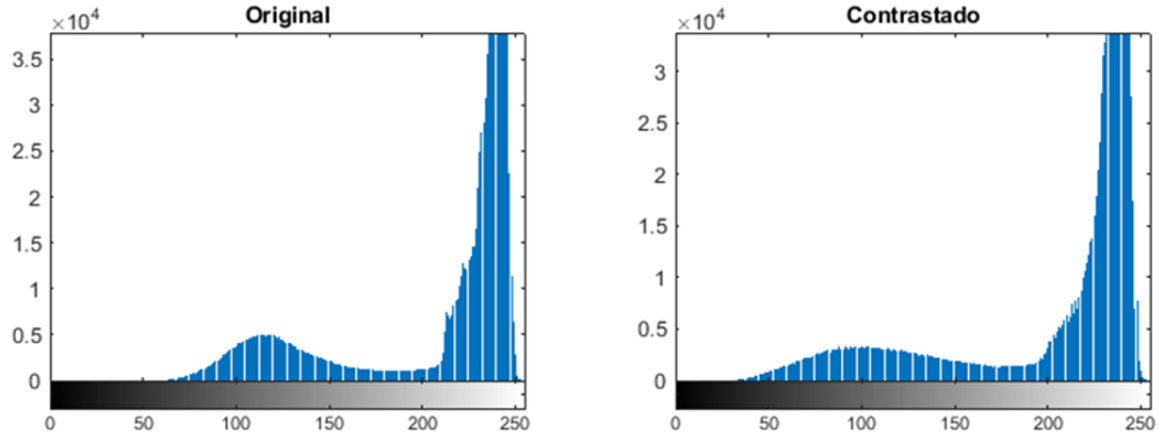


Figura 6.2: Comparativa entre los histogramas antes y después del aumento del contraste, respectivamente.

Para cuantificar los resultados, se calcularon el contraste de Michelson y el índice de mejora del contraste (CII). El contraste de Michelson (Ecuación 6.1) compara la diferencia entre intensidades máximas y mínimas y es un valor que oscila entre 0 (sin contraste) y 1 (máximo contraste).

$$\text{Contraste de Michelson} = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (6.1)$$

Siendo I_{\max} : intensidad máxima de la imagen e I_{\min} : intensidad mínima.

Por otro lado, el CII (Ecuación 6.2) mide cuánto ha mejorado el contraste de una imagen después de aplicar una técnica de preprocesado. Se define como el cociente entre el contraste después del preprocesado y el contraste antes del preprocesado.

$$\text{CII} = \frac{\text{Contraste después}}{\text{Contraste antes}} \quad (6.2)$$

Se calcularon estas métricas para un conjunto de muestras, obteniendo el contraste de Michelson antes y después de la ecualización adaptativa del histograma y el índice de mejora de contraste entre ambos. Los resultados se plasman en la Tabla 6.1.

Como se puede observar, el índice de contraste muestra un aumento ligero en las muestras. Esta decisión se tomó debido a que se observó que un aumento excesivo del contraste afectaba negativamente a la muestra, provocando la aparición de zonas oscuras en el fondo y artefactos no deseados. Por lo tanto, se optó por una mejora moderada del contraste para equilibrar la visibilidad de las colonias sin introducir elementos indeseados que pudieran interferir con el análisis. En definitiva, la mejora del contraste mediante la ecualización del histograma adaptativo resultó en una distribución más homogénea de los valores de intensidad, facilitando una mejor visualización de las características de interés en las imágenes.

Imagen	Contraste Michelson	Contraste Michelson	CII
CONTROL2_500NP_P1	0.814	0.939	1.152
3_B_2GNP_P1	0.619	0.672	1.085
1_B6GNP_P1	0.789	0.847	1.073
2_B_6G_P1	0.717	0.764	1.066
2_C_6GNP_P1	0.821	0.868	1.056
2_A_3GNP_P1	0.517	0.545	1.053
2_B_2G_P1	0.569	0.598	1.051
1_C_1GNP_P1	0.588	0.619	1.051
2_B_2GNP_P1	0.645	0.677	1.050
2_B_GP_P1	0.650	0.683	1.050

Tabla 6.1: Métricas de contraste y comparativa pre y post-procesado.

6.1.2 Umbralización

Como se comentó, se ha utilizado la umbralización adaptativa basada en la iluminación de fondo del pocillo, con un paso intermedio para mejorar la calidad en los bordes de los umbrales locales.

En la Figura 6.3 se observa claramente una mejora significativa en la umbralización de los bordes al aplicar el paso intermedio de sustitución de valores de borde. Esta técnica no solo mantiene intactas las estructuras importantes, sino que también cumple con el objetivo principal de limpiar el fondo, eliminando de manera eficaz elementos no deseados como sombras o manchas.

Finalmente, con el relleno de huecos se consigue recuperar pequeños puntos perdidos en la umbralización. En la Figura 6.4 se muestra el resultado.

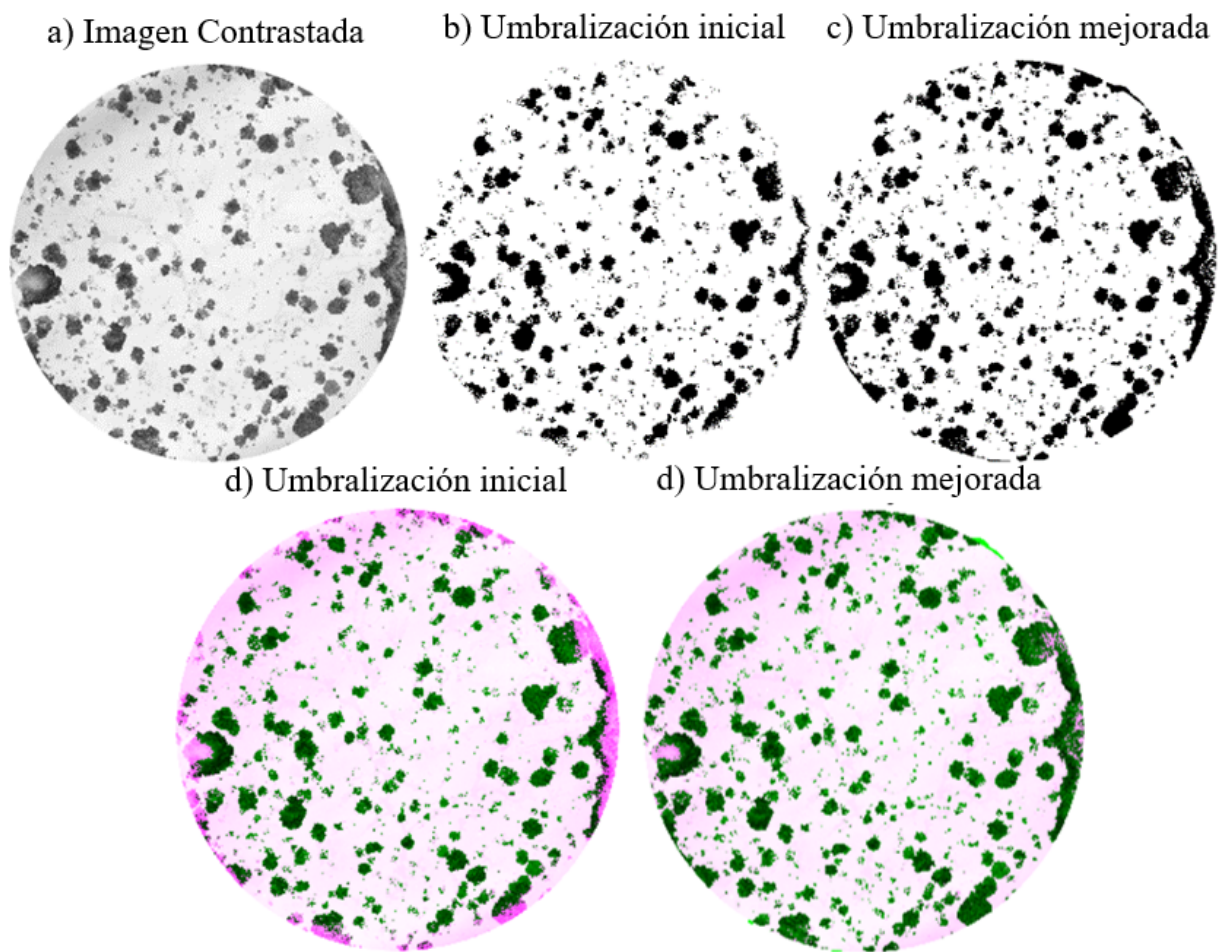


Figura 6.3: Mejora de la umbralización en los bordes. a) Imagen Original tras contraste. b) Umbralización sin el paso intermedio de sustitución de valores de borde. c) Umbralización con el paso intermedio de sustitución de valores de borde. d) y e) Superposición de la umbralización inicial y mejorada frente a la imagen original tras el contraste. Los tonos rosados indican elementos perdidos y los verdes conservados.

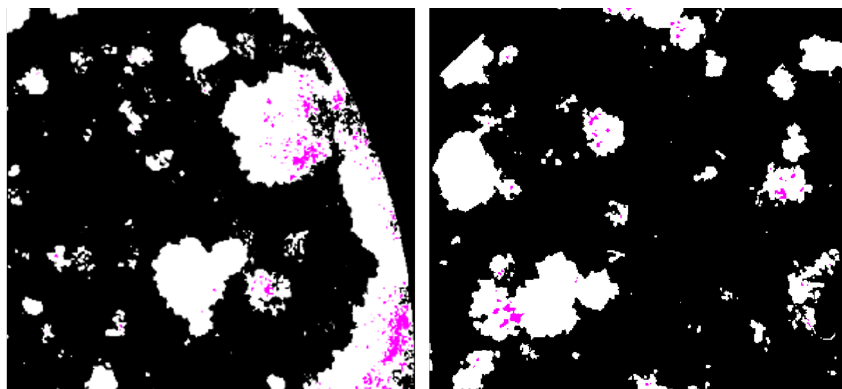


Figura 6.4: Fragmentos de la binarización de la imagen de ejemplo con una representación del relleno de huecos. En color rosado se representan las zonas que se recuperan.

6.2 Predicción de vacíos y saturados

Como se comentó en el Apartado 5.3.3 para predecir qué pocillos están vacíos y cuáles saturados se evaluaron diferentes características de las imágenes. Las cuatro características o índices calculados sobre las muestras de entrenamiento se representan en la Figura 6.5.

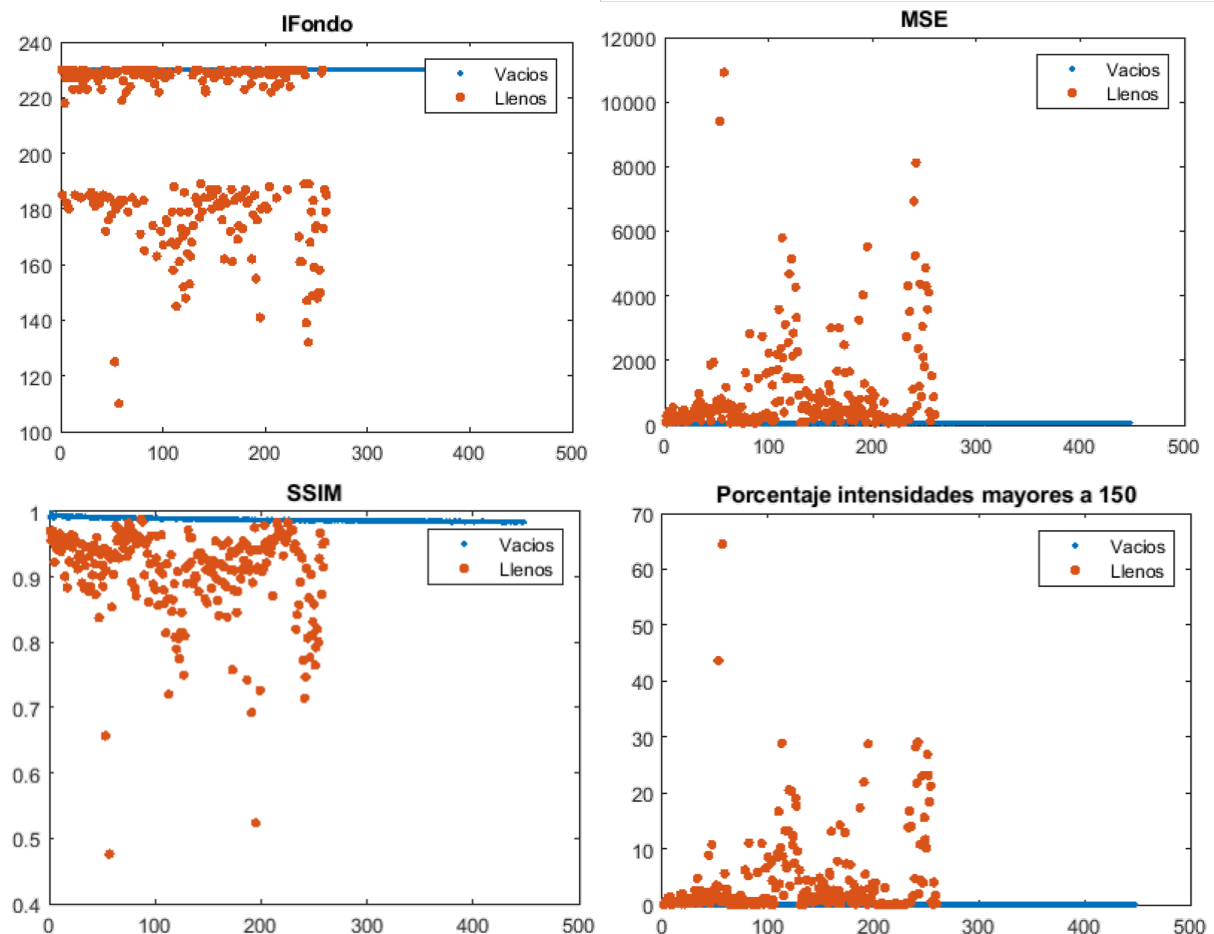


Figura 6.5: Representación de cada una de las características calculadas en las imágenes de pocillos. El eje y representa el valor para la característica calculada. El eje x representa el número de muestra o pocillo. En color azul se representan el grupo de vacíos, mientras que en naranja los llenos o utilizados.

Se observa que en todas ellas la división entre vacíos y utilizados es muy similar, sin diferencias significativas entre las características. Además, en todas se presenta el mismo problema: en muchas muestras, los grupos de vacíos y llenos se solapan, impidiendo elegir un umbral simple para dividir ambas clases.

Finalmente, se optó por utilizar el Índice de Similitud Estructural (SSIM), para predecir qué pocillos están vacíos y cuáles utilizados, pues es el que, dentro de esta problemática, genera ligeramente el mejor resultado. Este media la similitud percibida entre las cada imagen con una imagen referencia de un pocillo vacío, considerando cambios en la luminancia, contraste y estructura. Se definió el umbral en el valor mínimo de SSIM para el grupo de vacíos, con el objetivo de aumentar la sensibilidad para detectar los vacíos. Este umbral fue de 0.9835, de forma que:

- Muestra con $SSIM > 0.9835 = \text{Vacío}$
- Muestra con $SSIM < 0.9835 = \text{Utilizado}$

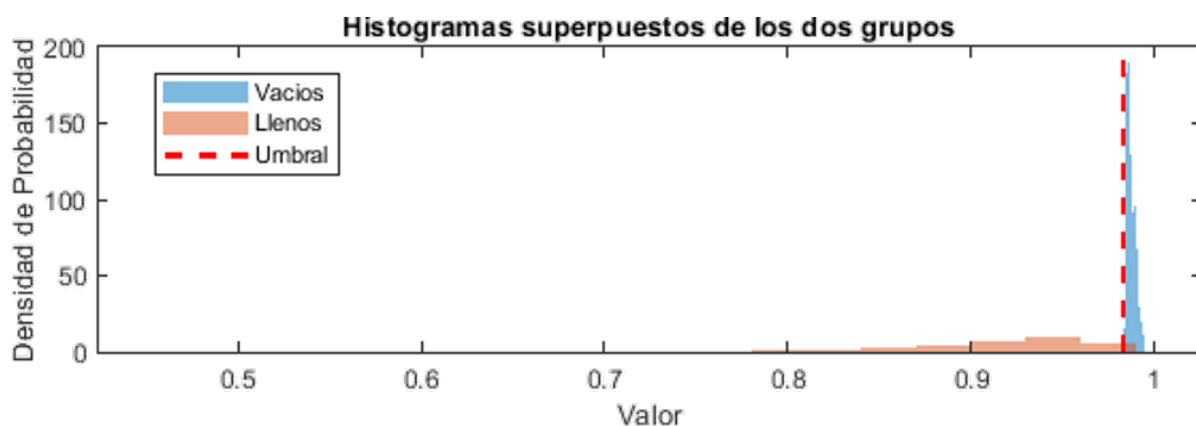


Figura 6.6: Representación de los histogramas de valores SSIM de cada grupo y del umbral escogido para separar ambos.

Para la detección de los saturados, se evaluaron sólo los pocillos utilizados. De estos se representaron los *outliers* para cada característica. Los *outliers* son valores que se desvían de forma excesiva de la media del grupo. La característica que mejor separaba en este caso fue el porcentaje de píxeles con valor de intensidad mayor a 150. En la Figura 6.7 se observa este resultado. Así, se definió el umbral para separar entre pocillos normales y saturados como el límite superior para la detección de outliers: 6.4394% de píxeles oscuros.

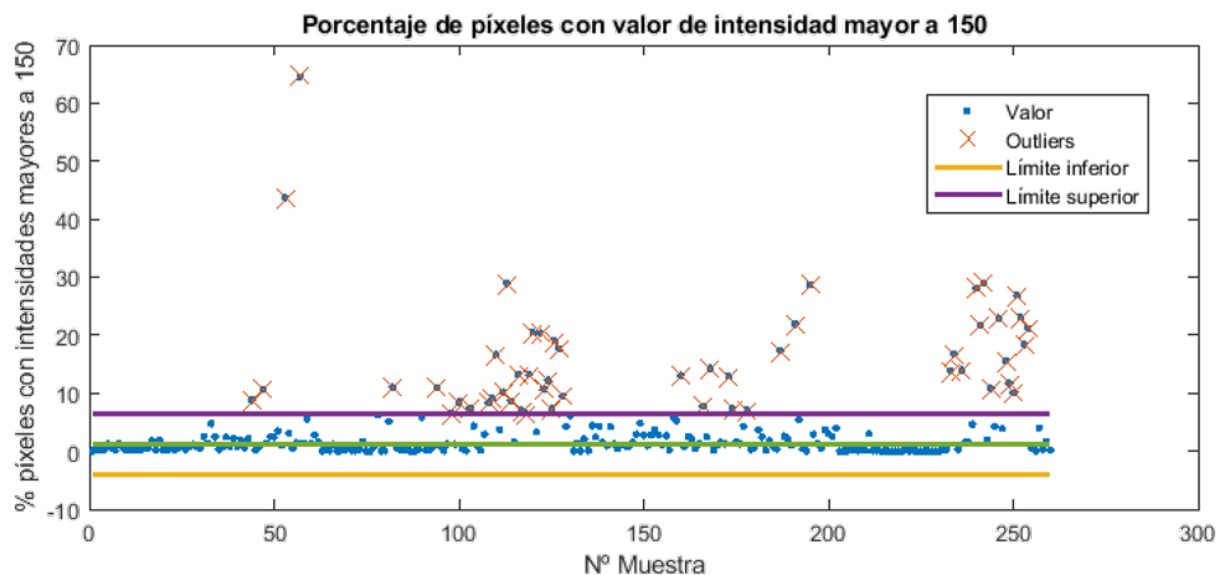


Figura 6.7: Porcentaje de píxeles con valor de intensidad mayor a 150.

Con ambos umbrales obtenidos, se comprobaron los resultados con el grupo de imágenes de test, que aún no se había analizado. Se obtuvieron las siguientes métricas de clasificación (Tabla 6.2).

Finalmente, analizando la matriz de confusión y la tabla con los resultados de las métricas de clasificación se deduce que: Para la detección de vacíos, la precisión es alta (0.9730), lo que indica que la mayoría de las predicciones de vacíos son correctas y hay pocos falsos positivos.

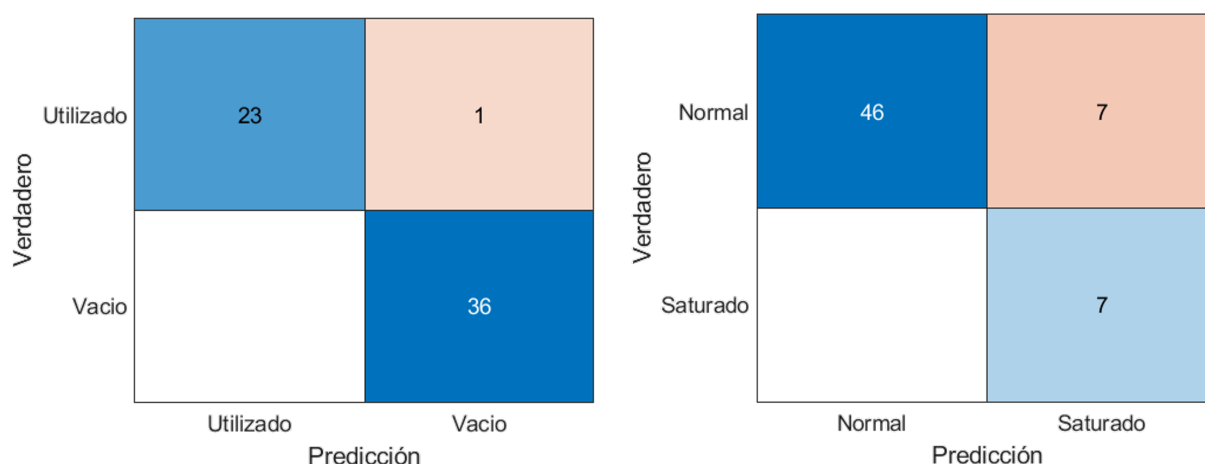


Figura 6.8: Matrices de confusión para ambos resultados.

	Predicción Vacíos	Predicción Saturados
Umbral obtenido	0.9835	6.4394
Precisión	0.9730	0.5000
Sensibilidad	1	1
Especificidad	0.9583	0.8679
Exactitud	0.9833	0.8833

Tabla 6.2: Resultado de las métricas de clasificación.

En contraste, para la detección de saturados, la precisión es baja (0.5), significando que solo la mitad de las predicciones de saturados son correctas, sugiriendo un número significativo de falsos positivos.

La sensibilidad es perfecta (1) para ambos análisis, lo que significa que todos los pocillos vacíos y saturados fueron correctamente identificados, sin ningún falso negativo. La especificidad es alta para los vacíos (0.9583), indicando que la mayoría de los pocillos utilizados se clasificaron correctamente como no vacíos, con pocos falsos positivos. Para los saturados, la especificidad es razonable (0.8679), aunque existe margen para mejorar, ya que algunos pocillos no saturados se clasifican incorrectamente como saturados.

La exactitud global es alta para ambos análisis, siendo mayor para los vacíos (0.9833), lo que indica que la mayoría de las predicciones fueron correctas. Para los saturados, la exactitud es buena (0.8833), aunque menor que para los vacíos.

Con todo esto se concluye que, la metodología aplicada para la predicción de pocillos vacíos ha demostrado ser bastante efectiva, con métricas de precisión, sensibilidad, especificidad y exactitud altas. Sin embargo, la predicción de pocillos saturados presenta limitaciones significativas. La baja precisión en este caso indica un alto número de falsos positivos, lo que podría afectar la fiabilidad de los resultados. Aunque la sensibilidad y la especificidad son razonablemente buenas, se necesitará en próximos estudios mejorar la precisión para una clasificación más confiable de los pocillos saturados.

6.3 Contaje de colonias. Comparación con el método manual y el programa ImageJ

En este apartado, se presentan los resultados del conteo de colonias celulares utilizando el algoritmo desarrollado. Se han comparado los resultados obtenidos mediante este método con contajes manuales y los resultados proporcionados por el programa ImageJ para evaluar dos aspectos fundamentales: la capacidad del algoritmo para contabilizar el número exacto de colonias y la calidad de la segmentación que proporciona.

En primer lugar, se compararon los resultados del algoritmo propuesto con el resto de los métodos para las principales características en un conjunto de 9 muestras. Se evaluó la diferencia para el número total de colonias encontradas, el área media de las mismas y el porcentaje de área total que representaban (Tabla 6.3).

Muestra	Image J			Algoritmo propuesto			Método Manual
	Nº colonias	Área media (px)	% Área	Nº colonias	Área media (px)	% Área	Nº colonias
1B_4G_P1	83	649.98	5.19	79	799.76	6.08	78
1B_4G_P6	69	577.32	3.84	67	680.45	4.38	64
1C_1G_P1	55	810.65	4.21	59	891.25	5.06	55
2A_4G_NP_P6	57	1026.68	5.63	63	1112.60	6.75	59
2B_1G_NP_P6	57	1220.19	6.70	58	1407.23	7.86	57
2C_1G_P6	85	2373.92	19.83	76	2583.52	18.90	76
2C_2G_P6	80	1473.86	11.35	81	1609.21	12.55	74
3B_4G_P6	104	1505.57	15.07	91	1737.16	15.22	101
4B_5G_NP_P6	35	505	1.70	29	585.14	1.63	27
CONTROL250_P6	45	3273.60	14.18	44	3307.24	14.01	45

Tabla 6.3: Comparativa de los resultados principales para cada método de conteo de colonias.

En general, el algoritmo propuesto mantiene una concordancia con los resultados manuales y los resultados de ImageJ en la mayoría de las muestras, aunque con ligeras variaciones. Comparado con ImageJ el número de colonias o es similar o ligeramente menor. Sin embargo, sí existen pequeñas diferencias en cuanto al área media de las colonias. El algoritmo propuesto tiende a obtener áreas medias mayores, esto puede ser debido a dos posibilidades:

1. El algoritmo propuesto puede tener dificultades en separar algunas de las colonias solapadas y por tanto esto genera que el área media de todas las encontradas aumente.
2. El algoritmo de ImageJ podría estar sobresegmentando algunas de las colonias o detectando algunas más pequeñas de lo que se considera correcto.

No obstante, el porcentaje del área total ocupado por las colonias mostró una buena correspondencia entre todos los métodos, lo que indica que, a nivel global, la segmentación del algoritmo es parecida.

Por otro lado, para evaluar la calidad de la segmentación proporcionada por el algoritmo, se seleccionaron muestras con diferentes tamaños de colonias. En este caso, se compararon los re-

sultados del algoritmo e ImageJ con las imágenes de conteos manuales. En concreto, se analizaron 2 muestras con diferentes tamaños de colonias, para garantizar una correcta representación de las mismas. En la Figura 6.9 se muestran las dos muestras escogidas.

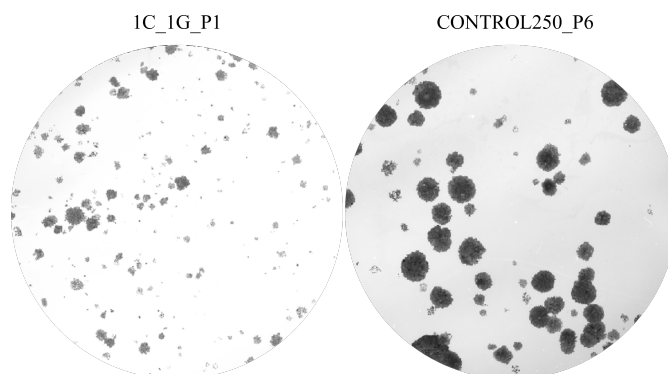


Figura 6.9: Muestras escogidas para obtener las métricas de los resultados de la segmentación.

Se analizaron las muestras obteniendo diferentes valores:

- Verdadero Positivo (VP): Colonias correctamente identificadas por el algoritmo.
- Falso Positivo (FP): Elementos incorrectamente identificados como colonias.
- Falso Negativo (FN): Colonias que no fueron detectadas.
- Verdadero Negativo (VN): Elementos no identificados que no eran colonias.

En la Figura 6.10 se muestra la obtención de estos valores para la muestra CONTROL250_P6.

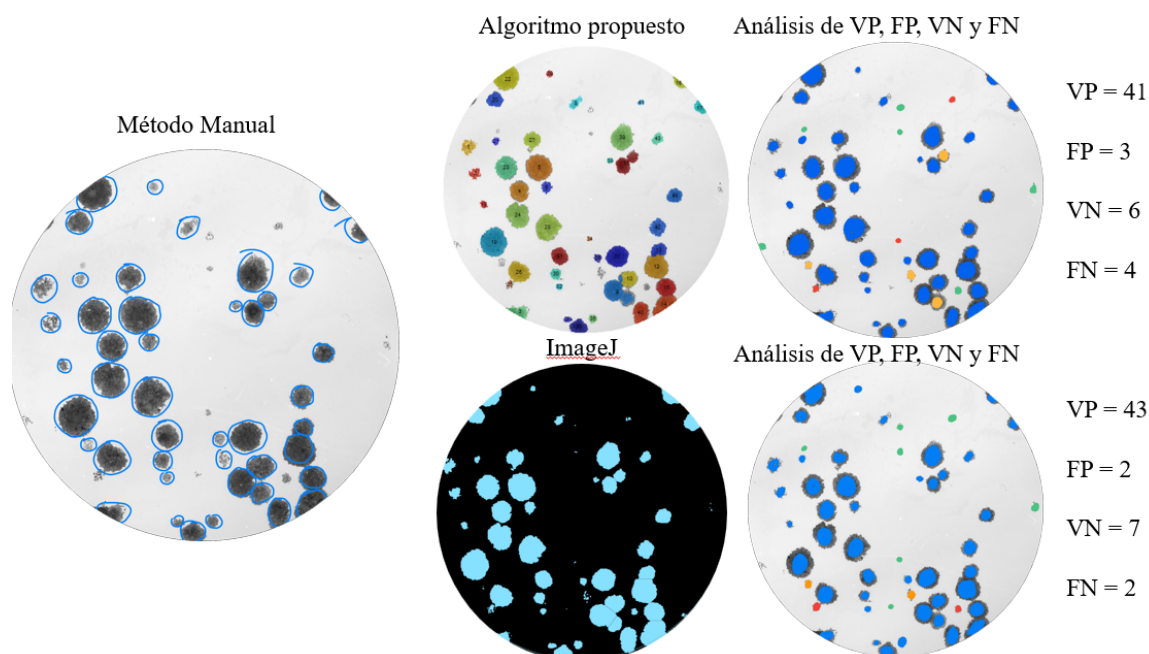


Figura 6.10: Muestra CONTROL250_P6. A la izquierda conteo manual, en el centro resultado de segmentación del algoritmo e ImageJ y a la derecha análisis de VP, FP, VN, FN. Los verdaderos positivos (VP) se representan en azul, los falsos positivos (FP) se representan en rojo, los verdaderos negativos (VN) en verde y los falsos negativos (FN) en naranja.

En la Tabla 6.4 resumen los resultados de estos valores sumados para las dos imágenes de muestra de la Figura 6.10.

		Contaje manual		
		Colonia	No colonia	Total
Algoritmo propuesto	Colonia	96 (VP)	7(FP)	103
	No Colonia	5 (FN)	38(VN)	43
	Total	101	45	146
ImageJ	Colonia	94 (VP)	4(FP)	98
	No colonia	6 (FN)	42(VN)	48
	Total	100	46	146

Tabla 6.4: Matriz de confusión de los resultados de los métodos de detección de colonias para el análisis de las dos muestras de la Figura 6.10.

Utilizando los datos de la Tabla 6.4 se calcularon las métricas siguientes para cada método:

$$\text{Precisión} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (6.3)$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (6.4)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (6.5)$$

$$\text{Exactitud} = \frac{VP + VN}{\text{total}} \quad (6.6)$$

	Precisión	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud
Algoritmo propuesto	0.93	0.95	0.84	0.92
ImageJ	0.96	0.94	0.91	0.95

Tabla 6.5: Resultados de las métricas para ambos métodos.

Estas métricas indican que, aunque ambos métodos son bastante efectivos, ImageJ supera ligeramente al algoritmo propuesto en la mayoría de las categorías. ImageJ presenta una mayor precisión y especificidad, lo que sugiere que es mejor identificar correctamente las colonias sin incluir falsos positivos. Sin embargo, el algoritmo desarrollado en el presente TFM tiene una sensibilidad ligeramente superior, lo que indica una mejor capacidad para detectar verdaderas colonias.

En términos generales, aunque ImageJ tiene un rendimiento ligeramente superior, el algoritmo propuesto sigue siendo altamente eficaz y proporciona resultados comparables.

Además, cabe destacar que estos resultados sólo proporcionan una idea preliminar del rendimiento de los algoritmos, ya que se han obtenido analizando solamente dos muestras. Para obtener conclusiones más fieles a la realidad y representativas sería necesario evaluar estas métricas para un conjunto de imágenes mayor. Este trabajo se deja como posible línea de futuro en otros estudios.

Finalmente, en cuanto a la interfaz desarrollada, esta permite obtener no solo el procesamiento de imágenes y las respectivas segmentaciones finales, sino también una serie de resultados de cada muestra individualmente. En general es de interés analizar la distribución (histograma) de tamaños de colonias en una muestra específica. Estas distribuciones se pueden utilizar como un indicador para identificar tandas de muestras que no hayan salido bien (muestras contaminadas o dónde no han crecido colonias) o para las cuales los parámetros experimentales no hayan sido optimizados correctamente (por tener colonias muy grandes o muy pequeñas). Además, es de interés calcular las métricas de la eficiencia de sembrado (Plating efficiency, PE) y la tasa de supervivencia SF (explicadas en el Apartado 1.4). Estos resultados se han obtenido a través de la implementación de funciones específicas en la interfaz y se muestran en la App de Resultados. Para visualizar un ejemplo de estos resultados se va a tomar como modelo la imagen 1C_1G (Figura 6.9.a).

En primer lugar, se representan el histograma de distribuciones de áreas para el pocillo irradiado y el de control (Figura 6.11). Se observa que la área media en el pocillo irradiado se encuentra en torno a 900 píxeles, mientras que en el de control a 1300 píxeles.

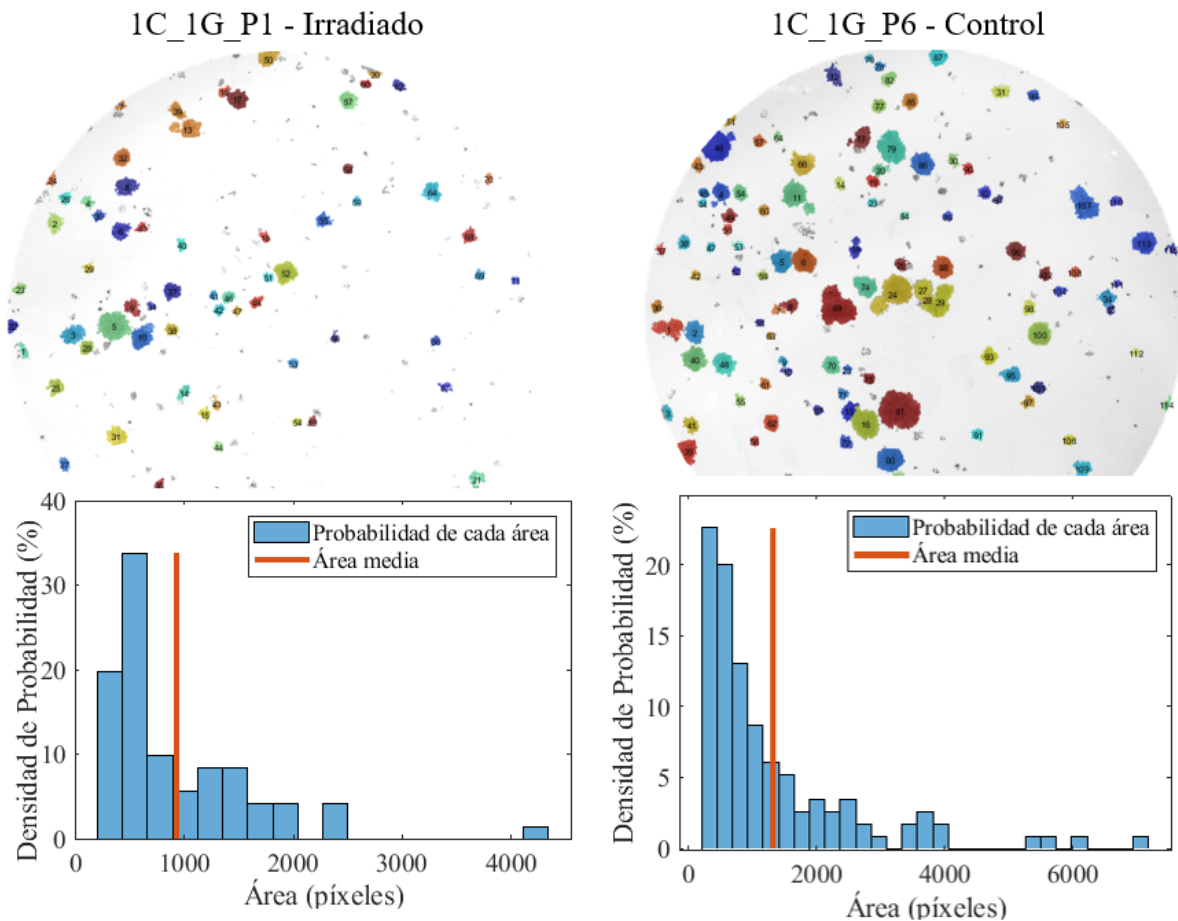


Figura 6.11: Distribución de áreas de colonias en las muestras 1C_1G.

Para calcular la eficiencia de sembrado (PE) se utiliza el pocillo de control (Ecuación 6.7). En este caso se contabilizaron 115 colonias en este y sabiendo que en las muestras de 1 Gy se sembraron 500 células se tiene que:

$$PE = \frac{115}{500} = 0,23 \quad (6.7)$$

Esto significa que el 23 % de las células sembradas en el pocillo de control lograron formar colonias. La PE proporciona una estimación de la eficiencia de sembrado, es decir, de la eficiencia del proceso de preparar las muestras celulares, ya que no todas las células que se siembran en la placa se adhieren correctamente.

Para el cálculo del factor de supervivencia del pocillo irradiado se tendrá en cuenta esta eficiencia de planteamiento de la siguiente forma:

$$SF(1C_1G_P1) = \frac{97}{500 \cdot \frac{1}{PE}} \cdot 100 = 84,35 \% \quad (6.8)$$

Esto significa que, después de la exposición a 1 Gy de radiación, el 84.35 % de las células sembradas sobrevivieron y formaron colonias, ajustado por la eficiencia de sembrado. De estos cálculos para esta muestra específica se deduce que la exposición a 1 Gy de radiación redujo la capacidad de las células para formar colonias a un 84.35 % en comparación con las condiciones de control.

Finalmente, la interfaz permite calcular estos datos automáticamente para todas y cada una de las muestras y resumirlos visualmente graficando las curvas de supervivencia.

Capítulo 7

Conclusiones

En el presente trabajo final de máster, se ha desarrollado un algoritmo eficiente para el conteo y segmentación de colonias celulares en ensayos clonogénicos. Se han utilizado imágenes de placas de pocillos en diferentes condiciones, incluyendo la presencia de nanopartículas y dosis variables de radiación. El principal objetivo fue intentar mejorar el conteo de colonias automático, mejorando su precisión. Adicionalmente, se diseñó una interfaz intuitiva que permite experimentar con parámetros, visualizar resultados de diferentes maneras y ajustar manualmente los resultados, facilitando así la obtención de datos más precisos en muestras difíciles de segmentar.

Para realizar esto, se emplearon técnicas de preprocesamiento y análisis de imágenes como las operaciones morfológicas y la técnica de *watershed*. Esta última fue el eje principal de la segmentación, que aplicada a las colonias superpuestas permitió separarlas en la mayoría de los casos. Una parte significativa del proyecto se centró en la optimización de parámetros para alcanzar los mejores resultados posibles y en idear las funciones necesarias para la utilidad de la interfaz.

A pesar de las dificultades para cuantificar los resultados debido a la subjetividad inherente (ya que la interpretación de lo que constituye una colonia puede variar entre diferentes personas), el algoritmo desarrollado mostró una precisión de segmentación comparable al estándar de oro, ImageJ, alcanzando aproximadamente un 92% de exactitud. Aunque ImageJ presentó una precisión ligeramente mayor en el análisis de muestras, el algoritmo propuesto tiene la ventaja de incluir una interfaz con una parte de visualización de resultados mucho más desarrollada que la de ImageJ. Este factor añadido permite calcular y visualizar los resultados en múltiples formas dentro de un mismo programa, facilitando su interpretación. Además, el algoritmo permite visualizar de forma sencilla y eliminar muestras contaminadas o saturadas, así como la redefinir del número de colonias finales, en casos de solapamiento que no pudieron ser separadas inicialmente.

A pesar de todo esto, se destaca que todavía existe un margen de mejora. Durante el desarrollo del proyecto se han identificado algunas limitaciones que influyeron en los resultados finales. La técnica *watershed*, así como las operaciones morfológicas, tienen limitaciones y no permiten separar algunas de las colonias solapadas. Además, las características biológicas impredecibles de las muestras pueden generar variabilidad en los resultados. Por ejemplo, algunas muestras estaban

sobresaturadas sin una razón aparente, y en otros casos, las muestras irradiadas presentaban más colonias que las de control. Además, se observó que las muestras de control, que deberían ser similares, mostraron variaciones significativas entre ellas.

En cuanto a futuros estudios o líneas de investigación, se destaca el uso de algoritmos de inteligencia artificial para la segmentación de colonias. Este campo está en pleno desarrollo y ya está demostrando sus posibilidades en multitudes de ámbitos. La inteligencia artificial como apoyo a la medicina y biología promete resultados superiores, aunque también tiene sus dificultades o limitaciones, pues se requiere de un gran volumen de imágenes y segmentaciones de entrenamiento fiables. Sin embargo, consiguiendo esto, puede ser de interés investigar por esta vía.

En conclusión, el algoritmo desarrollado demostró ser una herramienta eficaz para el conteo y segmentación de colonias celulares. En adición, se ha intentado colaborar en la búsqueda de parámetros y definición de los mismos para mejorar la estandarización de estos métodos. Además, la interfaz impulsa el proceso de análisis en general, pudiendo intervenir en diferentes partes del mismo y obteniendo una visualización clara y ordenada de los resultados, lo que permite y mejora su interpretación. Este trabajo aporta conocimiento para el conteo de colonias celulares en ensayos clonogénicos y sus aplicaciones en el campo de la radiobiología, proporcionando un herramienta que pretende facilitar el análisis de las pruebas de ensayo con el fin de acelerar las investigaciones en nuevos tratamientos, beneficiando tanto a los profesionales que deben dedicar un menor tiempo a analizar las muestras, como a los pacientes que necesitan estos nuevos tratamientos cuyo descubrimiento podría ser acelerado.

Parte II

Presupuesto

Presupuesto

El objetivo del presente capítulo es evaluar económicamente el trabajo realizado en este proyecto TFM titulado: “Desarrollo y optimización de métodos para el contaje de colonias en ensayos clonogénico”. Esta tarea se ha hecho mediante el cálculo de un presupuesto, que ha sido estructurado en dos partes: presupuestos parciales y presupuesto final. En adición, los presupuestos parciales se han organizado en tres cuadros de precios: mano de obra, maquinaria y materiales.

Presupuestos parciales

Mano de obra

En este apartado se especifican los costes relacionados con el personal involucrado en el proyecto, es decir, los recursos humanos necesarios para para el desarrollo del presente TFM. Se ha considerado una estimación del tiempo de trabajo, así como de las tarifas horarias de cada profesional. Se considera la contribución de D. Miguel Rodrigo, como tutor principal; D. Daniel Esperante como cotutor; Nuria Fuster, como cotutora; y Ayelén Hidalgo Blasco, como estudiante del Máster de Ingeniería Biomédica y autora del TFM.

Denominación	Uds	Precio Unitario (€)	Cantidad	Total (€)
Tutor Rodrigo (Profesor UV)	h	45,00	20	900,00
Tutor Esperante (Profesor UV)	h	45,00	20	900,00
Cotutora Fuster (Investigadora CSIC)	h	45,00	20	900,00
Autora Ayelén (Estudiante de MUIB)	h	20,00	500	10.000,00
			Total	12.700,00

Maquinaria

Este apartado detalla los costes asociados con el uso de maquinaria y equipos necesarios para la realización del proyecto. Se incluirán para este proyecto los recursos de hardware y software utilizados.

En cuanto al hardware, el TFM se ha desarrollado haciendo uso de un ordenador principal personal de la marca ASUS, modelo Zenbook UX3402ZA. Además, se incluye aquí el escáner empleado para la obtención de las imágenes.

Denominación	Uds	Cantidad	Precio Unitario (€)	Periodo de amortización (años)	Intervalo amortizado (meses)	Total (€)
ASUS Zenbook UX3402ZA	u	1	950,00	5	8	126,67
Escáner EPSON Perfection V850 Pro	u	1	500,00	5	1	8,33
Total						135,00

En cuanto al software, se ha empleado MATLAB® con el Toolbok principal de Image Processing para la generación de los algoritmos. Para la redacción de la memoria, se ha utilizado LaTeX, en lenguaje de código abierto, con el editor TeXstudio.

Denominación	Uds	Cantidad	Precio Unitario (€)	Periodo de amortización (años)	Intervalo amortizado (meses)	Total (€)
Licencia MATLAB® Academic	u	1	262,00	1	6	131,00
Image Processing Toolbox Academic	u	1	105,00	1	6	52,50
TeXstudio	u	1	0,00	1	2	0,00
Total						183,50

Materiales

Para este proyecto no fue requerido ningún material.

Presupuestos totales

Finalmente se presenta un resumen del presupuesto total del proyecto, integrando todos los presupuestos parciales detallados anteriormente. Además, se añaden los gastos generales, el gasto asociado al beneficio industrial y el impuesto sobre el valor añadido, IVA. Este resumen permitirá visualizar el coste total del presente TFM.

CAPÍTULOS	IMPORTE (€)
1. Coste mano de obra	12.700,00
2. Coste maquinaria	318,50
3. Coste materiales	00,00
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN DE MATERIAL	13.018,50
13 % de gastos generales	1.692,41
6 % de beneficio industrial	781,11
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA	15.492,02
21 % IVA	3.253,32
PRESUPUESTO TOTAL	18.745,34

Bibliografía

- [1] Joaquín Jordán. “Apoptosis: muerte celular programada”. es. En: *Offarm* 22.6 (jun. de 2003), págs. 100-106. ISSN: 0212-047X. URL: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-apoptosis-muerte-celularprogramada-13049112> (visitado 14-06-2024) (vid. pág. 3).
- [2] J F R Kerr, A H Wyllie y A R Currie. “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics”. en. En: *British Journal of Cancer* 26.4 (ago. de 1972), págs. 239-257. ISSN: 0007-0920, 1532-1827. DOI: 10.1038/bjc.1972.33. URL: <https://www.nature.com/articles/bjc197233> (visitado 14-06-2024) (vid. pág. 3).
- [3] Javier Puente y Guillermo De Velasco. *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* publisher: EOM: Sociedad Española de Oncología Médica. 2019. URL: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla> (visitado 14-06-2024) (vid. pág. 3).
- [4] NIH: Instituto Nacional Del Cáncer. *¿Qué es el cáncer?* es. Mayo de 2021. URL: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (visitado 14-06-2024) (vid. pág. 3).
- [5] IARC: International Agency for Research on Cancer. *Cancer Tomorrow*. Inf. téc. 2019. URL: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?sexes=1&single_unit=50000 (vid. pág. 3).
- [6] REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer. *Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2024*. Inf. téc. 2024. URL: <https://www.redecn.org/es/proyectos/17/estimaciones-de-la-incidencia-del-cancer-en-espana-2024> (vid. pág. 4).
- [7] AECC: Asociación Española Contra el Cáncer. *Informe Dinámico de Incidencia del Cáncer*. Inf. téc. 2022. URL: <https://observatorio.contraelcancer.es/informes/informe-dinamico-incidencia> (vid. pág. 4).

- [8] American Cancer Society. *Tipos de tratamiento*. es. URL: <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento.html> (vid. pág. 4).
- [9] AECC: Asociación Española Contra el Cáncer. *Acceso al tratamiento de Radioterapia en España*. Inf. téc. URL: <https://observatorio.contraelcancer.es/informes/acceso-al-tratamiento-de-radioterapia-en-espana> (vid. pág. 5).
- [10] Ervin B Podgorsak. *Radiation physics for medical physicists*. Springer, 2006. ISBN: 3-540-25041-7 (vid. págs. 5, 7, 8).
- [11] CSN: Consejo de Seguridad Nuclear. *Las radiaciones*. URL: <https://www.csn.es/las-radiaciones#:~:text=La%20radiaci%C3%B3n%20es%20la%20emisi%C3%B3n,radiaci%C3%B3n%20infrarroja%20no%20podr%C3%ADamos%20calentarnos> (visitado 31-05-2024) (vid. pág. 5).
- [12] Louis De Broglie. “Recherches sur la théorie des Quanta”. En: *Annales de Physique*. 10.^a ép. 3 (1925), pág. 22 (vid. pág. 5).
- [13] IAEA: Organismo Internacional de Energía Atómica. *¿Qué es la radiación?* es. [Fotografía]. 2024. URL: <https://www.iaea.org/es/newscenter/news/que-es-la-radiacion> (vid. pág. 6).
- [14] CSN: Consejo de Seguridad Nuclear. *Curso General de Formación de Actuantes en Emergencias Nucleares. TEMA 00. Conceptos básicos sobre protección radiológica*. URL: <https://www.csn.es/documents/10182/950714/Curso+General+de+Formaci%C3%B3n+de+Actuantes+en+Emergencias+Nucleares.+TEMA+00.+Conceptos+b%C3%A1sicos+sobre+protecci%C3%B3n+radiol%C3%B3gica> (vid. págs. 5-7).
- [15] Mario Valente. *Física de la radioterapia*. 2022. URL: https://www.famaf.unc.edu.ar/~valente/Documents/DidacticsMaterial/FISICA_DE_LA_RADIOTERAPIA_MFM_UFRO_2022.pdf (vid. pág. 6).
- [16] CSN: Consejo de Seguridad Nuclear. *Radiaciones ionizantes*. URL: <https://www.csn.es/radiaciones-ionizantes> (vid. pág. 6).
- [17] David S. Chang et al. *Basic radiotherapy physics and biology*. eng. Second edition. Cham, Switzerland: Springer, 2021. ISBN: 9783030618988 (vid. págs. 7-9, 14).
- [18] Dirk De Ruysscher et al. “Radiotherapy toxicity”. en. En: *Nature Reviews Disease Primers* 5.1 (feb. de 2019), pág. 13. ISSN: 2056-676X. DOI: 10.1038/s41572-019-0064-5. URL: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0064-5> (visitado 14-06-2024) (vid. pág. 8).
- [19] Leukemia & Lymphoma Society. *Terapia de radiación de haz externo*. 2022. URL: https://www.lls.org/sites/default/files/2023-02/FS38S_External_Beam_Radiation_Therapy_2022_Spanish.pdf (vid. pág. 9).

- [20] Alvaro Tucci Reali. *Radiodiagnóstico y radioterapia*. Lulu, 2012 (vid. pág. 10).
- [21] Harold Elford Johns y John Robert Cunningham. *The physics of radiology*. 4th. original-date: 1953. Springfield: Charles C Thomas, 1983. ISBN: 0-398-04669-7 (vid. pág. 10).
- [22] Sébastien Penninckx et al. “Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer: a transdisciplinary approach from physics to patient”. en. En: *Cancers* 12.8 (jul. de 2020), pág. 2021. ISSN: 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers12082021. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2021> (visitado 14-06-2024) (vid. págs. 10-12).
- [23] D Wilsoniii y V Bohr. “The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease”. en. En: *DNA Repair* 6.4 (abr. de 2007), págs. 544-559. ISSN: 15687864. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.10.017. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786406003260> (visitado 17-06-2024) (vid. pág. 10).
- [24] M. Valko et al. “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”. en. En: *Chemico-Biological Interactions* 160.1 (mar. de 2006), págs. 1-40. ISSN: 00092797. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279705004333> (visitado 17-06-2024) (vid. pág. 10).
- [25] NIH: Instituto Nacional del Cáncer. *Radiosensibilizador*. es. Feb. de 2011. URL: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/radiosensibilizador> (vid. pág. 11).
- [26] Imen Miladi et al. “The in vivo radiosensitizing effect of gold nanoparticles based mri contrast agents”. en. En: *Small* 10.6 (mar. de 2014), págs. 1116-1124. ISSN: 1613-6810, 1613-6829. DOI: 10.1002/sml1.201302303. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml1.201302303> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 11).
- [27] Zdenka Kuncic y Sandrine Lacombe. “Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment”. En: *Physics in Medicine & Biology* 63.2 (ene. de 2018), 02TR01. ISSN: 1361-6560. DOI: 10.1088/1361-6560/aa99ce. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6560/aa99ce> (visitado 08-07-2024) (vid. págs. 11, 12).
- [28] Joshua M. Stern et al. “Selective prostate cancer thermal ablation with laser activated gold nanoshells”. en. En: *Journal of Urology* 179.2 (feb. de 2008), págs. 748-753. ISSN: 0022-5347, 1527-3792. DOI: 10.1016/j.juro.2007.09.018. URL: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2007.09.018> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 12).
- [29] Clara Gerosa et al. “Gold nanoparticles: a new golden era in oncology?” en. En: *Pharmaceuticals* 13.8 (ago. de 2020), pág. 192. ISSN: 1424-8247. DOI: 10.3390/ph13080192. URL: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/8/192> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 12).

- [30] Nikolai Khlebtsov y Lev Dykman. “Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies”. en. En: *Chem. Soc. Rev.* 40.3 (2011), págs. 1647-1671. ISSN: 0306-0012, 1460-4744. DOI: 10.1039/C0CS00018C. URL: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C0CS00018C> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 12).
- [31] Theodore T. Puck y Philip I. Marcus. “Action of x-rays on mammalian cells”. en. En: *The Journal of Experimental Medicine* 103.5 (mayo de 1956), págs. 653-666. ISSN: 1540-9538, 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.103.5.653. URL: <https://rupress.org/jem/article/103/5/653/2233/ACTION-OF-X-RAYS-ON-MAMMALIAN-CELLS> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 12).
- [32] Nicolaas A P Franken et al. “Clonogenic assay of cells in vitro”. en. En: *Nature Protocols* 1.5 (dic. de 2006), págs. 2315-2319. ISSN: 1754-2189, 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. URL: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 12).
- [33] Haibin Qian et al. “High-content and high-throughput clonogenic survival assay using fluorescence barcoding”. en. En: *Cancers* 15.19 (sep. de 2023), pág. 4772. ISSN: 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers15194772. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/19/4772> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 13).
- [34] Dharmendra Kumar Maurya. “Colonycountj: a user-friendly image j add-on program for quantification of different colony parameters in clonogenic assay”. En: *Journal of Clinical Toxicology* 07.04 (2017). ISSN: 21610495. DOI: 10.4172/2161-0495.1000358. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/colonycountj-a-userfriendly-image-j-addon-program-forquantification-of-different-colony-parameters-in-clonogenic-assay-2161-0495-1000358.php?aid=92964> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).
- [35] Camilo Guzmán et al. “Colonyarea: an imagej plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays”. en. En: *PLoS ONE* 9.3 (mar. de 2014). Ed. por Rossella Rota, e92444. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0092444. URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092444> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).
- [36] Priya Choudhry. “High-throughput method for automated colony and cell counting by digital image analysis based on edge detection”. en. En: *PLOS ONE* 11.2 (feb. de 2016), e0148469. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0148469. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148469> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).
- [37] Louis Zhang. “Machine learning for enumeration of cell colony forming units”. en. En: *Visual Computing for Industry, Biomedicine, and Art* 5.1 (nov. de 2022), pág. 26. ISSN: 2524-4442. DOI: 10.1186/s42492-022-00122-3. URL: <https://vciba.springeropen.com/articles/10.1186/s42492-022-00122-3> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).

- [38] Shi-Jian Liu et al. “A two-stage deep counting for bacterial colonies from multi-sources”. en. En: *Applied Soft Computing* 130 (nov. de 2022), pág. 109706. ISSN: 15684946. DOI: 10.1016/j.asoc.2022.109706. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568494622007554> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).
- [39] Muhammed Talo. “An automated deep learning approach for bacterial image classification”. En: (2019). DOI: 10.48550/ARXIV.1912.08765. URL: <https://arxiv.org/abs/1912.08765> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 20).
- [40] Chris Solomon y Toby Breckon. *Fundamentals of digital image processing: a practical approach with examples in Matlab*. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 9780470844724 9780470844731 (vid. págs. 21, 22, 24-26).
- [41] Derek Bradley y Gerhard Roth. “Adaptive thresholding using the integral image”. en. En: *Journal of Graphics Tools* 12.2 (ene. de 2007), págs. 13-21. ISSN: 1086-7651. DOI: 10.1080/2151237X.2007.10129236. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2151237X.2007.10129236> (visitado 08-07-2024) (vid. pág. 23).

Parte III

Apéndices

Apéndice A

Alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030

Este Trabajo Final de Máster (TFM) se alinea con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la ONU, contribuyendo de manera directa a los ODS 3 y 9.

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	X			

Tabla A.1: Grado de alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenibles.

En primer lugar, respecto al ODS 3, titulado Salud y Bienestar, el desarrollo de un método eficiente para el conteo y segmentación de colonias celulares en ensayos clonogénicos tiene un impacto directo en la investigación biomédica y, por ende, en la mejora de la salud y bienestar. Este avance facilita estudios más precisos y rápidos sobre el efecto de nanopartículas y radiación en células, lo que puede acelerar el desarrollo de nuevas terapias y tratamientos contra el cáncer. La capacidad de contar y segmentar colonias celulares con mayor precisión mejora la calidad de los datos obtenidos en estudios preclínicos, permitiendo un análisis más riguroso de la eficacia de tratamientos innovadores y reduciendo el margen de error.

En segundo lugar, respecto al ODS 9, titulado Industria, Innovación e Infraestructura; el presente TFM también promueve la innovación tecnológica. El desarrollo de un algoritmo avanzado y una interfaz de usuario presentan una herramienta que puede formar parte de la infraestructura tecnológica de los laboratorios de investigación. Esto no solo mejora la calidad de la investigación, sino que también aumenta la eficiencia operativa, reduciendo el tiempo y los recursos necesarios para obtener resultados precisos.

En conclusión, este TFM no solo contribuye en las investigaciones actuales, sino que también impulsa el desarrollo sostenible al contribuir a la salud pública y fomentar la innovación tecnológica en el sector de la investigación biomédica. Estos avances están alineados con los objetivos globales de desarrollo sostenible, apoyando tanto la mejora del bienestar humano como la promoción de infraestructuras tecnológicas innovadoras.

Manual de usuario de la interfaz gráfica

Introducción

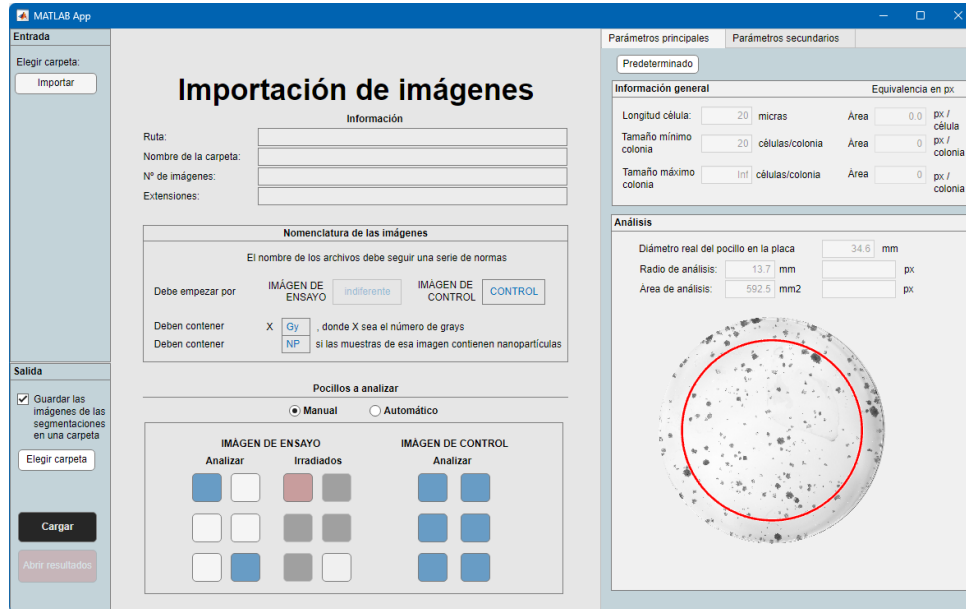
Este manual tiene como objetivo orientar a los usuarios en la utilización del programa desarrollado en el presente TFM. Se trata de una herramienta diseñada para la segmentación y análisis de resultados de colonias celulares en ensayos clonogénicos. Este manual está dirigido a investigadores que trabajan en laboratorios de biología celular y que necesitan una herramienta de apoyo para analizar los resultados de estas muestras.

El presente programa se compone de dos partes principales:

- Aplicación de Inicio: proporciona un entorno para importar las imágenes y adaptar los parámetros pertinentes para luego hacer el análisis. Es en esta misma ventana donde se cargan y procesan las muestras, almacenando los resultados en estructuras.
- Aplicación de Resultados: gestiona los resultados obtenidos y los visualiza en diferentes ventanas. La principal función de cada ventana es:
 - Ventana Resumen: agrupa los resultados de todas las muestras analizadas y genera las gráficas de supervivencia. Además, se muestran resultados generales como el tiempo de procesamiento, el número de muestras analizadas, el tipo de cada una de ellas, etc.
 - Ventana Lista Detallada: muestra una tabla con los datos de cada muestra por fila.
 - Ventana Pocillo: contiene información detallada de cada pocillo en específico, tanto de su parte de resultados como de su preprocesamiento.

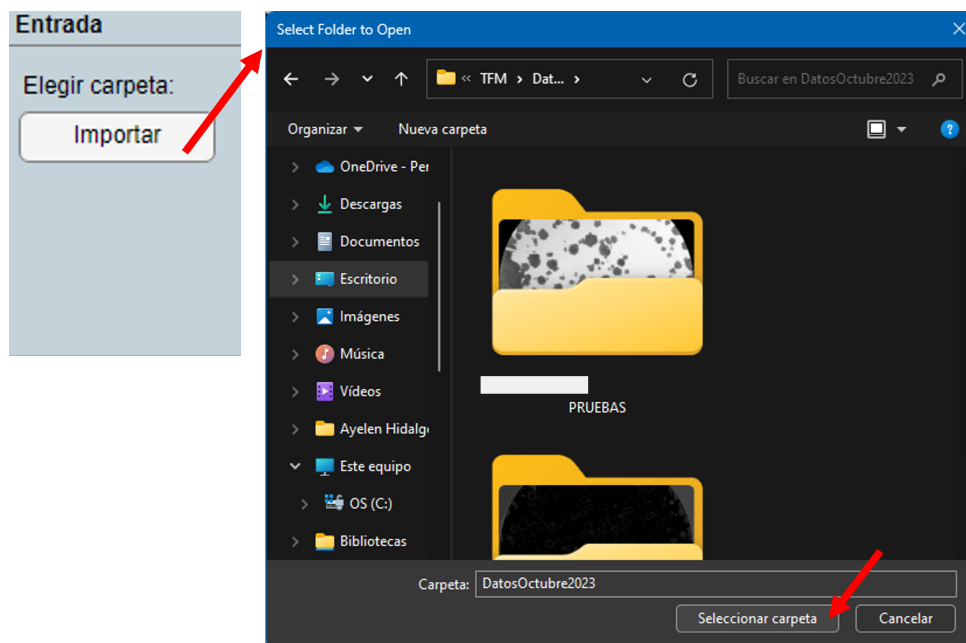
Ventana de Inicio

Al iniciar el programa se encontrará con la ventana principal de Inicio como la que se muestra en la Figura ??.



Importación de imágenes

El primer paso es importar una carpeta de imágenes. En el Panel lateral de Entrada encontrará el botón Importar. Al presionar el botón se abrirá el explorador de archivos del sistema donde se podrá navegar para elegir la carpeta correspondiente. Una vez encontrada seleccione Seleccionar Carpeta.



Tras importar la carpeta de imágenes se mostrará en la parte superior de Información las características principales.

Información	
Ruta:	C:\Users\ahbli\Desktop\TFM\DatosOctubre2023
Nombre de la carpeta:	DatosOctubre2023
Nº de imágenes:	131
Extensiones:	.jpg, .tif

- Ruta: directorio donde se encuentra la carpeta elegida.
- Nombre de la carpeta: nombre de la carpeta elegida.
- Nº de imágenes: número de imágenes que contiene la carpeta.
- Extensiones: extensiones de las imágenes que hay en la carpeta elegida.

Importante: la importación de imágenes lee la carpeta y solo obtiene los archivos en formato .tif, .jpg y .png. El resto de formatos no son compatibles.

Una vez importadas imágenes también se activará el panel lateral de Parámetros Principales.

Nomenclatura de las imágenes

Algunas de las características principales de cada muestra se obtienen de su nombre de archivo. Para configurar esto se dispone del Panel Nomenclatura de las Imágenes.

Nomenclatura de las imágenes					
El nombre de los archivos debe seguir una serie de normas					
Debe empezar por	<table border="0"> <tr> <td>IMÁGEN DE ENSAYO</td> <td><input type="text" value="indiferente"/></td> <td>IMÁGEN DE CONTROL</td> <td><input type="text" value="CONTROL"/></td> </tr> </table>	IMÁGEN DE ENSAYO	<input type="text" value="indiferente"/>	IMÁGEN DE CONTROL	<input type="text" value="CONTROL"/>
IMÁGEN DE ENSAYO	<input type="text" value="indiferente"/>	IMÁGEN DE CONTROL	<input type="text" value="CONTROL"/>		
Deben contener	X <input type="text" value="Gy"/> , donde X sea el número de grays				
Deben contener	<input type="text" value="NP"/> si las muestras de esa imagen contienen nanopartículas				

Primero cabe definir:

- IMAGEN DE ENSAYO: imagen de la placa de pocillos en la cuál alguna de las muestras presentes ha sido irradiada.
- IMAGEN DE CONTROL: imagen de la placa de pocillos en la cual de todas las muestras presentes ninguna ha sido irradiada.

En este panel se puede configurar que debe aparecer en los nombres de estos archivos:

1. Debe empezar por:

- Imágenes de control: El nombre del archivo debe empezar por "CONTROL". Este prefijo es configurable según las necesidades del usuario.

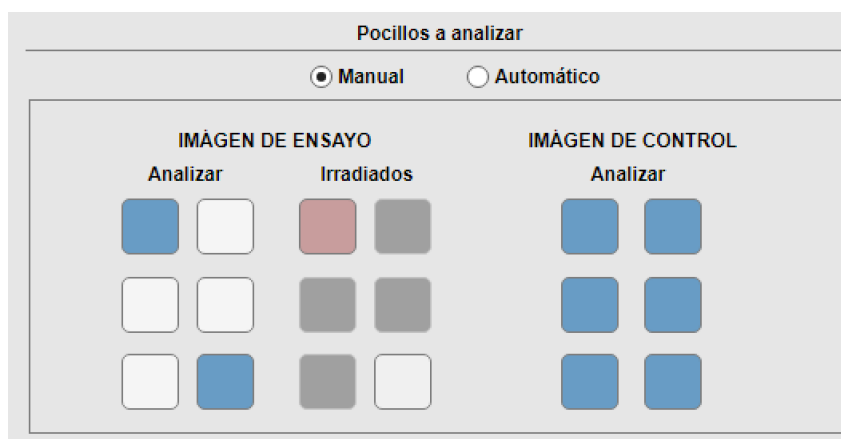
- Imágenes de ensayo: No requieren un prefijo específico, ya que se identificarán por descarte de las imágenes de control.

2. Deben contener:

- Valor de irradiación: El nombre del archivo debe incluir el valor de los grays con los que ha sido irradiado, seguido de los caracteres “Gy”. Estos caracteres son configurables.
- Presencia de nanopartículas: Si los pocillos en las imágenes contienen nanopartículas, el nombre del archivo debe incluir “NP”. Esta especificación también es configurable.

Pocillos a analizar

En este panel seleccione el método para elegir que pocillos se analizan.



Método Manual:

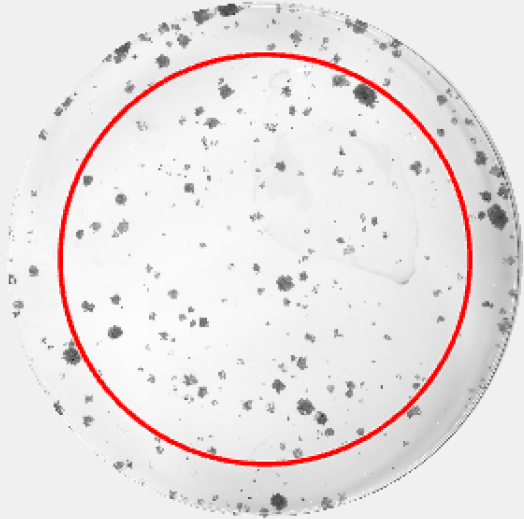
- Selección de pocillos:
 - En los botones inferiores se puede elegir que pocillos se analizan (azules, botones activos) y cuáles no (blancos, botones no activos), en cada tipo de imágenes: las imágenes de ensayo y las imágenes de control. Seleccione los pocillos a analizar haciendo click sobre los mismos.
 - Además, se pueden seleccionar de las imágenes de ensayo cuáles han sido irradiadas. Para ello solo se podrá seleccionar aquellos que se han marcado previamente como activos.
- En la visualización de resultados:
 - Solo se analizarán los pocillos marcados como activos. Los pocillos no seleccionados no se incluirán en los resultados.

Método automático:

- Selección de pocillos:
 - Se analizarán todos los pocillos presentes en las imágenes. Un algoritmo detectará los pocillos vacíos y los etiquetará como tales en los resultados.

- En la visualización de resultados:
 - En los resultados aparecerán todos y cada uno de los pocillos, pero solo se tendrán en cuenta para el resumen de resultados aquellos que no se han marcado como vacíos.
 - En cualquier caso, en la Ventana de Resultados se podrá reañadir los vacíos que se considere a los resultados o eliminar algunos de los pocillos no etiquetados como tal.

Parámetros principales

Parámetros principales	Parámetros secundarios	
Predeterminado		
Información general		Equivalencia en px
Longitud célula:	<input type="text" value="20"/> micras	Área <input type="text" value="14.8"/> px / célula
Tamaño mínimo colonia	<input type="text" value="20"/> células/colonia	Área <input type="text" value="297"/> px / colonia
Tamaño máximo colonia	<input type="text" value="Inf"/> células/colonia	Área <input type="text" value="Inf"/> px / colonia
Análisis		
Diámetro real del pocillo en la placa	<input type="text" value="34.6"/> mm	
Radio de análisis:	<input type="text" value="13.7"/> mm	<input type="text" value="649"/> px
Área de análisis:	<input type="text" value="592.5"/> mm ²	<input type="text" value="1322439"/> px
		

Activación del panel

El panel de parámetros principales no se activará hasta después de importar las imágenes. Esto es debido a que es necesario la resolución de las imágenes para las conversiones de micras a píxeles.

Botón Predeterminado

El botón Predeterminado restablece todos los valores de los parámetros principales a sus valores iniciales.

Panel Información General

- **Longitud de célula:** diámetro de la célula en micras.
- **Tamaño mínimo colonia:** número de células mínimo para considerar una colonia celular.
- **Tamaño máximo colonia:** número de células máximo para considerar una colonia celular. De forma predeterminada se establece infinito, pues en general no existe un tamaño de colonia máximo, pero esto puede ser igualmente configurable.
- **Equivalencia en px:** de arriba a abajo las diferentes áreas en píxeles corresponden a:
 - Área de la célula.
 - Área del tamaño mínimo de colonia.
 - Área del tamaño máximo de colonia.

Panel Análisis

- **Diámetro real del pocillo en la placa:** para calibrar posteriormente las dimensiones del área a analizar del pocillo (ROI), es importante añadir correctamente el diámetro real del pocillo en la placa. Se recomienda medir este valor en una de las placas utilizadas y modificarlo en la presente casilla.
- **Radio de análisis y área de análisis:** radio o área de la zona que se quiere analizar. Se puede introducir tanto el radio como el área y tanto en milímetros como en píxeles. Las casillas se actualizan automáticamente y se puede ver la correspondencia entre ellas.
- **Figura de previsualización:** se observa un pocillo de muestra con las dimensiones a analizar seleccionadas que se actualiza conforme se modifiquen los valores anteriores.

Parámetros secundarios

Haciendo click en la ventana de Parámetros secundarios se cambia la visualización a los mismos.

Nota: No se recomienda la modificación de estos parámetros. Sin embargo, se dejan expuestos en caso de futuros estudios de modificación del algoritmo interno de análisis o búsqueda de nuevos parámetros para mejorar los resultados.

Parámetros principales	Parámetros secundarios
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 5px; padding: 2px; display: inline-block;">Predeterminado</div>	
<p>Nota: no se recomienda el cambio de estos parámetros.</p>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Detección de la placa</p> <p>Umbral de la máscara de la placa: <input style="width: 50px;" type="text" value="150"/></p> <p>Tamaño elemento estructurante para eliminar imperfecciones del fondo de la máscara de la placa: <input style="width: 50px;" type="text" value="20"/></p> </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Detección de pocillos</p> <p>Nº de pocillos por columna: <input style="width: 50px;" type="text" value="3"/> <small>Nota: si se cambia el número de pocillos el programa no está preparado en la sección "Pocillos a analizar" para el modo manual</small></p> <p>Nº de pocillos por fila: <input style="width: 50px;" type="text" value="2"/></p> </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Preprocesado</p> <p>Tamaño ventana ecualización adaptativa del histograma: <input style="width: 50px;" type="text" value="10"/></p> </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Filtrado de colonias</p> <p>Rango solidez: mín. <input style="width: 50px;" type="text" value="0.6"/> máx. <input style="width: 50px;" type="text" value="Inf"/></p> <p>Rango extentricidad: mín. <input style="width: 50px;" type="text" value="-Inf"/> máx. <input style="width: 50px;" type="text" value="0.97"/></p> </div>	

Panel Detección Placa

Parámetros correspondientes a la etapa de detección y centrado de la placa de ensayo.

- **Umbral de la máscara de placa:** umbral utilizado para obtener la primera máscara binaria de la placa
- **Tamaño del elemento estructurante para eliminar imperfecciones del fondo de la máscara de la placa:** tamaño del elemento para la limpieza de la máscara.

Panel Detección Pocillos

Definición de la cuadrícula de pocillos de la placa.

- **Número de pocillos por columna:** de arriba a abajo cuantos pocillos para experimentar se tienen en la placa actual.
- **Número de pocillos por fila:** de izquierda a derecha cuántos pocillos para experimentar se tienen en la placa actual.

Nota: Por defecto el programa está preparado para placas de 3x2 pocillos. Modificar estos parámetros deshabilita la capacidad de seleccionar los pocillos manualmente en el Panel Pocillos a analizar.

Panel Preprocesado

Parámetros correspondientes a la etapa de preprocesado del pocillo.

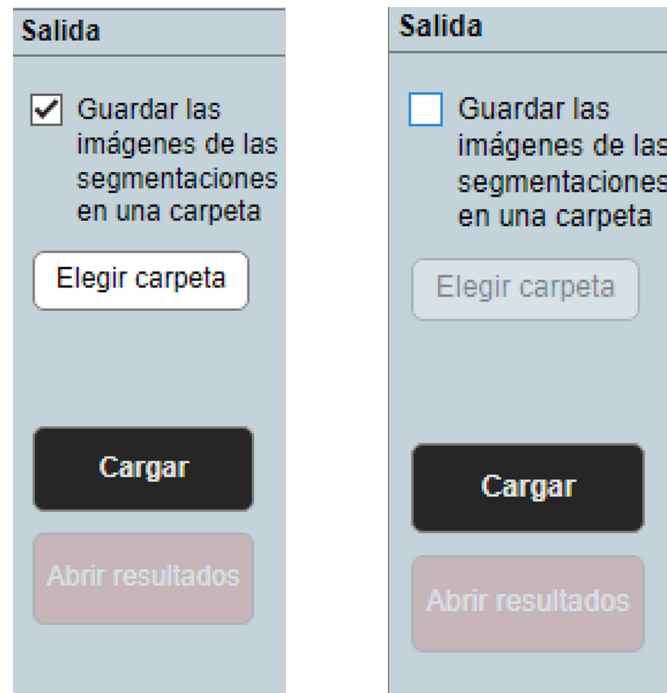
- **Tamaño de ventana de la ecualización adaptativa del histograma:** tamaño de ventana para realizar las ecualizaciones adaptativas en la etapa de mejora del contraste del pocillo. Se trata de ventanas cuadradas. Por ejemplo un tamaño de 10, sería equivalente a una ventana de 10x10 píxeles.

Panel Filtrado de colonias

Parámetros relacionados con la filtración de colonias según sus características.

- **Rango solidez:** define el rango de solidez aceptable para considerar una región como colonia.
- **Rango Circularidad:** define el rango de circularidad aceptable para considerar una región como colonia.

Panel Salida



Tras importar las imágenes y seleccionar todas las opciones anteriores es momento de comenzar el análisis. Para ello, en el Panel Salida situado al lateral izquierdo se dispone de :

CheckBox de Guardar

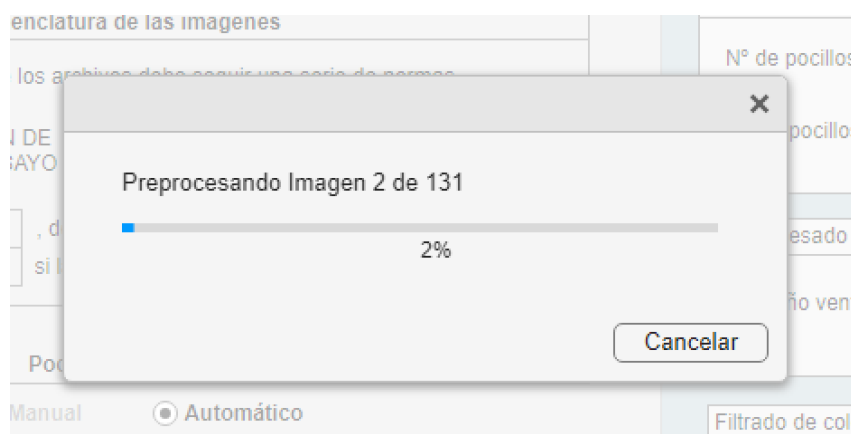
Si está activo se desea guardar las imágenes finales de las segmentaciones en una carpeta

Botón Elegir carpeta

Solo está activo cuando el CheckBox de Guardar está activo. Al hacer click sobre él se abre el explorador de archivos para elegir la carpeta correspondiente donde queremos guardar las imágenes.

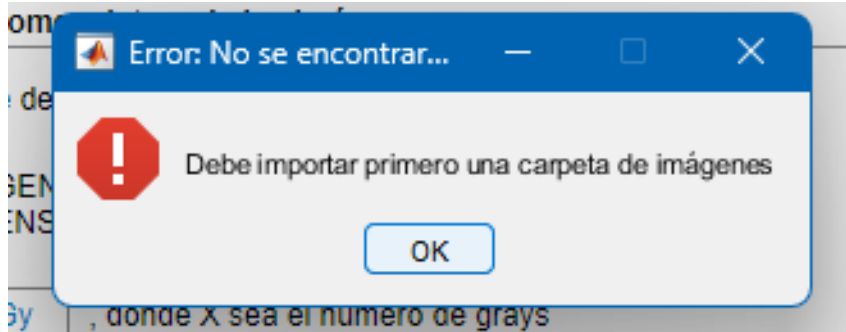
Botón Cargar

Se inicia el proceso de análisis de las imágenes importadas y con los parámetros seleccionados. Se abre una ventana de carga con el proceso actual.

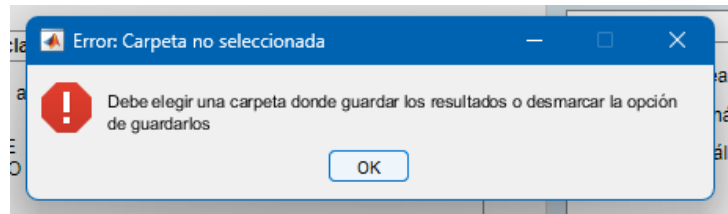


Errores comunes

Error: No se encontraron imágenes. En caso de no haber importado las imágenes previamente se mostrará un mensaje de error.



Error: Carpeta no seleccionada. En caso de tener activo el Check Box pero no haber elegido carpeta se mostrará un error.



Finalmente, tras terminar el análisis se activa el Botón Resultados. Este botón abre la ventana de Resultados, la segunda parte importante del presente programa.

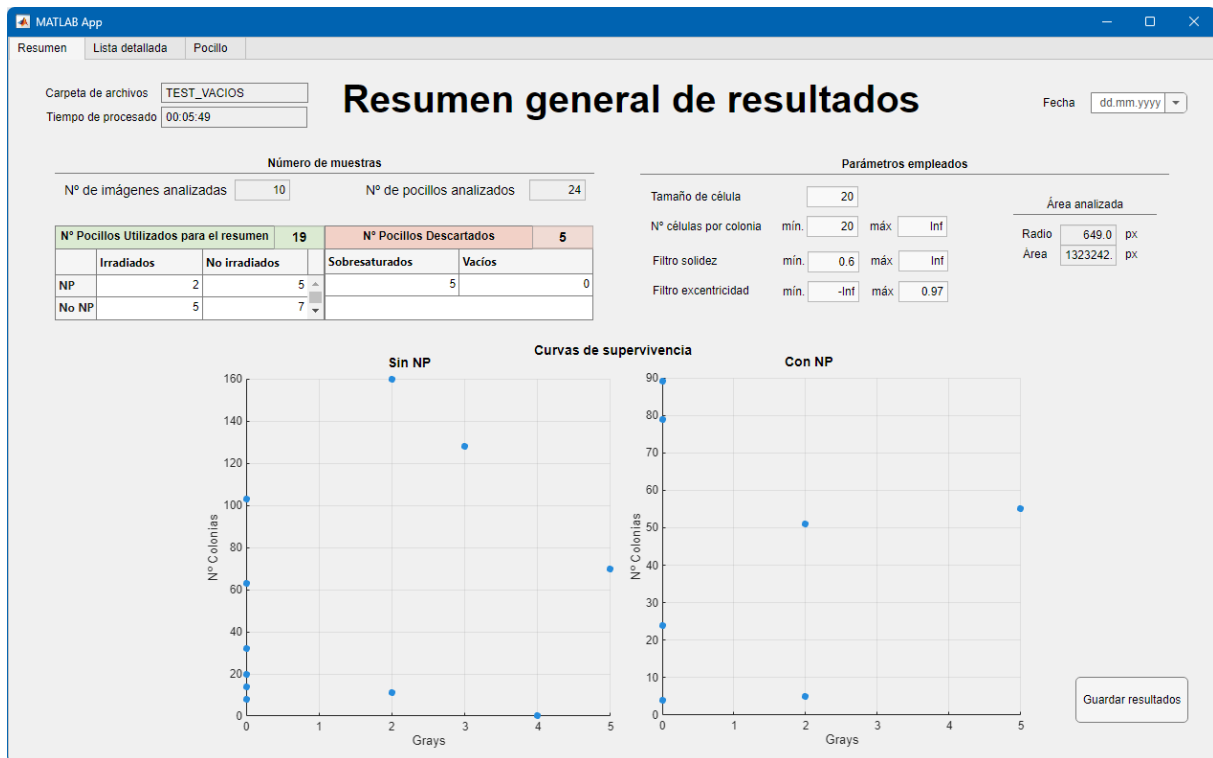
Ventana de Resultados

La aplicación o ventana de resultados está formada por tres ventanas principales:

- Ventana Resumen
- Ventana Lista Detallada
- Ventana Pocillo

Ventana Resumen

La ventana Resumen es la ventana principal que se abre en la visualización de resultados.



En la parte superior se muestra:

- Carpeta de archivos: nombre de la carpeta de la cual se han extraído y analizado las imágenes
- Tiempo de procesamiento: tiempo empleado para analizar todas las imágenes.
- Fecha: casilla modificable para introducir la fecha del análisis actual.

Panel Número de muestras

En este panel se resumen las cantidades de muestras analizadas y los diferentes tipos.

Número de muestras						
Nº de imágenes analizadas		10		Nº de pocillos analizados	24	
Nº Pocillos Utilizados para el resumen			19		Nº Pocillos Descartados	5
	Irradiados	No irradiados		Sobresaturados	Vacíos	
NP	2	5		5	0	
No NP	5	7				

- **Nº de imágenes analizadas:** número de imágenes obtenidas de la carpeta que han sido analizadas.
- **Nº de pocillos analizados:** número de pocillos totales que se han analizado
- **Tabla Nº Pocillos utilizados para el resumen:** del total de analizados se muestra el número de los que realmente se utilizan para el resumen de resultados y la graficación de las curvas. Se contabilizan también por irradiados y no irradiados con o sin nanopartículas.
- **Tabla Nº Pocillos Descartados:** número de pocillos descartados, es decir, no utilizados para el resumen de resultados. Se contabilizan también por sobresaturados y vacíos.

Se define:

- **Sobresaturados:** pocillos detectados como sobrepigmentados o contaminados, los cuales poseen una mancha de pigmentación considerable como para que no puedan ser analizados correctamente.
- **Vacíos:** en el caso de haber seleccionado Método Automático en la selección de pocillos de la ventana de Inicio, se mostrará aquí el total de vacíos que se detectaron.

Nota: Número total de pocillos descartados. El número de descartados total no siempre tiene que coincidir con la suma de sobresaturados y vacíos. Posteriormente se mostrará cómo seleccionar muestras específicas para que tampoco se incluyan en los resultados. Estas muestras pueden ser de cualquier tipo, sin necesidad de que sean sobresaturadas o vacías.

Panel Parámetros empleados

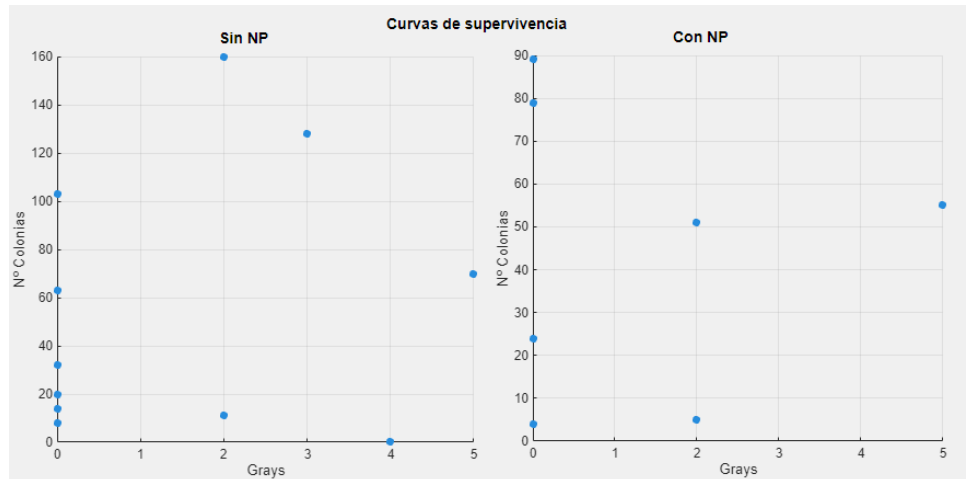
Se resumen los parámetros principales introducidos en la app de Inicio (comentados anteriormente) y el área analizada de cada pocillo según el radio o área en píxeles.

Parámetros empleados					
Tamaño de célula		<input type="text" value="20"/>			
Nº células por colonia	mín.	<input type="text" value="20"/>	máx.	<input type="text" value="Inf"/>	
Filtro solidez	mín.	<input type="text" value="0.6"/>	máx.	<input type="text" value="Inf"/>	
Filtro excentricidad	mín.	<input type="text" value="-Inf"/>	máx.	<input type="text" value="0.97"/>	
				Área analizada	
				Radio	<input type="text" value="649.0"/> px
				Área	<input type="text" value="1323242."/> px

Gráficas de supervivencia

Con los datos de cada muestra de las utilizadas para el resumen se calcula su métrica de SF (factor de supervivencia), en el caso de que estén irradiadas, ponderada adecuadamente con el SF (eficiencia de sembrado), que se obtiene a partir de las muestras de control.

Los resultados se muestran en dos gráficas, donde el eje x representa los grays y el eje y el SF. Una gráfica es para las muestras sin nanopartículas mientras que la otra para las muestras que contienen nanopartículas.



Ventana Lista Detallada

La presente ventana tiene como objetivo mostrar todos los resultados relevantes de todas las muestras de forma visualmente rápida.

Resumen
Lista detallada
Pocillo

Lista detallada de los pocillos

ID	Nº Colonias	Gy	NP	Vacio	Saturado	Utilizar	Área media	Área total	% Área	Nombre de la im:
1_A_2G_P1	11	2	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	414.8182	4563	0.3448	1_A_2G043.tif
1_A_2G_P6	32	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	596.2188	19079	1.4419	1_A_2G043.tif
1_A_5GNP_P1	55	5	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.1855e+03	65203	4.9278	1_A_5GNP028.tif
1_A_5GNP_P6	24	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	542.9583	13031	0.9848	1_A_5GNP028.tif
1_B_5G_P1	70	5	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	739.0714	51735	3.9098	1_B_5G040.tif
1_B_5G_P6	8	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	381.3750	3051	0.2306	1_B_5G040.tif
1_C_3G_P1	116	3	0	0	1	<input type="checkbox"/>	1.9963e+03	231572	17.5006	1_C_3G032.tif
1_C_3G_P6	14	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	674.2143	9439	0.7133	1_C_3G032.tif
1_C_6G_P1	71	6	0	0	1	<input type="checkbox"/>	2.1714e+03	154166	11.6514	1_C_6G035.tif
1_C_6G_P6	20	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	454.9500	9099	0.6877	1_C_6G035.tif
2_B_4G_P1	0	4	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	NaN	0	0	2_B_4G135.tif
2_B_4G_P6	8	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	662.5000	5300	0.4006	2_B_4G135.tif
2_C_3G_P1	128	3	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2.5055e+03	320703	24.2377	2_C_3G128.tif
2_C_3G_P6	63	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.9365e+03	121998	9.2202	2_C_3G128.tif
3_C_2G_P1	160	2	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	987.6125	158018	11.9425	3_C_2G055.tif
3_C_2G_P6	103	0	0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1.1689e+03	120394	9.0990	3_C_2G055.tif
4_B_2GNP_P1	5	2	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	547	2735	0.2067	4_B_2GNP087.tif
4_B_2GNP_P6	4	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	471	1884	0.1424	4_B_2GNP087.tif
CONTROL2_...	51	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2.5544e+03	130275	9.8458	CONTROL2_500.tif
CONTROL2_...	79	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3.2637e+03	257833	19.4854	CONTROL2_500.tif
CONTROL2_...	56	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	4.9129e+03	275120	20.7927	CONTROL2_500.tif
CONTROL2_...	49	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	5.9287e+03	290505	21.9541	CONTROL2_500.tif
CONTROL2_...	89	0	1	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3.6653e+03	326215	24.6529	CONTROL2_500.tif
CONTROL2_...	75	0	1	0	1	<input type="checkbox"/>	5.5452e+03	415893	31.4319	CONTROL2_500.tif

A la izquierda se muestra la tabla principal y a la derecha la previsualización del pocillo actual marcado.

La previsualización consta de dos imágenes: el pocillo original y la segmentación final obtenida.

La tabla general se organiza de la siguiente forma:

- Filas: representan las diferentes muestras

- Columnas: representan las diferentes características o propiedades calculadas de cada muestra. Se tiene:
 - **ID**: identificador de la muestra.
 - **Nº de colonias**: número de colonias detectadas en la muestra
 - **Gy**: valor de radiación en grays de la muestra
 - **NP**: determina si la muestra contenía nanopartículas o no. Siendo 1 cuando contiene nanopartículas y 0 cuando no.
 - **Vacío**: determina si el pocillo se ha detectado como vacío. Siendo 1 cuando se encuentra vacío 0 cuando no. En caso positivo se resalta la casilla.
 - **Saturado**: determina si el pocillo se ha detectado como saturado. Siendo 1 cuando se encuentra saturado y 0 cuando no. En caso positivo se resalta la casilla.
 - **Utilizar**: checkbox marcable y desmarcable. Indica si la muestra se va a utilizar para el resumen de resultados. Si se marca se utilizará y si está desmarcada no se va a utilizar.
 - **Área media**: área media de las colonias detectadas.
 - **Área total**: suma de todas las áreas de las colonias detectadas.
 - **% Área**: porcentaje de área de colonias en el total de área analizada (área de la zona del pocillo analizada).
 - **Nombre de la imagen**: nombre original del archivo de imagen de donde corresponde la muestra.
 - **Índice**: número del pocillo de la muestra actual. Siendo este el valor que se obtiene al numerar los pocillos en la placa de izquierda a derecha y de arriba a abajo.

Acciones propuestas

- Filtros de columnas: las diferentes columnas se pueden organizar de mayor a menor.
- Orden de las columnas: las columnas son arrastrables y se pueden ordenar de izquierda a derecha según sea más conveniente.
- Selección de muestra: realizando doble click en la columna ID de la muestra correspondiente se destaca la fila actual, se actualizan las figuras de previsualización y se actualiza la ventana Pocillo para mostrar el actual seleccionado.

Ventana Pocillo

La función de esta ventana es visualizar e inspeccionar una muestra en particular.

En la parte superior se encuentra un resumen de las características del pocillo, similares a la lista de la tabla de la ventana Lista Detallada. En la parte inferior se encuentra una serie de pestañas para visualizar diferentes resultados.

Resumen Lista detallada Pocillo

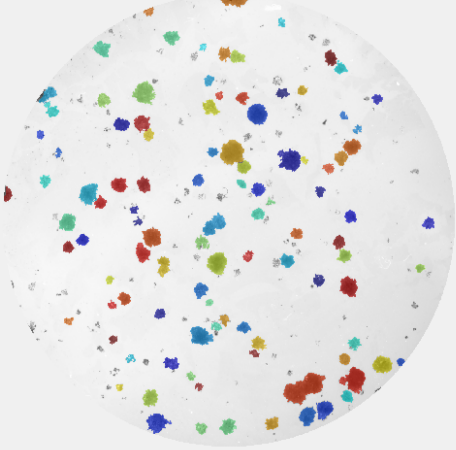
Pocillo 3_C_2G_P6

Información general

ID	Imagen	Gy	NP	Vacío	Saturado	Utilizar	Nº colonias
3_C_2G_P6	3_C_2G055.tif		0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	103

Conteo de...
Análisis de...
Preprocesado

Colonias encontradas



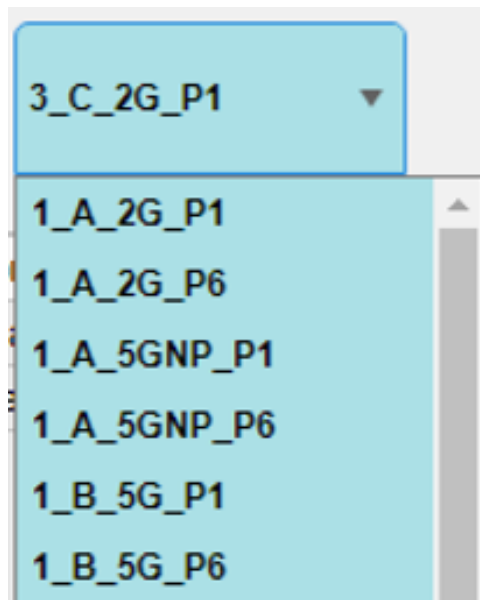
Nº	Area	Circularidad	Excentricidad	Solidez
57	2235	0.6545	0.3665	0.8859
58	1653	0.5642	0.5210	0.8769
59	489	0.5578	0.7143	0.8640
60	739	0.7723	0.5375	0.9237
61	1385	0.6760	0.4590	0.8964
62	462	0.6077	0.5644	0.8446
63	2524	0.6142	0.6845	0.8785
64	899	0.7020	0.5213	0.9202
65	1293	0.6008	0.5202	0.8713
66	810	0.7281	0.4761	0.8843
67	350	0.5302	0.6525	0.8578
68	1427	0.5262	0.6802	0.8292
69	677	0.7090	0.6287	0.8955
70	351	0.7946	0.5522	0.9335
71	610	0.7838	0.5428	0.9104
72	2731	0.6859	0.4734	0.9286
73	398	0.6124	0.5539	0.8671
74	1501	0.5425	0.5181	0.8514
75	935	0.5428	0.3114	0.8618
76	945	0.6457	0.6306	0.8686
77	507	0.7766	0.7924	0.9354
78	663	0.6408	0.6658	0.8828
79	2699	0.7593	0.3372	0.9359

Visualizar Visualizar el índice de colonia Volver a la imagen de segmentación global Volver

Descargar informe

DropDown Elección del Pocillo

En la parte superior izquierda se encuentra un componente del tipo DropDown. Al presionarlo se abre una lista con todos los IDs de los pocillos y haciendo click sobre cualquiera se actualiza la presente ventana a la información del mismo.



Pestaña Conteo de Colonias

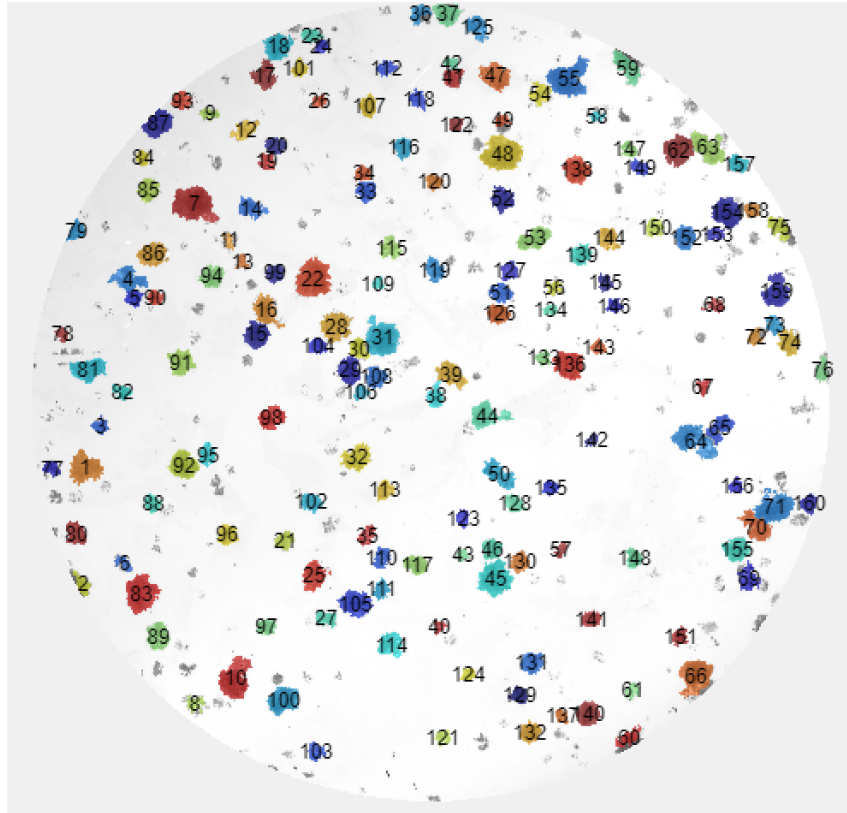
A la izquierda se encuentra imagen de segmentación obtenida para el análisis de colonias.

A la derecha una tabla con las propiedades de las colonias. Esta tabla se organiza de la siguiente forma:

- Filas: representan las diferentes colonias
- Columnas: representan las diferentes características o propiedades calculadas de cada colonia. Se tiene:
 - **Nº** : número indicador de la colonia actual.
 - **Área (px)**: área de la colonia calculada como el número de píxeles que pertenecen a la misma.
 - **Circularidad**: medida de cuán circular es la colonia, donde un valor de 1 indica una forma perfectamente circular y 0 es nada circular.
 - **Excentricidad**: Razón entre la distancia focal y el eje mayor de la elipse que contiene la región, variando entre 0 (círculo) y 1 (línea).
 - **Solidez**: Relación entre el área de la colonia y el área de su polígono convexo. Las colonias muy irregulares tendrán una solidez baja. También se trata de un valor entre 0 y 1.
 - **Subdividir colonia en**: opción para determinar cuántas colonias hay en la colonia actual. Por defecto el valor es 1 pero se puede aumentar hasta el valor deseado o disminuir a 0.
 - **Perímetro (px)**: Longitud del borde de la colonia.
 - **Long. Eje Mayor (px)**: Longitud del eje mayor de la elipse que tiene la colonia.
 - **Long. Eje Menor (px)**: Longitud del eje menor de la elipse que tiene la colonia.
 - **Área Convexa (px)**: área del polígono convexo que engloba la colonia.
 - **Orientación (º)**: ángulo entre el eje mayor de la elipse y el eje horizontal.
 - **Diámetro equivalente (px)**: diámetro del círculo con la misma área que la colonia.

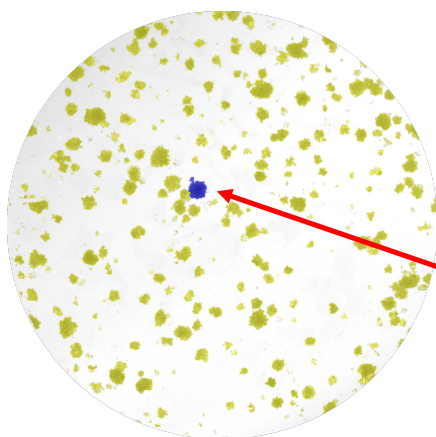
En la parte inferior se encuentran dos botones:

- Botón Visualizar: cuando está activo se muestra en la imagen de la segmentación el índice o número de cada colonia para que puedan ser fácilmente identificables.
- Botón Volver: cuando se presiona se vuelve a la imagen de segmentación global, en el caso de que la imagen anterior fuese la de una región en específico.



Acciones propuestas

- Filtros de columnas: las diferentes columnas se pueden organizar de mayor a menor.
- de las columnas: las columnas son arrastrables y se pueden ordenar de izquierda a derecha según sea más conveniente.
- Selección de muestra: realizando doble click en la columna N^o de la región correspondiente se destaca la fila actual, se actualizan las Figura de la segmentación para mostrar destacada la región actual.



:: N ^o	:: Area	:: Circularidad	:: Excentricidad	:: Solidez	:: s
27	665	0.5518	0.7585	0.8041	
28	1799	0.4287	0.2967	0.8333	
29	1298	0.5955	0.6185	0.8989	
30	759	0.6603	0.6781	0.8867	
31	2531	0.4582	0.4795	0.8454	
32	1463	0.4577	0.6628	0.8284	
33	854	0.7439	0.3643	0.8850	
34	542	0.6473	0.4744	0.8544	

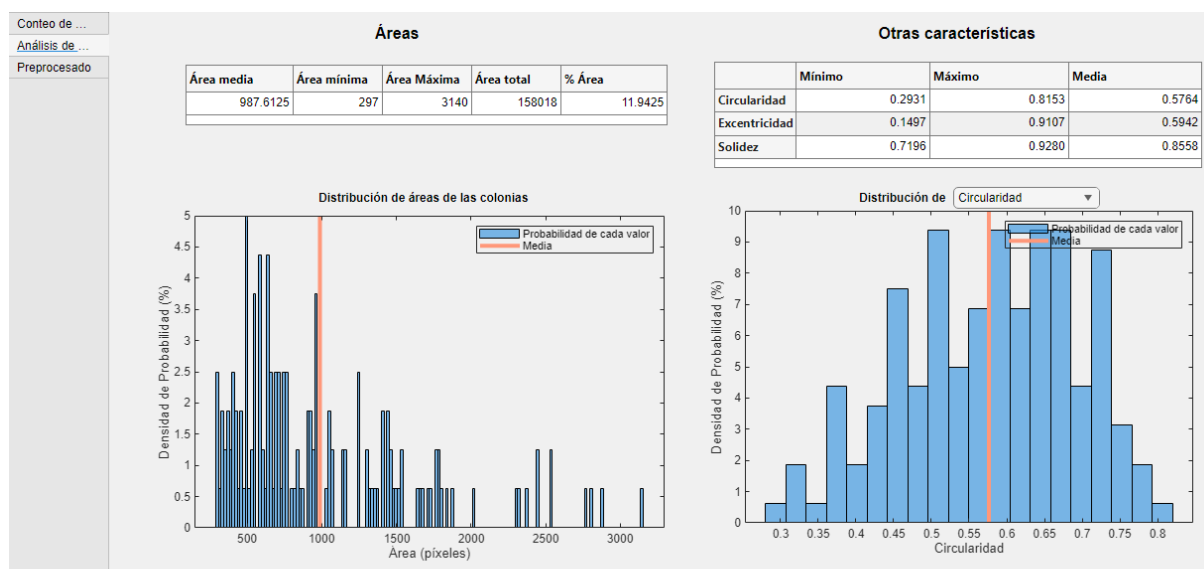
- Modificación Subdividir Columna en: esta casilla se puede modificar para corregir colonias solapadas que no han sido correctamente detectadas como varias. Se selecciona la región

pertinente y se modifica esta columna al número de colonias reales que posee. Los resultados del número de colonias total se actualizan en toda la App y se recalculan las curvas de supervivencia.

Subdivir colonia en		Subdivir colonia en	
1		1	
1		1	
1		1	
1	Nº colonias	1	Nº colonias
1	160	2	161

Pestaña Análisis de Resultados

En esta pestaña se muestra la distribución y resumen de las características más importantes para todas las colonias de una muestra.



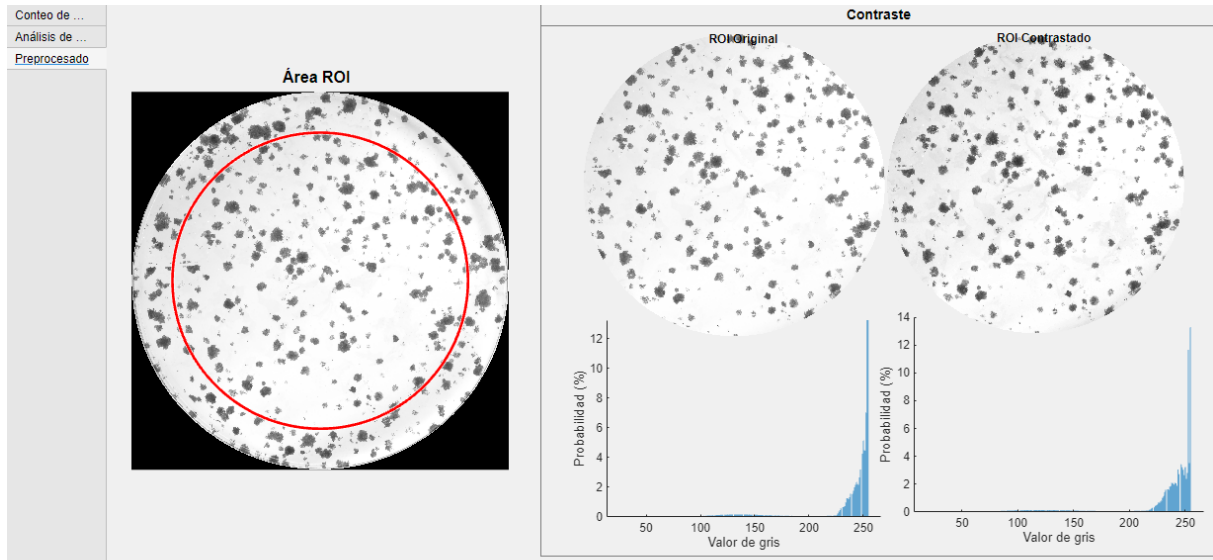
A la izquierda se muestran los resultados para las áreas y a la derecha para circularidad, excentricidad y solidez. Se muestran para cada una:

- El valor mínimo
- El valor máximo
- El valor medio

Además, se añade en la zona inferior las gráficas de distribución de los resultados. La de la izquierda corresponde a la de la distribución de las áreas de las colonias y la de la derecha se modifica desde el DropDown (botón que al pulsarlo despliega una lista) para elegir qué propiedades de las otras tres se quiere mostrar.

Pestaña Preprocesado

Finalmente, la pestaña preprocesado contiene gráficos de la etapa de preprocesamiento de las muestras.



Se visualiza a la izquierda el pocillo original con el área ROI seleccionada (área analizada); y a la derecha la diferencia entre la ROI original y la contrastada con sus respectivos histogramas.