



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**DISEÑO Y DESARROLLO DE SISTEMAS DE
IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE
GLAUCOMA INDUCIDO APLICADOS A
IMÁGENES OCT DE RETINA**

AUTORA: Laura Sánchez-Luis Jiménez

TUTORA: Valery Naranjo Ornedo

COTUTORA: Rocío del Amor del Amor

CURSO ACADÉMICO: 2019-2020

AGRADECIMIENTOS

“A mi familia,
por su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos.

A mi tutora y cotutora, especialmente a Rocío,
por su cariño, paciencia, comprensión
y por todo lo que he aprendido.

A los que de alguna forma me han acompañado en esta etapa.

A todos, muchas gracias.”

RESUMEN

Resumen:

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de diagnóstico por imagen no invasiva basada en el principio de interferometría de baja coherencia. La OCT es ampliamente utilizada en oftalmología ya que captura la estructura interna de la retina y permite monitorizar su posible daño. Un ejemplo de su uso en oftalmología se encuentra en el estudio del glaucoma. El glaucoma es la principal causa de ceguera en todo el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por causar un daño estructural y funcional progresivo en la cabeza del nervio óptico retiniano, lo que se traduce en la pérdida de espesor de algunas de las capas retinianas, entre ellas la capa de fibras del nervio óptico (RNFL), que es el objeto de estudio en este trabajo. El estudio del glaucoma en modelos animales es fundamental para entender su sintomatología y estudiar los posibles fármacos que pueden ser efectivos en esta enfermedad. Diversas técnicas se han utilizado para la estimulación del glaucoma en modelos animales. Entre ellas destaca la inyección de endotelina-1 (ET-1) y la de N-metil-d-aspartato, comúnmente denominada como NMDA. El principal objetivo de este TFG reside en el desarrollo de algoritmos que permitan identificar el daño retiniano causado por los fármacos ET-1 y NMDA en modelos de roedores. De esta forma, se identificará qué fármaco es más efectivo para la estimulación del glaucoma y, mediante algoritmos de *machine learning*, se llevará a cabo una distinción entre sujetos control y aquellos a los que se le ha inducido glaucoma. Para ello, se partirá de varias bases de datos de retina de roedores que serán segmentadas con métodos automáticos con el objetivo de disponer la capa RNFL de la retina para su posterior análisis.

Palabras Clave: tomografía de coherencia óptica, glaucoma, capa de fibras del nervio óptico, endotelina-1, N-metil-d-aspartato

RESUM

Resum:

La tomografia de coherència òptica (OCT) és una tècnica de diagnòstic per imatge no invasiva basada en el principi de interferometria de baixa coherència. La OCT és àmpliament utilitzada en oftalmologia ja que captura l'estructura interna de la retina i permet monitorar el seu possible mal. Un exemple del seu ús en oftalmologia es troba en l'estudi del glaucoma. El glaucoma és la principal causa de ceguesa a tot el món. Aquesta malaltia es caracteritza per causar un mal estructural i funcional progressiu al cap del nervi òptic retiniano, la qual cosa es tradueix en la pèrdua de grossària d'algunes de les capes retinianas, entre elles la capa de fibres del nervi òptic (RNFL), que és l'objecte d'estudi en aquest treball. L'estudi del glaucoma en models animals és fonamental per a entendre la seua simptomatologia i estudiar els possibles fàrmacs que poden ser efectius en aquesta malaltia. Diverses tècniques s'han utilitzat per a l'estimulació del glaucoma en models animals. Entre elles destaca la injecció de endotelina-1 (ET-1) i la de N-metil-d-aspartic, comunament denominada com NMDA. El principal objectiu d'aquest TFG resideix en el desenvolupament d'algorismes que permeten identificar el mal retiniano causat pels fàrmacs ET-1 i NMDA en models de rosegadors. D'aquesta forma, s'identificarà quin fàrmac és més efectiu per a l'estimulació del glaucoma i, mitjançant algorismes de *machine learning*, es durà a terme una distinció entre subjectes control i aquells als quals se li ha induït glaucoma. Per a això, es partirà de diverses bases de dades de retina de rosegadors que seran segmentades amb mètodes automàtics amb l'objectiu de disposar la capa RNFL de la retina per a la seua posterior anàlisi.

Paraules clau: tomografia de coherència òptica, glaucoma, capa de fibres del nervi òptic, endotelina-1, N-metil-d-aspartic

ABSTRACT

Abstract:

Optical coherence tomography (OCT) is a non-invasive imaging technique based on the principle of low coherence interferometry. OCT is widely used in ophthalmology since it captures the internal structure of the retina and allows monitoring of its possible damage. An example of its use in ophthalmology is found in the study of glaucoma. Glaucoma is the leading cause of blindness worldwide. This disease is characterized by causing progressive structural and functional damage to the head of the retinal optic nerve, which results in the loss of thickness of some of the retinal layers, including the retinal nerve fiber layer (RNFL), which is the object of study in this project. The study of glaucoma in animal models is essential to understand its symptoms and to study the possible drugs that may be effective in this disease. Various techniques have been used for the stimulation of glaucoma in animal models. Notable among these is the injection of endothelin – 1 (ET-1) and that of N-methyl-d-aspartic acid, commonly called NMDA. The main objective of this Bachelor Thesis lies in the development of algorithms to identify retinal damage caused by the ET-1 and NMDA drugs in rodent models. In this way, we will identify which drug is most effective in stimulating glaucoma and, through *machine learning* algorithms, a distinction will be made between control subjects and those who have been induced glaucoma. To do this, several rodent retina databases will be used, which will be segmented with automatic methods in order to arrange the RNFL layer of the retina for subsequent analysis.

Keywords: optical coherence tomography, glaucoma, retinal nerve fiber layer, endothelin-1, N-methyl-d-aspartic

LISTADO DE ABREVIATURAS PRINCIPALES

ET-1	Endothelin-1 (Endotelina-1)
GCL	Ganglion Cell Layer (Capa de células ganglionares)
GPAA	Glaucoma Primario de Ángulo Abierto
ILM	Inner Limiting Membrane (Membrana limitante interna)
INL	Inner Nuclear Layer (Membrana nuclear interna)
IPL	Inner Plexiform Layer (Capa plexiforme interna)
NMDA	N-methyl-d-aspartate (N-metil-D-aspártico)
OCT	Optical Coherence Tomography (Tomografía de coherencia óptica)
OLM	Outer Limiting Membrane (Membrana limitante externa)
ONL	Outer Nuclear Layer (Capa nuclear externa)
OPL	Outer Plexiform Layer (Capa plexiforme externa)
PIO	Presión Intraocular
RNFL	Retinal Nerve Fiber Layer (Capa de fibras del nervio óptico)
RPE	Retinal Pigment Epithelium (Epitelio pigmentario de la retina)

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras anatómicas más importantes del globo ocular. Imagen adaptada de [14].	8
Figura 2. Capas externas del globo ocular y partes que las forman. (a) Capa externa, (b) capa media o úvea, (c) capa interna.	9
Figura 3. Fondo de ojo humano izquierdo. Imagen adaptada de [15].	10
Figura 4. Esquema de las diferentes capas de la retina, así como los distintos tipos de células presentes. Imagen adaptada de [16].	11
Figura 5. Estructuras más importantes en la circulación del humor acuoso en el interior del ojo (canal de Schlemm, malla trabecular, ángulo iridocorneal). Imagen adaptada de [17].	12
Figura 6. Esquema del funcionamiento del interferómetro de Michelson. Imagen adaptada de [26].	15
Figura 7. Estructura de un volumen OCT. Imagen adaptada de [28].	16
Figura 8. Esquema básico del funcionamiento del TD-OCT. Imagen adaptada de [29].	17
Figura 9. Esquema básico del funcionamiento del SD-OCT. Imagen adaptada de [29].	18
Figura 10. Imagen OCT de la estructura retiniana segmentada por capas. Recuperada de [31].	19
Figura 11. Posiciones en la que se han adquirido las imágenes de la base de datos de roedores.	23
Figura 12. Imagen OCT de la primera base de datos de ET-1. (a) Imagen OCT. (b) Imagen OCT con las segmentaciones obtenidas mediante el método de deep learning desarrollado en [42].	25
Figura 13. Evolución del grosor de la RNFL. (a) Evolución correspondiente al roedor C23 GP1A A2 a la primera entrega de ET-1. (b) Evolución correspondiente al roedor Rat009 de la segunda entrega de ET-1.	26
Figura 14. Imagen de la retina del volumen NMDA con la segmentación automática de la RNFL.	28
Figura 15. Aplicación desarrollada para corregir la segmentación automática de imágenes OCT.	28
Figura 16. Modo de actuación para modificar la segmentación automática. (a) imagen segmentada automáticamente. (b) capas que aparecen como líneas discontinuas. (c) puntos modificados manualmente para ajustarlos al grosor de la RNFL. (d) nueva segmentación de la imagen.	29
Figura 17. Imagen OCT de la segmentación modificada.	30
Figura 18. Segmentación OCT de imagen de la base de datos de NMDA. En (b) se visualizan las distancias de un punto de la ILM a varios puntos de la GCL, donde la distancia marcada en verde es la distancia mínima.	31
Figura 19. Esquema modelo análisis ANOVA con medidas repetidas. La variable ‘A’ representa la variable dependiente (grosor).	32
Figura 20. Arquitectura del perceptrón multicapa. E corresponde a la señal de entrada, O a la señal de la capa oculta, S a la señal de salida y w a los pesos de las conexiones neuronales.	35

Figura 21. Esquema perceptrón multicapa utilizado. (a) esquema del perceptrón en la base de datos de ET-1, donde 1024 corresponde al tamaño de la curva en cada imagen. (b) esquema del perceptrón en la base de datos de NMDA, en la que 101 corresponde al tamaño de cada curva tras la reducción al tamaño mínimo.....	36
Figura 22. Evolución del grosor de la RNFL en el tiempo de la primera entrega de la base de datos de ET-1.....	42
Figura 23. Evolución del grosor de la RNFL en el tiempo de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.....	44

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Número de imágenes por rata y por fecha de adquisición de la primera entrega de la base de datos de ET-1.	22
Tabla 2. Número de imágenes por rata y por fecha de adquisición de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.....	23
Tabla 3. Dimensiones y número de imágenes por rata y tiempo de adquisición de los volúmenes de ratas, antes y después de inyectarles NMDA.	24
Tabla 4. Media del grosor de la RNFL en la primera entrega de datos de ET-1 por roedor y por fecha de adquisición.....	26
Tabla 5. Media del grosor de la RNFL en la segunda entrega de datos de ET-1 por roedor y por fecha de adquisición.....	27
Tabla 6. Número de imágenes por rata y tiempo de adquisición de los volúmenes de ratas, antes y después de inyectarles NMDA.	30
Tabla 7. Media del grosor de la RNFL del conjunto de imágenes de la base de datos de NMDA por roedor y momento de adquisición de las imágenes.	31
Tabla 8. Modelo análisis ANOVA de medidas repetidas. J representa el número total de medidas en el tiempo y K el número total de sujetos en el estudio.....	33
Tabla 9. Resultados de la prueba de esfericidad de Mauchly para las dos entregas de la base de datos de ET-1.....	40
Tabla 10. Conjunto de medias de la RNFL de la primera entrega de la base de datos de ET-1 a analizar.	40
Tabla 11. Comprobación de la diferencia significativa en las poblaciones de la primera entrega de la base de datos de ET-1.....	41
Tabla 12. Significación por parejas de poblaciones de la primera entrega de la base de datos de ET-1.....	41
Tabla 13. Conjunto de medias de la RNFL de la segunda entrega de la base de datos de ET-1 a analizar.	43
Tabla 14. Comprobación de la diferencia significativa en las poblaciones de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.....	43
Tabla 15. Significación por parejas de poblaciones de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.....	43
Tabla 16. Conjunto de medias de la RNFL la base de datos de NMDA.	44
Tabla 17. Resultado análisis estadístico T-Test para la base de datos de NMDA.	44
Tabla 18. Distribución de la matriz de confusión.	46
Tabla 19. Análisis de la validez de la red neuronal.....	47

ÍNDICE GENERAL

I. Memoria

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Motivación y descripción del problema	4
1.2 Marco del proyecto.....	4
1.3 Objetivos del proyecto	5
1.4 Guía de la memoria	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Ojo.....	8
2.2 Glaucoma	12
2.3 Inducción del glaucoma en roedores	13
2.4 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT).....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1. Material	22
3.2 Métodos.....	25
4. RESULTADOS	39
4.1. Análisis estadístico del grosor RNFL con SPSS Statistics.....	40
4.2. Análisis resultados de la red neuronal	45
5. CONCLUSIONES	49
5.1. Conclusiones	50
5.2. Limitaciones y líneas futuras.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	53

II. Presupuesto

I. MEMORIA

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Índice de contenidos

1.1 Motivación y descripción del problema	4
1.2 Marco del proyecto.....	4
1.3 Objetivos del proyecto	5
1.4 Guía de la memoria	6

1.1 Motivación y descripción del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de 2200 millones de personas en todo el mundo tienen algún tipo de problema ocular, lo que supone un 28% de la población [1].

Entre las enfermedades oftalmológicas más frecuentes se encuentra el glaucoma, que es el segundo motivo de ceguera a nivel mundial [2]. Esto demuestra la importancia del estudio continuo de esta enfermedad, sus posibles tratamientos, así como la investigación para realizar un diagnóstico temprano ya que, a pesar de que no puede repararse el daño, se puede frenar su evolución.

El glaucoma es una enfermedad crónica que actualmente tiene tratamiento. Aun así, el estudio de nuevos fármacos es necesario para mejorar la calidad de vida de los pacientes, en el sentido de encontrar un fármaco que tenga mejor adherencia, poco o ningún efecto adverso, con las menores contraindicaciones posibles y con rapidez de actuación [3]. En este contexto surge la experimentación animal, que tiene como objetivo la creación de conocimiento científico que posibilite una mejora en la calidad de vida humana [4]. En este caso, la experimentación con roedores es necesaria en el estudio del glaucoma, ya que permite analizar la evolución de la retina dañada en un organismo vivo para desarrollar terapias farmacológicas nuevas. Por tanto, la experimentación animal es esencial ya que estos ensayos no pueden realizarse directamente en humanos por cuestiones éticas y de salud [5].

La Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) es una herramienta imprescindible en el ámbito clínico y de la investigación, que ha revolucionado el estudio por imagen en el área de la oftalmología [6]. La OCT es una técnica de diagnóstico no invasiva, que mediante luz infrarroja penetra en las diferentes capas de tejidos como la retina, obteniendo imágenes OCT de su estructura. Estas imágenes son esenciales para la investigación de enfermedades oftalmológicas, así como para que los especialistas, tras su análisis, puedan realizar un diagnóstico precoz.

Por todo lo descrito anteriormente, en este trabajo se pretende diseñar y desarrollar sistemas de identificación del daño retiniano en imágenes OCT. Para ello, se ha inducido glaucoma en roedores mediante la utilización de los fármacos endotelina-1 (ET-1) y N-methyl-d-aspartate (NMDA). De este modo, se busca identificar qué fármaco es más efectivo para la estimulación del glaucoma en un modelo animal para posteriormente, estudiar nuevas terapias que aporten valor añadido a esta enfermedad oftalmológica.

1.2 Marco del proyecto

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto “*Glaucoma – Advanced, Label-free High resolution Automated OCT Diagnostics*” (GALAHAD). Se trata de un proyecto de investigación coordinado por Andrew Robertson, organizado por *Gooch and Housego (Torquay)* y en el que coopera CVBLab (Computer Vision and Behaviour Analysis Lab), un grupo de investigación de la Universidad Politécnica de Valencia. Este proyecto está subvencionado por el programa de la Unión Europea Horizon 2020, que financia proyectos de investigación e innovación de diferentes ámbitos dentro del entorno europeo, para el periodo 2016-2020 [7].

El objetivo de GALAHAD reside en mejorar los sistemas de diagnóstico que se utilizan hoy en día en la detección del glaucoma. Actualmente, para diagnosticar esta enfermedad es necesario medir la

presión intraocular, realizar pruebas de campo visual y detectar daño estructural tanto en la cabeza del nervio óptico como en las fibras nerviosas de la retina. Esta última prueba no puede realizarse con precisión debido a la poca resolución de las tecnologías disponibles, lo que da lugar a una gran cantidad de falsos positivos o falsos negativos. Además, la OCT es el candidato ideal para lidiar con los problemas mencionados, sin embargo, la resolución axial de los sistemas comerciales actuales es de 3-5 μm , frente a la resolución requerida de 1 μm .

Así pues, el propósito de este proyecto es desarrollar un sistema de diagnóstico de OCT compacto, de alta resolución y de fácil manejo [8]. Este sistema pretende incorporar, como uno de sus elementos innovadores, algoritmos automatizados que permiten cribar el glaucoma. Por ello, una vez se desarrolle, se podrán reducir los falsos positivos y falsos negativos, generando un diagnóstico mucho más fiable que el actual.

Dado que la función del grupo de investigación CVBLab dentro de este proyecto es diseñar y desarrollar algoritmos para emplearlos en imágenes OCT, el objetivo de este trabajo es desarrollar sistemas de identificación y clasificación de glaucoma inducido aplicados a imágenes OCT de retina de roedores.

1.3 Objetivos del proyecto

El objetivo principal del trabajo consiste en desarrollar algoritmos que permitan identificar el daño retiniano en roedores causado por los fármacos ET-1 y NMDA, a partir del análisis de los grosores de las principales estructuras retinianas en imágenes OCT, y evaluar cuál de estos es más efectivo para la inducción del glaucoma.

Para conseguir este objetivo general, se deben seguir los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener y adecuar las imágenes OCT que son objeto de estudio para poder utilizarlas.
2. Implementar una aplicación para modificar manualmente la segmentación de las estructuras objetivo en las imágenes OCT de interés.
3. Calcular el grosor de las estructuras retinianas bajo estudio.
4. Realizar un análisis estadístico de las bases de datos retinianas para analizar si hay cambios significativos en el grosor de las estructuras objetivo antes y después de inyectar cada uno de los fármacos.
5. Realizar una partición de datos para garantizar la robustez de los modelos desarrollados. Esta partición no puede ser aleatoria, sino que tiene que desarrollarse para que los grosores de las imágenes que corresponden a un roedor no se empleen para entrenar y validar en la misma iteración. De este modo se asegura la fiabilidad del modelo.
6. Desarrollar un sistema de clasificación basado en redes neuronales que permita identificar el glaucoma inducido en roedores.
7. Evaluar y sacar conclusiones de los resultados obtenidos comparándolos con aquellos presentes en el estado del arte en la manera que sea posible.
8. Identificar y describir los problemas y limitaciones encontrados y, proponer posibles mejoras para investigaciones futuras.

1.4 Guía de la memoria

En el capítulo 2 se efectúa una revisión bibliográfica general de los aspectos anatómicos y tecnológicos relacionados con este trabajo. En primer lugar, se explica la anatomía del ojo, detallando las diferentes capas que conforman la retina, pues es el tejido bajo estudio en este trabajo. A continuación, se expone el glaucoma como enfermedad oftalmológica, así como su posible tratamiento en ratas. Por último, se explican los fundamentos de la técnica de diagnóstico utilizada, la OCT.

En el capítulo 3 se menciona tanto el material como la metodología empleada para desarrollar algoritmos que permitan identificar el daño retiniano causado por los fármacos ET-1 y NMDA.

En el capítulo 4 se muestran los resultados obtenidos con las técnicas implementadas para la identificación del daño en la retina.

En el capítulo 5 se recogen las conclusiones más importantes que se han obtenido del trabajo, así como las posibles líneas futuras dentro del marco del proyecto.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

Índice de contenidos

2.1 Ojo.....	8
2.2 Glaucoma	12
2.3 Inducción del glaucoma en roedores	13
2.4 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT).....	14
2.4.1. Principios de OCT	15
2.4.2. Técnicas de OCT actuales	16
2.4.3. Aplicación clínica.....	18

2.1 Ojo

El sistema visual humano es el encargado de construir imágenes momentáneas tridimensionales de multitud de tonalidades, mediante la transformación de la energía lumínica, que viaja desde la córnea hasta la retina, a impulsos nerviosos que se transmiten hasta la corteza visual.

El ojo está formado por el párpado, el globo ocular, los músculos oculares externos y el aparato lagrimal. El globo ocular tiene una forma esférica, rota en su cavidad orbitaria y que mantiene su colocación con la ayuda de los músculos externos [13]. Su peso y su diámetro antero-posterior, en condiciones normales, es de 7,5 gramos y 24 mm, respectivamente [9]. En la Figura 1, se muestran las estructuras anatómicas más importantes del globo ocular.

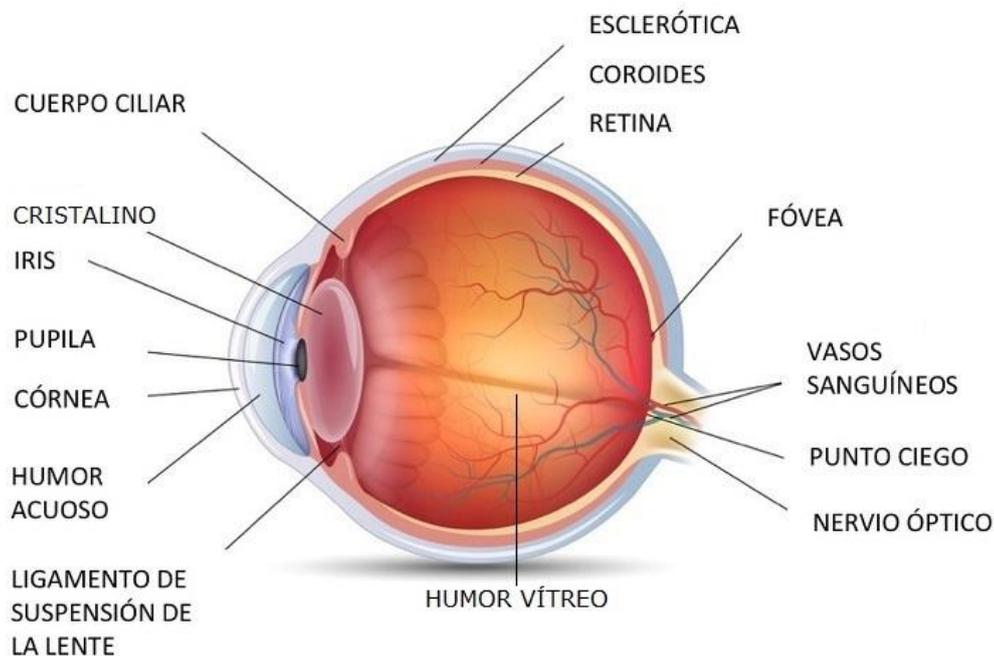


Figura 1. Estructuras anatómicas más importantes del globo ocular. Imagen adaptada de [14].

El interior del globo ocular se compone de la cámara anterior, de la cámara posterior y de la cámara vítrea. Estas estructuras están delimitadas por la estructura externa del globo ocular, y albergan diferentes líquidos. La cámara anterior se encuentra entre la córnea y el iris. La cámara posterior, que es una lente biconvexa de +22 dioptrías, se extiende desde el iris hasta el cristalino. Ambas cavidades tienen dentro humor acuoso, un líquido transparente encargado de mantener la presión intraocular (PIO) necesaria para el tono y las funciones oculares, así como para la nutrición y oxigenación del cristalino y de la córnea, ya que no disponen de riego sanguíneo propio [9]. Por último, la cámara vítrea es la zona comprendida entre el cristalino y la retina, y está rellena de humor vítreo, un gel transparente y avascular que ayuda en el metabolismo y en el mantenimiento del aspecto del globo ocular [11].

La estructura externa del globo ocular (véase Figura 2) se divide en tres capas: la exterior, la intermedia y la interna, que se explican a continuación.

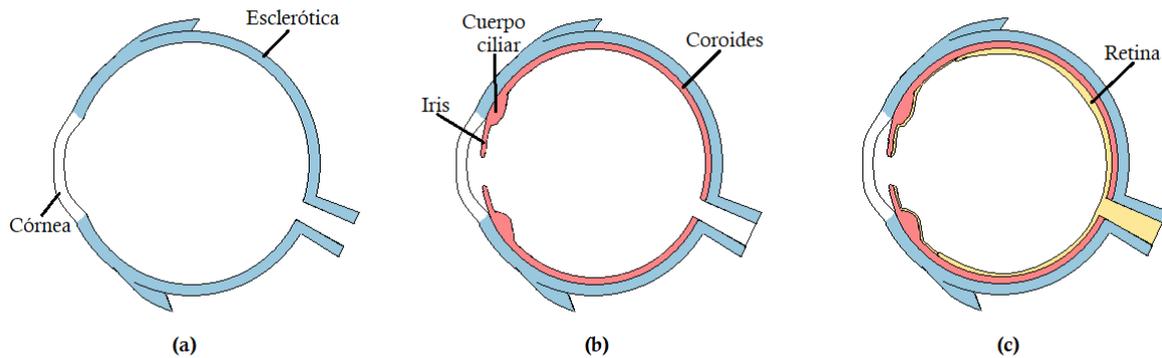


Figura 2. Capas externas del globo ocular y partes que las forman. (a) Capa externa, (b) capa media o úvea, (c) capa interna.

- **Capa externa.**

Es la capa más externa del ojo y está constituida por la córnea y la esclerótica.

- **Córnea:** es la capa más externa por lo que actúa como capa protectora del polo anterior del ojo frente a traumatismos e infecciones. Se trata de una lente convergente, ya que tiene una curvatura regular, y a través de ella accede la luz ya que es transparente. Está formada histológicamente por el epitelio anterior, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio.
- **Esclerótica:** se sitúa posteriormente a la córnea. Está cubierta por la conjuntiva, una membrana transparente que lubrica el ojo, originando mucosidad y lágrimas. La esclerótica está constituida por fibras elásticas, que, al ser tan resistentes, convierten a la esclerótica en la capa protectora del polo posterior ocular y, además, mantienen la forma del ojo [10].

- **Capa media o úvea.**

Esta capa contiene muchos vasos sanguíneos encargados de nutrir al ojo. En la parte anterior de esta capa se encuentra el iris, con fibras musculares que dilatan y contraen la pupila, regulando de este modo la cantidad de luz que entra a través de ella. En la parte intermedia, se localiza el cuerpo ciliar, donde se encuentra el músculo ciliar que, al contraerse, provoca la relajación del ligamento suspensorio del cristalino y su abombamiento, dando lugar a la acomodación del ojo [9]. Por último, en la parte posterior, aparece el coroides, una capa vascular responsable de suministrar oxígeno y nutrientes a la retina.

- **Capa interna o retina.**

Esta capa es una prolongación del sistema nervioso central y está conectada con el cerebro gracias al nervio óptico. Las funciones de la retina son recoger, elaborar y transmitir cada estímulo visual lo que permite la formación de la imagen [13]. Se encuentra entre la coroides y el humor vítreo y, se puede visualizar en el fondo del ojo como una zona transparente y rojiza.

La retina tiene dos tipos de células fotorreceptoras, conos y bastones, que se encargan de absorber la energía lumínica y transformarla en impulsos nerviosos. Los conos se ocupan de la visión diurna, la percepción del color y los detalles finos, mientras que los bastones son los responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad [13]. En la parte central de la retina, se localiza la mácula, un área con forma oval que alberga aproximadamente el 50% de los conos, y donde tiene lugar la mayor parte de la fotorrecepción. En el centro de la mácula se encuentra la fovea, la zona de la retina de mayor agudeza visual, debido a que en ella figura la mayor proporción de conos [9]. Otra zona importante de la retina es el disco óptico. En él no hay fotorreceptores debido a que esta es la zona de entrada del nervio óptico, por lo que actúa como un punto ciego en el campo visual (véase Figura 3). A través del disco óptico transcurren la arteria y la vena centrales de la retina [13].

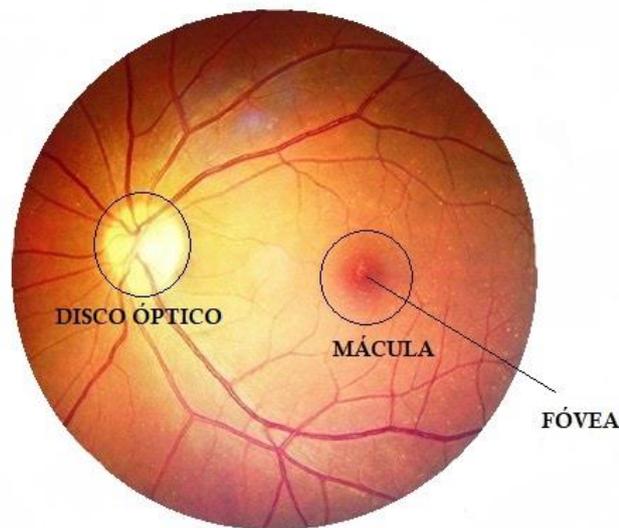


Figura 3. Fondo de ojo humano izquierdo. Imagen adaptada de [15].

Dado que la retina es la capa más afectada por el glaucoma y el presente TFG se centra en el estudio de esta enfermedad, se va a detallar en profundidad las 10 capas que la conforman (véase Figura 4), y que de más a menos externas son:

- **Epitelio pigmentario de la retina (RPE):** capa de la retina formada por células pigmentarias, cada una se relaciona con los segmentos externos de 15 o 20 receptores. Sus funciones son regular el medio extracelular y actuar como metabolismo del pigmento visual, degradando los fragmentos externos de los fotorreceptores. Está separada de la coroides por la Membrana de Bruch (MB).
- **Capa de células fotorreceptoras:** es la capa formada por la porción externa de los fotorreceptores (conos y bastones), que se extienden hasta la plexiforme externa (OPL). Aquí comienza la neurotransmisión vertical, que se dirige a la célula bipolar (1° neurona de la vía óptica), conecta con los fotorreceptores por sus expansiones externas y con las células ganglionares por sus expansiones internas) y después a las células ganglionares (2° neurona de la vía óptica, sus axones forman las fibras del nervio óptico).

- **Membrana limitante externa (OLM):** formada por la unión entre las células de Müller (células gliales) y los segmentos internos de los fotorreceptores.
- **Capa nuclear externa (ONL):** compuesta por los núcleos de los fotorreceptores.
- **Capa plexiforme externa (OPL):** se produce la sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares y las células horizontales (células de asociación horizontal).
- **Capa nuclear interna (INL):** compuesta por los núcleos de las células bipolares, las horizontales y las amacrinas (células de asociación horizontal).
- **Capa plexiforme interna (IPL):** aquí ocurre la conexión de las células bipolares con las células ganglionares y las amacrinas.
- **Capa de células ganglionares (GCL):** formada por los núcleos de las células ganglionares.
- **Capa de las fibras del nervio óptico (RNFL):** formada por los axones de las células ganglionares, que forman el disco óptico y se mielinizan en la cabeza del nervio óptico. Actúa como la vía común final en el flujo de información visual al nervio óptico.
- **Membrana limitante interna (ILM):** es una fina membrana que separa el humor vítreo de las fibras nerviosas.

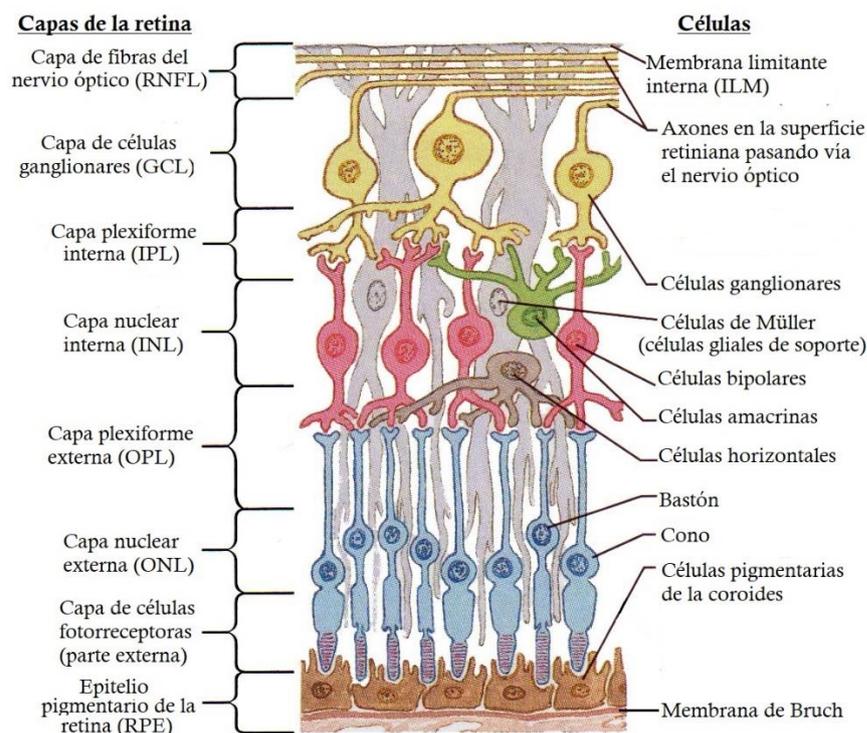


Figura 4. Esquema de las diferentes capas de la retina, así como los distintos tipos de células presentes. Imagen adaptada de [16].

2.2 Glaucoma

El glaucoma es una neuropatía óptica considerada como la segunda causa de ceguera en el mundo después de la retinopatía diabética [2]. La Sociedad Europea de Glaucoma afirma la existencia de diferentes clasificaciones y arbitrariedad en el glaucoma. Para catalogarlo, es necesario considerar los siguientes factores: tipo de ángulo iridocorneal, ángulo formado entre la periferia de la córnea y el iris, campo visual, nivel de PIO, morfología de la papila y alteraciones asociadas, tanto oculares como sistémicas.

Dentro de los diferentes tipos de glaucoma, el más frecuente es el glaucoma crónico simple o glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA), una neuropatía óptica crónica progresiva caracterizada por presentar alteraciones morfológicas en el disco óptico y en la RNFL. Sus principales efectos se traducen en la muerte progresiva de células ganglionares retinianas, lo que conlleva el adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas de la retina (RNFL), y la pérdida del campo visual. Esta patología afecta al 1% de la población, y su prevalencia se incrementa con la edad, siendo superior al 5% por encima de los 75 años. La evolución del GPAA es lenta, gradual y generalmente asintomática, por lo que es importante la detección precoz de esta enfermedad. El análisis de la capa RNFL peripapilar es el protocolo de escaneo más eficaz para el diagnóstico precoz del glaucoma y, por tanto, en el que se centra este proyecto.

El glaucoma se produce por una obstrucción en la malla trabecular o canal de Schlemm (Figura 5) que dificulta el drenado del humor acuoso originando un aumento de la presión intraocular, que es la responsable del daño en la cabeza del nervio óptico y en las fibras nerviosas de la retina. Aunque una PIO elevada es el factor de riesgo más importante, existen otros factores como los vasculares (flujo sanguíneo en la cabeza del nervio óptico), factores genéticos, miopía, susceptibilidad de las células ganglionares retinianas o la estructura anatómica del disco óptico que también tienen un papel importante en el desarrollo del glaucoma. Estos factores conducen a un agravio axonal, que deriva en la pérdida de células ganglionares y fibras nerviosas.

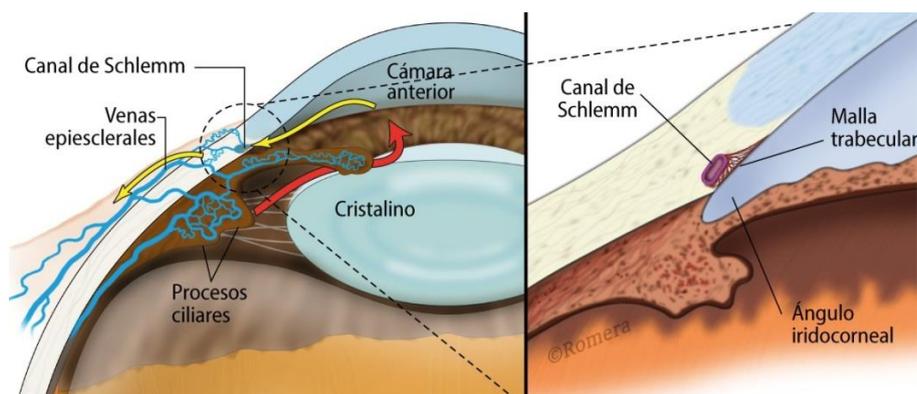


Figura 5. Estructuras más importantes en la circulación del humor acuoso en el interior del ojo (canal de Schlemm, malla trabecular, ángulo iridocorneal). Imagen adaptada de [17].

Cuando se realiza el diagnóstico del glaucoma mediante el análisis del campo visual, en el que se detectan alteraciones en la perimetría del campo visual, ya se han perdido multitud de fibras nerviosas pues la detección de la pérdida del campo visual requiere la muerte de un 25-35% de células ganglionares. Es por ello por lo que interesa desarrollar nuevas técnicas que consigan realizar un

diagnóstico precoz de la enfermedad. De esta forma surge la tomografía por coherencia óptica (OCT), una técnica que permite observar el interior de la retina de forma no invasiva basándose en el principio de interferometría. Gracias a la OCT, el glaucoma puede ser detectado evaluando el disco óptico y cuantificando el espesor de la RNFL, puesto que una disminución del grosor de esta capa indica una progresión en la enfermedad.

En este contexto surge la necesidad de estudiar el glaucoma en modelos animales, en este caso en modelos roedores, ya que es necesario analizar la evolución de la retina en un organismo vivo durante el desarrollo de esta enfermedad para generar terapias farmacológicas nuevas y estudiar sus posibles efectos. Dado que estos ensayos no pueden realizarse directamente en humanos por cuestiones éticas y de salud, la experimentación animal es un proceso fundamenta en investigación oftalmológica [5].

2.3 Inducción del glaucoma en roedores

Como se ha comentado anteriormente, el glaucoma provoca la degeneración y muerte de las células ganglionares y de las fibras nerviosas de la retina. Al estar esta estructura aislada en el globo ocular, se puede inducir su alteración mediante la inyección de fármacos en el vítreo sin afectar al resto del Sistema Nervioso Central.

Existen dos técnicas experimentales que inducen el glaucoma en roedores: inducción de la hipertensión ocular e inducción de la muerte de las células ganglionares (CGR). Tras realizar una revisión del estado del arte, se ha podido comprobar que los métodos más utilizados para la inducción del glaucoma son, por un lado, el ácido hialurónico y suero salino hipertónico (inducen la hipertensión ocular) y, por otro lado, los fármacos N-metil-D-aspartato (NMDA) y endotelina-1 (inducen la muerte de las CGR) [34]. La ventaja que presenta la inducción de muerte de las CGR frente a la inducción de la hipertensión ocular es que daña las CGR sin alterar la PIO, ya sea dañando el nervio óptico mecánicamente, induciendo isquemia transitoria o mediante la inyección intraocular de agentes tóxicos.

En este trabajo se van a estudiar diferentes bases de datos de ratas, en las que el glaucoma ha sido inducido mediante la inyección de endotelina-1 (ET-1) o de N-methyl-d-aspartate (NMDA).

La ET-1 es un péptido vasoconstrictor producido por las células endoteliales vasculares [33]. Se ha demostrado que un nivel de ET-1 elevado en el organismo está asociado al glaucoma, ya que al ser un vasoconstrictor reduce el riego sanguíneo ocular, lo que provoca la isquemia en la retina y el daño de las células ganglionares [34]. Por lo tanto, la inyección intravítrea de este péptido de forma artificial en roedores, al reducir su flujo sanguíneo ocular y provocar una isquemia parcial de la retina, daña el transporte axoplasmático, generando una pérdida en el grosor de las capas de CGR y RNFL y, por tanto, provoca las mismas condiciones que se dan en el glaucoma [20].

El NMDA es un aminoácido receptor del glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, y además un agente excitotóxico. En el estudio [32] se asocia la excitotoxicidad del aminoácido al glaucoma. Por tanto, la administración intravítrea de NMDA en roedores imita el mecanismo de excitotoxicidad percibido en pacientes glaucomatosos. Este mecanismo activa un exceso de enzimas que provocan un daño en diferentes estructuras celulares [21], la apoptosis de las CGR y la degeneración de las fibras nerviosas tanto en ratón como en rata [33].

Uno de los objetivos de este trabajo es analizar el daño retiniano que produce tanto el ET-1 como el NMDA en ratas, con el fin de estudiar cuál de estos dos fármacos es capaz de simular mejor las condiciones que se dan en el glaucoma.

2.4 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)

La tomografía es una técnica de registro por imagen comúnmente utilizada para la obtención de imágenes anatómicas que corresponden a un plano específico del cuerpo humano. En la actualidad, existen muchos tipos diferentes de tomografía, como la tomografía de rayos X, la tomografía por resonancia magnética, la tomografía por emisión de positrones, la tomografía axial computerizada (TAC) o la tomografía óptica. La biomedicina es el campo en el que son más habituales estas técnicas, puesto que permiten diagnosticar enfermedades o lesiones a partir de la imagen obtenida, de manera poco o nada invasiva, en función de la técnica que se utilice.

La tomografía óptica es una técnica que en los últimos años está adquiriendo gran valor en el estudio de estructuras anatómicas, especialmente transparentes como el ojo. Esto se debe a que al ser una técnica que utiliza energía luminosa para obtener las imágenes, es más fácil obtener una imagen de tejidos poco opacos.

Según [25], en tomografía óptica se distinguen dos tipos:

- **Tomografía óptica difusa (DOT):** se basa en la propagación difusa de fotones, tanto espacial como temporalmente. La luz se modula y se lanza contra la muestra de interés, donde se dispersa. Cuando la señal transmitida es captada, ésta es procesada mediante modelos de proyección hacia atrás, de perturbación o de optimización no lineal, obteniendo la imagen.
- **Tomografía óptica por difracción (ODT):** se basa en el “*scattering*”, un fenómeno que consiste en que una partícula, tras recibir energía y absorber una parte, extrae otra parte de la energía que se desvía hacia todas direcciones. Este efecto provoca que la luz adopte un estado de polarización diferente al inicial. Las imágenes se obtienen a partir del teorema de proyección de la difracción de Fourier [24]. Un tipo de ODT particular es la tomografía de coherencia óptica (OCT), la técnica de tomografía óptica de interés en este trabajo.

La tomografía de coherencia óptica es una técnica de diagnóstico por imagen caracterizada por la realización de cortes tomográficos micrométricos gracias a la luz que incide en el objeto de estudio. Principalmente se utiliza para conseguir imágenes del cuerpo humano, aunque de forma mayoritaria se emplea en tejido subcutáneo o transparente [24]. Es uno de los métodos de exploración imagenológicos y de diagnóstico principales en oftalmología, un instrumento innovador ya que permite estudiar, in vivo y sin dolor, estructuras tisulares que no podrían verse de manera convencional [22]. La ventaja que presenta en oftalmología es que la luz índice sobre el tejido directamente, sin utilizar un transductor, permitiendo el estudio de estructuras oculares de forma no invasiva [23]. Actualmente es un herramienta imprescindible en este campo para el diagnóstico y el control de enfermedades retinianas como el glaucoma.

2.4.1. Principios de OCT

Dentro de las técnicas tomográficas, la OCT es similar a la técnica de ultrasonidos para la obtención de imágenes, exceptuando el modo de excitación y, por consiguiente, el parámetro a evaluar. En lugar de medir ondas de presión sonora, se mide la intensidad de luz infrarroja. El punto a favor de la OCT frente a los ultrasonidos es que estos últimos se ven limitados por su longitud de onda, ya que es demasiado alta, estableciendo su resolución mínima a 1 mm. La OCT, en cambio, utiliza una longitud de onda mínima (luz infrarroja), permitiendo una resolución inferior a $10\ \mu\text{m}$ [25]. Por ello, las imágenes de OCT son mucho más nítidas, lo que mejora la visualización de los detalles más finos. En el campo de la oftalmología, al permitir la obtención de imágenes en profundidad y con gran resolución, la OCT permite observar correctamente tanto el segmento anterior como el segmento posterior del ojo. Estos aparatos de tomografía oftalmológica se dividen en los que realizan imágenes sobre el segmento anterior (córnea, cristalino) y los que la realizan sobre el segmento posterior del ojo (retina, nervio óptico).

El funcionamiento de la OCT se basa en la interferometría de baja coherencia (LCI), que no necesita contacto directo con la muestra de estudio [25]. Para aplicar la interferometría se necesita un interferómetro, en OCT se emplea el interferómetro de Michelson. Este dispositivo está compuesto por una fuente de iluminación, un divisor de haz (beam splitter), dos espejos y un detector (véase Figura 6). Las propiedades de cada uno de estos componentes determinan el tipo de resultado de interferencia que se obtiene en el dispositivo de salida (detector).

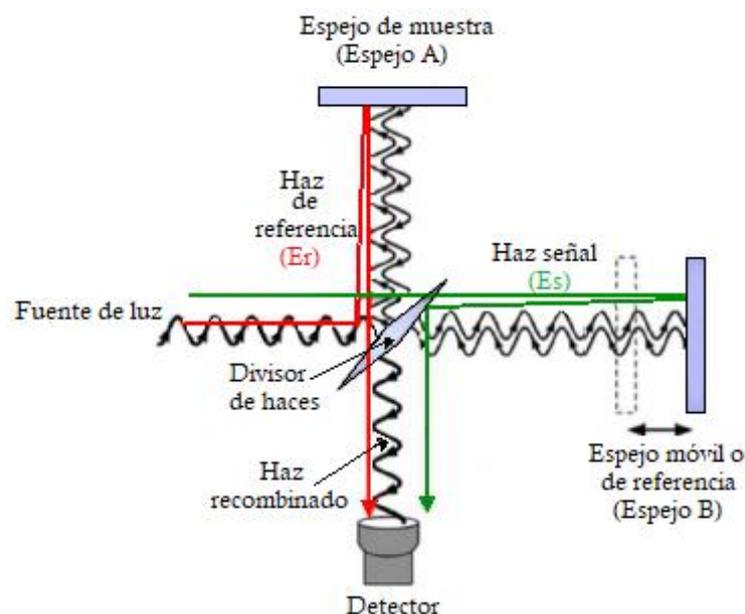


Figura 6. Esquema del funcionamiento del interferómetro de Michelson. Imagen adaptada de [26].

El interferómetro óptico suma las ondas electromagnéticas de dos haces de luz. Esa fuente de luz resultante (Coherent Light Source) se dirige al divisor de haces (beam splitter), donde se divide en dos haces de luz. Uno de ellos es reflejado por el divisor, dirigiéndose al espejo de muestra (Espejo A), actuando como rayo de referencia (Er); el otro haz atraviesa el divisor, reflejándose en el espejo de referencia móvil (Espejo B), que en este caso será el tejido a analizar, y actuando como rayo señal (Es). La luz de referencia es reflejada por el espejo A, pasando de nuevo por el divisor de haces; el

rayo señal es reflejado por el tejido, volviendo también al divisor. Ahí ambas luces se recombinan, y se dirigen al detector. Por tanto, al detector llega un haz de luz recombinado de dos haces, con diferente fase correspondiente a la diferencia en la distancia recorrida por cada haz.

Cuando la distancia entre los dos haces es la misma, las fases también lo son, logrando una amplitud máxima. Esto se consigue mediante una interferencia constructiva, en el que los campos eléctricos y magnéticos de los dos haces se adicionan, dando como resultado un rayo más intenso. De esta forma se puede conocer a qué distancia se encuentra el tejido (en este caso cada capa de la retina) ya que, si la distancia es igual y se sabe la distancia al espejo de referencia, se conoce también la distancia al tejido. De este modo, al generar cada capa un reflejo que coincide en fase con el reflejo del espejo de referencia, se obtiene la distancia a la que se encuentra cada estructura.

Gracias al fenómeno de interferometría se va generando una gráfica con las diferentes distancias en las que se origina este fenómeno, se recoge la señal y se construye un vector en modo axial lineal (A-scan). Las imágenes bidimensionales de retina se forman sumando los A-scan, que se unen formando una imagen bidimensional de barrido de OCT (B-scan). Un conjunto de B-scans puede ser utilizado para construir un volumen 3D (3D-scan) [27], como puede verse en la Figura 7.

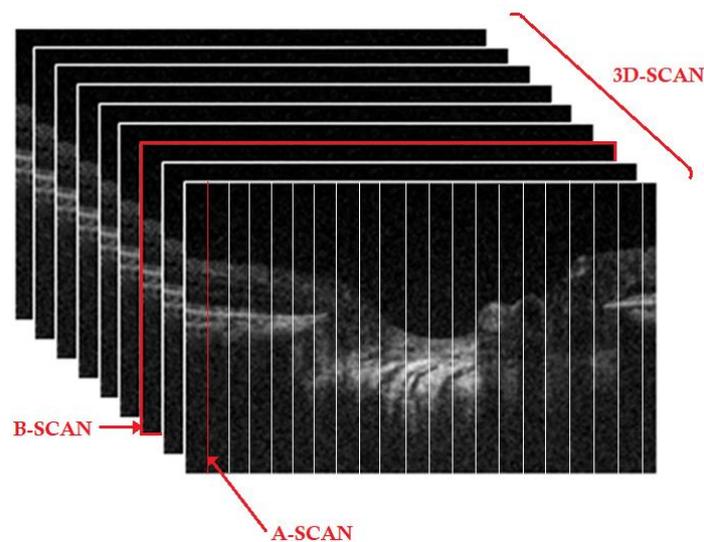


Figura 7. Estructura de un volumen OCT. Imagen adaptada de [28].

De esta manera la OCT obtiene las imágenes de diferentes estructuras del cuerpo humano. Gracias a que la interferometría emplea luz infrarroja, que es una fuente de luz con longitud de onda mínima, la OCT consigue imágenes de 1 μm de resolución axial, que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de enfermedades, puesto que el nivel de detalle es muy fino. En el caso del glaucoma, la OCT consigue imágenes retinianas con una alta definición de todas sus capas [22].

2.4.2. Técnicas de OCT actuales

Actualmente imperan dos técnicas de OCT: la primera se basa en un análisis en el dominio del tiempo (TD-OCT) y la segunda se fundamenta en el dominio de Fourier (FD-OCT), y presenta dos subtipos: el dominio espectral (SD-OCT) y la fuente barrida (SS-OCT) [29]. Estos últimos están sustituyendo a los TD-OCT, ya que ofrecen más ventajas en cuanto a velocidad de obtención de imágenes y sensibilidad.

- **OCT en el dominio del tiempo (TD-OCT).**

Esta técnica se basa en el interferómetro de Michelson. El brazo de referencia se mueve mecánicamente para lograr medir la profundidad del tejido. Cada escaneo del espejo corresponde a la imagen de una capa de la muestra. La desventaja que presenta esta técnica es que, al necesitar un movimiento constante del espejo de referencia, se limita la adquisición de A-scans a 400 por segundo como máximo; esto significa un límite de resolución axial de 10 μm . El haz de luz recombinado del reflejo del tejido y del espejo de referencia llega al detector. Ahí se filtra la interferencia resultante y se almacena en un ordenador [30]. En la Figura 8 se visualiza el esquema básico de esta técnica.

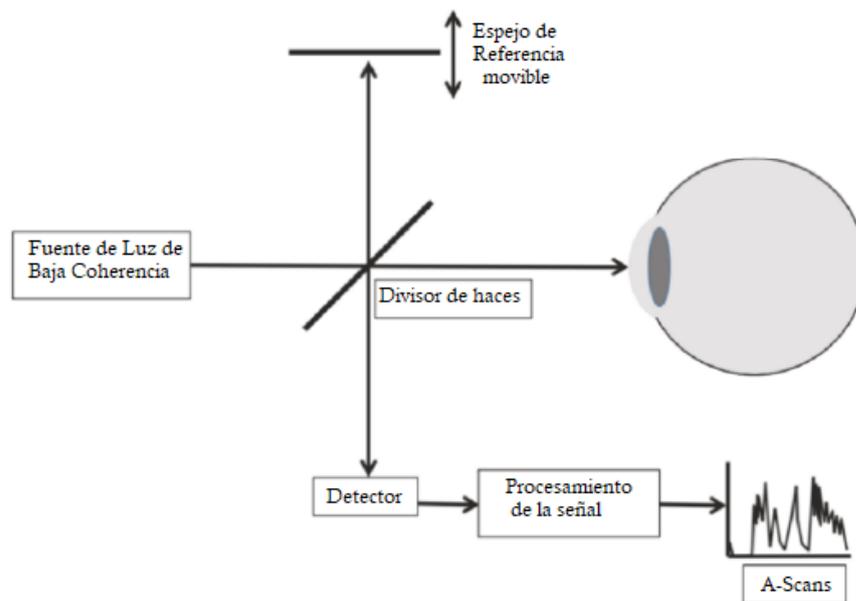


Figura 8. Esquema básico del funcionamiento del TD-OCT. Imagen adaptada de [29].

- **OCT en el dominio de Fourier (FD-OCT).**

En FD-OCT, el espejo de referencia se mantiene estacionario, lo que permite una adquisición más rápida que TD-OCT. Como las señales de todas las capas se detectan simultáneamente, también se mejora la relación señal / ruido. La distancia entre la fuente de luz y el espejo es aproximadamente la misma que la distancia entre la fuente de luz y el tejido. FD-OCT se subdivide en 2 modalidades dependiendo de la fuente de luz y el detector:

- OCT de dominio espectral (SD-OCT): esta técnica sustituyó a la TD-OCT. En Figura 9 se puede ver el esquema de esta técnica, que utiliza una fuente de luz de banda ancha y cuyo detector se combina con un espectrómetro. El espectro óptico recuperado se analiza utilizando la transformada de Fourier. Al utilizar un espejo de referencia fijo, la adquisición de imágenes es mucho más rápida, realizando entre 18.000 y 70.000 A-scans por segundo. El espectrómetro permite estudiar en profundidad la muestra, que mide los ecos de luz de forma simultánea, convirtiendo los espectros obtenidos en datos de profundidad, que son los que conforman el A-scan. Otra ventaja de la SD-OCT es la disminución de artefactos producidos por el movimiento ocular.

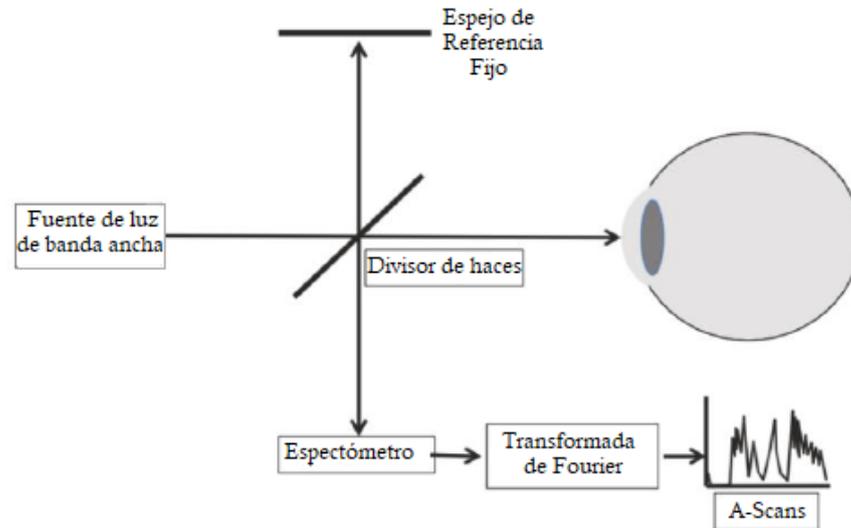


Figura 9. Esquema básico del funcionamiento del SD-OCT. Imagen adaptada de [29].

- OCT de fuente barrida (SS-OCT): combina el dominio de Fourier con algunas ventajas de la TD-OCT, aunque difiere de TD y SD-OCT por la naturaleza de la fuente de luz. Con esta modalidad no se emplea un espectrómetro, sino que se utiliza un láser de fuente barrida, es decir, con longitud de onda sintonizable y con ancho de banda estrecho. De esta forma permite barrer una banda estrecha con longitudes de onda distintas en el tiempo. Esta variación de la frecuencia en el tiempo consigue codificar distintos tiempos de retardo de eco en el rayo de luz [26]. El patrón de interferencia espectral se detecta mediante un detector simple (como el utilizado para TD-OCT) de alta velocidad, y posteriormente se utiliza la transformada de Fourier para obtener las diferentes medidas de los tiempos de retardo y las magnitudes del eco. La SS-OCT permite alcanzar una velocidad de escaneo de 100.000 A-scans por segundos, además de incrementar la relación señal/ruido.

2.4.3. Aplicación clínica

En el ámbito de la oftalmología, la aplicación más empleada de la OCT actualmente es la adquisición de imágenes retinianas. La OCT permite a los oftalmólogos obtener imágenes transversales de esta zona ocular, dando lugar a medidas objetivas y cuantitativas de su estructura [23]. De esta forma, es posible visualizar cada una de las capas que conforman la retina, tal y como se puede observar en la Figura 10.

El campo visible de la retina con OCT se corresponde con los 30° centrales [23]. Las imágenes formadas son, en conjunto, una representación del tejido en escala de grises, que va desde el color blanco hasta el negro. Esto se debe a que el comportamiento de cada parte del tejido depende de su reflectividad frente al haz de luz. Las zonas más claras representan una alta reflectividad (zonas hiperreflectivas), es decir, bloquean total o parcialmente el paso de la luz. Las zonas más oscuras significan baja reflectividad (zonas hiporreflectivas), resultando en tejidos con poca o nula resistencia al paso de la luz.

En la estructura retiniana, así como en las zonas que la rodean, cada estructura tiene una reflectividad diferente. De esta forma, se distinguen las diferentes partes de la retina según si son hiperreflectivas o hiporreflectivas [35]:

Zonas hiperreflectivas: ILM, RNFL y el complejo formado por el RPE y la porción externa de las células fotorreceptoras. Son zonas muy brillantes (zonas claras).

Zonas hiporreflectivas: GCL, IPL, OPL, ONL e INL, complejo formado por la parte interna y núcleos de los fotorreceptores y humor vítreo. Son zonas más oscuras, dejan pasar la luz. El humor vítreo es la zona más hiporreflectiva, ya que al ser un líquido acuoso permite el paso completo del haz.

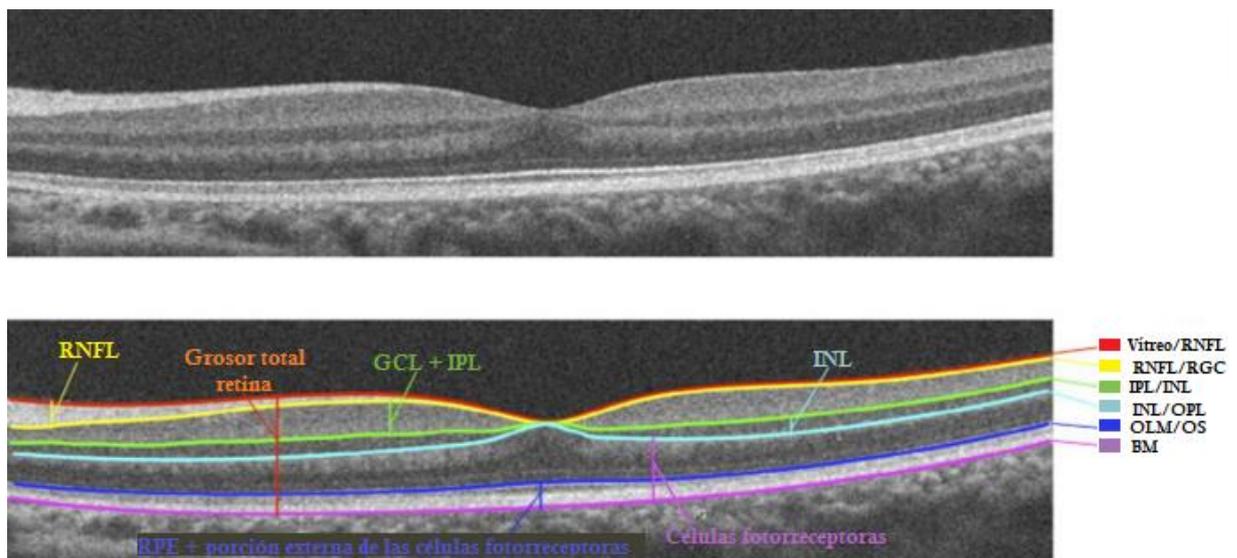


Figura 10. Imagen OCT de la estructura retiniana segmentada por capas. Recuperada de [31].

La OCT puede ser adaptada para la adquisición de imágenes de roedores con el objetivo de utilizarlas en estudios de investigación de enfermedades oftalmológicas, así como en la evaluación de diferentes tratamientos. Como se ha mencionado anteriormente y como se explicará en secciones posteriores, el estudio realizado en este proyecto se ha centrado en imágenes de retina que pertenecen a roedores.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la retina humana presenta algunas diferencias respecto a la retina de roedor. Por ejemplo, los roedores no presentan ni fovea ni mácula. En cuanto al grosor de las capas de la retina,

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la retina humana y la de roedores presentan diferencias significativas. Por ejemplo, los roedores no tienen mácula ni fovea y sus lentes son relativamente más grandes. Con respecto al grosor de las capas retinianas también existen diferencias, puesto que la capa de células ganglionares (GCL) en roedores no se distingue visualmente (su grosor es de $2\mu\text{m}$ aproximadamente), mientras que en humanos sus valores ascienden a alrededor de $20\text{-}60\mu\text{m}$. Por el contrario, la capa plexiforme interna (IPL), es relativamente más gruesa que en la retina humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Índice de contenidos

3.1. Material	22
3.1.1. Bases de datos	22
3.1.2. Hardware	24
3.1.3. Software	24
3.2 Métodos.....	25
3.2.1. Obtención de grosores de la RNFL en la base de datos de ET-1	25
3.2.2. Obtención de segmentación y grosores de la RNFL en la base de datos de NMDA	27
3.2.3. Análisis estadístico con SPSS	31
3.2.4. Aplicación de un perceptrón multicapa.....	35

3.1. Material

3.1.1. Bases de datos

Para la realización de este trabajo se han utilizado dos bases de datos de imágenes OCT pertenecientes a la retina de varios roedores. La primera base de datos está compuesta por dos grupos de ratas a las que se les ha inyectado ET-1 para la inducción del glaucoma; la segunda base de datos está formada por otro grupo de ratas a las que se les ha introducido NMDA con el mismo objetivo.

3.1.1.1. Bases de datos ET-1

Las imágenes OCT de roedores que conforman las bases de datos de ET-1 se adquirieron con el equipo Micron IV (Phoenix Research Labs, Pleasanton, EE. UU) en distintos momentos temporales. El Consejo Danés para la Experimentación con animales dio el número de licencia: 2017-15-0201-0121, con el que se concedió el permiso de experimentación animal.

En concreto, se han utilizado dos entregas de una base de datos de ratas con glaucoma inducido debido a la administración de ET-1 a una concentración de 500 μ M. Las imágenes pertenecientes a ambas entregas tienen un tamaño de 1024x1024 píxeles y una resolución espacial de 0,9775 μ m/píxel.

En la primera entrega de la base de datos se realiza un seguimiento antes de suministrarles ET-1 (día 0) y a los 3, 7 y 14 días después de su inyección. En total, esta entrega está formada por un conjunto de 10 ratas Sprague-Dawley de las que se adquirieron 129 imágenes. En la Tabla 1 se recogen el número de imágenes que forman esta entrega por rata y por fecha de adquisición de la OCT.

ID DE LA RATA	N.º IMÁGENES	DÍA 0	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14
C23 GP1A A1	16	4	4	4	4
C23 GP1A A2	17	4	5	4	4
C23 GP1A A3	16	4	4	4	4
C23 GP1A A4	16	4	4	4	4
C24 GP2B A1	16	4	4	4	4
C24 GP2B A2	16	4	4	4	4
C24 GP2B A3	16	4	4	4	4
C24 GP2B A4	4	4	0	0	0
C25 GP1A A1	8	4	4	0	0
C25 GP2B A3	4	4	0	0	0

Tabla 1. Número de imágenes por rata y por fecha de adquisición de la primera entrega de la base de datos de ET-1.

La segunda entrega de la base de datos de ET-1 tiene un seguimiento del glaucoma inducido en el día 0, en el día 3 y en el día 7. Está compuesta por 12 ratas y se conforma de un total de 115 imágenes. Al igual que en la entrega anterior, en la Tabla 2 se recogen el número de imágenes OCT por rata y por fecha de adquisición.

ID DE LA RATA	N.º IMÁGENES	DÍA 0	DÍA 3	DÍA 7
RAT001	7	5	2	0
RAT002	11	5	3	3
RAT003	10	5	3	2
RAT004	7	5	0	2
RAT005	11	5	2	4
RAT006	10	5	2	3
RAT007	11	4	4	3
RAT008	9	4	4	1
RAT009	14	5	4	5
RAT010	7	4	2	1
RAT011	10	3	4	3
RAT012	8	4	2	2

Tabla 2. Número de imágenes por rata y por fecha de adquisición de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.

En ambas entregas, las imágenes se obtienen formando un B-scan a partir de la adquisición de A-scans en la retina mediante exploraciones circulares ubicadas en diferentes posiciones del ojo tal y como se observa en la Figura 11.

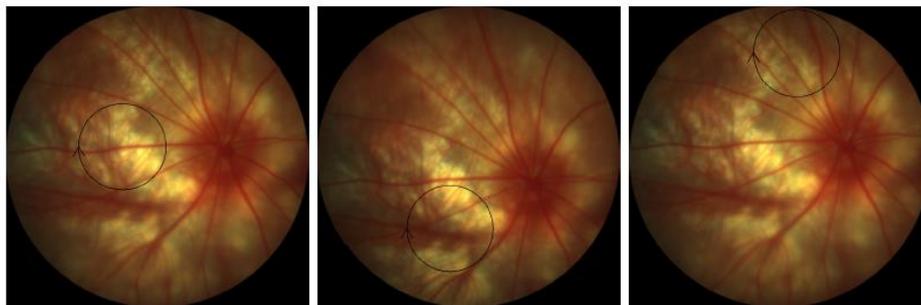


Figura 11. Posiciones en la que se han adquirido las imágenes de la base de datos de roedores.

3.1.1.2. Base de datos NMDA

Este conjunto de datos está formado por un total de 10 volúmenes de imágenes OCT que pertenecen a 5 ratas diferentes. De cada rata se han adquirido dos volúmenes, uno de ellos perteneciente al ojo del roedor en el que no se ha inyectado NMDA y otro que corresponde al ojo al que se le ha administrado NMDA. En este caso, se preparó una solución 100 mM de NMDA en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y se inyectó intravítreamente en el ojo del ratón (inyectando 100 nmol por ojo). Tras la inyección de NMDA en uno de los ojos de los roedores y pasados 7 días, se procede a sacrificar al animal. A continuación, se extrajo la retina de cada ojo (control y glaucoma inducido) y se introdujo en un gel de agarosa. Por tanto, a diferencia de la base de datos de ET-1 donde el análisis se llevaba a cabo in-vivo, en este caso el estudio se realiza ex-vivo. Posteriormente, se procedió a adquirir las imágenes de cada retina utilizando un equipo OCT en el dominio espectral desarrollado por la Universidad de Münster, que participa en el proyecto GALAHAD.

Cada volumen 3D-OCT adquirido tiene un tamaño (número de imágenes B-scan) diferente, así como unas dimensiones de imagen y resoluciones distintas que figuran en la Tabla 3.

ID DE LA RATA	TIEMPO DE ADQUISICIÓN	N.º IMÁGENES DEL VOLUMEN	DIMENSIONES (píxeles)	RESOLUCIÓN ($\mu\text{m}/\text{píxel}$)
180917-MOUSE 1	Antes (Control)	226	828 x 800	3.7500 x 1.3787
	Después (NMDA)	216	828 x 800	3.7500 x 1.3787
180917-MOUSE 2	Antes (Control)	268	828 x 800	3.7500 x 1.3787
	Después (NMDA)	214	828 x 800	3.1250 x 1.3787
181004-MOUSE 1	Antes (Control)	401	600 x 800	2.5336 x 1.3787
	Después (NMDA)	431	572 x 800	1.6627 x 1.3787
181004-MOUSE 2	Antes (Control)	650	600 x 800	2.8767 x 1.3787
	Después (NMDA)	521	600 x 800	2.8767 x 1.3787
191010-MOUSE	Antes (Control)	402	600 x 750	4.000 x 1.2427
	Después (NMDA)	501	600 x 750	4.000 x 1.2427

Tabla 3. Dimensiones y número de imágenes por rata y tiempo de adquisición de los volúmenes de ratas, antes y después de inyectarles NMDA.

3.1.2. Hardware

El proyecto se ha desarrollado en un ordenador portátil con procesador Intel® Core™ i7-3537U CPU @ 2.00GHz 2.50 GHz, con memoria instalada (RAM) DE 8,00 GB. El sistema operativo es Windows 10 de 64 bits, con un procesador x64. Además, tiene una tarjeta gráfica NVIDIA GeForce GT 720M.

3.1.3. Software

Para implementar los algoritmos propuestos y analizar los resultados en este trabajo se ha utilizado el entorno de programación MATLAB® v.R2018b. El software Matlab (MATrix LABoratory) es una aplicación creada para solucionar problemas relacionados con el campo científico y de la ingeniería, basado en operaciones matriciales y utilizando un lenguaje de programación propio. Se emplea en el procesamiento de señales e imágenes, en el desarrollo de visión artificial y aprendizaje automático, robótica, finanzas computacionales, y otros muchos campos. Tiene Interfaces para C/C++, Java®, .NET, Python, SQL, Hadoop y Microsoft® Excel® y está disponible para las plataformas Windows, macOS, GNU/Linux y Unix [36].

Aunque con la instalación de MATLAB ya viene integrada una amplia biblioteca de herramientas (Toolbox) que permiten trabajar directamente con el programa, para la realización de este trabajo se descargaron otras Toolbox como Bioinformatics Toolbox o Deep Learning Toolbox.

Por último, también se ha utilizado la plataforma estadística BM SPSS® Statistics (Statistical Package for the Social Sciences) para la realización del análisis estadístico. Este software permite comprender y analizar datos complejos y de gran tamaño, para así resolver problemas de negocio e investigación o garantizar una toma de decisión de alta calidad y precisión [37].

3.2 Métodos

En el siguiente apartado se explica la metodología empleada para llevar a cabo el objetivo propuesto, identificación de glaucoma inducido en un modelo animal mediante la inyección de ET-1 y NMDA.

3.2.1. Obtención de grosores de la RNFL en la base de datos de ET-1

Tal y como se ha explicado en secciones anteriores, una de las capas más importantes de la retina y en la que tiene más efecto el desarrollo del glaucoma es la RNFL. Es por ello por lo que el presente proyecto se ha centrado en el estudio de esta capa. De esta forma, el primer paso para poder discriminar las imágenes de los roedores en los que se ha inducido glaucoma consiste en obtener los límites de la capa RNFL, así como su grosor.

La base de datos que se ha utilizado para estudiar la inducción de glaucoma mediante la inyección de ET-1 contaba con imágenes retinianas de roedores como la que aparece en la Figura 12 (a), en las que se distinguen las diferentes capas de la retina en función de los distintos niveles de grises.

A partir de estas imágenes se obtienen, mediante los mecanismos *deep learning* desarrollados en [42], la segmentación automática de las capas más importantes de la retina de todas las imágenes de la base de datos. Estos métodos están basados en algoritmos de segmentación supervisados con los que es posible obtener las capas de la retina mediante la extracción de características de las imágenes, como se puede ver en la Figura 12 (b).

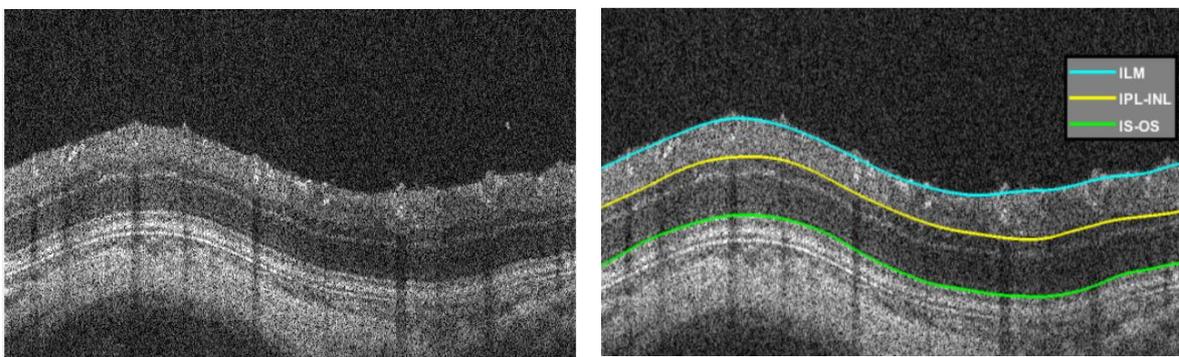


Figura 12. Imagen OCT de la primera base de datos de ET-1. (a) Imagen OCT. (b) Imagen OCT con las segmentaciones obtenidas mediante el método de deep learning desarrollado en [42].

La RNFL, que es la estructura bajo estudio, es la capa más superior en la imagen, aparece limitada por la membrana limitante externa (ILM) y la capa de células ganglionares (GCL).

Debido a que en estas bases de datos la estructura retiniana aparece en las imágenes con una disposición horizontal, se tiene para cada punto del eje X en la imagen un único valor en el eje Y de cada capa. De este modo, calcular los grosores de la RNFL es muy sencillo una vez que se tiene delimitada su superficie, y para ello se tiene que restar al límite superior de la capa el límite inferior de ésta, para cada punto del eje X.

$$\text{Grosor RNFL} = \text{capa 2} - \text{capa 1}; \text{ siendo la capa 1 la ILM y la capa 2 la GCL.}$$

Una vez se obtienen los grosores, éstos se multiplican por la escala, que como se ha mencionado en el punto 3.1 es de 0,9775 $\mu\text{m}/\text{píxel}$.

Tras calcular los grosores de todas las imágenes, se procede a realizar un gráfico de barras agrupado por momentos temporales para cada roedor, en el que se analizan la media del grosor de la RNFL para cada imagen. De este modo, se pretende visualizar de una manera sencilla la evolución que tiene cada rata con la inyección de ET-1.

A modo de ejemplo se muestran dos diagramas de barras de dos roedores, uno de cada entrega de la base de datos de ET-1. En la Figura 13, se puede visualizar la evolución del grosor de la RNFL en un roedor de la primera entrega de la base de datos de ET-1, en el que para el día 0, el día 7 y el día 14 de medición se tomaron 4 imágenes, y para el día 3 se obtuvieron 5 imágenes. En el caso de la Figura 13, aparece representada la evolución del grosor retiniano en un roedor de la segunda entrega de la base de datos de ET-1, en el que para tanto el día 0 como el día 7 se tomaron 5 imágenes, y para el día 3 se tomaron 4 imágenes.

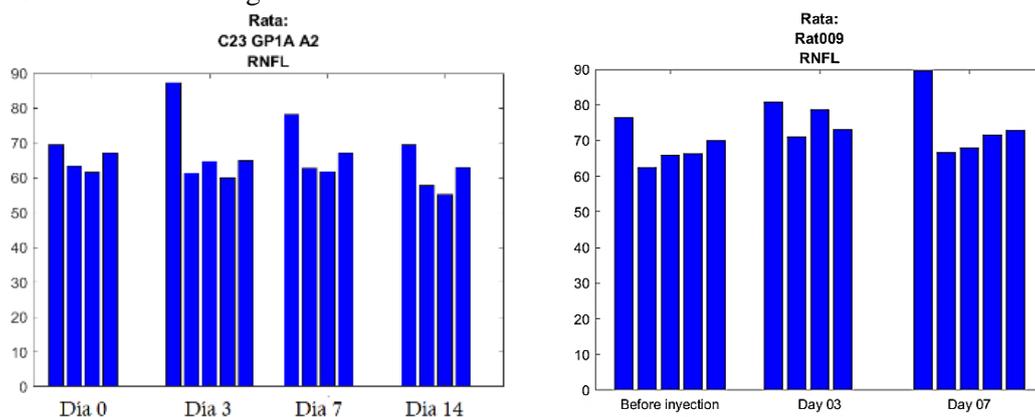


Figura 13. Evolución del grosor de la RNFL. (a) Evolución correspondiente al roedor C23 GP1A A2 a la primera entrega de ET-1. (b) Evolución correspondiente al roedor Rat009 de la segunda entrega de ET-1.

Tras realizar los gráficos de barras para analizar la evolución de los grosores en estas bases de datos, se procedió a construir una tabla Excel tanto para el grosor de la retina como para el grosor de la RNFL de cada base de datos. En total se tienen 2 tablas en las que se recoge la media del grosor de la capa en cuestión por roedor y tiempo de adquisición (Tabla 4 y Tabla 5).

ID_RATA	DÍA 0 (µm)	DÍA 3 (µm)	DÍA 7 (µm)	DÍA 14 (µm)
C23 GP1A A1	60,407	68,649	64,133	57,900
C23 GP1A A2	65,377	67,638	67,424	61,340
C23 GP1A A3	66,786	75,047	76,699	68,393
C23 GP1A A4	61,961	80,569	70,987	61,895
C24 GP2B A1	65,094	65,153	66,305	66,579
C24 GP2B A2	60,469	73,609	68,057	65,798
C24 GP2B A3	60,090	81,852	63,019	64,741
C24 GP2B A4	60,545			
C25 GP1A A1	61,613	73,528		
C25 GP2B A3	66,051			

Tabla 4. Media del grosor de la RNFL en la primera entrega de datos de ET-1 por roedor y por fecha de adquisición.

ID_RATA	DÍA 0	DÍA_3	DÍA_7
	(μm)	(μm)	(μm)
RAT001	65,537	63,103	
RAT002	66,009	74,415	70,665
RAT003	64,297	79,497	67,690
RAT004	75,103		64,266
RAT005	62,691	64,764	62,884
RAT006	61,106	65,586	69,619
RAT007	60,165	80,056	70,610
RAT008	60,107	67,685	62,932
RAT009	68,275	75,971	73,733
RAT010	61,985	78,987	73,809
RAT011	71,532	75,969	69,325
RAT012	69,457	89,658	77,748

Tabla 5. Media del grosor de la RNFL en la segunda entrega de datos de ET-1 por roedor y por fecha de adquisición.

Las casillas sombreadas en rojo de cada tabla representan que no existe ninguna toma de imágenes para la fecha de adquisición y la rata en la que se localizan dichas casillas. Esto significa, por ejemplo, que para la segunda entrega de datos de ET-1, a la Rat001 no le adquirieron imágenes OCT en el día 7 y que a la Rat004 no se le hicieron en el Día 3. Todos los roedores que no tienen ninguna imagen para un tiempo de adquisición determinado se eliminaron del estudio. En el caso de la primera entrega de datos, se eliminaron los roedores C24 GP2B A4, C25 GP1A A1 y C25 GP2B A3. En el caso de la segunda entrega, se eliminaron los roedores Rat001 y Rat004. Las medias del resto de grosores fueron analizadas con SPSS Statistics, para evaluar si existe una diferencia significativa en el grosor de la retina con el paso del tiempo al administrar ET-1.

3.2.2. Obtención de segmentación y grosores de la RNFL en la base de datos de NMDA

En el caso de la base de datos de NMDA, se tienen 10 volúmenes de imágenes OCT, correspondientes a 5 ratas (2 volúmenes por rata). Como se ha comentado anteriormente, estos volúmenes han sido adquiridos de forma ex-vivo, por lo que como se puede observar en la Figura 15, la forma de la retina es relativamente diferente a aquella obtenida en la anterior base de datos. Para obtener la segmentación de la capa RNFL de esta base de datos, se han utilizado los modelos de segmentación basados en *deep learning* que se entrenaron con la base de datos in-vivo a la que se le inyectó ET-1. De esta forma se pueden transferir las características extraídas de la base de datos in-vivo para encontrar los límites de la capa RNFL en el caso ex-vivo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las imágenes adquiridas in-vivo y ex-vivo son relativamente diferentes por lo que la segmentación automática generada en esta base de datos presenta algunas imperfecciones, tal y como como puede verse en la Figura 14.

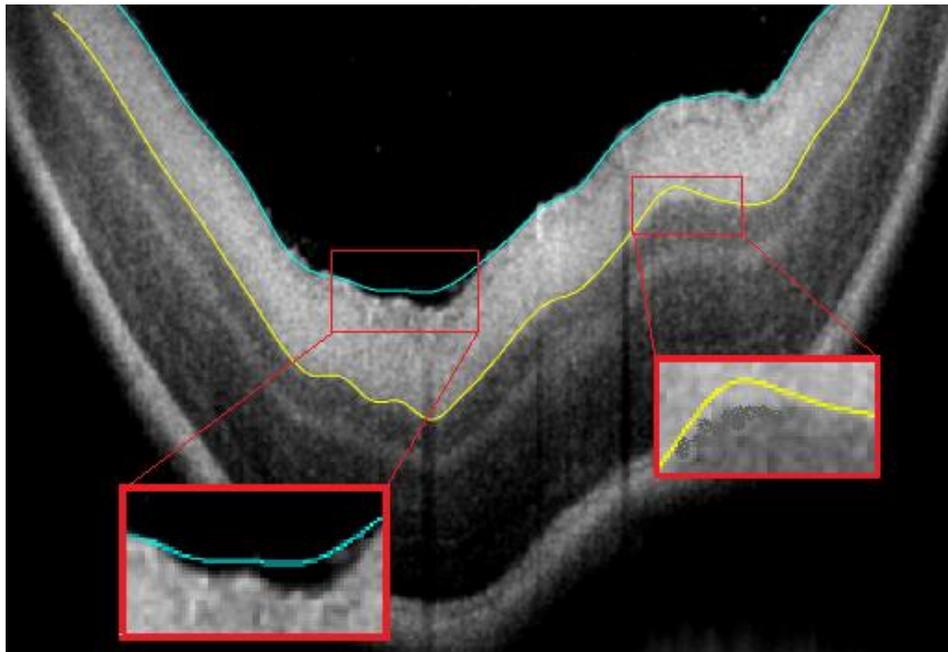


Figura 14. Imagen de la retina del volumen NMDA con la segmentación automática de la RNFL.

Estas imperfecciones se tienen que corregir de forma manual para poder obtener el grosor acertado de la RNFL. Para modificar la segmentación se emplea una interfaz gráfica de usuario diseñada en Matlab (véase Figura 15).

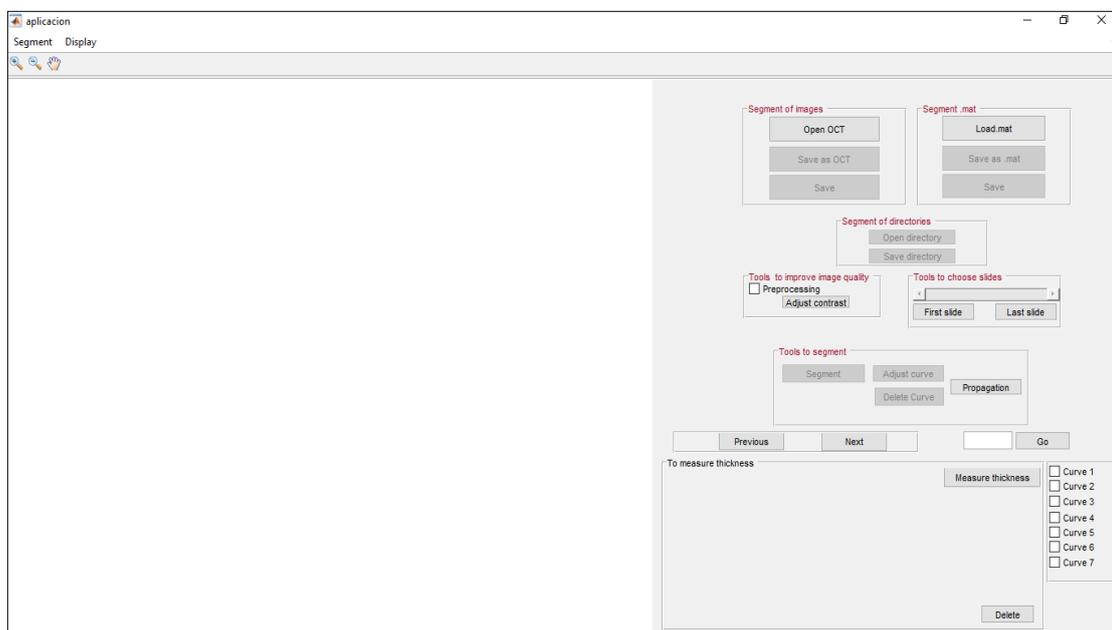


Figura 15. Aplicación desarrollada para corregir la segmentación automática de imágenes OCT.

Este programa tiene una interfaz muy intuitiva y fácil de utilizar, que permite tanto modificar como crear nuevas segmentaciones. A través de esta aplicación se pueden cargar directamente archivos de imágenes cuya extensión sea .mat y .OCT. Una vez se carga el archivo de interés, la aplicación permite modificar la segmentación, borrarla o generar una nueva. En este caso, se utilizó la función “Adjust Curve” que aparece en la parte de la aplicación donde figuran las herramientas para segmentar (“Tools to segment”).

Para este trabajo, se fue cargando de 1 en 1 los distintos volúmenes de NMDA. Una vez que el volumen estaba cargado, con ayuda de los botones Previous y Next, se buscaban aquellas imágenes que tenían la segmentación automática hecha, puesto que no se segmentó todo el volumen de imágenes sino aquellas que eran significativas. Cuando se encontraba cada una de estas imágenes ya segmentadas de forma automática (Figura 16 (a)), se procedía a modificar la segmentación haciendo uso del botón “Adjust Curve”, mencionado anteriormente. Una vez se seleccionaba este botón, las distintas segmentaciones de la capa RNFL aparecían como líneas discontinuas formadas por puntos a lo largo de la imagen (Figura 16 (b)). Clicando con el ratón en uno de esos puntos, se podía modificar de posición (hacia arriba o hacia abajo) de píxel a píxel utilizando las flechas del teclado de arriba o de abajo, en función de donde se quisiese mover. Si se quería desplazar el punto más de un píxel se podían utilizar los comandos del teclado W (subir) y S (bajar) que permitían mover el punto de 5 en 5 píxeles.

Cuando el punto era corregido (Figura 16 (c)), se pasaba a los puntos adyacentes utilizando las flechas izquierda y derecha del teclado, o utilizando las teclas A (izquierda) o D (derecha) si se quería desplazar de 5 en 5 puntos. Una vez que la curva estaba modificada se le daba al botón “Enter”, con lo que se interpola la misma y se genera la nueva segmentación, quedando guardada (Figura 16 (d)). Para corregir el límite inferior de la capa RNFL se volvía a realizar los mismos pasos mencionados antes. Una vez que la imagen estaba totalmente modificada se continuaba recorriendo el volumen (botón Next) para encontrar la siguiente imagen segmentada automáticamente y se volvía a realizar los mismos pasos.

En la Figura 16 se ejemplifica el modo de modificar la segmentación de la capa RNFL.

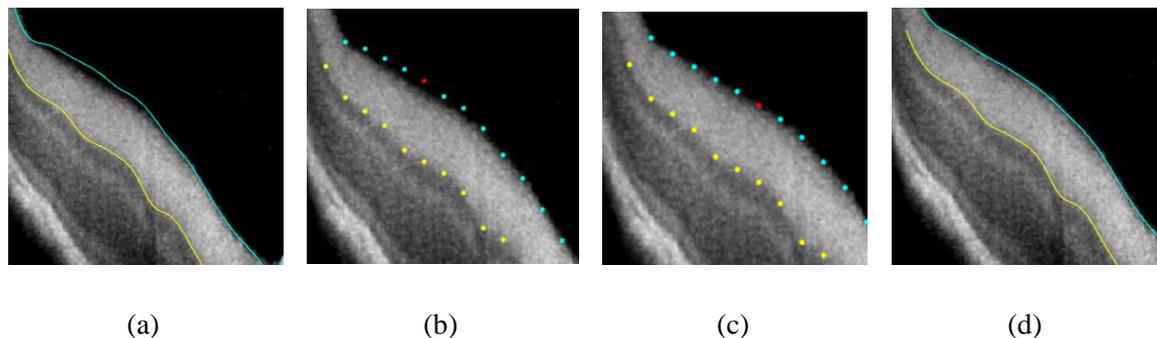


Figura 16. Modo de actuación para modificar la segmentación automática. (a) imagen segmentada automáticamente. (b) capas que aparecen como líneas discontinuas. (c) puntos modificados manualmente para ajustarlos al grosor de la RNFL. (d) nueva segmentación de la imagen.

Como se ha mencionado antes, tan sólo un número de imágenes determinado fue segmentado para cada volumen, y por tanto sólo se realizó una modificación del grosor de la RNFL en esas imágenes segmentadas automáticamente. En la Tabla 6 aparecen reflejados el número de imágenes totales que han sido modificadas manualmente a través de la aplicación, y que van a servir para analizar la efectividad de la NMDA induciendo glaucoma en roedores.

ID DE LA RATA	TIEMPO DE ADQUISICIÓN	N.º IMÁGENES DEL VOLUMEN	N.º IMÁGENES MODIFICADAS
180917-MOUSE 1	Antes (Control)	226	20
	Después (NMDA)	216	20
180917-MOUSE 2	Antes (Control)	268	23
	Después (NMDA)	214	20
181004-MOUSE 1	Antes (Control)	401	21
	Después (NMDA)	431	29
181004-MOUSE 2	Antes (Control)	650	21
	Después (NMDA)	521	21
191010-MOUSE	Antes (Control)	402	30
	Después (NMDA)	501	39

Tabla 6. Número de imágenes por rata y tiempo de adquisición de los volúmenes de ratas, antes y después de inyectarles NMDA.

Cabe destacar que como se muestra en la Figura 17 en este caso no se ha llevado a cabo la segmentación de toda la imagen al completo sino de la zona central que corresponde al nervio óptico.

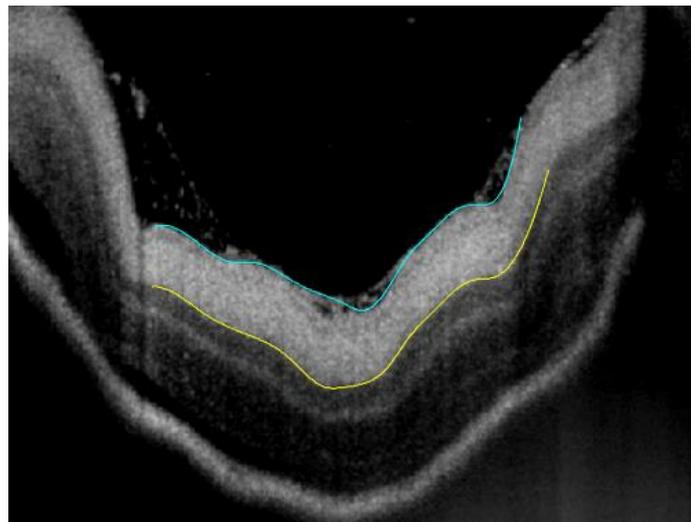


Figura 17. Imagen OCT de la segmentación modificada.

Como se puede observar en la Figura 18 (a) en este caso la segmentación presenta una curvatura, por lo que no es preciso calcular el grosor de la RNFL mediante la resta de los límites de la capa superior e inferior. En su lugar, se ha implementado la siguiente fórmula, para calcular el grosor de cada uno de los puntos:

$$dist(i) = \min_{k \in B} \left| \sqrt{((A(1, i) - B(1, k)) * s_{row})^2 + ((A(2, i) - B(2, k)) * s_{column})^2} \right|$$

En la que para un punto i de la curva ILM (A) se calcula la distancia a cada uno de los puntos k de la GCL (B), y se escoge aquella que es mínima. Los valores s_{row} y s_{column} representan la escala en el eje x y en el eje y .

Por tanto, para cada punto del límite superior de la RNFL se busca, de entre todos los puntos del límite inferior, el punto en el que la distancia al límite inferior es mínima. Este proceso es repetido para todos los puntos del límite superior (Figura 18 (b)).

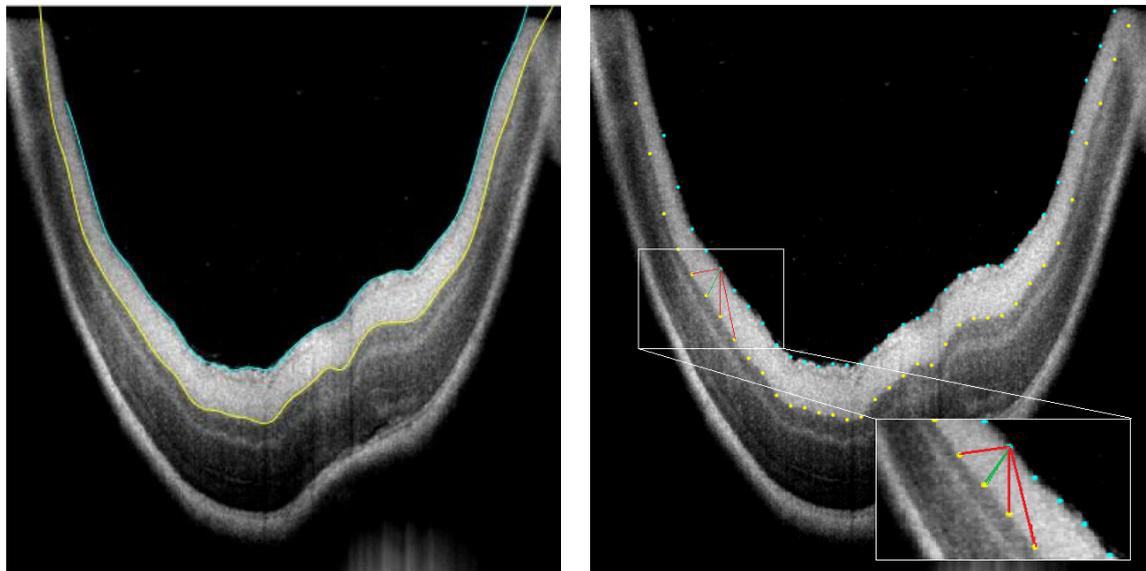


Figura 18. Segmentación OCT de imagen de la base de datos de NMDA. En (b) se visualizan las distancias de un punto de la ILM a varios puntos de la GCL, donde la distancia marcada en verde es la distancia mínima.

Posteriormente, se construye una tabla Excel para el grosor de la RNFL, del mismo modo que se ha hecho para las bases de datos de ET-1. En la tabla 7 se recoge la media del grosor de todos los píxeles de la curva RNFL por roedor y por momento de adquisición.

ID_RATA	ANTES (CONTROL)	DESPUÉS (NMDA)
	(μm)	(μm)
180917-MOUSE1	99,000	80,011
180917-MOUSE2	136,979	126,006
181004-MOUSE1	144,923	67,285
181004-MOUSE2	122,404	65,792
191010-MOUSE	109,762	74,679

Tabla 7. Media del grosor de la RNFL del conjunto de imágenes de la base de datos de NMDA por roedor y momento de adquisición de las imágenes.

Al igual que con las medias de la RNFL en la base de datos de ET-1, las medias del grosor de la RNFL de la base de datos a la que se le inyectó NMDA fueron analizadas con SPSS Statistics, para evaluar si existe una diferencia significativa en el grosor de la retina con el paso del tiempo al inyectarle NMDA.

3.2.3. Análisis estadístico con SPSS

Una vez que se han obtenido las segmentaciones y los grosores de la capa RNFL de ambas bases de datos, se procede a realizar un análisis estadístico sobre estas medidas para establecer si existen diferencias significativas entre las imágenes que se han adquirido tras la inyección de los fármacos ET-1 y NMDA. Dado que el seguimiento llevado a cabo sobre la base de datos ET-1 es diferente al que se ha realizado con NMDA, el análisis estadístico que se realiza también lo es.

Para realizar el análisis estadístico de la capa RNFL de la retina en los roedores con el programa estadístico SPSS, se ha utilizado un nivel de significación p del 0.05, teniendo por consiguiente un intervalo de confianza del 95%.

- **Análisis para los datos de ET-1**

En el caso de este grupo de datos, para realizar el análisis estadístico con el programa SPSS se utilizó un ANOVA de medidas repetidas, que se utiliza, por ejemplo, cuando se quiere evaluar la efectividad de un tratamiento. Esta prueba estadística compara las medias de un mismo grupo obtenidas en diferentes condiciones o tiempos, es decir, a los mismos sujetos se les realiza la misma valoración en distintas ocasiones (más de 2 ocasiones, puesto que si sólo se tuviesen 2 medidas se emplearía el análisis estadístico *T-Test*) [38].

En la Figura 19 se representa el modelo base para implementar el análisis ANOVA con medidas repetidas, aplicándolo al objeto de estudio de este trabajo.

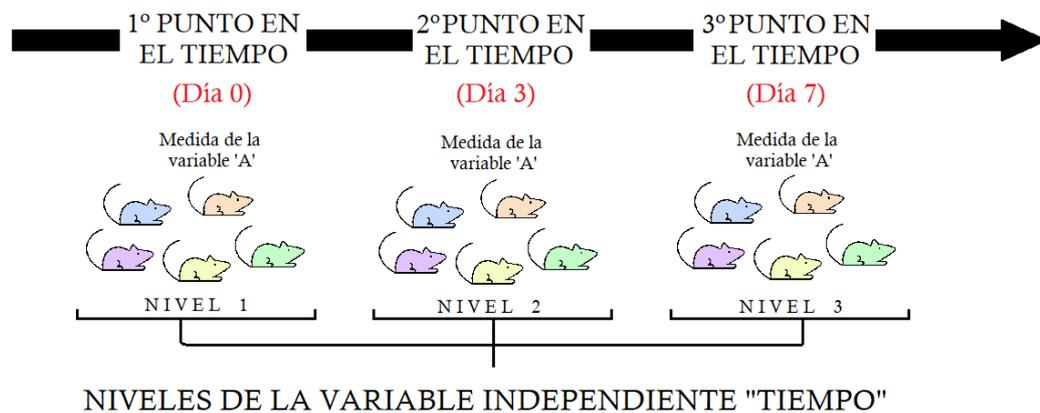


Figura 19. Esquema modelo análisis ANOVA con medidas repetidas. La variable 'A' representa la variable dependiente (grosor).

Por tanto, este análisis comprueba si existen diferencias significativas entre las medias de las poblaciones relacionadas a lo largo del tiempo. La hipótesis nula (H_0) mantiene que las medias son iguales, por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la RNFL de los roedores al administrarles ET-1 con el paso del tiempo:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k,$$

siendo μ la media de la población y k el número de grupos relacionados. La hipótesis alternativa (H_1) comprueba que las medias de las diferentes poblaciones no son iguales o que por lo menos dos de las medias son significativamente diferentes, es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la RNFL tras la administración de ET-1 con el paso del tiempo.

H_1 : al menos dos medias son significativamente diferentes.

La variable independiente (tiempo) en este caso constituye un factor intra-sujetos. La variable dependiente es una variable continua (intervalo o ratio), que como se ha mencionado antes, es el grosor de la capa de la retina a analizar. Por lo tanto, con este análisis se pretende

analizar si existe una variación del grosor de la RNFL (variable dependiente) en el tiempo (variable independiente).

La representación de los datos en este tipo de estudio (Tabla 8) consiste en formar una matriz en la que cada fila se corresponde con un sujeto y cada columna se corresponde con cada condición o momento en el tiempo. Para la primera entrega de la base de datos se tienen 7 filas correspondientes a los 7 roedores que participan en el estudio y 4 columnas correspondientes a los tiempos de adquisición (día 0, día 3, día 7 y día 14). Para la segunda entrega de la base de datos se tienen 10 filas correspondientes a los 10 roedores que participan en el estudio y 3 columnas correspondientes a los tiempos de adquisición (día 0, día 3 y día 7).

		TIEMPO (T)				
SUJETO (S)		T ₁	T ₂	T ₃	...	T _j
S ₁		S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	...	S _{1j}
S ₂		S ₂₁	S ₂₂	S ₂₃	...	S _{2j}
S ₃		S ₃₁	S ₃₂	S ₃₃	...	S _{3j}
.	
.	
.	
S _i		S _{i1}	S _{i2}	S _{i3}	...	S _{ij}

Tabla 8. Modelo análisis ANOVA de medidas repetidas. *i* el número total de sujetos en el estudio y *j* representa el número total de medidas en el tiempo y

La dispersión o la varianza asociada a un estudio puede deberse a diferentes aspectos. Para calcular esa dispersión se calcula la suma de cuadrados total (SS_T) y dentro de esta la SS entre-grupos (si hay más de un grupo) y la SS intra-sujeto. En el ANOVA de medidas repetidas únicamente se calcula la SS intra-sujeto, ya que se analiza un único grupo en diferentes tiempos.

La SS intra-sujeto se corresponde con la dispersión de cada sujeto, bien sea debido al efecto del experimento (SS_M), que sería el efecto del fármaco a lo largo del tiempo, o al error (SS_R), que se corresponde con las diferencias individuales que tiene cada uno de los sujetos (por ejemplo, la obtención de la imagen en distintos puntos de la retina).

A continuación se va a explicar brevemente a qué corresponde cada suma de cuadrados, ya que a partir de estos datos se obtiene el nivel de significación del estudio con el que se determina si existe una diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la RNFL con el paso del tiempo.

- **Suma de cuadrados total (SS_T):** Se corresponde con la varianza o dispersión existente entre las puntuaciones de cada sujeto (S_{ij}) respecto a la media total (S_{total}), ignorando la condición experimental.

$$SS_T = \sum_i (S_{ij} - S_{total})^2$$

- **Suma de cuadrados intra-sujetos (SS_{intra}):** se corresponde con la varianza o dispersión dentro del mismo sujeto.

$$SS_{intra} = \sum S_N^2(n_N - 1)$$

siendo $S_N^2 = \frac{SS_T}{Gl_T}$ la varianza entre cada puntuación del sujeto en cada condición y la media de todas las condiciones, N el número de sujetos y n_N el número de condiciones.

- **Ratio F:** compara el tamaño de la varianza asociada al experimento con la varianza. Se calcula dividiendo la media cuadrática de la variable continua (grosor RNFL) entre la media cuadrática del error de la variable continua.
- **Tamaño del efecto (η_p^2):** indica el porcentaje de la variación que se debe al experimento en sí y no al error en los datos de estudio.

Este análisis estadístico necesita que se cumplan unas condiciones para obtener un resultado válido. Las dos primeras son que la variable dependiente debe ser continua y la variable independiente debe tener al menos dos grupos relacionados. Tener al menos dos grupos relacionados significa que los mismos sujetos de estudio están presentes en ambos grupos.

Las siguientes condiciones son que no puede haber *outliers*, que la distribución de la variable dependiente debe distribuirse como una distribución normal y que los datos deben cumplir el supuesto de esfericidad, en el que las varianzas de todas las combinaciones de los grupos relacionados son iguales. Estas tres últimas condiciones se pueden comprobar a partir del programa SPSS. La única de todas ellas que no es obligatoria cumplir para que el análisis resulte válido es el supuesto de esfericidad (Test de Mauchly) ya que, si este test resulta estadísticamente significativo (no se cumple el supuesto de esfericidad), en lugar de mirar si hay una significación en la población con la prueba de la esfericidad asumida, se haría con la prueba de Greenhouse-Geisser.

En este estudio todas estas suposiciones se cumplen, por lo que el resultado del ANOVA de medidas repetidas será válido con un intervalo del 95% de confianza.

- **Análisis para los datos de NMDA**

En el caso de esta base de datos ya no se cuenta con 3 o más medidas a lo largo del tiempo, sino que se tiene únicamente una medida sin la inyección de NMDA, y otra medida 7 días después tras el suministro de este fármaco. Es por ello por lo que el análisis ANOVA de medidas repetidas no puede aplicarse en este caso. Para comparar 2 grupos relacionados entre sí (medida del grosor de la retina sin y con el suministro de NMDA) con un tipo de datos numéricos (grosor de la RNFL) se utiliza el análisis estadístico T-test para dos muestras relacionadas. El T-Test para datos relacionados exige que exista una dependencia entre los datos, dando a entender que la primera toma de muestras sirve como control, y con ella se evalúan los cambios que se originan en la segunda toma de muestras tras aplicar una variable experimental que en este caso es la inyección de NMDA [39]. Con esta prueba se comparan

las medias y las desviaciones de cada grupo de datos (cada rata), y se determina si las diferencias entre esos parámetros son estadísticamente significativas.

3.2.4. Aplicación de un perceptrón multicapa

Con el fin de llevar a cabo una identificación automática de aquellas imágenes en las que se ha producido una disminución del grosor de la RNFL a causa de la inyección de los vasoconstrictores anteriormente citados y poder comparar las conclusiones obtenidas mediante los análisis estadísticos, se implementa un algoritmo de clasificación basado en *machine learning* y denominado perceptrón.

El perceptrón es una red neuronal básica de aprendizaje supervisado al que se le introduce unos valores de entrada que son las características que se quieren analizar, produce una transformación de estas entradas de acuerdo con unos pesos e introduce el resultado en una función de activación [40]. Esta función de activación en algoritmos cuyo objetivo es la clasificación se encarga de generar una salida en un rango entre 0 y 1 que indica la probabilidad de pertenencia a cada clase bajo estudio.

Un perceptrón multicapa es como un perceptrón simple, con la diferencia de que además de tener capa de entrada y capa de salida, tiene capas ocultas que se localizan entre ambas capas. En la Figura 20 aparece un esquema del perceptrón multicapa, en el que se ven reflejadas las partes que componen esta red neuronal. En este esquema aparece únicamente una capa oculta para que sea más sencillo de visualizar. Sin embargo, un perceptrón multicapa normalmente está formado por 2 o 3 capas ocultas.

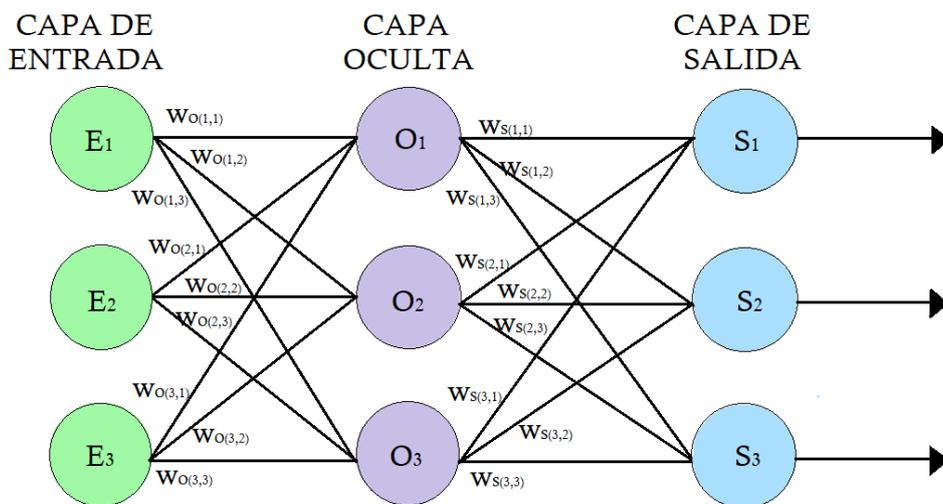


Figura 20. Arquitectura del perceptrón multicapa. E corresponde a la señal de entrada, O a la señal de la capa oculta, S a la señal de salida y w a los pesos de las conexiones neuronales.

En la capa de entrada, el número de neuronas corresponde con el número total de variables de entrada a la red. En el caso de este proyecto, para cada base de datos las variables de entrada a la red neuronal son los grosores de la RNFL a nivel de píxel para cada imagen. Esta información pasa a las capas ocultas, encargadas de transformar la información a la entrada en niveles superiores de abstracción con el objetivo de poder dividir datos de manera precisa. La capa de salida conecta la última capa oculta con la salida de la red neuronal, que es la que proporciona los resultados y está compuesta por el mismo número de neuronas que clases se pretenden predecir. En este caso la capa de salida está formada por dos neuronas, al tratarse de un problema de clasificación binario.

El aprendizaje del perceptrón multicapa es iterativo y sigue el orden que se muestra a continuación [40]:

1.- Propagación (forward): a partir de los valores de entrada se calcula el resultado de salida de la red. El algoritmo coge los datos de entrenamiento y los pasa por la red. En la primera iteración la salida no va a proporcionar información, ya que los valores de los pesos se inician aleatoriamente. Tras esta propagación hacia delante, se obtiene el error que la red ha originado al comparar la etiqueta de los datos de entrada respecto a las predicciones mediante la función de pérdidas.

2.- Aprendizaje: los errores que se obtienen en la salida del perceptrón se propagan hacia atrás (backpropagation) para ajustar los pesos de las conexiones para que el valor de la función de pérdidas disminuya, ayudando a que el valor estimado de la red en la salida se parezca más al valor real [41]. Esta aproximación se hace a través de la función gradiente del error. De este modo, después de la primera iteración, la red vuelve a leer los valores de entrada modificando los pesos de las conexiones, y vuelve a obtener una salida. Así la red va actualizando los pesos hasta que consigue un error mínimo.

Debido a las características de la segmentación de la base de datos en NMDA en las que sólo se ha segmentado la parte central de la RNFL, la longitud de cada curva es diferente, y consecuentemente el tamaño del vector para imagen que recoge el grosor de la RNFL también lo será. Por tanto, se ha hecho una reducción de los vectores de datos de cada grosor, igualando el número de datos de cada imagen a la que tiene la menor longitud medida de la RNFL (vector más pequeño). Esta reducción consiste en coger los datos centrales de la medición de todas las imágenes, para que así se tengan unos resultados equitativos de las imágenes.

En la figura 21, se muestra un ejemplo del perceptrón multicapa utilizado.

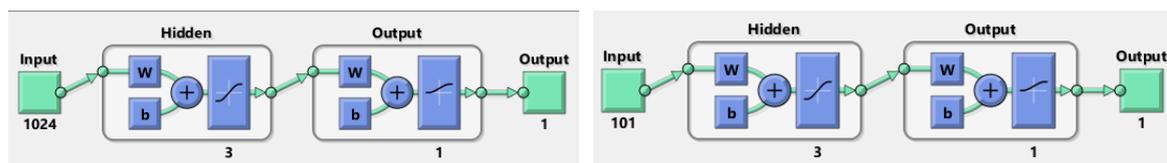


Figura 21. Esquema perceptrón multicapa utilizado. (a) esquema del perceptrón en la base de datos de ET-1, donde 1024 corresponde al tamaño de la curva en cada imagen. (b) esquema del perceptrón en la base de datos de NMDA, en la que 101 corresponde al tamaño de cada curva tras la reducción al tamaño mínimo.

Para cada red neuronal se han utilizado 3 capas ocultas. Además, los parámetros que se han utilizado en el perceptrón multicapa han sido: el optimizador Ledenverg-Marquardt (ajusta curvas de mínimos cuadrados), la función de pérdidas *crossentropy* (encargada de minimizar el error) y se ha establecido un nivel máximo de error de 40.

La función de activación a la salida en este trabajo es la *softmax*, que permite realizar una clasificación binaria (propósito de este trabajo). Con esta clasificación binaria se obtiene, para cada imagen, un 0 si la retina no tiene glaucoma y con un 1 si tiene glaucoma inducido.

Como se ha comentado anteriormente, un perceptrón multicapa es un algoritmo supervisado por lo que es necesario determinar que muestras se utilizarán para el entrenamiento y validación del modelo. Esto se debe a que, si se utilizan los mismos datos para entrenar que para validar, los resultados

finales no serán robustos, debido a que la red habría utilizado datos de validación con los que ya ha trabajado en el entrenamiento.

Para evitar que esto suceda, se ha utilizado la técnica de *leave-one-out cross validation*. Con esta técnica se realiza una partición de datos de manera que para cada iteración todos los sujetos de estudio menos 1 se utilizan para el entrenamiento y ese 1 restante se utiliza para la validación de la red. Este proceso se va repitiendo hasta que todos los sujetos han sido utilizados para testear y validar en iteraciones distintas. De esta forma se pueden obtener las predicciones para todos los sujetos bajo estudio.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Índice de contenidos

4.1. Análisis estadístico del grosor RNFL con SPSS Statistics.....	40
4.1.1. Base de datos ET-1.....	40
4.1.2. Base de datos NMDA.....	44
4.2. Análisis resultados de la red neuronal.....	45

4.1. Análisis estadístico del grosor RNFL con SPSS Statistics

En esta sección aparecen los resultados estadísticos del análisis del grosor de la capa RNFL con el programa estadístico SPSS Statistics.

4.1.1. Base de datos ET-1

El análisis estadístico de este grupo de base de datos se realizó mediante el análisis ANOVA de medidas repetidas. A la hora de realizar este análisis, para cada entrega de la base de datos de ET-1, al programa se le añade el número de niveles que tiene la variable independiente (tiempo), y se le asigna un nombre a la variable dependiente, que en este caso es el grosor de la RNFL. Tras definir las variables se adjudica a cada grupo de toma de medidas el tiempo correspondiente de cada nivel de la variable independiente, y se selecciona comparar los efectos principales. Esto quiere decir que, si bien el ANOVA va a estudiar si existen diferencias significativas o no entre las medias de los distintos grupos, para poder comparar entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas, se necesita comparar los efectos principales y ajustar el intervalo de confianza. Este intervalo se ajusta mediante Bonferroni, para solventar el problema de las comparaciones múltiples [44].

Los resultados para la prueba de esfericidad de Mauchly se recogen en la Tabla 9, donde se puede observar que en ambas entregas $p > 0.05$, no resultando estadísticamente significativo. Por tanto, ambas entregas de la base de datos cumplen el supuesto de esfericidad.

NÚMERO DE ENTREGA DE LA BASE DE DATOS	SIGNIFICACIÓN (p)
PRIMERA ENTREGA DE ET-1	0.314
SEGUNDA ENTREGA ET-1	0.265

Tabla 9. Resultados de la prueba de esfericidad de Mauchly para las dos entregas de la base de datos de ET-1.

- **Primera entrega de la base de datos de ET-1.**

En la Tabla 10, aparece la media de la capa de RNFL para cada roedor en cada momento de adquisición. Estos datos son los que se introducen al programa estadístico para que sean analizados, estudiando si existe con una diferencia significativa entre el grosor de la RNFL antes de inyectarle ET-1 y en días posteriores.

ID RATA	DÍA 0	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14
	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
C23 GP1A A1	60,407	68,649	64,133	57,900
C23 GP1A A2	65,377	67,638	67,424	61,340
C23 GP1A A3	66,786	75,047	76,699	68,393
C23 GP1A A4	61,961	80,569	70,987	61,895
C24 GP2B A1	65,094	65,153	66,305	66,579
C24 GP2B A2	60,469	73,609	68,057	65,798
C24 GP2B A3	60,090	81,852	63,019	64,741

Tabla 10. Conjunto de medias de la RNFL de la primera entrega de la base de datos de ET-1 a analizar.

Como se cumple el supuesto de esfericidad, para comprobar si existe una diferencia significativa en las poblaciones se comprueba el resultado obtenido en la esfericidad asumida de las pruebas de efectos intra-sujetos (Tabla 11).

	ORIGEN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG. (p)	TAMAÑO DEL EFECTO (η_p^2)
ESFERICIDAD ASUMIDA	Tiempo	468,829	3	156,276	9,054	0,001	0,601
	Error (Tiempo)	310,685	18	17,260			

Tabla 11. Comprobación de la diferencia significativa en las poblaciones de la primera entrega de la base de datos de ET-1.

La significación es menor de 0.05 ($p = 0,001$), por tanto, existe alguna diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la RNFL entre las diferentes tomas de medidas, con un nivel de confianza del 95%. El tamaño del efecto (η_p^2) indica el porcentaje de la variación que se debe al experimento en sí y no al error. En este caso, el 60,1% se debe al efecto de las condiciones de valoración.

Por lo tanto, a primera instancia se podría concluir que el grosor de la capa de RNFL en esta entrega de datos se ve afectado por la inyección de ET-1 a lo largo del tiempo, $F(3,18) = 9.054$, $p < 0.05$, $(\eta_p^2) = 0.601$. Para saber entre qué grupos se encuentra esta diferencia y si tiene el sentido esperado, reducción del grosor de la RNFL tras la inyección de ET-1, se analiza la tabla de comparaciones por pares, que indica las diferencias estadísticamente significativas entre pares de mediciones. En esta tabla aparece la diferencia de medias, si esta diferencia es negativa, significa al comparar el grosor de la RNFL entre los dos momentos de tiempo, éste ha aumentado. Para esta entrega, en total, se hacen 6 comparaciones (Tabla 12): 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 y 3-4, donde 1 corresponde al día 0, 2 corresponde al día 3, 3 corresponde al día 7 y 4 corresponde al día 14. En esta tabla se visualiza dónde está la diferencia estadísticamente significativa.

POBLACIONES DE ESTUDIO		DIFERENCIA DE MEDIAS (μm)	SIGNIFICACIÓN (p)
1	2	-10.333	0.086
1	3	-5.206	0.049
1	4	-0.923	1
2	3	5.127	0.670
2	4	9.410	0.067
3	4	4.283	0.219

Tabla 12. Significación por parejas de poblaciones de la primera entrega de la base de datos de ET-1.

En esta tabla se ve que la única comparación estadísticamente significativa se encuentra entre el día 0 y el día 7 ($p < 0.05$). Sin embargo, a partir de la tabla se puede observar también que la media del día 7 con respecto al día 0 aumentó. Por lo tanto, este resultado no tiene sentido ya que, independientemente de esto, lo que debería pasar es que la diferencia entre los momentos temporales fuese positiva.

Para comprender este resultado se obtiene el gráfico de medias marginales estimadas del grosor de la RNFL (Thickness RNFL) a lo largo del tiempo (Figura 22).

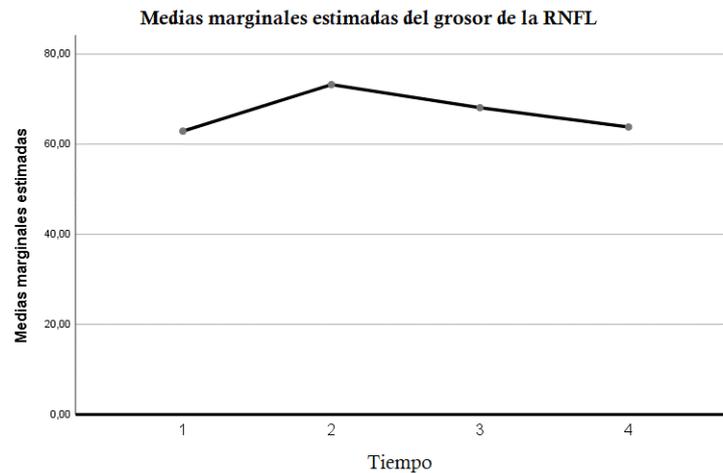


Figura 22. Evolución del grosor de la RNFL en el tiempo de la primera entrega de la base de datos de ET-1.

En este gráfico se visualiza que en el día 7 el grosor de la RNFL aumenta. Este aumento puede deberse a que la adquisición en ese día se realizó en una zona que no se vio afectada por la ET-1, ya que las imágenes retinianas que se obtienen en esta base de datos se forman a partir exploraciones circulares ubicadas en diferentes posiciones del ojo.

Por lo tanto, aunque exista una diferencia significativa entre el día 0 y el día 7, este resultado no sería válido, ya que en la gráfica se debería ver un descenso del tamaño de la retina en el tiempo. Además, se puede ver que en el día 14 se produce un decremento de la RNFL, pero éste no es significativo con respecto al día 0.

En base a estos resultados estadísticos obtenidos se puede concluir que la inyección del ET-1 con estas adquisiciones no es útil para inducir el glaucoma.

- **Segunda entrega de la base de datos de ET-1.**

En la Tabla 13, aparece la media de la capa de RNFL para cada roedor en cada momento de adquisición para esta entrega de datos. Al igual que en la primera entrega, estos datos son los que se introducen al programa estadístico e para que sean analizados, estudiando si existe con una diferencia significativa entre el grosor de la RNFL antes de inyectarle ET-1 y en días posteriores.

ID RATA	DÍA 0 (μm)	DÍA 3 (μm)	DÍA 7 (μm)
RAT002	66,009	74,415	70,665
RAT003	64,297	79,497	67,690
RAT005	62,691	64,764	62,884
RAT006	61,106	65,586	69,619
RAT007	60,165	80,056	70,610
RAT008	60,107	67,685	62,932
RAT009	68,275	75,971	73,733
RAT010	61,985	78,987	73,809
RAT011	71,532	75,969	69,325

RAT012	69,457	89,658	77,748
---------------	--------	--------	--------

Tabla 13. Conjunto de medias de la RNFL de la segunda entrega de la base de datos de ET-1 a analizar.

Al igual que para la primera entrega, como se cumple el supuesto de esfericidad, se analiza el resultado obtenido en la esfericidad asumida de las pruebas de efectos intra-sujetos para comprobar si existe una diferencia significativa en las poblaciones (Tabla 14).

	ORIGEN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG. (P)	TAMAÑO DEL EFECTO (η_p^2)
ESFERICIDAD ASUMIDA	Tiempo	572,062	2	286,031	19,118	0,00003	0,680
	Error (Tiempo)	269,298	18	14,961			

Tabla 14. Comprobación de la diferencia significativa en las poblaciones de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.

La significación es menor de 0.05 ($p = 0,00003$), por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la RNFL entre las diferentes tomas de medidas, con un nivel de confianza del 95%. En este caso, el 68% de la variación se debe al experimento en sí y no el error.

Por lo tanto, en una primera prueba se podría concluir que el grosor de la capa de RNFL en esta entrega de datos se ve afectado por la inyección de ET-1 a lo largo del tiempo, $F(2,18) = 19.118$, $p < 0.05$, $(\eta_p^2) = 0.680$. Para saber entre qué grupos se encuentra esta diferencia y si tiene el sentido esperado, se analiza la tabla de comparaciones por pares, que va a indicar las diferencias estadísticamente significativas entre pares de mediciones. Para esta entrega en total se hacen 3 comparaciones (Tabla 15): 1-2, 1-3 y 2-4, donde 1 corresponde al día 0, 2 corresponde al día 3 y 3 corresponde al día 7. En esta tabla se visualiza dónde está la diferencia estadísticamente significativa.

POBLACIONES DE ESTUDIO		DIFERENCIA DE MEDIAS (μm)	SIGNIFICACIÓN (P)
1	2	-10.696	0.002
1	3	-5.339	0.013
2	3	5.357	0.022

Tabla 15. Significación por parejas de poblaciones de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.

En esta tabla se ve que todas las comparaciones son estadísticamente significativas ($p < 0.05$), con un nivel de significación del 0.05. También se observa a partir de la tabla, que a medida que pasa el tiempo, el grosor de la RNFL aumenta (signo negativo en la diferencia de medias) y que el resultado último del grosor de esta capa es mayor que en el día 0 del estudio. Para visualizar este resultado, también se obtiene el gráfico de las medias marginales estimadas del grosor de la RNFL a lo largo del tiempo (Figura 23).

En este gráfico se puede ver lo comentado en el párrafo anterior, que en el día 3 el grosor de la RNFL aumenta y que el grosor en el día 7 es mayor que en el día 0. Por lo tanto, aunque exista una diferencia significativa, este resultado tampoco sería válido, ya que en la gráfica se debería ver un descenso del tamaño de la retina en el tiempo.

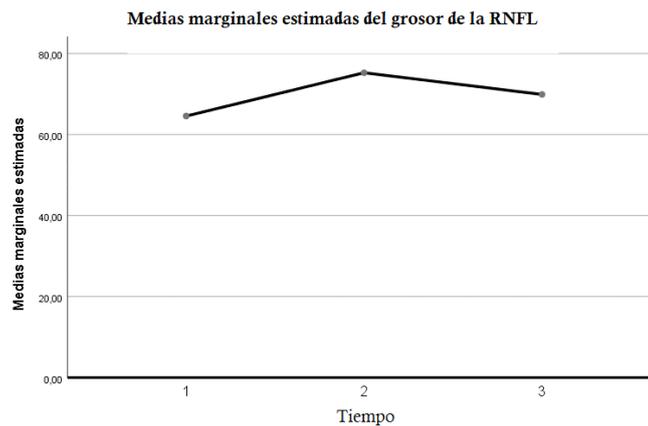


Figura 23. Evolución del grosor de la RNFL en el tiempo de la segunda entrega de la base de datos de ET-1.

4.1.2. Base de datos NMDA

El análisis estadístico de este grupo de base de datos se realizó mediante el análisis estadístico *T-Test* para dos muestras relacionadas. A la hora de realizar este análisis, para la base de datos de NMDA, al programa se le añaden los datos de cada grupo, uno correspondiente a los datos control, que sirve para evaluar los cambios que se originan en el segundo grupo a analizar. El segundo grupo corresponde a la retina con NMDA. Con esta prueba se determina si la diferencia entre las medias de la RNFL para cada grupo es estadísticamente significativa.

En la Tabla 16, aparece la media del grosor de la capa de RNFL para cada roedor en la retina control y en la retina con NMDA. Estos datos se introducen en SPSS para evaluar si existe una diferencia significativa entre el grosor de la RNFL en la retina control y la retina con NMDA.

ID RATA	ANTES	NMDA
	(μm)	(μm)
180917-MOUSE1	99	80,011
180917-MOUSE2	136,979	126,006
181004-MOUSE1	144,923	67,285
181004-MOUSE2	122,404	65,792
191010-MOUSE	109,762	74,679

Tabla 16. Conjunto de medias de la RNFL de la base de datos de NMDA.

En la Tabla 17 aparece el resultado del análisis estadístico *T-Test* para esta base de datos. El resultado de este análisis es estadísticamente significativo, por lo que se puede decir que con un nivel de significación del 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grosor de la RNFL en la retina control y el grosor de la RNFL en la retina a la que se le administró NMDA. Además, como puede verse en la tabla anterior, los grosores en todos los casos son menores cuando se añade NMDA.

PRUEBA DE MUESTRAS EMPAREJADAS	SIGNIFICACIÓN
GROSOR RNFL CONTROL – GROSOR RNFL NMDA	0,031

Tabla 17. Resultado análisis estadístico T-Test para la base de datos de NMDA.

4.2. Análisis resultados de la red neuronal

El objetivo de la red neuronal utilizada reside en detectar automáticamente a aquellos roedores en los que se ha inducido el glaucoma. Por ello, en este apartado se analizan los resultados obtenidos del análisis de sensibilidad y especificidad en la red neuronal para cada base de datos, que sirve para indicar la validez de la red. Los índices utilizados en esta prueba son:

- Verdaderos positivos (VP): número de casos que la prueba declara como positivos y que realmente son positivos.
- Falsos positivos (FP): casos que aparecen como positivos y que en realidad son negativos.
- Verdaderos negativos (VN): casos que la prueba declara como negativos y que realmente son negativos.
- Falsos negativos (FN): casos que aparecen en la prueba como negativos y que en realidad son positivos.

A continuación, se expone el significado de cada dato obtenido, así como el modo de obtenerlo:

- **Sensibilidad:** Equivale a la tasa de verdaderos positivos (VP). Es la proporción de casos positivos que son detectados en la prueba, es decir, la capacidad para detectar de manera correcta la presencia de la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

- **Especificidad:** Equivale a la tasa de verdaderos negativos (VN). Es la proporción de casos negativos que son detectados en la prueba, es decir, la capacidad para detectar la ausencia de la enfermedad.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

- **Valor Predictivo Positivo (VPP):** Es la relación entre todos los casos verdaderamente positivos y los verdaderos positivos que son detectados por la prueba. Señala el porcentaje de casos positivos detectados por la prueba entre todos los casos positivos.

$$\text{VPP} = \frac{VP}{VP + FP}$$

- **Valor Predictivo Negativo (VPN):** Es la relación entre todos los casos verdaderamente negativos y los verdaderos negativos que han sido detectados por la prueba. Señala el porcentaje de casos negativos detectados por la prueba entre todos los casos negativos.

$$\text{VPN} = \frac{VN}{VN + FN}$$

- **Exactitud:** Es el porcentaje de acierto total que tiene la prueba. Se obtiene dividiendo los verdaderos positivos y negativos entre el número total de datos.

$$\text{Exactitud} = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN}$$

- **F-Score:** es la media armónica entre valor predictivo positivo (VPP) y la sensibilidad, asumiendo que estas dos variables son igual de importantes.

$$F_Score = 2 * \frac{VPP * sensibilidad}{VPP + sensibilidad}$$

- **Matriz de confusión:** esta matriz recoge todos los índices obtenidos en el estudio. Siguiendo el orden que se recoge en la Tabla 18:

Verdaderos Positivos	Falsos Negativos
Falsos Positivos	Verdaderos Negativos

Tabla 18. Distribución de la matriz de confusión.

En la Tabla 19 se recogen los resultados del análisis de la red neuronal para cada base de datos utilizada en este trabajo. Los resultados que se muestran se obtienen aplicando las ecuaciones anteriores, partiendo de los datos que aparecen en cada matriz de confusión.

Para las dos entregas de la base de datos de ET-1 los resultados obtenidos son similares. Estos resultados no dejan ver que la red neuronal utilizada sea muy efectiva, ya que los datos se sitúan alrededor del 0.5, y al analizar la matriz de confusión, se observa que la red detecta muy pocos VP. Para la primera entrega de datos, aunque el valor del VPN en el estudio en la primera entrega de datos de la ET-1 es bastante elevado, el resto de los índices presentan un valor intermedio. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en el análisis estadístico, ya que al no tener resultados estadísticamente significativos, obtener un análisis de sensibilidad y especificidad óptimos resulta imposible. De esta forma se concluye con la red neuronal que la ET-1 en este estudio no demuestra que pueda inducir glaucoma en la dosis que se le inyecta a los roedores.

En cambio, al observar los resultados de la base de datos de NMDA, éstos se sitúan muy cercanos al 1. Además, en la matriz de confusión, se puede ver que la red neuronal detecta un gran porcentaje de VP y VN. Los resultados de esta base de datos también concuerdan con lo obtenido en el análisis estadístico, ya que se consiguió un resultado estadísticamente significativo. De este modo se puede concluir con la red neuronal que en este estudio el NMDA es mejor que la ET-1, ya que con una menor concentración, se demuestra que puede inducir glaucoma en roedores.

ÍNDICES OBTENIDOS	1º ENTREGA ET-1	2º ENTREGA ET-1	NMDA
SENSIBILIDAD	0.5714	0.5682	0.7364
ESPECIFICIDAD	0.6824	0.6491	0.8261
PPV	0.3721	0.5556	0.8261
VPN	0.8286	0.6607	0.7364
EXACTITUD	0.6549	0.6139	0.7787
FSCORE	0.4507	0.5618	0.7787
MATRIZ DE CONFUSIÓN	16 12	25 19	95 34
	27 58	20 37	20 95

Tabla 19. Análisis de la validez de la red neuronal.

Haciendo revisión bibliográfica se encuentra que la inyección de NMDA en modelo roedor daña las células de las capa de fibras del nervio óptico y las células ganglionares en roedores, reduciendo su viabilidad al 50% a partir del suministro de una dosis de NMDA de 100 μ M [45]. En la base de datos de NMDA utilizada para este trabajo, aunque la dosis utilizada para inducir glaucoma fue mucho menor (100 nmolar), se obtuvieron buenos resultados induciendo el glaucoma en los roedores.

Además, en el estudio [46] la concentración de endotelina-1 suministrada para inducir glaucoma fue mucho menor que la inyectada en los roedores utilizados en este estudio. La dosis administrada fue de 20 a 200 pmol/ ojo, y provocó una disminución significativa en el grosor de la retina de las ratas de este estudio, y esta lesión retiniana se traduce en glaucoma inducido por ET-1 en la rata. Esto puede deberse a la manera de obtener las imágenes OCT, ya que aunque en este estudio también se obtuvieron mediante exploraciones circulares, sólo se realizó en la parte central del disco óptico, y además, sólo se analizó la zona superior de la sección circumpapilar.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Índice de contenidos

5.1. Conclusiones	50
5.2. Limitaciones y líneas futuras.....	50

5.1. Conclusiones

La motivación de este trabajo es el desarrollo de sistemas de identificación de glaucoma inducido aplicados a imágenes OCT de retina para evaluar qué fármaco es más efectivo induciendo el glaucoma en roedores.

Para llevar a cabo el objetivo de este proyecto, se ha trabajado con dos bases de datos de imágenes OCT procedentes de dos poblaciones de roedores, a las que se les ha inducido el glaucoma de manera artificial. A los roedores de la primera base de datos se les ha inducido glaucoma mediante ET-1 y a la segunda con NMDA. Las imágenes de la primera base de datos se obtuvieron a partir de unos cortes circulares en la retina, mientras que para la segunda base de datos se obtuvieron los volúmenes 3D-OCT de la retina. A partir de estas imágenes, se ha calculado el grosor de la RNFL, y se han tenido en cuenta unos criterios de exclusión, eliminando del estudio algunos sujetos, para que éste sea fiable. Con los grosores de la RNFL se ha estudiado si existen diferencias estadísticamente significativas en estos roedores habiendo suministrado ET-1 o NMDA. Además, utilizando los grosores como características de entrada, se ha realizado un perceptrón multicapa para clasificar de forma automática los datos a los que se le ha inducido glaucoma de los que no.

Para la base de datos de ET-1, aunque aparecen diferencias estadísticamente significativas entre determinados grupos, estos resultados no son congruentes, ya que en lugar de disminuir el grosor de la RNFL con el tiempo, estos datos se ven alterados, aumentando el grosor de la RNFL en el día 3 y carecen de sentido. Para la base de datos de NMDA, aparece una diferencia estadísticamente significativa entre la retina control del roedor y la retina a la que se le ha suministrado NMDA, disminuyendo el grosor de la capa RNFL. Estos resultados estadísticos concuerdan con los valores extraídos de la red neuronal, ya que únicamente es en el base de datos de NMDA donde aparece un buen resultado.

Teniendo en cuenta estos resultados, y sabiendo que la concentración administrada de ET-1 es muy superior a la administrada de NMDA (siendo estas concentraciones de 500 μ molar y 100 nmolar para ET-1 y NMDA respectivamente) podemos concluir que el NMDA es efectivo induciendo el glaucoma en roedores, ya que con mucha menos concentración del fármaco ha sido capaz de producir cambios estadísticamente significativos en el grosor de la RNFL.

Por otro lado, se puede decir que la red neuronal entrenada y validada para detectar el glaucoma da buenos resultados, debido a que para la base de datos de NMDA, que es la que en el análisis estadístico da un resultado estadísticamente significativo, los valores obtenidos tanto de sensibilidad como de especificidad están muy cercanos al 1.

5.2. Limitaciones y líneas futuras

Las principales limitaciones en este trabajo han sido las bases de datos tan reducidas con la que se ha hecho el estudio. Una base de datos con más roedores podría mejorar los resultados. Otra limitación respecto a la base de datos de ET-1 es la obtención de las imágenes OCT de la estructura retiniana en diferentes puntos de la retina, y no marcar a qué posición corresponde cada imagen. Esto ha afectado en el sentido de que realmente no es posible asegurar que el fármaco ET-1 no sea efectivo induciendo el glaucoma, ya que ha podido influir la zona en la que se ha recogido cada imagen. De

Para futuros estudios, sería interesante recoger las imágenes OCT en la misma zona de la retina, puesto que, aunque se tenga una estructura anatómica normal del ojo, el grosor de capa difiere en función de en qué punto de la retina se obtengan las imágenes. De este modo, se podría realizar un estudio mucho más fiable, ya que se analizaría la efectividad de un fármaco induciendo el glaucoma en roedores sólo teniendo en cuenta el fármaco en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud. (8 de octubre de 2019). *La OMS presenta el primer Informe mundial sobre la visión*. <https://www.who.int/es/news-room/detail/08-10-2019-who-launches-first-world-report-on-vision>
- [2] Río Torres, M. (2017). "Glaucoma: pasado y presente". *Revista Cubana de Oftalmología*. La Habana: Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". http://revoftalmologia.sld.cu/index.php/oftalmologia/article/view/629/html_321
- [3] Marovac, J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista médica de Chile*, 129(1), 99-106. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001000100015>
- [4] Understanding Animal Research. (2018). *For human health*. <https://www.understandinganimalresearch.org.uk/why/human-health/>
- [5] Marín García, P. (2013). El animal de laboratorio: herramienta esencial en la investigación biomédica. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*. DOI: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2013.12.1
- [6] Pinilla, I., Ruiz-Moreno, J.M., y Cuenca, N. (2012). Correlación de la tomografía de coherencia óptica con la histología retiniana. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 87(9), 275-277. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.oftal.2012.05.002>
- [7] Comisión Europea (2014). *Horizon 2020 en breve – El Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea*. DOI: 10.2777/80075. ISBN 978-92-79-38915-3
- [8] T. G. Project and V. C. Ltd. (2018). *Glaucoma – Advanced, Label-free High resolution Automated OCT Diagnostics*. <https://galahad-project.eu/>
- [9] Ramírez, S., Peña-Toro Girela, J., & Cabezas Jiménez, J. 1. Anatomía del ojo. <https://www.faeditorial.es/capitulos/urgencias-oftalmologicas.pdf>
- [10] Dimieri, L. D. (2015). *Aspectos físicos de la visión humana*. Tesis de licenciatura en física [Imagen]. Recuperado de <http://leodimieri.16mb.com/>
- [11] Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K. y Omid, Y. (2010). *Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidosis disease on structure and function - a review*. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 38, no. SUPPL. 1, pp.
- [12] Garcia, L. (2014) *Cámara anterior, posterior y vítrea*. Introducción a la optometría. <https://es.slideshare.net/linitaleightoon/cmara-47219579>
- [13] Puell Marín, M. (2006). Óptica Fisiológica: el sistema óptico del ojo y la visión binocular. *Manual. Universidad Complutense de Madrid, Madrid*. ID: 14823. https://eprints.ucm.es/14823/1/Puell_%C3%93ptica_Fisiol%C3%B3gica.pdf
- [14] Pro Visum Foundation. (2019). *Anatomía del ojo*. [Imagen]. Recuperado de <https://www.provisu.ch/es/dossiers-es/ojo-y-vision.html>

- [15] Oftalvist. (s.f.). *Unidades de tratamiento: Retina y mácula*. [Imagen]. Recuperado de <https://www.oftalvist.es/es/especialidades/unidad-de-retina-y-macula>
- [16] Salas Torras, A. (2017). Desarrollo de modelos celulares y animales para el estudio de terapia génica no viral anti-angiogénica en retina. ISBN: 9788449074479. [Imagen]. Recuperado de <https://www.tdx.cat/handle/10803/456676#page=1>
- [17] Romera, M. ¿Por dónde drena el líquido intraocular? *Innova Ocular ICO Barcelona*. [Imagen]. Recuperado de <https://www.icoftalmologia.es/es/noticias/por-donde-drena-el-liquido-intraocular-glaucoma/>
- [18] Vademecum. (2015). *Principios activos del tafluprost*. <https://www.vademecum.es/principios-activos-tafluprost-s01ee05>
- [19] Nagata, A., Omachi, K., Higashide, T., Shirae, S., Shimazaki, A., Nakamura, M., Ishida, N. y Sugiyama, K. (2014). Evaluación de OCT de los efectos neuroprotectores del tafluprost sobre la lesión retiniana después de la inyección intravítrea de endotelina-1 en el ojo de rata. *Invertir. Oftalmol Vis. Sci.*; 55 (2): 1040-1047. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13056>
- [20] Mozafarieh, M., Fraenkl, S., Konieczka, K., Flammer, J. (2010). Más allá de la presión intraocular. <https://www.franjaocular.com/index.php/glaucoma/115-mas-alla-de-la-presion-intraocular-parte-i>
- [21] Wikipedia. (2020). *Excitotoxicidad*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Excitotoxicidad>
- [22] Mendoza Santiesteban, C., Santiesteban Freixas, R., González García, A., González Hess, L., Perdomo Trujillo, Y., Alemañy Rubio, E., Eguía, F., y Vidal Casals, S. (2005). La tomografía de coherencia óptica en el diagnóstico de enfermedades de la retina y el nervio óptico. *Revista Cubana de Oftalmología*, 18(2) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762005000200009&lng=es&tlng=es
- [23] Boixadera Espax, A. (2003). Descripción y análisis de los hallazgos con tomografía de coherencia óptica en el desprendimiento de la retina rhexmatógeno primario con afectación macular.
- [24] López Quiroga, D. (2007). Realización de un Tomógrafo Óptico Coherente.
- [25] Vilaplana Cerdá, R. (2004). Propiedades de dispersión de luz por partículas irregulares: una aplicación al estudio de las partículas cometarias
- [26] Moreno, S. (2019). Diseño y desarrollo de un sistema de detección automática de glaucoma a partir de la segmentación y estudio de las capas de la retina en imágenes OCT circumpapilares.
- [27] Griño, C., Lugo, F., León, M., Ligeró, S., Ruiz-Moreno, J. y Montero, J. (2008). *Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Funcionamiento y utilidad en patología macular*. Artículos Científicos, no. I, pp. 12–14.
- [28] Plos One. (s.f.). Glaucomatous changes in lamina pores shape within the lamina cribrosa using wide bandwidth, femtosecond mode-locked laser OCT. [Imagen]. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181675.g001>

- [29] Ungar, A. K., Wollstein, G. y J. S. Schuman, J. S. (2012). Optical coherence tomography in glaucoma.
- [30] Carreño Peñaranda, R. (2013). Diferencia en la medida centrada y descentrada del espesor y volumen retiniano con Tomografía de Coherencia Óptica (OCT 3D). <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/3696>
- [31] Hernández, M. (2014). Validez del ratio espesor del complejo de células ganglionares maculares respecto al espesor retiniano total en la detección del glaucoma en nuestro medio. [Imagen]. <http://hdl.handle.net/2117/89269>
- [32] Pang, I. H., & Clark, A. F. (2007). Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *Journal of glaucoma*, 16(5), 483–505. <https://doi.org/10.1097/IJG.0b013e3181405d4f>
- [33] Valiente, F.J. (2015). Caracterización en Roedores Adultos de la Población de Células Ganglionares de Retina Melanopsínicas y Estudio de la Degeneración de las Células Ganglionares tras Hipertensión Ocular y Neuroprotección. <http://hdl.handle.net/10201/45558>
- [34] Sugiyama, T., Moriya, S., Oku, H., & Azuma, I. (1995). Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies. *Survey of ophthalmology*, 39 Suppl 1, S49–S56. [https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(05\)80073-6](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(05)80073-6)
- [35] Villanueva Coello, B. (2017). Análisis de imágenes oftalmológicas de Tomografía por Coherencia Óptica OCT.
- [36] MathWorks, https://es.mathworks.com/help/matlab/learn_matlab/product-description.html
- [37] IBM, <https://www.ibm.com/es-es/products/spss-statistics>
- [38] Laerd statistics. *ANOVA with Repeated Measures using SPSS Statistics*. <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/one-way-anova-repeated-measures-using-spss-statistics.php>
- [39] Máxima formación. *Guía definitiva para encontrar la prueba estadística que buscas*. <https://www.maximaformacion.es/blog-dat/guia-para-encontrar-tu-prueba-estadistica/>
- [40] Diego Calvo. <https://www.diegocalvo.es/perceptron/>
- [41] Diego Calvo. <https://www.diegocalvo.es/perceptron-multicapa/>
- [42] Towards Automatic Glaucoma Assessment: An Encoder-decoder CNN for Retinal Layer Segmentation in Rodent OCT images, ya que es el algoritmo utilizado para obtener la segmentación.
- [43] Marin, J. M. (s.f.). Análisis de varianza con medidas repetidas. *Capítulo 16: El procedimiento Modelo lineal general. Medidas repetidas*. <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/GuiaSPSS/16anovar.pdf>
- [4] Molina Arias, M. (2014). El problema de las comparaciones múltiples. *Pediatría Atención Primaria*, 16(64), 367-370. <https://dx.doi.org/10.4321/S1139-76322014000500019>

- [45] Li, R., Jin, Y., Li, Q., Sun, X., Zhu, H., & Cui, H. (2018). MiR-93-5p targeting PTEN regulates the NMDA-induced autophagy of retinal ganglion cells via AKT/mTOR pathway in glaucoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, 1-7.
- [46] Nagata, A., Omachi, K., Higashide, T., Shirae, S., Shimazaki, A., Nakamura, M., ... & Sugiyama, K. (2014). OCT evaluation of neuroprotective effects of tafluprost on retinal injury after intravitreal injection of endothelin-1 in the rat eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(2), 1040-1047.

II. PRESUPUESTO

CAPÍTULO 1

PRESUPUESTO

Índice de contenidos

1.1.	Objetivo.....	60
1.2.	Presupuestos parciales.....	60
1.2.1.	Costes de personal.....	60
1.2.2.	Costes de hardware.....	60
1.2.3.	Costes de software.....	601
1.3.	Presupuestos totales.....	61

1.1. Objetivo

El objetivo de esta sección es realizar una valoración económica de este proyecto basado en el desarrollo de sistemas de identificación de glaucoma inducido aplicados a imágenes OCT de retina.

1.2. Presupuestos parciales

Los presupuestos parciales de este trabajo se dividen en: coste de personal, coste de *software* y coste de *hardware*. A partir de estos presupuestos parciales se obtendrá el presupuesto total.

1.2.1. Costes de personal

En este punto se calculan los recursos humanos necesarios para la realización de este proyecto. En la Tabla 1 se recogen los costes de mano de obra, con la remuneración de cada participante en función de las horas invertidas en el proyecto:

- ⇒ D^a Valery Naranjo Ornedo, catedrática de universidad y tutora del trabajo.
- ⇒ D^a Rocío del Amor del Amor, estudiante del Máster de Ingeniería Biomédica y cotutora del proyecto.
- ⇒ D^a Laura Sánchez-Luis Jiménez, estudiante del Grado de Ingeniería Biomédica y autora del proyecto.

Descripción	Uds.	Cantidad	Precio unitario (€/h)	Coste imputable (€)
Tutora (Catedrática)	h	32	42	1.344,00
Cotutora (Estudiante MIB)	h	32	17,20	550,40
Autora (Estudiante GIB)	h	300	12,50	3.750,00
TOTAL				5.644,40

Tabla 1. Descomposición del coste de personal.

1.2.2. Costes de hardware

Este proyecto se ha desarrollado utilizando un único ordenador, por lo que en la Tabla 2 se recoge el coste que ha supuesto el uso del equipo personal, que es el coste completo de hardware.

Descripción	Cantidad	Coste unitario (€) sin IVA	Periodo de amortización (meses)	Intervalo amortizado (meses)	Coste imputable (€) sin IVA
ASUS X550CC CJ398 Intel Core i7-3537U, 2.50 GHz, RAM 8,00 GB, 64 GB, NVIDIA GeForce GT 720M.	1	617,07	73	3	25,36
TOTAL					25,36

Tabla 20. Coste del hardware.

1.2.3. Costes de software

En este apartado se recoge el coste necesario para obtener las licencias de software necesarias para realizar este proyecto. Este trabajo se ha redactado con *Word*, que viene incorporado en el equipo con la licencia de Windows 10, por lo que no supone ningún coste. Los software que han supuesto un coste, y que se recogen en la Tabla 3, son la utilización de Matlab y de la aplicación estadística SPSS.

Descripción	Cantidad	Coste unitario (€) sin IVA	Periodo de amortización (meses)	Intervalo amortizado (meses)	Coste imputable (€) sin IVA
Matlab R2018b	1	69 (licencia suite para estudiantes)	12	3	17,25
BM SPS Statistics	1	266	12	3	66,5
TOTAL					83,75

Tabla 3. Coste del hardware.

1.3.Presupuestos totales

Una vez calculado los costes parciales del personal, *hardware* y *software*, se calcula el Presupuesto de Ejecución de Material (PEM) (Tabla 4), que es la suma de los costes parciales mencionados anteriormente.

Descripción	Coste (€)
Costes de mano de obra	5.644,40
Costes de <i>hardware</i>	25,36
Costes de <i>software</i>	83,75
TOTAL	5.753,51

Tabla 4. Presupuesto de Ejecución de Material.

Una vez se tiene el PEM, se calcula el importe total de este Trabajo Fin de Grado, incorporando la parte proporcional al beneficio industrial y a los costes generales. En concreto, se añade un 6% con relación al beneficio industrial y un 13% correspondiente a los gastos generales. Una vez obtenido este nuevo presupuesto con los márgenes de coste y beneficio, se calcula el presupuesto final (Tabla 5) en el que se le añade un 21% adicional correspondiente al Impuesto sobre el Valor Añadido (IVA).

Diseño y desarrollo de sistemas de identificación y clasificación de glaucoma inducido aplicados a imágenes OCT de retina

Descripción	Coste (€)
Presupuesto de Ejecución del Material	5.753,51
Gastos generales (13%)	747,96
Beneficio industrial (6%)	345,21
Suma	6.846,68
IVA (21%)	1.437,80
PRESUPUESTO TOTAL	8.284,48€

Tabla 5. Presupuesto total del proyecto.

Por tanto, el coste total de la realización de este Trabajo Fin de Grado es de **OCHO MIL DOSCIENTOS OCHENTA Y CUATRO EUROS CON CUARENTA Y OCHO CÉNTIMOS.**