

1.3 ESQUEMA GENERAL DE LA APLICACIÓN



Este proyecto consiste en desarrollar una aplicación informática "a la carta" para algunos de los investigadores del Centro Oceanográfico de Málaga, ya que se puede facilitar mucho su trabajo en ciertos aspectos y por eso nos indicaron las bases, restricciones y condiciones que necesitaban para este fin. Lo primero que debemos saber es que no se está inventando nada nuevo, ya existe software profesional para realizar muchas de las observaciones y medidas de la microestructura de los otolitos, pero lo que sí se va a conseguir, es aunar en una aplicación todas las ventajas de otros programas que no se consideran completos en algún sentido. Principalmente es eso, crear exactamente lo que necesitan, suprimiendo funciones innecesarias y añadiendo lo que falta, además de un proceso de diálogo en el que se buscan posibles mejoras en todo momento.

Por ejemplo se puede decir que uno de los programas que se utilizaba anteriormente es el OTO 3.0, necesita de una pantalla adicional en la que se visualizaba lo que la cámara científica captura a través del microscopio. Para medir la distancia entre un anillo y otro del otolito, se mueven unas líneas verticales a modo de cursores, y a continuación se van introduciendo los datos. Entonces una de las primeras premisas era la de no depender de ese monitor externo, por eso la aplicación desarrollada se ejecuta directamente en la pantalla del ordenador al que está conectada la cámara, y además la forma de medir los anillos no es con cursores verticales, sino que el usuario va haciendo clic con el ratón directamente en los puntos que considera oportunos (anillos o conjunto de anillos diarios visibles con calidad aceptable), de manera que acaba teniendo una polilínea (cadena poligonal abierta) del recorrido que ha realizado en esa imagen. También necesitan hacer uso del video (Real Time Viewing, RTV), y no sólo de capturas estáticas, para cambiar de una zona de medidas a otra.

Para ir introduciendo términos y la metodología de trabajo que siguen los investigadores, antes de empezar a medir anillos, primero se calibra el microscopio mediante un portaobjetos con un micrómetro como el de la Figura 4, esto sirve para relacionar lo que se ve por el microscopio con una medida real.

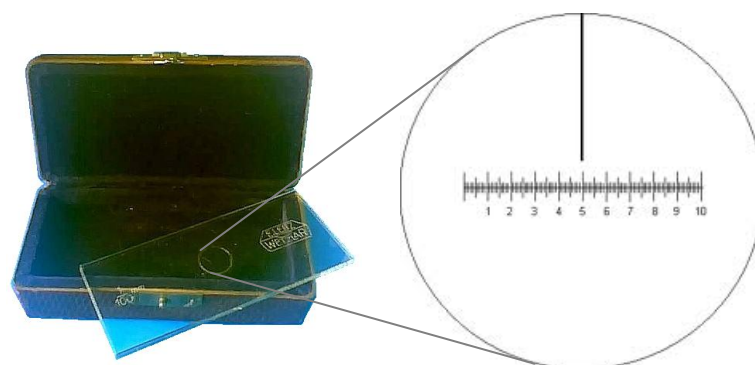


Figura 4.- Micrómetro para calibrar el microscopio

Después, una vez fijada la fina preparación del otolito a un portaobjetos y colocada en el microscopio, ya se pueden empezar a tomar medidas. La calibración anterior es totalmente necesaria, y también es clave saber que durante las medidas no se van a cambiar los aumentos del microscopio (a excepción de pequeños reajustes para enfocar las imágenes, que no influyen cualitativamente a la relación de aspecto calculada al calibrar), por lo que esa relación valdrá para todas las medidas.

Para dar unas cifras, una horquilla que nos ayude a saber a qué magnitudes nos estamos refiriendo, decir que los investigadores miden unos 3 años de edad por otolito observado, y eso nos lleva a pensar aproximadamente en medir 1000 anillos diarios. Por supuesto, no se mide esta cantidad de anillos de una vez, en una sola imagen, si no que se van tomando ampliaciones a lo largo de un radio del otolito para medir unos 20-30 anillos de media en cada imagen (atendiendo a la comodidad de observación del investigador, con imágenes en las que se distingan bien unos anillos de otros). Estas imágenes ampliadas se denominan "transectos", un término importante para el proyecto. Y cuando nos referimos a que los transectos son capturados a lo largo de un radio del otolito, se debe a la forma de éstos, que suele ser más o menos irregular y ovalada, con cierto parecido a una lágrima (aunque depende de la edad, el otolito de un pez en estado larvario crece de forma más concéntrica en larvas y progresivamente el crecimiento en distintos ejes va haciéndose más diferente. Hay una gran diferencia entre el eje de máximo crecimiento (anteroposterior) y el de menor crecimiento (interno-externo). Elegimos el eje intermedio de crecimiento (dorso-ventral) por ser en el que de manera más sencilla se localizan los anillos de crecimiento; o de la especie, etc.). Así podemos encontrar un centro del otolito, que corresponde al nacimiento del pez, y luego empiezan a formarse los anillos alrededor (tridimensionalmente por supuesto, capas esféricas de carbonato cálcico y proteína, aunque luego sólo tengamos vistas bidimensionales a través del corte realizado en el pulido de la muestra), como muestra la Figura 5.

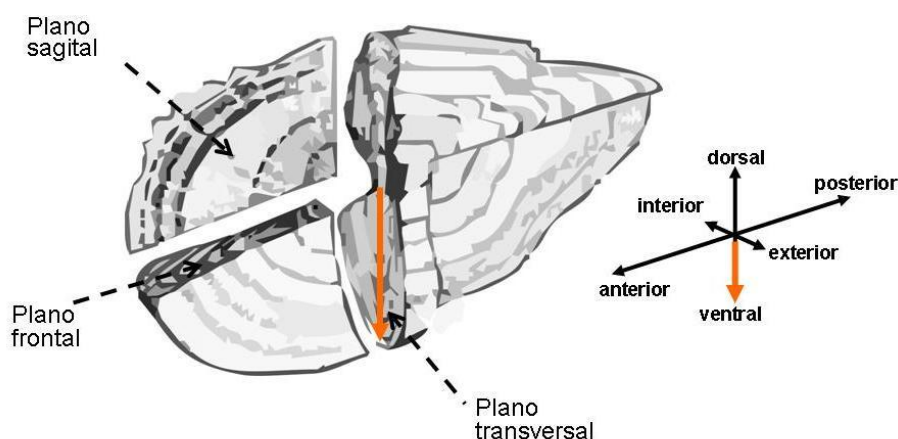


Figura 5.- Planos de corte y ejes de crecimiento en un otolito. Las flechas son proporcionales al crecimiento en cada uno de los ejes (eje de lectura usado preferentemente en color naranja)

Se puede diferenciar una primera región correspondiente al estado larvario del pez, que va desde el centro, hasta un borde más o menos reconocible que indica la metamorfosis de larva a juvenil y el pez pasa de vida pelágica (nadando libremente en la masa de agua) a demersal (pegado al fondo marino). Este borde no tiene un nombre definido y para ver esta etapa de la vida larvaria hay que observar un corte sagital a bastantes aumentos (entre x400-x1000), ya que los anillos diarios suelen ser muy estrechos; para hablar de este borde en este documento, vamos a referirnos a él como al final de la fase larvaria. Y entonces el pez va creciendo hasta que muere (momento de su captura), y es cuando se observa el borde final, el último anillo diario. Representamos un radio completo en la Figura 6, y detalles de cada zona en la Figura 7.

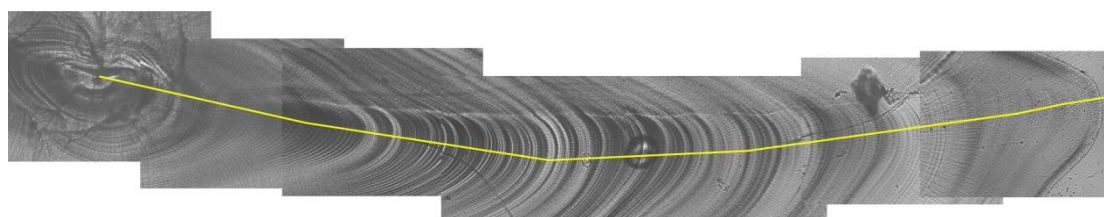


Figura 6.- Radio a lo largo del otolito, del centro al borde, representado por superposición de transectos. en una sección transversal del otolito. Radio ventral (flecha amarilla)

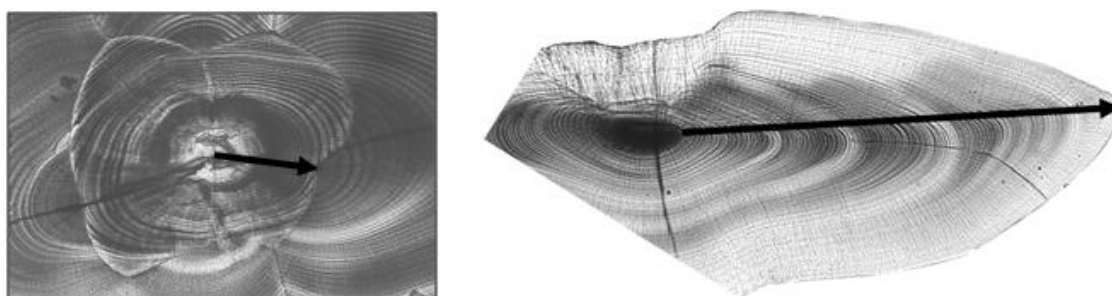


Figura 7.- Radios del centro al final de la fase larvaria (flecha), en corte sagital (izquierda); y del final de la zona larvaria a la muerte (flecha, eje ventral), corte transversal (derecha)

Es lógico establecer que un radio es una línea poligonal (a lo que comúnmente nos referiremos como polilínea) compuesta por muchos segmentos de forma que siempre se avance cruzando perpendicularmente a los anillos (camino de máximo crecimiento).

Como hemos señalado antes que vamos a medir alrededor de 20-30 anillos por transecto a lo largo de todo el otolito, el cual posee alrededor de 1000 anillos del centro al borde, por simple regla de tres se medirán anillos repartidos entre unos 30 transectos, a modo orientativo para conocer el orden de magnitud de la información que nos disponemos a procesar.

Disponiendo de todos estos conocimientos acerca del trabajo de los investigadores, ya se puede empezar a esbozar una idea general de la aplicación informática que necesitan (la cual bautizamos como OTOLIVE), y al menos cómo debe estar estructurada, como se aprecia en la Figura 8.

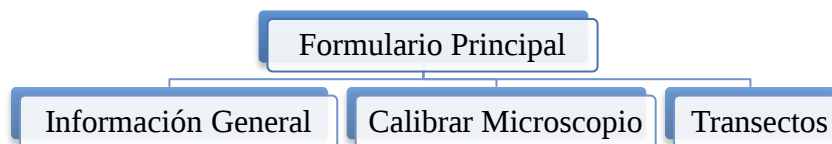


Figura 8.- Estructura general de la aplicación OTOLIVE

Se ha hablado en general de las partes encargadas de la calibración y de la toma de medidas de los transectos, pero no hay que olvidar un primer bloque en el que se anota toda la información necesaria para enmarcar el conteo de anillos de un otolito. En este apartado de Información General se introducen los datos del experimento a modo de formulario, aportando por ejemplo campos como el nombre del investigador que realiza la lectura, la fecha de la misma, el tipo de corte que se le ha hecho al otolito, etc.

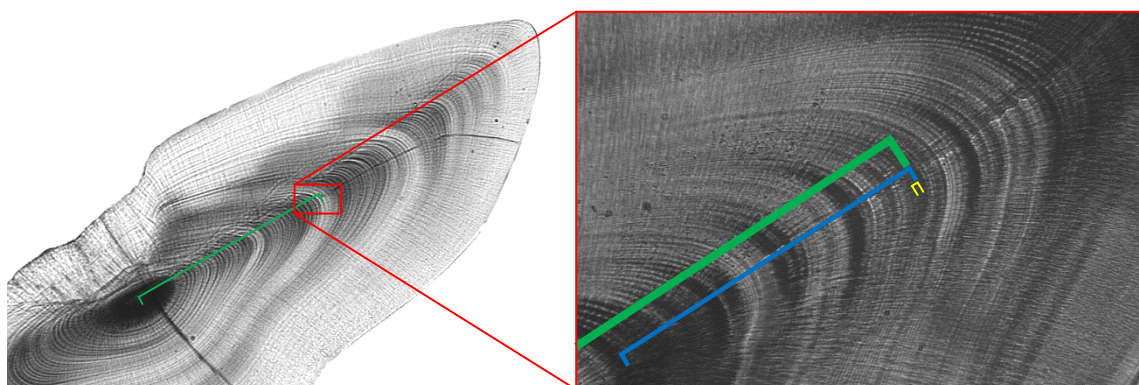
El bloque para calibrar el microscopio recoge información sobre la óptica que se usa para la visualización (los aumentos usados), y lo más importante, el momento en que se conecta con la cámara, siendo esta la primera vez que se toman imágenes al comenzar una lectura. Al iniciar la conexión, se visualizan las capturas de la cámara en modo video, de manera que se puede enfocar la imagen colocando el portaobjetos en el lugar donde se necesite, ajustando la iluminación y cambiando los aumentos hasta tener una imagen nítida del micrómetro. En ese momento, cuando se acepta la calidad de la imagen enfocada en el modo video, se pasa a un modo fijo que recoge la última imagen del modo video. Sobre esta imagen fija podemos dibujar una línea, un segmento, gracias al cual podremos calcular la conversión entre la realidad (milímetros o micras) y lo virtual (píxeles). Al estar viendo un micrómetro y dibujando un segmento sobre él, lo que hacemos es proporcionar dos puntos (inicial y final de la línea), una distancia en píxeles, y la relacionamos con la medida real del micrómetro, como se expone en la Figura 9. Así obtenemos una constante que nos posibilitará el trabajo de medición con unidades reales en el siguiente bloque de transectos.



$$\begin{cases} 0.5 \text{ mm} \\ 500 \text{ } \mu\text{m} \end{cases} \equiv 174 \text{ píxeles} \Rightarrow \text{Relación} = \begin{cases} 0.00287 \text{ mm/px} \\ 2.87356 \text{ } \mu\text{m/px} \end{cases}$$

Figura 9.- Relación unidades/píxeles al calibrar el microscopio (ejemplo)

Y como último bloque principal, el formulario en el que se cuentan los anillos. Este va a ser el apartado más importante de la aplicación, en el que más tiempo se dedica, ya que al comienzo se rellena el formulario de Información General, luego se pasa al de Calibrar Microscopio, pero una vez hecho esto, es cuando el investigador empieza a dibujar polilíneas sobre los transectos para ir añadiendo tandas de distancias que se irán almacenando en la base de datos. En la Figura 10 se aprecia parte de la información que es guardada al contar anillos en un transecto. Las distancias entre anillos se pueden representar de tres formas:



Anillos	Distancias (μm)		
	Individuales o Relativas	Acumuladas	Absolutas
1	4,043	4,043	466,691
2	3,366	7,409	470,057
3	3,986	11,395	474,043
4	4,144	15,539	478,187
5	5,026	20,565	483,213
6	4,755	25,320	487,968
7	3,907	29,227	491,875
8	4,234	33,461	496,109
9	4,656	38,117	500,765
10	3,897	42,014	504,662
11	3,688	45,702	508,350
12	5,021	50,723	513,371
13	4,677	55,400	518,048
14	4,346	59,746	522,394
15	4,747	64,493	527,141
16	4,897	69,390	532,038
17	3,975	73,365	536,013
18	4,043	77,408	540,056
19	3,967	81,375	544,023
20	4,708	86,083	548,731
21	4,477	90,560	553,208
22	4,867	95,427	558,075
23	4,324	99,751	562,399
24	3,987	103,738	566,386
25	4,235	107,973	570,621

Figura 10.- Distancias entre anillos (ejemplo)

- A la primera la llamaremos distancia "individual o relativa", y contempla la distancia que hay entre un anillo y el anterior dentro del mismo transecto. Esta es la mínima distancia que se mide (en amarillo).
- La segunda medición se calcula a través de la primera, y es la distancia "acumulada". Seguimos centrándonos en el transecto en el que estamos, pero no se cuenta la distancia entre un anillo y el anterior, sino entre un anillo y el primero que se contó de ese transecto (en azul).
- La tercera y última medida es la distancia "absoluta", la cual informa sobre la distancia a la que un anillo se encuentra del punto en el que empezamos a medir el otolito, que será el centro, el foco o el borde (en verde).

Por supuesto, estos datos almacenados como distancias reales, en milímetros o en micras, también se pueden guardar como distancias virtuales, siendo entonces distancias relativas, acumuladas o absolutas, medidas en píxeles. También es interesante saber no sólo el número del anillo que se está contando en un transecto, sino su número absoluto, etc. Sin ningún problema todo se puede calcular con las distancias relativas que se han ido midiendo a lo largo del otolito, y así tener todos los datos representados de maneras distintas, pudiendo cada una de ellas aportar una información importante dependiendo de lo que se quiera conocer. El investigador no tendrá que hacer ningún cálculo a posteriori ya que tendrá estos resultados a la vista en el documento donde se guarde la base de datos, y además se añadirán datos estadísticos y gráficas para completar el informe.

Ya que se tiene una idea más profunda de lo que se necesita, se puede decir que el Formulario Principal de la aplicación OTOLIVE es el padre, y éste llama a sus hijos Información General, Calibrar Microscopio y Transecto según precise, utilizando terminología de procesos informáticos. El formulario padre estará siempre abierto mientras la aplicación esté ejecutándose, y dependiendo de lo que se desee hacer, se activarán los procesos hijo. OTOLIVE servirá como menú a todas las funcionalidades de la aplicación. Estos procesos padre e hijo son Formularios de Windows, y a su vez se ayudarán de funciones programadas en C/C++ básico, que serán las que se valgan de las librerías de la cámara (QCam API) y de procesamiento de imágenes (CImg) para completar todas las competencias del programa.



