

MESOFT 1.0: PROTOTIPO SOFTWARE PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS MESOTELIALES NO TUMORALES MALIGNAS EN CITOLOGÍA DE
LÍQUIDO PLEURAL

SANDRA MYLENA DELGADO ANAYA
DIANA ROSALVA VILLAMIZAR ARIAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA
2006

MESOFT 1.0: PROTOTIPO SOFTWARE PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS MESOTELIALES NO TUMORALES MALIGNAS EN CITOLOGÍA DE
LÍQUIDO PLEURAL

SANDRA MYLENA DELGADO ANAYA
DIANA ROSALVA VILLAMIZAR ARIAS

Trabajo de Grado para Optar al Título de
Ingeniero de Sistemas

Director:
Alfonso Mendoza Castellanos
Bachelor of Science DEA.

Codirector:
Ernesto García Ayala. MD.
Especialista en Patología

Codirector:
Víctor Eduardo Martínez Abaunza
Ingeniero de Sistemas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA
2006

A los motores de mi vida:
Dios, mis padres y hermanos.

Sandra

Al Dios en el que creo firmemente,
del cual los cielos anuncian su gloria
y el firmamento anuncia la obra de sus manos.

A mi familia,
por su sacrificio inalcanzable, por su paciencia
y por mantener siempre viva la esperanza.

A mis amigos,
por enseñarme la dulzura de la vida,
especialmente a Sandra por aprender a soportarme.

A todos aquellos cuyo nombre no menciono
y que forman parte importante en mi vida.

Diana

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Mendoza por la confianza.

A Víctor por su amistad, dedicación y amor que siempre le infundió al proyecto.

Al Dr. García por la iniciativa y apoyo.

A la Dra. Olga por su dedicación y acompañamiento invaluable.

A nuestros amigos por estar siempre a nuestro lado.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO	22
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo General	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
1.2 DEFINICIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.3 IMPACTO ESPERADO	24
1.4 VIABILIDAD	25
2. MARCO TEÓRICO	26
2.1 PATOLOGÍA PLEURAL	26
2.1.1 Generalidades	26
• Anatomía	26
• Fisiopatología de la Pleura	29
2.1.1 Técnicas de Diagnóstico en el Derrame Pleural	32
• Citología de líquido pleural	32
• Biopsia Pleural	32
2.1.2 Componentes Celulares de la Citología Pleural	33
• Elementos Benignos	34
• Células Mesoteliales	34
• Macrófagos	36
• Hematíes	36
• Linfocitos	37
• Trastornos no neoplásicos	37
2. .3 Efusiones Malignas	37
2.2 TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES	37
2.2.1 Fundamentos	37

2.2.2 Etapas fundamentales del Procesamiento de Imágenes.	38
• Adquisición	38
• Pre-procesamiento	39
• Segmentación	46
• Descripción	50
• Reconocimiento e Interpretación	50
3. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO COMPUTACIONAL	52
3.1 METODOLOGIA	52
3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	53
4. ADQUISICIÓN	55
5. PREPROCESAMIENTO	58
6. SEGMENTACIÓN	62
6.1 MÉTODOS DE UMBRALIZACIÓN	62
6.1.1 Pun-Kapur	62
6.1.2 Iterativo	62
6.1.3 Triangular	63
6.2 Descomposición en Componentes Principales	64
6.3 CRECIMIENTO DE REGIONES	67
6.3.1 Selección de Semillas	68
6.3.2 Parámetro de Comparación Inicialmente se definió el valor de la intensidad de los pixeles de la imagen.	69
6.3.3 Umbral para agregación de píxeles que cumplan con la condición establecida	69
6.3.4 Definición de estado para detención de algoritmo	70
7. DESCRIPCIÓN	75
8. RECONOCIMIENTO	77
8.1 SISTEMA BASADO EN EL CONOCIMIENTO	77
8.1.1 Base de Conocimiento	77
8.2.2 Motor de Inferencia	78
8.2.3 Subsistema de Explicación	78
9. BASE DE DATOS	80
10. MODELO COMPUTACIONAL	83

11. RESULTADOS	85
12. DISCUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	93

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Parámetros Núcleo de Células Mesoteliales	85
Tabla 2. Parámetros Citoplasma de Células Mesoteliales	85

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Anatomía pleural	26
Figura 2. Derrame pleural	29
Figura 3. Trasudado.	30
Figura 4. Exudado inflamatorio.	31
Figura 5. Pleura normal.	34
Figura 6. Modelo RGB	42
Figura 7. Modelo HSI	43
Figura 8. Matiz, saturación, luminosidad.	44
Figura 9. Splitting and Merging	48
Figura 10. Crecimiento de regiones	49
Figura 11. Imágenes Celulares	55
Figura 12. Imágenes utilizadas para desarrollo del proyecto	57
Figura 13. Filtro gaussiano Tamaño 6 y un sigma de 2.5.	59
Figura 14. Ecuación de histogramas	59
Figura 15. Mejora de imágenes.	60
Figura 16. Mejora de la imagen convirtiendo al modelo IHLS	61
Figura 17. Segmentación método Kapur más fraccionamiento de niveles de intensidad	64
Figura 18. Segmentación método promedio	64
Figura 19. Análisis de Componentes Principales	66
Figura 20. Ajuste de imágenes resultado de análisis de componentes principales	67
Figura 21. Método segmentación semi automática células individuales	70
Figura 22. Método segmentación semi automática sábanas	71
Figura 23. Crecimiento en HLS	72
Figura 24. Crecimiento en HLS	73
Figura 25. Crecimiento RGB	74
Figura 26. Cuadro interior más pequeño de la Cámara de Neubauer	76
Figura 28. Base de Datos	82
Figura 29. Sistema Basado en el conocimiento	83
Figura 30. Esquema del Modelo Computacional	84
Figura 31. Diagrama de Casos de Uso	94
Figura 32. Diagrama de análisis caso de uso: Administrar Datos Paciente	97
Figura 33. Diagrama de análisis caso de uso: Analizar Célula	98
Figura 34. Diagrama de análisis caso de uso: Revisar Diagnóstico	98
Figura 35. Diagrama de Entradas y Salidas	998

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Modelo de casos de uso y de análisis	93
ANEXO B. Requerimientos del sistema	99
ANEXO C. Manal de usuario	100

GLOSARIO

ACINO: que tiene forma o estructura semejante a un racimo de uvas.

ACÚMULOS: aumento de la cantidad de una sustancia que está contenida en una víscera.

ADENOCARCINOMA: forma de carcinoma que se origina en el tejido glandular.

ADQUISICIÓN: etapa del procesamiento digital de imágenes que permite obtener una imagen digital de un objeto, a partir de una escena.

ALBÚMINA: es la proteína plasmática más abundante (60%), utilizada para el transporte de proteínas, ácidos grasos, hormonas, fármacos, etc. Se sintetiza en el hígado.

ANFÓFILO: que puede teñirse con colores ácidos o básicos.

ANISONUCLEOSIS: variación en el radio nuclear, núcleos deformes.

ASCITIS: acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal. Se produce cuando hay una inflamación del peritoneo o bien cuando aumenta la presión en el sistema de la vena porta.

AUTOVALOR: factor de escala por el que ha sido multiplicado un autovector.

AUTOVECTORES: vectores no nulos que, cuando son transformados por el operador, dan lugar a un múltiplo escalar de sí mismos, con lo que no cambian su dirección.

BINARIZACIÓN: procedimiento para convertir una imagen que se encuentra en el formato de color verdadero, o en escala de grises, a un formato de dos colores (Blanco y Negro).

CARCINOMA ESCAMOSO: término descriptivo para tumor, cuyas células tienen apariencia escamosa.

CARCINOMA: cualquier tipo de cáncer que se forma en las células epiteliales, maligno por definición.

CELULAS MESOTELIALES: componentes benignos de citología pleural,

CIANÓFILO: de color azul o verde.

CITOLOGIA DE LÍQUIDO PLEURAL: el examen de fluido pleural es una prueba que se realiza para detectar la presencia de células cancerosas, véase toraconcentesis.

CITOPATOLOGÍA: rama conocida que se dedica al estudio de los cambios celulares.

COAGULOPATÍA: enfermedad que consiste en un trastorno del sistema de la coagulación que funciona deficientemente

CROMA: también llamado tono o matiz, es el color en sí mismo, atributo que permite diferenciar a un color de otro.

CROMATINA: sustancia contenida en unos filamentos que son susceptibles de teñirse y que está esparcida por todo el núcleo.

CROMOCENTROS: falsos nucleolos o grumos de cromatina, zonas donde la cromatina está más condensada.

EOSINOFÍLIA: propiedad que tienen algunas células de teñirse con la eosina.

FILTRADO: etapa del procesamiento digital de imágenes que permite mejorar las características de una imagen digital.

FIRMA DE NÚCLEO: función unidimensional del contorno nuclear.

HEMATIES: glóbulos rojos, que están presentes en la sangre y transportan oxígeno al resto de las células del cuerpo.

HIPERCROMASIA: abundancia de cromatina en una célula. En imágenes digitales se manifiesta con bajos niveles de color.

HIPERCROMATISMO: véase hipercromasia.

HIPERPLASICO: aumentado de tamaño.

HIPOPROTEINEMIA: disminución de la concentración sérica de proteínas (<< 6,5 g/dl).

HISTIOCITO: véase macrófago.

HISTOGRAMA: gráfico utilizado para la representación de la cada uno de los niveles de color.

IDIOPÁTICO: se dice de cualquier proceso o síndrome con varias causas posibles conocidas, pero que, en el caso concreto que se estudia, se desconoce la causa específica, porque no se puede demostrar ninguna de las posibles causas. Diagnóstico de exclusión.

LDH: enzima catalizadora que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero es mayor su presencia en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, en el cerebro y en los pulmones.

LINFIA: líquido corporal que recorre los vasos linfáticos.

LINFOMA DE HODKING: véase linfoma.

LINFOMA: enfermedad cancerosa que se origina en el sistema linfático.

LIQUIDO PLEURAL EXUDADO: tipo de derrame ocasionado por diversas patologías que afecta la pleura.

LIQUIDO PLEURAL TRASUDADO: indica que la enfermedad no reside en la pleura.

MACRÓFAGOS: células presentes en el derrame pleural, de núcleo arriñonado y citoplasma de morfología agujereada.

MEDIASTINO: región media entre los dos sacos pleurales, que se extiende desde el orificio superior del tórax hasta el diafragma y desde el esternón y los cartílagos costales por delante hasta la superficie anterior de las doce vértebras dorsales por detrás.

MESOTELIOMA: tumor primario de la pleura, poco frecuente, derivado de las células mesoteliales que puede ser benigno o maligno

METASTÁSICO: véase metástasis.

METÁSTASIS: propagación a órganos distantes del tumor primario maligno o cáncer que ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática.

NEOPLASIA: sinónimo de tumor, en el sentido de cualquier proceso que curse con proliferación celular excesiva, se aplica generalmente para tumores malignos.

PAPILAR: que tiene forma de verruga o papila.

PATOLOGÍA PLEURAL: enfermedad de la pleura.

PERINUCLEAR: situado alrededor del núcleo.

PLEOMÓRFICO: que adquiere varias formas.

PREPROCESAMIENTO: véase filtrado.

PRESIÓN ONCÓTICA: presión ejercida por las proteínas dentro de los vasos sanguíneos.

RADIO NÚCLEO/CITOPLASMA: relación entre el tamaño del núcleo y el citoplasma.

RECONOCIMIENTO: etapa del procesamiento digital de imágenes que permite la clasificación de los objetos presentes en una escena.

SARCOMA: cáncer del tejido conectivo (hueso, cartílago, músculo, vasos sanguíneos).

SEGMENTACIÓN: etapa del procesamiento digital de imágenes que permite la separación de los objetos presentes en una imagen.

SISTEMA BASADO EN EL CONOCIMIENTO: sistemas informáticos que involucran conocimiento propio de especialistas.

TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS: técnicas que utilizan anticuerpos específicos, previamente marcados mediante enlaces químicos con una sustancia que se puede transformar en visible.

TORACOCENTESIS: técnica sencilla, en la cual se administra anestesia local y luego se introduce una aguja dentro del espacio pleural para extraer el líquido.

TRANSFORMADA DE FOURIER: función matemática que permite obtener las componentes de frecuencia de una señal.

UMBRALIZACIÓN: técnica de segmentación que consiste en binarizar una imagen, tomando como referencia un nivel del histograma.

VACUOLIZACIÓN: proceso de formación de vacuolas que tiene lugar en los procesos de degeneración celular.

VÉNULAS: pequeños vasos sanguíneos que llevan sangre procedente de los plexos capilares.

RESUMEN

TITULO. MESOFT 1.0 PROTOTIPO SOFTWARE PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESOTELIALES NO TUMORALES MALIGNAS EN CITOLOGÍA DE LÍQUIDO PLEURAL*

Autores:

SANDRA MYLENA DELGADO ANAYA
DIANA ROSALVA VILLAMIZAR ARIAS**

Palabras Claves: Tratamiento digital de imágenes, Sistema basado en el conocimiento, Modelos de color, Crecimiento de regiones, Morfología matemática, Células mesoteliales, Citología de líquido pleural, Neoplasia.

Resumen

El presente proyecto continúa el trabajo realizado por el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB), en la línea de tratamiento de imágenes médicas. Está orientado a la construcción de aplicaciones futuras que permitan contribuir al diagnóstico de ciertas patologías que se apoya en la lectura de Citología de Fluido Pleural, de tal manera que se reduzca el error ocasionado por subvaloración o sobrevaloración de las características cuantitativas y cualitativas de las células mesoteliales observadas.

Existen numerosas enfermedades que se asocian a la Patología Pleural, con el citodiagnóstico a través del análisis de los componentes celulares se logra establecer con cierto grado de precisión la presencia de neoplasia maligna, sustituyendo procedimientos invasivos como la intervención quirúrgica y ofreciendo igual grado de exactitud diagnóstica. Dicho procedimiento presenta falsos positivos poco frecuentes, existe un porcentaje importante de falsos negativos que surgen cuando las características citológicas no son concluyentes, lo que conduce a la sospecha de lesiones neoplásicas que no existen, en el primer caso, o al diagnóstico tardío de cualquier tipo de tumor, en el último caso. Con el desarrollo del presente proyecto se construye un soporte adecuado que permite tomar al médico patólogo decisiones en el momento de realizar el diagnóstico citológico.

Se emplearon técnicas comunes de tratamiento de imágenes, se evaluó el uso de modelos de color diferentes al Rojo, Verde y Azul (RGB en inglés) y la metodología de Proceso Unificado de Desarrollo de Software, que permitieron clasificar las células. Se determinaron los parámetros correspondientes a los criterios que logran la identificación de normalidad. Se recomienda establecer un protocolo adecuado en la adquisición de muestras y el uso de técnicas como segmentación de imágenes a color sin aplicación en el ámbito local, que permitirán la construcción de aplicaciones más avanzadas para el análisis de imágenes en el área médica.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas.
Director: Alfonso Mendoza Castellanos. Codirectores: Ernesto García Ayala, Víctor Eduardo Martínez Abaunza.

ABSTRACT

TITLE. MESOFT 1.0 SOFTWARE PROTOTYPE FOR THE CHARACTERIZATION OF NON TUMOROUS MESOTHELIALS CELLS - WICKED IN PLEURAL LIQUID CYTOLOGY*

Authors:

SANDRA MYLENA DELGADO ANAYA
DIANA ROSALVA VILLAMIZAR ARIAS**

Key words: Digital images processing, Based on knowledge system, Color models, Growth of regions, Mathematical morphology, Mesothelial cells, Cytology of pleural liquid, Neoplasm.

Summary

The present project continues the work carried out by the Biomedical Engineering Investigation Group (BEIG), in the line of medical images processing. It is oriented to the construction of future applications that will contribute to the diagnosis of certain pathologies that rely on the reading of Pleural Fluid Cytology, in such way that will decrease the error caused by undervaluation or overvaluation of the quantitative and qualitative characteristics of the observed mesothelial cells.

Numerous diseases are associated to Pleural Pathology, with the cytodagnosis and through the the cellular components analysis it is possible to establish with certain degree of accuracy the presence of malignant neoplasm, replacing invasive procedures like surgical interventions and offering equal degree of diagnosis accuracy. This procedure doesn't present false positives quite often, but there exists an important percentage of false negatives that arise when the cytological characteristic are not conclusive, leading to the suspicion of malignant lesions wich don't exist, in the first case, or a delay in the diagnosis of any kind of tumor, in the last case. With the development of the present project it is constructed an appropriate support that allows to pathologist doctor to make decisions in the moment to realize a cytology diagnosis.

Common techniques of images processing were used, included the color's models using different techniques to the RGB and the Unified Process of Software Development methodology, which allowed the cells clasification. Parameters corresponding to criteria that achieve the identification of normality were determined. It is recommended to establish an appropriate protocol in the acquisition of samples and an aproppied use of techniques like color images segmentation, without application in the local area at this time, which will allow the construction of more advanced applications for the analysis of images in the medical area.

* Degree work

** Physical-Mechanical Engineering Faculty
Computer Science and Systems Engineering School
Director: Alfonso Mendoza Castellanos
Co directors: Ernesto García Ayala, Víctor Eduardo Martínez Abaunza

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto es una herramienta que permite la medición y extracción de características de células no tumorales malignas de citologías de líquido pleural.

La patología pleural es un problema clínico frecuente - en el Departamento de Patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander en el año 2005 se presentaron 950 citologías no vaginales de las cuales un 30% correspondió a citologías de líquido pleural-, que generalmente se asocia al curso de un fallo respiratorio agudo, infecciones, o tumores neoplásicos, estos últimos de especial interés.

Existe un alto porcentaje de derrames pleurales malignos que se diagnostican con la citología, aunque debe considerarse que existen algunos factores que influyen en los resultados, algunos tumores como los adenocarcinomas presentan con más frecuencia citologías positivas que otros tipos como el carcinoma escamoso, el linfoma de Hodgkin, los sarcomas o el mesotelioma. Al analizar los componentes celulares del derrame se logra establecer con cierto grado de precisión la presencia de neoplasia, sustituyendo procedimientos como la intervención quirúrgica y ofreciendo igual grado de exactitud diagnóstica, pero de forma menos invasiva, más eficaz y rápida.

En un estado normal las estructuras clave son: núcleo, un patrón de cromatina uniforme, posición dentro de la célula, borde, forma, membrana nuclear prominente y lisa. Los procesos patológicos que condicionan la aparición de un derrame pleural, conducen a una serie de cambios reactivos que pueden ser interpretados por error como signos de malignidad: binucleación, multinucleación, aumento en el número de mitosis que provoca un aumento en el tamaño celular, aumento en la relación núcleo/citoplasma. Los cambios debido al cáncer están relacionados a alteraciones similares de estas estructuras como: aumento en el tamaño nuclear muy importante, elevada relación núcleo/citoplasma, irregularidad en el contorno nuclear y alteraciones en la textura de la cromatina o nucleolos muy llamativos.

La metodología empleada para la construcción de la herramienta ha sido el Proceso Unificado de Desarrollo de Software. Las imágenes se digitalizaron mediante una cámara de vídeo acoplada a un microscopio y conectada a un computador.

La investigación está orientada a la construcción de aplicaciones futuras que permitan contribuir al diagnóstico de ciertas patologías, que se apoya en la lectura de Citología de Fluido Pleural, de tal manera que se reduzca el error ocasionado

por subvaloración o sobrevaloración de las características cuantitativas y cualitativas de las células mesoteliales observadas.

El desarrollo de nuevas técnicas en inteligencia artificial y computacional son factores que motivan la aplicación de nuevos desarrollos tecnológicos al estudio de imágenes médicas que permitan una mayor precisión en la observación de las irregularidades y en consecuencia en los diagnósticos. Aunque el diseño de la visión humana es demasiado complejo, y no puede reemplazarse por una máquina, tiene sus limitaciones en cuanto a información cuantitativa la cual podría ser suministrada por un programa de computador diseñado para tal fin, cuyo propósito sea asistir el diagnóstico, en este caso el emitido por el especialista en Patología.

1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Desarrollar un software que permita establecer en células mesoteliales de Citología de Líquido pleural, criterios morfológicos que las permitan clasificar como no tumorales malignas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Establecer los criterios cualificables y cuantificables de los parámetros correspondientes a células mesoteliales no tumorales malignas.
- Construir los algoritmos necesarios para el reconocimiento de los parámetros de clasificación de células mesoteliales no tumorales malignas.
- Desarrollar un software que caracterice las células mesoteliales de acuerdo con los parámetros extraídos de una lámina de citología de líquido pleural.

1.2 DEFINICIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La patología pleural es un problema clínico frecuente, según una publicación efectuada por Mattison¹, el 62% de los pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos tenían derrame pleural. Existen numerosas enfermedades que se pueden asociar con dicha anomalía, generalmente se debe al curso de un fallo respiratorio agudo, infecciones, o tumores neoplásicos.

Dentro de los tumores primarios que dan metástasis a la pleura, el cáncer de pulmón es el responsable del mayor número de éstas dada su estrecha proximidad y su tendencia a invadir la vasculatura pulmonar, el segundo lugar en frecuencia está dado por el cáncer mamario, los linfomas responsables del 10%, siguen el cáncer gástrico y ovárico que representan aproximadamente el 5% y además en cerca de un 10% de los casos se desconoce el tumor primario en el momento del diagnóstico, por lo tanto ha sido fundamental el desarrollo de técnicas para el tratamiento de esta complicación, debido al elevado número de perfiles clínicos.

¹ LE, Mattison et al. Pleural Effusions in the Medical ICU. Prevalence, Causes and Clinical Implications. En: Chest. Utah. Vol. 111, (1997); p.1018.

La citopatología se ha utilizado durante más de 100 años, ocupándose principalmente del diagnóstico diferencial entre los derrames malignos y no malignos.

Quienes se encargan del Citodiagnóstico a través del análisis de los componentes celulares de humores orgánicos logran establecer con cierto grado de precisión el tipo de neoplasia, sustituyendo procedimientos como la intervención quirúrgica y ofreciendo igual grado de exactitud diagnóstica. Según el National Cancer Institute², el examen citológico del líquido pleural tiene una sensibilidad de aproximadamente el 65 % y una especificidad del 97%, “parece ser un método diagnóstico más eficaz que la misma biopsia pleural con un porcentaje de falsos positivos que no supera el 3%”³.

Es la forma menos invasiva, rápida y eficaz de establecer el diagnóstico de malignidad y aunque se han propuesto otros procedimientos como técnicas inmunohistoquímicas debido a su relativa baja sensibilidad y especificidad no son considerados en el diagnóstico final. Se concluye que el análisis del líquido pleural mediante toracocentesis permite establecer un juicio definitivo en más de dos terceras partes de los pacientes, además “se ha comprobado que ante la presencia de neoplasia en la pleura, ésta ha resultado positiva en la primera citología en el 63% de los casos, en la segunda en el 71% y en la tercera en el 74%”⁴. Dicho procedimiento también permite la identificación del tipo y sitio primario de la neoplasia causante del derrame, sirviendo como guía para la conducta terapéutica e indicando la expectativa de vida del paciente.

“El porcentaje de derrames pleurales malignos que se diagnostican con la citología oscila entre el 40 y el 87% (media del 60%)”⁵, aunque debe considerarse que existen algunos factores que influyen en los resultados, algunos tumores como los adenocarcinomas presentan con más frecuencia citologías positivas que otros tipos como el carcinoma escamoso, el linfoma de Hodgkin, los sarcomas o el mesotelioma. En este último, el examen citológico es diagnóstico en menos del 20% de los casos. En segundo lugar, los derrames pleurales paramalignos, es decir, aquellos que no derivan de la afectación neoplásica de la pleura, pero tienen relación con el tumor primario, dan resultados negativos en la citología. El líquido

² NATIONAL CANCER INSTITUTE. Efusión Pleural Maligna (on line).
<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/cuidados-medicos-apoyo/cardiopulmonares/HealthProfessional/page3>

³ WW, Johnston. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. En: Cancer. Vol. 56 (1985); p. 905-909.

⁴ BARRANCO, F et al. Patología Pleural (on line) <http://tratado.uninet.edu/c020602.html>

⁵ RW, Light. Diagnostic principles in pleural diseases, citado por PORCEL, J. M. Manejo Práctico del Derrame Pleural. En: Anales de Medicina Interna. Madrid. Vol 19, No. 4 (2002); p. 205.

pleural puede ser de predominio linfocitario pero presenta dificultades a la hora de distinguir células mesoteliales reactivas de neoplásicas y el mesotelioma del adenocarcinoma metastásico*.

En resumen, el rendimiento de la citología depende del número de muestras remitidas y de la experiencia del citopatólogo. Si se envían tres muestras separadas de líquido pleural a un citólogo experimentado, se puede obtener un diagnóstico positivo en cerca del 80% de pacientes, es importante resaltar que no existen contraindicaciones absolutas para la toracocentesis diagnóstica, sólo algunas relativas como un derrame pleural muy pequeño (menos de 1 cm), coagulopatía, tratamiento anticoagulante y ventilación mecánica, además de algunas circunstancias particulares que pueden representar un riesgo, todas ellas poco frecuentes.

En el diagnóstico de derrames malignos se tienen falsos positivos poco frecuentes, pero un porcentaje importante de falsos negativos se debe a errores de muestreo y de interpretación y aunque la experiencia del Citopatólogo es fundamental, es preocupante que estos últimos errores que surgen cuando las indicaciones citológicas no son concluyentes, conduzcan a la sospecha de lesiones neoplásicas que no existen o en el peor de los casos al diagnóstico tardío de cualquier tipo de tumor y por lo tanto no intervención y tratamientos adecuados que puedan mejorar la calidad de vida del paciente. Ante la presencia de irregularidades de este tipo, esperamos con el desarrollo del presente proyecto construir bases que permitan emitir un diagnóstico más acertado.

1.3 IMPACTO ESPERADO

Se espera contribuir al diagnóstico de ciertas patologías apoyado en la lectura de Citología de fluido Pleural, de tal manera que se reduzca el error ocasionado por subvaloración o sobrevaloración de las características cuantitativas y cualitativas de las células mesoteliales observadas.

Además, el proyecto pretende establecer los cimientos que den continuidad a futuros estudios de las Células Mesoteliales y permitan la clasificación de las mismas en Citología de líquido Pleural, dentro de las irregularidades más frecuentes: reactivas y neoplásicas.

* Los procesos patológicos que condicionan la aparición de un derrame conducen a una serie de cambios reactivos interpretados por error como signos de malignidad, además debido a la tendencia que tienen las células mesoteliales a adoptar formas atípicas, un operador sin la debida experiencia puede confundir células benignas con células neoplásicas.

En el campo investigativo, se busca afianzar la utilización de la Ingeniería de Sistemas como ciencia aplicada a la Medicina, mediante innovación de modelos computacionales que fortalezcan los avances científicos actuales.

1.4 VIABILIDAD

Se tiene la intención de apoyar a la investigación por parte del Departamento de Patología, de la Escuela de Medicina y del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, se cuenta con el recurso humano, informático y el equipo necesario para respaldar el curso del desarrollo del trabajo, de tal forma que se de respuesta tanto a las necesidades académicas y asistenciales propias de los patólogos como a la ciencia.

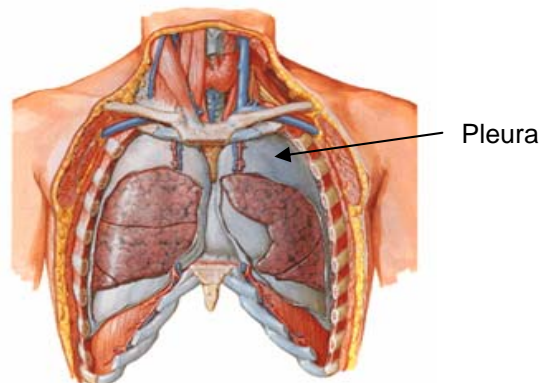
2. MARCO TEÓRICO

2.1 PATOLOGÍA PLEURAL

2.1.1 Generalidades

- **Anatomía** La pleura es una capa serosa transparente de origen mesodérmico que recubre ambos pulmones, el mediastino, el diafragma (figura 1) y la parte interna de la caja torácica; está formada por una capa de células mesoteliales, compuesta de colágeno, elastina, capilares sanguíneos y linfáticos. Contribuye a distribuir las fuerzas mecánicas sobre la superficie del pulmón y a sus propiedades elásticas. Entre ambas hojas pleurales existe un espacio, en este “espacio pleural” hay una pequeña cantidad de líquido que en sujetos normales está en equilibrio dinámico y varía entre 0.1 a 0.2 ml por Kg de peso corporal por hora, cuya función es lubricar y facilitar el acoplamiento del pulmón y la pared torácica. Está compuesta por la pleura parietal y la pleura visceral. La pleura parietal está compuesta por tejido conectivo irregular, blando, cubierto por una capa única de células mesoteliales. La pleura visceral es gruesa y está constituida por dos capas: el mesotelio y el tejido conectivo; los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios se localizan en el tejido conectivo. El espesor de este último limita el intercambio de líquido y partículas entre el espacio pleural y los vasos sanguíneos y linfáticos.

Figura 1. Anatomía pleural



Fuente: Interactive Atlas of Human Anatomy (CD ROM). USA: Frank Netter, 2004.

Presiones Intrapleurales

Si se abriera el tórax a presión atmosférica, los pulmones disminuirían su volumen, perdiendo su elongación habitual. Con el tórax abierto el volumen de la cavidad

torácica es alrededor del 55% de la capacidad vital. Existe, pues, una fuerza elástica que se opone a esta situación de reposo y que lleva el pulmón a la pared torácica. Esta fuerza negativa se aloja entre la pared visceral y la pleura parietal y se denomina presión negativa intrapleural. Dicha presión rodea todo el pulmón, siendo la principal causante de que éste permanezca expandido sin necesidad de estar fijado a la pared torácica.

Formación y absorción de líquido pleural

En el estudio del líquido pleural (LP) se debe tener en cuenta el volumen de líquido, las células existentes y los factores físico-químicos. Existe una pequeña cantidad de LP en sujetos normales. Este líquido normal es transparente o ligeramente opaco, contiene células entre las que se encuentran leucocitos (polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos), escasa cantidad de hematíes y células mesoteliales.

Las variaciones de los electrolitos sugieren que existe un proceso activo en la formación del LP. El movimiento de líquido a través de la membrana pleural está regido por la ley de Starling del intercambio capilar:

$$Q_f = L_p * A [(P_{cap} - P_{pl}) - R_d (O_{cap} - O_{pl})] \quad (1)$$

Donde:

- Q_f = movimiento líquido
- L_p = coeficiente de filtración por unidad de área
- A = área de membrana
- P_{cap} = presión hidrostática capilar
- P_{pl} = presión pleural
- O_{pl} = presión oncótica pleural
- O_{cap} = presión oncótica capilar
- R_d = coeficiente de reflexión de solutos para proteínas

Por tanto, el flujo de líquido a través de las membranas pleurales es controlado por la suma de las presiones oncóticas e hidrostáticas de los capilares pleurales y el espacio pleural. La medición de las presiones hidrostáticas y oncóticas a través de la pleura parietal y visceral, indica que existe un balance neto de las fuerzas, dando lugar a un movimiento de líquido a través de la pleura parietal dentro del espacio pleural con mínima contribución de la pleura visceral en condiciones normales. La pleura visceral recibe su irrigación de la circulación sistémica (arterias bronquiales) y drena en el sistema venoso pulmonar que es de baja presión. Esto produce una presión hidrostática similar a la que hay en los capilares pulmonares, mucho más baja que en los capilares sistémicos de la pleura parietal. Considerando solo las fuerzas oncótica e hidrostática, el LP se acumularía en el

espacio pleural, sin salida. En cambio, hay salida de líquido y proteínas desde el espacio pleural hacia los linfáticos subpleurales a través de los estomas encontrados sólo en la pleura parietal. Estos linfáticos tienen gran capacidad para retirar líquido pleural, incluso 28 veces el grado normal de formación de líquido.

En resumen, el LP se forma como un ultra filtrado de los vasos sistémicos de la pleura parietal (y en mucho menor grado de la pleura visceral), y que sale a través de los linfáticos de la pleura parietal.

Para Sahn, existen seis mecanismos responsables de la acumulación de líquido en el espacio pleural:

1. **Aumento de las presiones hidrostáticas.** Aunque hace algunos años se pensó que podrían producirse derrames pleurales (DP) a partir de elevaciones de la presión venosa sistémica, en la actualidad parece demostrado que este mecanismo solo tiene importancia cuando se elevan las presiones capilares en la circulación pulmonar.
2. **Descenso de la presión oncótica en la microcirculación.** Este fenómeno es poco habitual como causa de DP importante, debido a la gran reserva que posee la circulación linfática, que es capaz de reabsorber hasta 30 veces el volumen normal de LP formado diariamente.
3. **Descenso de la presión en el espacio pleural** (o lo que es lo mismo, aumento de la presión negativa).
4. **Aumento de la permeabilidad en la microcirculación.** Este es un mecanismo obvio, sobre todo cuando la pleura está directamente implicada en el proceso patológico (exudado). El aumento de permeabilidad podría iniciarse a través de la formación de anafilotoxinas producidas a partir de inmunocomplejos fagocitados por los polinucleares y macrófagos en el espacio pleural.
5. **Deterioro del drenaje linfático.** A la luz de lo que se ha expuesto sobre el protagonismo del sistema linfático, en la actualidad parece claro que éste es uno de los principales mecanismos responsables de la persistencia de derrame en la pleura. El bloqueo linfático puede producirse en la misma zona subpleural, o en el mediastino, y en ambos casos la reabsorción de líquido se verá seriamente comprometida.
6. **Llegada de líquido desde el espacio peritoneal.** De forma casi invariable esto se produce a través de pequeñas comunicaciones transdiafragmáticas. Este parece ser el mecanismo habitual de

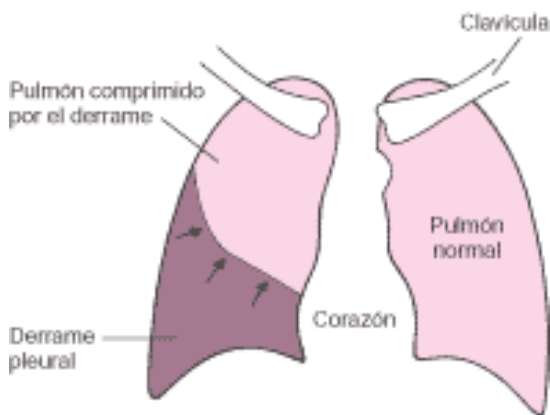
producción de DP en presencia de ascitis y también en enfermedades pancreáticas⁶.

La presencia de DP produce disminución de la capacidad residual funcional, de la capacidad pulmonar total y de la capacidad vital forzada, dando lugar a un trastorno restrictivo. También se produce un descenso de las presiones inspiratorias máximas por la afectación del diafragma. Puede haber incremento del gradiente alveolo-arterial de O₂ y disminución de la PaO₂. Estos cambios fisiopatológicos dependen del tamaño del DP y de la causa subyacente.

- **Fisiopatología de la Pleura**

- **Derrame Pleural** El DP se define, como la acumulación patológica de líquido en el espacio pleural (300-500 ml) y es el resultado de un desequilibrio entre la formación y la reabsorción de líquido (Figura 2); como causantes de la formación se encuentran la presión hidrostática vascular, presión oncótica y la permeabilidad capilar, y responsables de la reabsorción, los linfáticos, capilares y vénulas de tejido conectivo subyacente, dicho desequilibrio puede deberse a un incremento en la formación de LP, a una disminución del aclaramiento del líquido pleural por los linfáticos, o a la combinación de ambos factores.

Figura 2. Derrame pleural



Fuente:

http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_04/seccion_04_044.html

Generalmente se produce debido a enfermedad pleural o pulmonar, pero es una manifestación frecuente de enfermedades sistémicas. Entre las causas más usuales de derrame pleural se incluyen insuficiencia cardiaca congestiva, infecciones broncopulmonares, nefrosis, hipoproteinemia, cirrosis y traumatismos.

⁶ SA, Sahn. The pleura, citado por BARRANCO, F et al. Patología Pleural (on line)
<http://tratado.uninet.edu/c020602.html>

Según García⁷, algunos estudios han demostrado que la participación primaria o metastásica de neoplasias malignas pleurales es la responsable del 30% del total de efusiones pleurales. Más importante es aún el hecho de haber encontrado que aproximadamente en el 70% de estos pacientes el derrame pleural fue la primera manifestación de un carcinoma oculto o “tumor fantasma”.

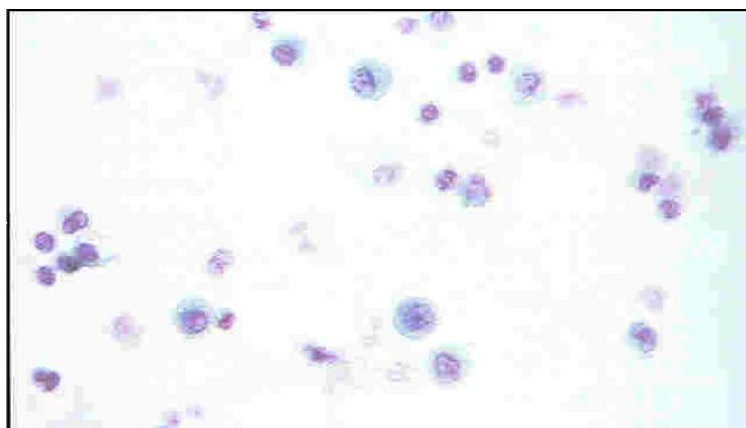
Algunos derrames pleurales reciben su nombre de acuerdo a ciertas características, los de abundante sangre se denominan “Hemotórax”, frecuentes en tuberculosis o en tumores malignos; si predomina pus “Empiema”, los que contienen aire “Hidroneumotórax” y constituidos por linfa “Quilotórax”.

La presión hidrostática excesiva en la pleura visceral y la presión oncótica disminuida no se acompañan de lesión en las paredes circulatorias, por lo que dan lugar a derrames con muy pocas células y proteínas, cuando contienen menos de 3 g/dl de éstas últimas y un peso específico igual que 1.015 o menos se denominan **TRASUDADOS**, de lo contrario se denominan **EXUDADOS**, ocasionado por la obstrucción de los vasos linfáticos y alteraciones de la permeabilidad capilar.

Trasudados

Se produce cuando hay alteraciones en los factores sistémicos que intervienen en el movimiento del LP, como son la presión capilar pulmonar, la presión capilar sistémica o la presión oncótica del plasma. En la figura 3, las células más grandes corresponden a mesoteliales hiperplásicas y algunos histiocitos vacuolados.

Figura 3. Trasudado.



Fuente: FARINA GONZÁLES, J y RODRIGUEZ COSTA, J. Citopatología Respiratoria y Pleural. Madrid: Panamericana S.A., 1996. p 122.

⁷ García Ayala, Ernesto. Eficacia del Examen citológico de líquido pleural en el diagnóstico de neoplasias malignas que comprometen la pleura y su correlación con la biopsia pleural. En: Rev. UIS SALUD. Bucaramanga. Vol. 17, No.1 (Octubre 1989); p.19-27.

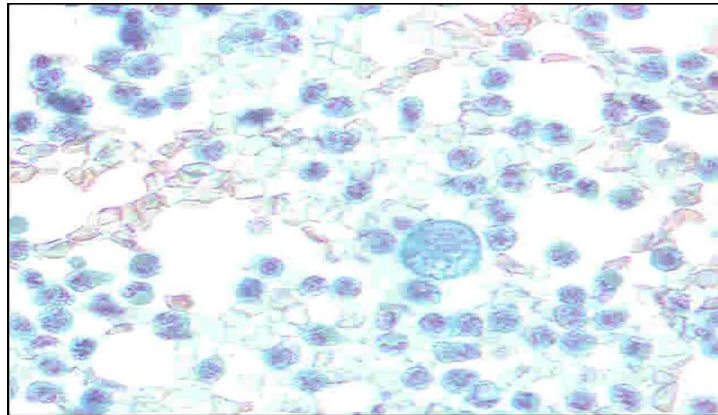
El derrame es de aspecto claro, de color amarillo pajizo, se encuentran algunas células mesoteliales, algunos leucocitos y escasos histiocitos. Pueden deberse a insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y otro tipo de anomalías como diálisis peritoneal, malnutrición y nefrosis.

Exudados

Este tipo de derrame puede ser ocasionado por diversas patologías que logran modificar la permeabilidad de las paredes vasculares sanguíneas y/o linfáticas.

Además de tumores malignos, son causa diversas enfermedades inflamatorias del pulmón o de la pared torácica que afectan a la capa pleural, como las bacterianas productoras de neumonía, tuberculosis, micosis, parasitarias pulmonares, infarto pulmonar, artritis reumatoide, sensibilidad a drogas terapéuticas. En la figura 4, la célula más grande central, vacuolizada es una mesotelial degenerada.

Figura 4. Exudado inflamatorio.



Fuente: Ibid. p 122.

Según los criterios descritos por Light, los derrames exudativos deben cumplir al menos uno de estos criterios:

- A- Cociente proteínas pleurales/séricas >0.5 ó proteínas en el líquido pleural >3 .
- B- LDH pleural/LDH sérica >0.6 .
- C- LDH pleural superior a las dos terceras partes del límite superior normal de LDH en sangre⁸.

En caso de que se sospeche un derrame trasudado y según los criterios de Light, se comporte como un exudado, para diferenciarlo se han proponen nuevos parámetros bioquímicos como colesterol en líquido pleural >50 mg/dl (el más

⁸ Light RW, Pleural Efussion, citado por COCA PRIETO, Inmaculada, BOSCA CRESPO, Antonio y ABARCA COSTALAGO, Manuel. Derrame Pleural (on line)
<http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/derapleu.pdf>

fiable); cociente de colesterol pleural/sérico >0.3; determinación de albúmina en suero menos albúmina en líquido pleural <1.2 g; cociente bilirrubina en líquido/bilirrubina en suero >0.6; éstos nos indicarían que estamos ante un exudado.

2.1.1 Técnicas de Diagnóstico en el Derrame Pleural Encontrar la causa de la ocupación pleural es importante, ya que el hallazgo de células malignas indica que el proceso canceroso está muy avanzado y no se puede realizar un tratamiento quirúrgico con intención de recuperación.

El aumento del fluido causado por la efusión pleural puede ser detectado en una radiografía del pecho y se oye en un examen físico pero un diagnóstico firme sólo puede hacerse mediante una biopsia y un examen citológico.

- **Citología de líquido pleural** El examen de fluido pleural es una prueba que se realiza para detectar la presencia de células cancerosas. Se realiza por medio de un procedimiento llamado Toracentesis, la cual es una técnica sencilla y poco agresiva; una vez localizado el Derrame Pleural, se administra anestesia local, luego se introduce una aguja dentro del espacio pleural para extraer el líquido. El Líquido Pleural (LP) se procesará para estudio bioquímico, citológico, microbiológico y determinación del pH. La muestra debe obtenerse y transportarse en condiciones anaerobias para el procesamiento microbiológico y determinación de pH. El análisis del LP tiene un reconocido valor diagnóstico, ya que junto a los datos clínicos permite un diagnóstico útil en más del 75% de los derrames pleurales.

- **Biopsia Pleural** Permite obtener una muestra de pleura mediante una aguja especial que se introduce a través de la pared torácica. Las agujas pleurales más conocidas son las de Abrams, Cope y Castelain; de éstas las que se utilizan con más frecuencia son las dos primeras, aunque no se ha encontrado diferencias en cuanto a su rendimiento. Se deben obtener 2-3 muestras para el estudio anatomopatológico y una para estudio microbiológico. La biopsia pleural, está indicada en todo derrame pleural de etiología que cumpla criterios de exudado. No debe realizarse en los trasudados a no ser que exista sospecha de malignidad y está contraindicada en las efusiones paraneumónicas complicadas para evitar el desarrollo de abscesos subcutáneos, en el lugar de la biopsia. Las contraindicaciones y las complicaciones son similares a las de la toracocentesis. La precisión diagnóstica depende de la extensión de la afectación pleural. Cuanto más extensa es la afectación pleural, mayor es la efectividad de la biopsia pleural. La mayor rentabilidad se obtiene en los derrames pleurales tuberculosos y en neoplasias, la biopsia pleural es el procedimiento más sensible y específico para

diagnosticar pleuritis tuberculosa mientras que la citología del líquido pleural no contribuye en la detección de dicho procedimiento⁹.

Se ha comprobado que la combinación de varias técnicas diagnósticas puede mejorar la eficacia en sus resultados. Según González¹⁰, por ejemplo en neoplasias, la biopsia por si sola tiene un rendimiento diagnóstico cercano al 50%, en el estudio citológico de 54% y la combinación de ambos métodos del 90%.

Algunos estudios concluyen que el superior rendimiento de la citología pleural puede atribuirse a que la población celular presente en el sedimento representa una mayor área de la superficie pleural que la obtenida de la biopsia de la biopsia con aguja. Además la citología tiene mayor posibilidad de retirar células malignas cuando hay depósitos escasos en la pleura, otra ventaja adicional de la citología sobre la biopsia pleural es el hecho de brindar mayor seguridad en la clasificación del tipo de cáncer que está comprometiendo la pleura. En los casos en los cuales la causa es benigna ninguno de los métodos brinda mayor seguridad que el otro a excepción de los procesos granulomatosos en los cuales la biopsia pleural es mucho más confiable¹¹.

2.1.2 Componentes Celulares de la Citología Pleural Las células que forman la pleura, además de actuar como células de revestimiento tienen una función metabólica muy importante. Son células multipotenciales y su tamaño oscila entre 1- 4 mcm. Normalmente hay menos de 10 cc en cada pleura, en las que puede haber hasta 3 g/dl de proteína y unas 4.500 células por milímetro, entre las que hay células mesoteliales descamadas, monolitos, linfocitos y granulocitos procedentes de la sangre.

El contenido de los derrames benignos varía según los factores etiológicos que intervienen. Los exudados inflamatorios contienen sobre todo leucocitos, cuyo tipo celular predominante depende del agente etiológico, de la cronicidad de la infección y de otros factores. Los trasudados que aparecen en el colapso cardíaco, la cirrosis y otros trastornos menos frecuentes pueden plantear problemas de citodiagnóstico, sobre todo cuando son antiguos y se acompañan de proliferación mesotelial. Algunos elementos celulares que se observan son histiocitos, linfocitos y, en ocasiones glóbulos rojos.

⁹ GARCIA, Ernesto y ZAMORA, Kléber. Eficacia de la biopsia pleural en el diagnóstico de pleuritis tuberculosa. En: Rev. UIS SALUD. Bucaramanga. Vol. 17 No. 1 (Octubre 1989); p. 29-32.

¹⁰ GONZÁLES BOMBARDIERE, Sergio. Contribución de la Biopsia Pleural al estudio de las enfermedades de la pleura (on line).
<http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/Boletin/html/patologiaPleural/pleura04.html>

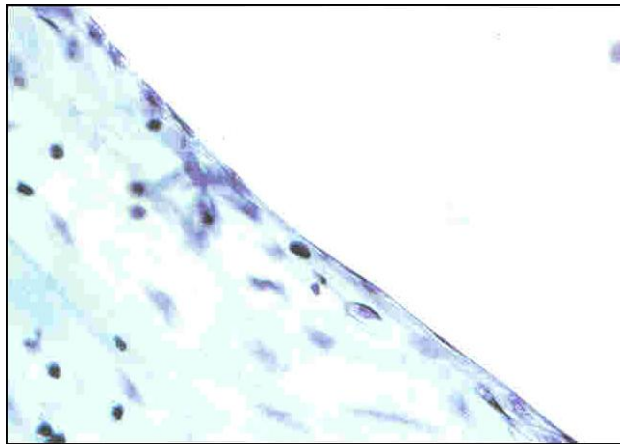
¹¹ GARCIA, Ernesto et al. Eficacia del Examen citológico de líquido pleural en el diagnóstico de neoplasias malignas que comprometen la pleura y su correlación con la biopsia pleural. En: Rev. UIS SALUD. Bucaramanga 17(1):19-27, Octubre 1989.

- **Elementos Benignos**

- **Células Mesoteliales** En general su diámetro varía entre 18 y 40 micras, aunque en ciertas condiciones puede llegar a ser enormes y alcanzar un diámetro de 70 micras, lo que suele asociarse a la aparición de varios núcleos. Sin embargo existe la posibilidad en algunas entidades de ser muy pequeñas con un diámetro aproximado de 10 micras.

En la figura 5 se muestra una hilera de células mesoteliales aplanada, los núcleos no hacen relieve, los citoplasmas son extendidos y amplios.

Figura 5. Pleura normal.



Fuente: FARIÑA GONZÁLES, J y RODRIGUEZ COSTA, J. Op. Cit. p 122.

En los tejidos, forman una capa única y lisa sobre superficies corporales, comparten rasgos de células escamosas pero tienen una característica única y distintiva consistente en la presencia de microvellosidades largas y delgadas que intervienen en la absorción; aunque éstas pueden perderse cuando llevan mucho tiempo en el derrame. La activación de la célula mesotelial puede iniciar toda la cascada de procesos implicados en la inflamación así como provocar cambios en la permeabilidad de la membrana pleural y es capaz de emigrar para iniciar procesos de reparación pleural y además, puede transformarse en macrófago.

Suelen aparecer aisladamente, pero a menudo se presentan como agrupaciones monoestratificadas de varias células. Los núcleos suelen ser centrales aunque pueden aparecer desplazados, son regulares, redondos u ovals, presentan una dispersión uniforme de cromatina, que también puede ser pálida y fina o grumosa y oscura. Los cromocentros son muy visibles y pueden encontrarse uno o más nucleolos pequeños y regulares. Los núcleos ocupan entre la tercera parte y la mitad de la superficie celular. La binucleación es frecuente y entre los núcleos suele haber una zona clara. La membrana nuclear es prominente y lisa.

Con la técnica de Papanicolaou, muestran un citoplasma de color verde, azulado o casi anaranjado y suele ser más grueso en torno al núcleo, donde se demuestra la existencia de filamentos, en la periferia el citoplasma va adelgazándose. Algunas veces puede ser anfófilo. El citoplasma perinuclear es denso y de aspecto esmerilado debido a los filamentos intermedios concentrados en el centro de la célula, en la periferia de la célula hay a menudo una zona de aspecto menos denso que difumina los contornos celulares. La vacuolización puede alcanzar tales extremos que con frecuencia desplaza al núcleo, por lo general situado en el centro, hacia la periferia. En esos casos el núcleo aparece deformado por las vacuolas y muchas veces dificulta el diagnóstico diferencial con el adenocarcinoma. Las células mesoteliales pueden contener células o partículas fagocitadas.

Los procesos patológicos que condicionan la aparición de un derrame conducen a una serie de cambios reactivos interpretados por error como signos de malignidad. Aspectos como la binucleación y la multinucleación generalmente son respuesta a la agresión celular, algunos procesos reactivos son la proliferación de células mesoteliales y un aumento del número de mitosis que provoca un incremento de tamaño nuclear; un aumento en la relación núcleo: citoplasma, cromatina grosera y nucleolos prominentes pueden confundirse con un proceso neoplásico.

Las células mesoteliales reactivas generalmente aparecen sueltas aunque a veces crean grupos cohesivos o estructuras papilares que pueden confundirse con tumores malignos. La presencia de numerosos acúmulos de células mesoteliales de gran tamaño es muy rara en procesos benignos y debe sospecharse malignidad.

Las células mesoteliales en los derrames reciben a veces el adjetivo de degeneradas, atípicas, reactivas o hiperplásicas.

a) **Degeneradas** Se considera que son benignas y suelen encontrarse en derrames de larga duración o con intensos signos inflamatorios. Presentan numerosas vacuolas en el citoplasma, las cuales pueden llegar a desplazar el núcleo y formar entre sí células en anillo de sello. Aunque la mayoría de las células benignas en anillo de sello son macrófagos. Algunos procesos como la quimioterapia producen células con citoplasmas y núcleos vacuolizados.

b) **Atípicas** Son células con caracteres sugerentes de malignidad. El diagnóstico de derrame con células atípicas casi siempre significa que sólo se han visto varias células de aspecto compatible con malignidad. Debe repetirse el estudio y se denomina derrame sospechoso de malignidad.

c) **Reactivas** Abarca diversas variaciones morfológicas que puede adquirir el mesotelio en un derrame acompañado o ausente de células neoplásicas. La célula reactiva no es más grande que la normal, el citoplasma tiene mucha cantidad de

filamentos en torno al núcleo, lo que hace más visible la delimitación entre la zona perinuclear y periférica. A menudo se visualizan vacuolas llenas de glucógeno. La vacuolización citoplasmática puede conducir a las imágenes de células degeneradas o en anillo de sello que se supone uno de los posibles finales de las células reactivas. Pero las células reactivas pueden sufrir mitosis, aunque típicas y por ello su núcleo tiene moderado grado de anisonucleosis. El borde celular puede aparecer liso por haber perdido las microvellosidades al llevar mucho tiempo en el líquido. Las células reactivas entre sí se articulan en dobletes o tripletes o en agrupaciones algo papilares, pero son más pequeñas que las conocidas como grupos proliferativos papilares hiperplásicos.

d) Hiperplásica Se caracteriza por tener mayor tamaño que la reactiva pero menor que la neoplásica, con núcleo aumentado de tamaño, hipercromático y con nucleólos grandes y más de uno. El citoplasma se acompaña también de una hipercoloración, indicando que la reacción de la célula es del citoplasma y del núcleo. En las células malignas el hipercromatismo nuclear no va acompañado de modificaciones en la tinción citoplasmática, la célula hiperplásica a menudo presenta mitosis, pero son típicas, en la superficie celular tiene, muy frecuentemente, microvellosidades muy largas y enredadas formando vesículas entre ellas, en otras ocasiones hay zonas de la membrana en que se han perdido las microvellosidades.

- **Macrófagos** La cantidad que está en los derrames es muy variable, pueden presentarse en los derrames exudados por: infecciones, infarto pulmonar, hemotórax, materiales extraños en la cavidad pleural, diseminación neoplásica, histiocitosis, artritis reumatoide y lupus eritematoso diseminado.

El núcleo tiene forma arriñonada y el citoplasma es de morfología algo agujereada, la característica principal de los histiocitos es la fagocitosis*, por lo que se denominan macrófagos. En ellos puede encontrarse células muertas, restos celulares, partículas de carbón, talco, almidón.

- **Hematíes** Su color apenas rosado o fuertemente rojizo depende de la relación entre la cantidad de la sangre y el volumen del exudado. Las causas de la presencia de eritrocitos en los derrames es muy variada, entre estas se encuentran: traumas, el mismo proceso de toracocentesis, neumonías de diversos orígenes, infarto pulmonar, tuberculosis, invasión neoplásica o derrames de larga evolución por insuficiencia cardíaca. Con Papanicolaou se ven como discos de unas 7 micras de diámetro, de color amarillo anaranjado, pero a menudo por la fijación se alisan transformándose en cáscaras vacías de variados colores verdosos.

* Las células mesoteliales pueden arquearse y abrazar en su concavidad a otra célula mesotelial o de otro tipo, lo que puede dar la imagen de que se ha introducido una célula en la otra.

- **Linfocitos** En casi todos los derrames pleurales se observan algunos linfocitos, los exudados con predominio de estos se deben a tuberculosis con invasión o no de la pleura, infecciones virales, carcinoma broncogénico u otras neoplasias.

Con Papanicolaou la mayoría son células de citoplasma escaso o indistinguible, el núcleo es redondeado y ocupa toda la célula, su cromatina es densa y no se ven los nucleolos. Los linfocitos maduros son de un tamaño un poco más grande, citoplasma evidente, núcleo a veces hendido, de contorno más irregular e incluso nucleolo. En los derrames linfocitarios benignos los linfocitos no presentan mitosis ni necrosis.

- **Trastornos no neoplásicos** Los derrames que tienen gran cantidad de neutrófilos se deben a infecciones bacterianas como la tuberculosis pulmonar en fase primaria. Ante la presencia de linfocitos con escasas células mesoteliales es difícil distinguir un trastorno no neoplásico de un linfoma o leucemia.

Las efusiones de tipo eosinofílico, es decir con un 10% de eosinófilos o más entre leucocitos, suelen ser idiopáticos pero pueden asociarse con traumatismos, infecciones e infartos.

En caso de artritis reumatoide y afección de la pleura, se visualizan células amorfas con histiocitos, células gigantes multinucleadas y pocas células mesoteliales.

2.1.3 Efusiones Malignas Las células neoplásicas malignas no siempre son más grandes, pleomórficas e hiper cromáticas que las mesoteliales. Algunos signos de naturaleza maligna son: aumento importante en el tamaño nuclear, elevada relación núcleo:citoplasma, irregularidad en el contorno nuclear, alteraciones en la textura de la cromatina o nucleolos muy llamativos.

Aunque la mayor parte de los tumores metastáticos en los derrames pleurales forman estructuras tridimensionales complejas como esferas de proliferación, papilas o acinos, algunos tipos de tumores (linfoma, melanoma, adenocarcinoma de origen gástrico o mamario) aparecen como células sueltas.

2.2 TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

2.2.1 Fundamentos El interés de estudiar métodos para tratar imágenes digitales surge para dos posibles áreas: Una que mejorara la información gráfica capturada, de tal forma que fuese perfeccionada para la observación humana; y otra que permitiera la percepción autónoma por máquinas, mediante el

procesamiento de los datos capturados. Además, se buscaba la mejor adaptación de la imagen para el envío y el almacenamiento.

Sin embargo, fue la aparición de los computadores de gran potencia y las necesidades de la astronomía los que impulsaron la evolución del tratamiento de imágenes. Por ejemplo la tarea de usar técnicas computacionales en la mejora de imágenes recibidas de una sonda espacial se inició en el laboratorio de Propulsión espacial en 1964 cuando las imágenes de la luna transmitidas por el Ranger 7 fueron procesadas por un ordenador para corregir diversos tipos de distorsión de las imágenes inherentes a la cámara de televisión. Desde 1964 hasta hoy el tratamiento digital de imágenes ha progresado ampliamente; además de aplicaciones al programa espacial se emplean para problemas muy diversos, aunque a menudo parecen inconexos, estos problemas requieren normalmente métodos capaces de realzar la información de las imágenes para la interpretación y el análisis humano.

En la percepción autónoma por máquinas, el interés se centra en los procedimientos para extraer la información de la imagen de forma conveniente para el procesamiento por computador. Esta información tiene poco en común con los rasgos visuales que los seres humanos emplean para interpretar el contenido de una imagen, algunos ejemplos de los tipos de información utilizados en la percepción automatizada son: Los momentos estadísticos, coeficientes de la transformada de fourier y las medidas de distancias multidimensionales. Algunas aplicaciones de esta segunda área son: el reconocimiento automático de caracteres, la visión industrial mecanizada para el ensamblado e inspección de productos, reconocimientos militares, tratamiento automático de huellas digitales, muestras de sangre, procesamiento automático de imágenes aéreas y de satélites para predicción del tiempo, evaluación de cultivos e imágenes de rayos X, entre otros.

2.2.2 Etapas fundamentales del Procesamiento de Imágenes.

- **Propuesta clásica de tratamiento digital de imágenes**
- **Adquisición** Consiste en la captura de la imagen digital para lo cual se requiere dos elementos: un dispositivo físico y un digitalizador. El primero es sensible a una determinada banda del espectro de energía electromagnético (rayos X, ultravioleta, infrarrojo, etc.) y produce una señal eléctrica de salida proporcional al nivel de energía incidente en cualquier tiempo. El segundo convierte la señal eléctrica de salida continua del primer dispositivo físico en forma digital.

Algunas formas de adquirir la imagen son:

- Proyección geométrica: Basada en elementos sensibles a la radiación electromagnética.
 - Digitalización con sensores 2D
 - Cámaras digitales
 - Digitalización con sensores 1D (Scanner – Papel, diapositivas –)
 - Al captar la imagen del mundo real, se obtiene un arreglo bidimensional, donde cada elemento del arreglo se llama elemento de la imagen o pixel, y el valor de este elemento es llamado nivel de gris. El número de pixeles del arreglo y de los valores que pueden tomar lo niveles de gris determinan la calidad de la imagen.
- **Preprocesamiento** La imagen que se captura en la etapa anterior no es del todo confiable, ya que se pueden presentar inconvenientes, ya sean del dispositivo usado o de iluminación entre otros. Por ello, el objetivo de esta etapa es mejorar la imagen, reduciendo el ruido y realzando los detalles importantes, de forma que se aumente la posibilidad de éxito en procesos posteriores. El principal objetivo de las técnicas de mejora es procesar la imagen de forma que resulte más adecuada que la original para una aplicación específica, es decir dicha mejora estará orientada a un problema específico, ya que un método que sea muy útil para mejorar imágenes de rayos X puede no ser necesariamente el ideal para mejorar las imágenes de Marte transmitidas por una sonda espacial, por ejemplo.

Se tienen métodos en el dominio espacial –propio plano de la imagen, manipulación directa de los pixeles-, métodos en el dominio de la frecuencia –modificación de la transformada de fourier de una imagen-, técnicas de filtrado, procesamiento de imágenes en color.

○ **Método en el dominio espacial**

Las funciones de procesamiento de la imagen en el dominio espacial pueden expresarse como:

$$g(x, y) = T[f(x, y)] \quad (2)$$

donde $f(x,y)$ es la imagen de entrada, $g(x,y)$ es la imagen procesada y T es un operador que actúa sobre f , definido en algún entorno de (x,y) . T puede operar sobre un conjunto de imágenes de entrada. Un ejemplo característico de esta técnica es la conocida como aumento de contraste, cuyo efecto de la transformación es producir una imagen de mayor contraste que la inicial al oscurecer los niveles de gris por debajo de m e iluminar los niveles de gris por encima de m en la imagen original. Debido a que la mejora de cada punto de una imagen depende solo del nivel de gris en ese punto, las técnicas de esta categoría se conocen como procesamiento de punto.

De intensidad simple:

- Negativos de imágenes: útiles en numerosas aplicaciones como representación de imágenes médicas, consiste en invertir el orden de blanco a negro.
- Aumento del contraste: permite corregir fallas como iluminación deficiente, incorrecta captación de la imagen, consiste en el aumento del rango dinámico de los niveles de gris.
- Compresión del rango dinámico: transformaciones de intensidad.
- Fraccionamiento de niveles de gris: se destaca un rango específico de niveles de gris de la imagen, se puede dar un valor alto a las intensidades de interés y un valor bajo a las restantes, produciendo una imagen binaria, o resaltando intensidades específicas pero preservando el fondo y las tonalidades de gris de la imagen.

Procesamiento De Histograma:

El histograma es utilizado como una función discreta de niveles de gris que proporciona una descripción global de la apariencia de la imagen.

- Ecuación del histograma: permite hacer una distribución de los niveles de gris de la imagen, se aplica en forma global a toda la imagen.
- Mejora local: Sirve para mejorar detalles en áreas más pequeñas.

Sustracción De Imágenes:

Tiene aplicación en mejora de la imagen y también en segmentación. Generalmente se sustrae de la imagen original otra utilizada como máscara.

- **Métodos en el dominio de la frecuencia**

La base de estas técnicas es el teorema de convolución. Sea $g(x, y)$ una imagen formada por la convolución de una imagen $f(x, y)$ y un operador lineal invariante de posición $h(x, y)$:

$$g(x, y) = h(x, y) * f(x, y) \quad (3)$$

Por el teorema de convolución, se cumple una relación en el dominio de la frecuencia:

$$G(u, v) = H(u, v)F(u, v) \quad (4)$$

Donde G , H y F son respectivamente las transformadas de Fourier de g , h y f . Existen numerosos problemas de mejora que pueden solucionarse mediante este

procedimiento, en una aplicación típica, $f(x,y)$ es conocida y el objetivo después de calcular $F(u,v)$ es seleccionar $H(u,v)$ de forma que la imagen deseada resalte alguna característica de $f(x,y)$, por ejemplo: los bordes de la imagen, poniendo énfasis a las componentes de alta frecuencia.

- **Procesamiento de imágenes en color**

Existen fuertes razones para el empleo del color en el procesamiento de imágenes ya que el color representa un descriptor valioso que simplifica la identificación de los objetos y por lo tanto de sus características, además el ojo humano es capaz de discernir miles de matices e intensidades de color en comparación a sólo algunos valores de intensidades.

Un estudio reciente de Serra (2002) indica que muchos de los espacios de color actuales habiendo sido desarrollados para aplicaciones gráficas de los ordenadores, son inadecuados para el tratamiento cuantitativo de las imágenes. Una representación conveniente, debe estar basada en distancias o normas para los vectores de los puntos del espacio de representación y además proporcionar independencia entre las componentes cromática y acromática¹².

El espectro de color se puede dividir en seis amplias regiones: violeta, azul, verde, amarillo, naranja y rojo. Cuando se observa el color real se ve que ningún color del espectro finaliza de forma brusca, sino que cada color se mezcla suavemente con el siguiente. La caracterización de la luz es un aspecto central de la ciencia del color. Cuando la luz es acromática su único atributo es la intensidad o cantidad de luz. El termino nivel de gris se refiere a una medida escalar de la intensidad que va del negro al blanco, pasando por los grises. Debido a la estructura del ojo humano, todos los colores se ven como combinaciones variables de los denominados tres colores primarios, rojo, verde y azul.

Las características generalmente empleadas para distinguir un color de otro son: brillo, tono y saturación.

- Brillo: relacionado con la noción acromática de intensidad.
- Tono o matiz: atributo asociado con la longitud de onda dominante en una mezcla de ondas luminosas. El tono representa el dominio del color tal como lo percibe el observador.
- Saturación: se refiere específicamente a su pureza relativa o cantidad de luz blanca mezclada con un tono.

¹² SERRA, Jean. Espaces couleur et traitement d'images, citado por ANGULO, Jesús y SERRA, Jean. Segmentación de imágenes en color utilizando histogramas bi-variables en espacios de color polares luminancia/saturación/matiz. En: Computación y Sistemas. México. Vol. 8, No. 4 (Junio 2005); p.2.

Los colores puros están completamente saturados, colores como rosa, lavanda, están menos saturados, siendo su grado de saturación inversamente proporcional a la cantidad de luz blanca añadida, así cuanto más alto contenido de gris menor será la saturación.

Tono y saturación considerados conjuntamente constituyen la cromaticidad, por lo tanto el color se puede caracterizar por su brillo y su cromaticidad.

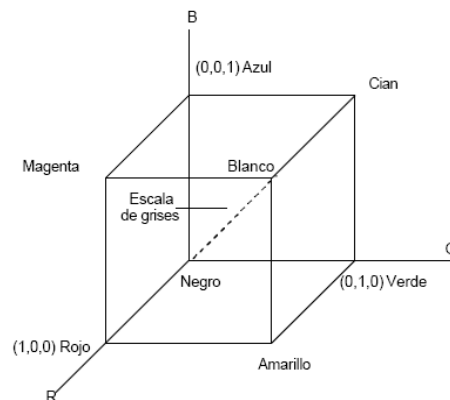
- **Modelos de Color**

La mayoría de modelos empleados están orientados hacia el hardware o hacia aplicaciones que pretenden manipular el color. Así el modelo **Red, Green, Blue** (RGB) es orientado al hardware y el modelo **Hue, Saturation, Intensity** (HSI) hacia la manipulación de color.

- **Modelo RGB**

El color aparece con sus componentes espectrales primarias de rojo, verde y azul. Basado en un sistema de coordenadas cartesianas. En la figura 6 se observa que el subespacio de color de interés es un cubo, en la que los valores RGB están en tres vértices, el negro en el origen y el blanco en el vértice opuesto al origen. En este modelo la escala de grises se extiende del negro al blanco a lo largo de una diagonal del cubo y los colores son puntos del cubo o de su interior, definidos por vectores que se extienden desde el origen. Las imágenes de este modelo consisten en tres planos de imágenes independientes, uno por cada color primario, los cuales se combinan para formar una imagen en color compuesta.

Figura 6. Modelo RGB



Fuente: GONZÁLEZ, Rafael C. y WOODS, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison Wesley / Diaz de Santos. 1996.

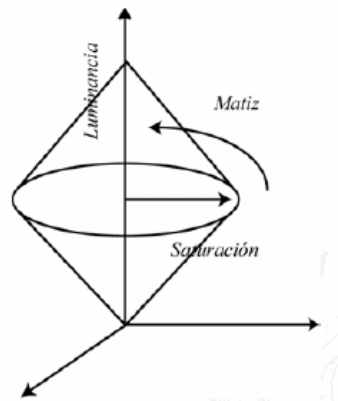
- Modelo de color HSI

Este modelo es de gran utilidad, ya que la componente intensidad I , es independiente de la información cromática contenida en la imagen, además las componentes de tono y saturación están íntimamente relacionadas con la forma en que los seres humanos percibimos el color.

Sus aplicaciones se centran en aquellas en las que se haga énfasis en las propiedades del color. Las componentes de color de este modelo (H , S) están definidas con respecto al triángulo de color. Así, el tono, H , del punto de color P es el ángulo con respecto al eje rojo, a un ángulo de cero el color es rojo, a un ángulo de 60 grados el color es amarillo.

La saturación del punto P es el grado que el color no está diluido en blanco y es proporcional a la distancia desde P al centro del triángulo. La intensidad se mide con respecto a una línea perpendicular al plano del triángulo y que pase por su centro. Mezclando tono, saturación e intensidad en un espacio tridimensional de color se tiene la estructura de una doble pirámide triangular (Figura 7), cada punto de ésta representa un color totalmente saturado.

Figura 7. Modelo HSI



Fuente: Ibid.

En la figura 8 se observa una escala de matices en la que se distinguen tonos rojos, amarillos, verdes, azules, etc. En la escala de saturaciones para un estímulo verdoso se observa como varía su viveza en función de la saturación. En la escala de luminosidades, el matiz anterior parece emitir más o menos luz al modificar los valores de esta escala.

Figura 8. Matiz, saturación, luminosidad.



Fuente: FUNDAMENTOS DEL color (on line)

http://descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/57915842105571617400080/008591_2.pdf

La representación del espacio RGB en términos de coordenadas polares 3D es usada frecuentemente en el análisis de imágenes, e incluso a pesar de contar con algunas fallas ofrece una representación más intuitiva que la ofrecida por RGB, y podría revelar características de la imagen que no son visibles con RGB. La transformación entre estos dos sistemas es una simple transformación de coordenadas.

La función para brillo:

$$L_{HLS} = \frac{\max(R, G, B) + \min(R, G, B)}{2} \quad (5)$$

La función para saturación:

$$S_{HLS} = \begin{cases} 0 & \text{si } \max(R, G, B) = \min(R, G, B) \\ \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{\max(R, G, B) + \min(R, G, B)} & \text{si } L_{HLS} \leq 1/2 \\ \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{2 - [\max(R, G, B) + \min(R, G, B)]} & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (6)$$

La función para el tono:

$$H'_{HLS} = \arcsin \left[\frac{R - \frac{1}{2}G - \frac{1}{2}B}{\left(R^2 + G^2 + B^2 - RG - RB - BG \right)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (7)$$

$$H = \begin{cases} 360^\circ - H' \text{ si } B > G \\ H' \text{ en otro caso} \end{cases} \quad (8)$$

En esta transformación se encuentra que:

- La saturación no necesariamente tiene un bajo valor para pixeles acromáticos.
- La información cromática y de brillo no son independientes. La función de brillo en usada para normalizar la saturación, así que los valores de saturación dependen en gran medida de la función brillo.

Las anteriores desventajas deben solucionarse entonces, removiendo la normalización de la saturación en las expresiones de brillo.

Se tiene entonces una nueva expresión para saturación,

$$S = \max(R, G, B) - \min(R, G, B) \quad (9)$$

“Dentro de esta nueva alternativa, la cantidad máx-mín asociada a la saturación permite una mejora del espacio HLS”¹³. Sin embargo, esta semi-norma no puede utilizarse para el brillo o luminancia, así que para esta se utiliza la ecuación recomendada por el estándar de televisión de alta definición. Obteniéndose un sistema HLS mejorado o **Improve Hue Luminance Saturation System (IHLS)**.

Ecuaciones IHLS

$$L_{IHLS} = 0.213R + 0.715G + 0.072B \quad (10)$$

$$H'_{HLS} = \arccos \left[\frac{R - \frac{1}{2}G - \frac{1}{2}B}{(R^2 + G^2 + B^2 - RG - RB - BG)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (11)$$

$$H_{IHLS} = \begin{cases} 360^\circ - H' \text{ si } B > G \\ H' \text{ en otro caso} \end{cases} \quad (12)$$

$$S_{IHLS} = \max(R, G, B) - \min(R, G, B) \quad (13)$$

¹³ HANBURY, A y SERRA J. Colour Image Analysis in 3D-polar coordinates, citado por ANGULO, Jesús y SERRA, Jean. Segmentación de imágenes en color utilizando histogramas bi-variables en espacios de color polares luminancia/saturación/matiz. En: Computación y Sistemas. México. Vol. 8, No. 4 (Junio 2005); p.6.

- **Segmentación** Permite separar la imagen en sus objetos componentes o partes de interés. Los algoritmos de segmentación se basan en alguna de las tres propiedades siguientes:

- **Discontinuidad** en los tonos de gris de los píxeles de un entorno, que permite detectar puntos aislados, líneas y aristas (bordes).
- **Similaridad** en los tonos de gris de los píxeles de un entorno, que permite construir regiones por división y fusión, por crecimiento o por umbralización.
- **Conectividad** de los píxeles desempeña un papel importante en la segmentación de imágenes.

Existen diversas técnicas de segmentación:

- Métodos basados en píxeles, que a su vez pueden ser:
 - locales (basadas en las propiedades de los píxeles y su entorno)
 - globales (basadas en la información global obtenida, por ejemplo, con el histograma de la imagen).
- Métodos basados en bordes.
- Métodos basados en regiones, que utilizan las nociones de homogeneidad y proximidad geométrica, como las técnicas de crecimiento, fusión o división.
- Métodos basados en modelos.

Los algoritmos más utilizados son: Transformada de Hough, Laplaciano de una función bidimensional y el procesado global mediante teoría de grafos y la umbralización.

- **Umbralización**

Consiste en identificar el umbral, el cual corresponde a uno de los niveles de la escala de grises; se trabaja con la imagen binaria (blanco y negro) donde se acepta la región negra como el fondo y las partes blancas como objetos, también se usan herramientas como la morfología matemática.

- **Morfología Matemática.**

Utiliza un lenguaje similar al usado en Teoría de Conjuntos en donde la Morfología Matemática representa las formas identificadas en la imagen.

Se opera con la imagen, definida como un conjunto, mediante otro conjunto denominado elemento estructurante el cual es, para imágenes digitales, una matriz de menor tamaño que la imagen.

Las operaciones básicas son:

Sea A la imagen segmentada y B el elemento estructurante.

- **Erosión.** Definida como:

$$A \ominus B = \{x \mid (\hat{B})_x \subseteq A\} \quad (14)$$

Todos los elementos de B reflejado se encuentran contenidos en A.

- **Dilatación.** Definida como:

$$A \oplus B = \{x \mid (\hat{B})_x \cap A \neq \emptyset\} \quad (15)$$

Al menos uno de los elementos de B reflejado se encuentra contenido en A.

La utilización de estas operaciones permite construcción de las siguientes rutinas:

- **Apertura.** Definida como:

$$A \circ B = A \oplus (A \ominus B) \quad (16)$$

Esto es una erosión, seguida de una dilatación. Permite separar objetos traslapados o unidos.

- **Cierre.** Definida como:

$$A \bullet B = A \ominus (A \oplus B) \quad (17)$$

Esto es una dilatación, seguida de una erosión. Permite llenar huecos en los objetos.

- **Crecimiento de Regiones**

El método de crecimiento de regiones implementado es el denominado Segmentación de Regiones por Agregación de Píxeles, el cual comienza con un conjunto de puntos generadores o semillas a partir de los cuales se van agregando píxeles vecinos mientras cumplan una propiedad de similitud, la cual es definida según la conveniencia para el tipo de imagen a segmentar. El proceso se detiene cuando no se agregan más píxeles a la región. Después del proceso de crecimiento podrían existir pequeñas regiones que pertenezcan a dos o más regiones vecinas que exhiben propiedades similares. Un proceso posterior muy común, consiste en la combinación de estas regiones, y generación de regiones

más amplias. La ventaja que puede ofrecer este tipo de técnicas es que se obtienen regiones bastante compactas. En la literatura se encuentran métodos de segmentación que usan crecimiento de regiones en imágenes de grises. Para imágenes en color se han propuesto nuevas e interesantes estrategias.

Las regiones pueden formarse cortando la imagen en pequeñas regiones hasta que estas verifiquen cierto predicado de similaridad, aunque en teoría parece sencillo, decidir cuando una región satisface o no el criterio de homogeneidad no es tan sencillo, ya que se puede generar sobre segmentación de la imagen.

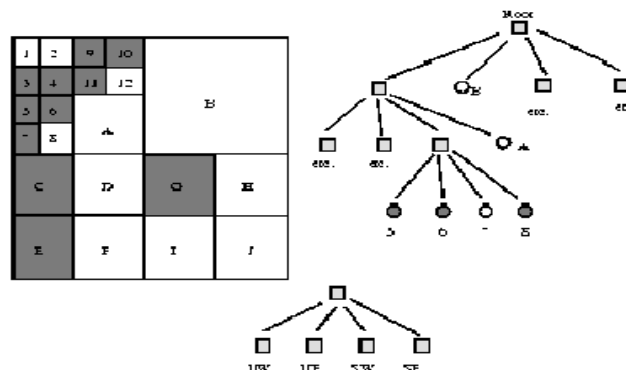
Pueden establecerse dos tipos de crecimiento:

Splitting and Merging Es un método que consiste en dividir la imagen en regiones uniformes (figura 9). La representación que se utiliza es piramidal, una región cuadrada ($m \times m$), en un nivel de la pirámide tiene 4 sub-regiones.

Normalmente el algoritmo comienza con la hipótesis de que la imagen completa es una única región, entonces analiza la homogeneidad de la misma (mediante un cierto criterio y propiedades). Si existe homogeneidad, la imagen se encuentra ya segmentada, si no es así, entonces la región es dividida en 4 regiones. Este proceso se repite para cada una de las regiones generadas hasta que el proceso de división no puede llevarse a cabo.

Una vez que se ha llevado a cabo el proceso de división, se comprueba para cada región generada, si es posible unirla con una región adyacente (lógicamente si satisfacen el criterio de homogeneidad establecido). El proceso termina cuando no se pueden fusionar más regiones.

Figura 9. Splitting and Merging



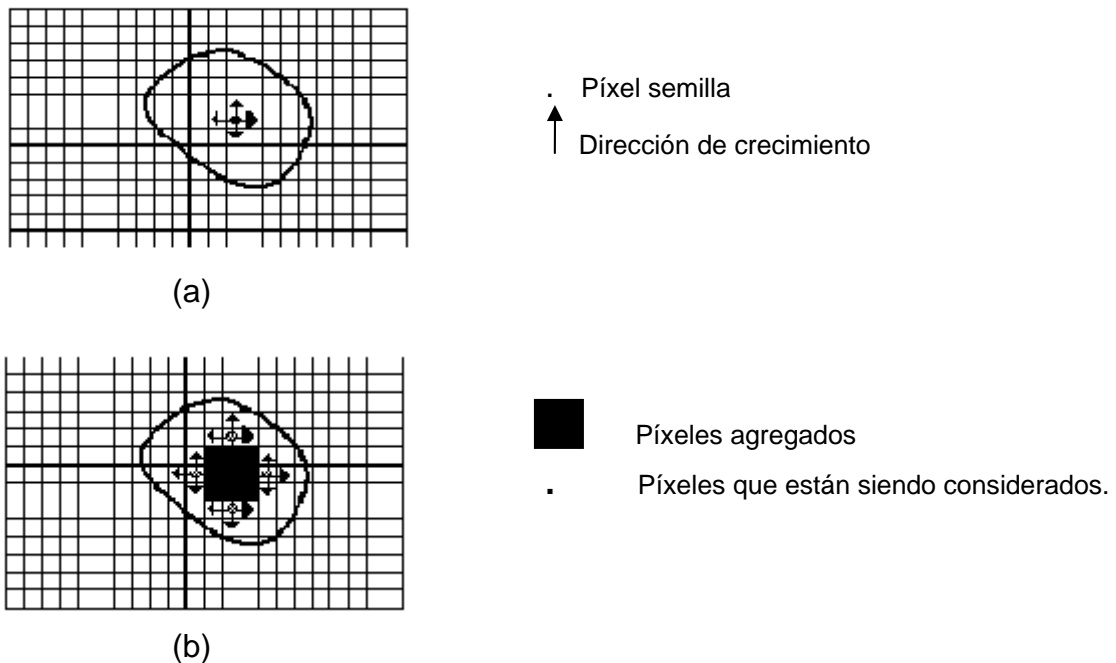
Fuente: MÉTODOS DE segmentación orientada a regiones. (on line)
http://www.lfcia.org/~cipenedo/cursos/lp/Tema3/nodo3_3.html

Region Growing Es un método de segmentación que utiliza un principio totalmente opuesto al split and merge.

En la figura 10 se observa que en este método, las regiones crecen mediante agregación de píxeles similares en valor respecto a la propiedad P que se utilice para realizar la segmentación. Este tipo de algoritmos necesita que el usuario seleccione un conjunto de *puntos semilla* en la imagen. Estos puntos semillas servirán como puntos de comienzo del proceso de crecimiento de las regiones, con lo cual, el número final de regiones ha de ser como mucho igual al número de semillas sembradas por el usuario (puede ser menor, pues en algún paso del algoritmo se puede decidir unir dos regiones para formar una sola). Para poder realizar la agregación de píxeles similares será necesario definir el concepto de similitud, que no tiene porque ser el mismo para todo tipo de aplicaciones. Posibles criterios, ya utilizados en algoritmos desarrollados, pueden ser que la diferencia entre el valor del píxel a agregar y el valor de la semilla, o el valor medio de la región ya formada, sea menor que un cierto umbral predeterminado.

Figura 10. Crecimiento de regiones

(a) Elección de punto semilla, inicio del proceso. (b) Región luego de ciertas iteraciones.



Fuente: Ibid.

El comienzo con un píxel semilla en particular, permite que esta región crezca completamente antes de tratar otras semillas puede tener varios efectos:

- Crecimiento de regiones dominantes: Ambigüedades entorno a los bordes de regiones adyacentes pueden no ser resueltas correctamente.
- La elección de diferentes puntos semilla, puede dar lugar a diferentes segmentaciones.
- Pueden surgir problemas si un pixel semilla (elegido arbitrariamente) pertenece a un borde.

Para tratar de resolver estos problemas, se han *desarrollado técnicas de crecimiento de regiones de forma simultánea*:

- No se permite que una única región domine completamente el proceso.
- Un cierto número de regiones crecen al mismo tiempo. (regiones similares, presentan un mismo comportamiento en su crecimiento).

- **Descripción**

Busca dar información acerca de las características internas y externas de los objetos presentes en la imagen, las primeras se refieren a los pixeles que comprenden una región u objeto y las segundas a los bordes o contornos de estos. Además, permite diferenciar características de tamaño, forma, coloración, entre otras. Algunos esquemas de representación de contornos son:

- **Códigos de Cadena.** Utilizan segmentos de una determinada longitud y dirección para formar una sucesión que representan los contornos.
- **Aproximaciones Poligonales.** Busca aproximar los contornos de los objetos a polígonos que posean el menor número de lados posibles.
- **Firmas.** Consiste en representar con una función unidimensional un contorno.
- **Descriptores Geométricos.** Se fundamentan en medidas geométricas tales como longitud, diámetro, área, centroide, etc.
- **Descriptores de Fourier.** Son los coeficientes de la Transformada Discreta de Fourier de una serie, donde las coordenadas de los píxeles son utilizados como una serie de números complejos.

- **Reconocimiento e Interpretación**

Es el proceso que asigna una etiqueta a un objeto basándose en la información proporcionada por sus descriptores, es decir se asigna un significado al conjunto de objetos reconocidos por medio de patrones. El análisis de imágenes es un proceso que consiste en descubrir, identificar y comprender los patrones que son relevantes en el rendimiento de un trabajo basado en imágenes. Esta etapa se conoce como procesado de alto nivel, tiene un gran parecido con lo que se conoce como conocimiento inteligente.

Patrón Descripción estructural o cuantitativa de un objeto o de alguna otra entidad de interés en una imagen. En general puede estar formado por uno o más descriptores, las tres representaciones de vectores más usadas son vectores (descripciones cuantitativas), cadenas y árboles (descripciones estructurales). Por ejemplo, para describir tres tipos de lirios se usan como medidas la longitud y anchura de sus pétalos (para cada tipo de lirio). Otro ejemplo en forma de árbol para fotografía aérea de zonas terrestres rurales y urbanas puede ser: se tiene composición de áreas rurales y urbanas, el área rural se compone de zonas de bosque y pasto. El área urbana se puede subdividir en centro de ciudad, afuera, barrios residenciales, red de calles y carreteras, etc.

Las principales técnicas de reconocimiento de decisión teórica son los clasificadores de mínima distancia, los correladores, los clasificadores de Bayes y redes neuronales.

La interpretación de imágenes por medio de computadoras es un proceso complejo, para esto se tienen tres técnicas: lógica formal, redes semánticas, sistemas de producción. Casi siempre, los sistemas lógicos se basan en el cálculo de predicados de primer orden, un lenguaje de la lógica simbólica en el que se puede expresar un amplio espectro de sentencias, desde hechos simples hasta expresiones complejas. Las herramientas de cálculo de predicados permiten expresar el conocimiento como reglas lógicas que se pueden utilizar para demostrar o refutar la validez de expresiones lógicas. Los métodos semánticos representan el conocimiento en forma de lo que se conoce como redes semánticas que son grafos dirigidos, con leyendas. Estos grafos ofrecen formulaciones intuitivas en términos de relaciones entre los elementos de una imagen. En este tipo de formulación, los objetos se presentan como nodos de un grafo y las relaciones entre ellos se presentan como arcos que conectan distintos nodos y que poseen una leyenda. Los métodos basados en sistemas de producción se conocen como sistemas basados en reglas.

3. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO COMPUTACIONAL

3.1 METODOLOGIA

La metodología utilizada en la construcción del prototipo software fue la del Proceso Unificado de Desarrollo de Software, creada por Ivar Jacobson, Grady Booch y James Rumbaugh, miembros de Rational Software Corporation.

Por medio de dicha metodología se buscó guiar de manera lógica y ordenada todas las actividades necesarias para lograr el desarrollo óptimo del sistema; utilizando el Lenguaje Unificado de Modelado (UML) con el cual se prepararon todos los componentes necesarios en la caracterización de las células mesoteliales no tumorales malignas.

Como es un proceso dirigido por casos de uso, centrado en la arquitectura, iterativo e incremental, se hizo importante definir claramente los objetivos del sistema y requisitos del usuario, así a medida que se van estableciendo casos de uso se le va dando una dirección al proceso de desarrollo de software.

Dividiéndose el trabajo en partes más pequeñas, cada una de estas partes como avance en la construcción del producto, hechas de manera planificada con el fin de cumplir con los casos de uso que se han identificado y especificado para cada una de aquellas partes; realizándose iteraciones que contribuyen al crecimiento del producto.

Para construir una versión del producto siguiendo esta metodología se realizaron cuatro fases:

1. Inicio. En esta fase se recopiló la información necesaria para documentar el proyecto, la forma de realización y procedimientos de la citología de líquido pleural, parámetros a evaluar de las células mesoteliales no tumorales malignas en una citología de líquido pleural, modelos anteriores implementados para la clasificación de estas células y casos de uso funcionales más relevante para el modelo.

2. Elaboración. En esta fase se realizó un estudio de los posibles lenguajes de programación a utilizar para el desarrollo del modelo, y eligió el lenguaje Matlab como el más ajustado a la naturaleza del proyecto. Además se definieron los parámetros a evaluar de las células mesoteliales no tumorales malignas en una muestra de citología de líquido pleural. Se estudiaron los modelos matemáticos

existentes en el área del tratamiento de imágenes existentes para el tratamiento del problema. En esta etapa se inició la recolección de muestras.

3. Construcción. Una vez realizados los diseños mencionados en la fase anterior, se continuó con la construcción y codificación de los algoritmos, además de tomar la totalidad de las muestras necesarias para el proyecto.

4. Transición. Se realizó la verificación de la herramienta, construcción del manual del usuario; y se espera publicar los respectivos resultados en congresos y artículos de revistas especializadas.

Adicionalmente, en cada una de las iteraciones se realizaron los siguientes flujos de trabajo:

- **Requisitos.** Descripción de requisitos de la iteración.
- **Análisis.** Comprensión más precisa de los requisitos,
- **Diseño.** Formulación de modelos.
- **Implementación.** Elaboración de la iteración: código fuente, almacenamiento en la base de datos, construcción de interfaces.
- **Prueba.** Comprobación de resultados de la implementación mediante pruebas.

El primer paso fue la definición de los casos de uso o acciones que proporcionan un resultado importante y que guían el desarrollo del sistema, teniendo en cuenta el cumplimiento del objetivo general, donde el actor es el Médico Patólogo. Los casos de uso, permiten a su vez crear el modelo de análisis, descrito como una estructura de clases y relaciones entre ellas y que será utilizado para el diseño y etapas posteriores en el proceso de construcción. En el Anexo A, se presentan los diferentes diagramas de casos de uso y de análisis realizados.

3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de citologías de líquido pleural eran recolectadas por los patólogos del proyecto, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- Citologías con coloración de papanicolaou y hematoxilina
- Citologías no tumorales malignas.

- Citologías que presentaron característica de normalidad o cambios reactivos.

Las muestras que no cumplieran estos criterios eran rechazadas. Luego se digitalizaban cada una de las imágenes con el propósito de identificar los parámetros.

Se obtuvieron un total de 81 imágenes que se sometieron a un proceso de selección, con el fin de obtener una muestra que no pudiese presentar ambigüedades en la información. Esto produjo un total de 50 imágenes celulares evaluadas.

4. ADQUISICIÓN

La adquisición de las imágenes se realizó en las instalaciones del departamento de Patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, se utilizó:

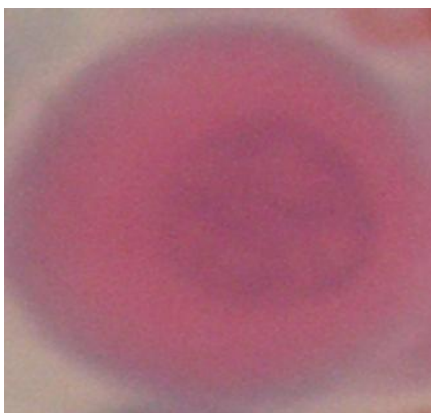
- Tarjeta de adquisición de video
- Cámara Digital Olympus C-7070WZ con conexión USB que permite el almacenamiento de las imágenes en un computador.
- Microscopio (tres objetivos) Olympus Cx31RTSF

Las imágenes fueron guardadas en el formato JPEG (Joint Photographic Experts Group), en una resolución de 1600*1200 pixeles y un tamaño aproximado de 1.2 MB. Se utilizó un equipo portátil para visualizar las imágenes adquiridas, se tomaron imágenes de células mesoteliales sueltas o en grupos con características normales, al principio el tamaño del zoom digital se aumentó para una mejor visualización de las células, pero dicho procedimiento llevó a un tamaño excesivo de las imágenes a digitalizar y la no estandarización en el uso del aumento en el microscopio hizo que no se obtuvieran resultados óptimos en el proceso de segmentación y que el tiempo de ejecución de los algoritmos aumentara considerablemente.

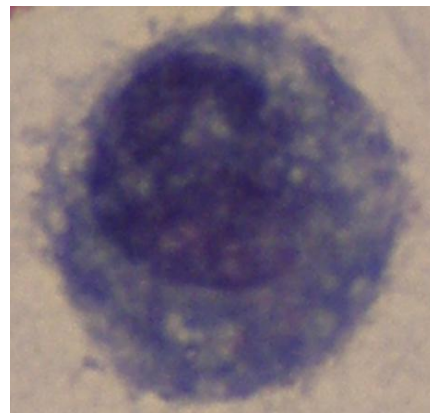
Las siguientes figuras muestran algunas de las imágenes obtenidas inicialmente. Se observa que no se presenta un claro contraste entre citoplasma y núcleo celular y que en otras imágenes es difícil la distinción entre el fondo y la célula a analizar.

Figura 11. Imágenes Celulares

(a, b, c, d, e) Imágenes individuales. (f, g) Imágenes de grupos o racimos



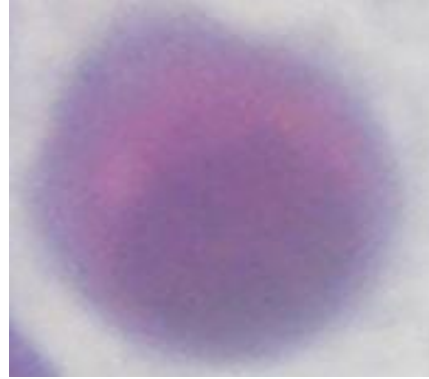
(a)



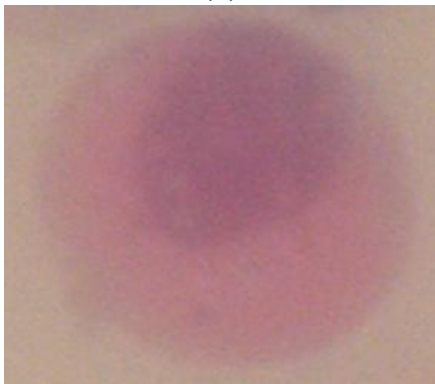
(b)



(c)



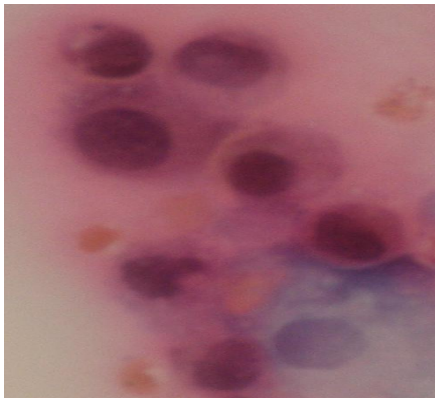
(d)



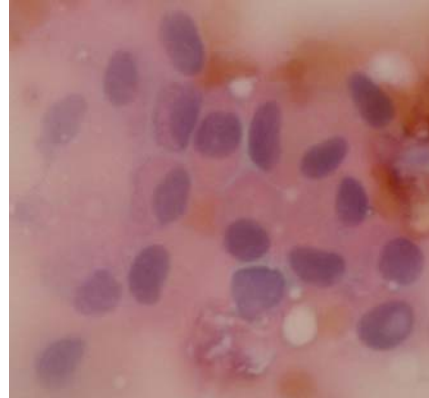
(e)



(f)



(g)



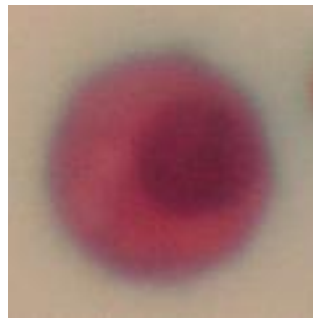
(h)

Se utilizó un segundo procedimiento, manteniendo resolución y tamaño de imagen, pero sin uso de zoom digital, además de un mismo aumento en la toma de las imágenes.

Figura 12. Imágenes utilizadas para desarrollo del proyecto
(a-f) Células mesoteliales individuales.



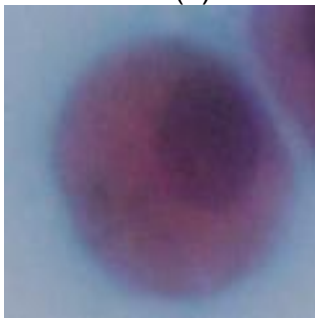
(a)



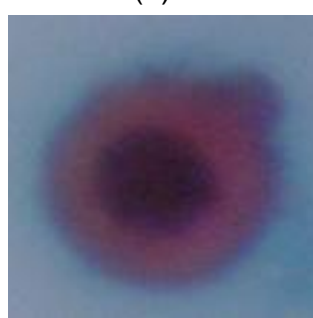
(b)



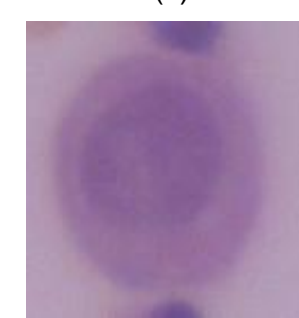
(c)



(d)



(e)



(f)

5. PREPROCESAMIENTO

Una vez adquirida la imagen se procedió a la construcción de los algoritmos para la etapa de pre-procesamiento, se evaluaron varios procedimientos para el tratamiento de las primeras imágenes tomadas las cuales no presentaban buen contraste. Se enumeraron los resultados obtenidos y los procedimientos finales utilizados para las imágenes que finalmente se seleccionaron.

Filtros:

Se utilizaron filtros promedio y gauss clasificados como espaciales paso bajo, los cuales se encuentran implementados en las herramientas de tratamiento de imágenes del lenguaje de programación seleccionado, éste último filtro presentó mejores resultados.

Se recurrió a esta serie de matrices porque su funcionamiento permite suavizar la imagen, y cada una de las superficies, núcleo y citoplasma, tiende a ser homogénea. El filtrado se realiza como la convolución de la matriz del filtro $h(x, y)$ con la imagen original $f(x, y)$, dando como resultado la imagen filtrada $g(x, y)$:

$$g(x, y) = h(x, y) * f(x, y) \quad (20)$$

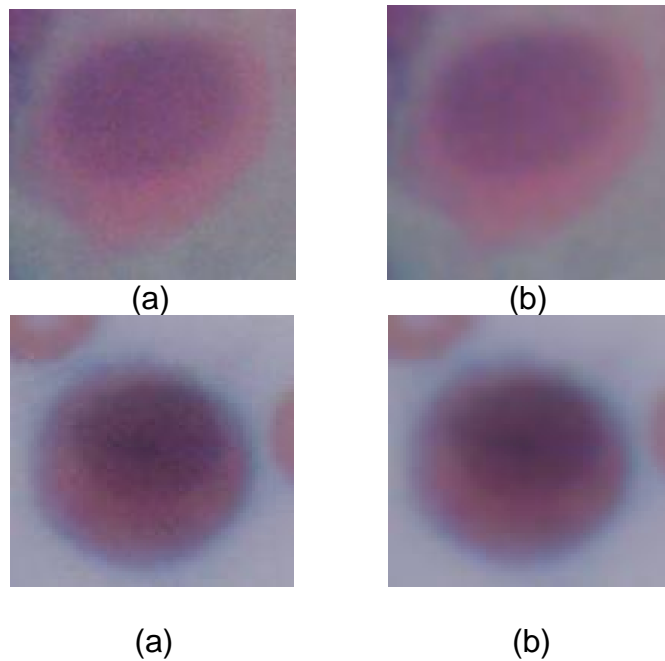
- **Promedio.** Este filtro promedia el valor del píxel con sus vecinos, su resultado depende del tamaño de la matriz utilizada. Un filtro de tamaño tres está definido de la siguiente manera:

$$1/9 * \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

- **Gauss.** Se aplica un filtro Gaussiano rotacionalmente simétrico, el resultado depende del tamaño de la matriz y de la desviación estándar utilizada (sigma). Un filtro de tamaño tres y sigma $\frac{1}{2}$ está definido de la siguiente manera:

$$\begin{bmatrix} 0.0113 & 0.0838 & 0.0113 \\ 0.0838 & 0.6193 & 0.0838 \\ 0.0113 & 0.0838 & 0.0113 \end{bmatrix}$$

Figura 13. Filtro gaussiano Tamaño 6 y un sigma de 2.5.
(a) Imagen original. (b) Imagen filtrada.



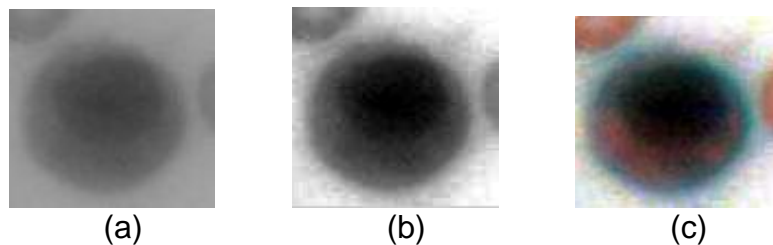
Métodos en el dominio Espacial

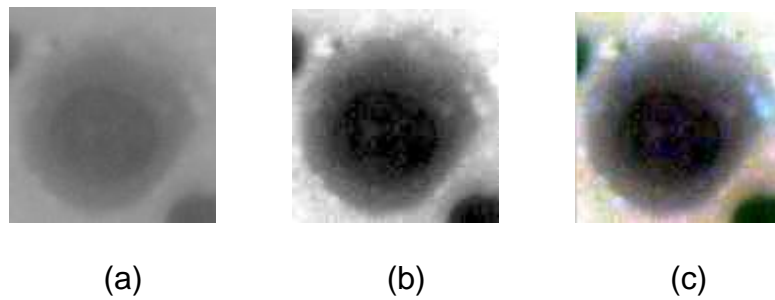
Se realizaron varios procedimientos cuyo objetivo era corregir fallas como iluminación deficiente y/o incorrecta captación de la imagen:

- Fraccionamiento de niveles de gris.
- Ecuilización de los histogramas de la imagen, dicho procedimiento no permitió la umbralización óptima en la etapa de segmentación para encontrar las regiones de núcleo y citoplasma con métodos comunes como Otsu, Kapur, Método Iterativo, Triangular.

Figura 14. Ecuilización de histogramas

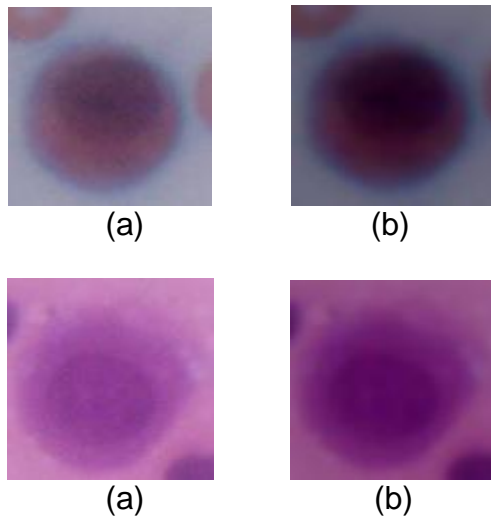
(a) Imagen de grises. (b) Ecuilización de imagen de grises. (c) ecuilización de los 3 planos de color RGB.





- En la figura 15 se muestra el resultado obtenido al aplicar un ajuste a valores de intensidad para aumentar el contraste de la imagen, mejorando considerablemente la calidad de la imagen.

Figura 15. Mejora de imágenes.
 (a) Imagen Original (b) Imagen mejorada



- Mejora de la imagen adquirida con procesamiento en color

El modelo IHLS está idealmente indicado para mejora de imágenes, dado que el componente de intensidad está desacoplado de la información del color de la imagen. El procedimiento consiste en convertir la imagen en formato IHLS, modificando la componente de intensidad y convirtiendo el resultado a RGB para su visualización. El contenido de la imagen no resulta afectado. Aunque el tono y la saturación permanecen iguales, los colores aparecen más claros dado el ajuste a la intensidad (figura 16). Aplicando esta técnica de mejora a cada componente de la imagen RGB se pueden incrementar los detalles visibles y el brillo.

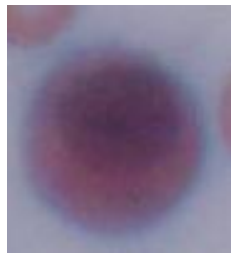
Figura 16. Mejora de la imagen convirtiendo al modelo IHLS
(a)Imagen original. (b) Imagen mejorada usando IHLS



(a)



(b)



(a)



(b)

6. SEGMENTACIÓN

Se construyó un algoritmo de segmentación basado en el uso de métodos de umbralización del histograma de la imagen de grises, obtención de imagen binaria con regiones de interés y algunos elementos de morfología matemática en escala de grises y en imágenes binarias que permiten resaltar la región de núcleo y citoplasma celulares.

6.1 MÉTODOS DE UMBRALIZACIÓN

La umbralización es un método que busca segmentar imágenes escalares creando una partición binaria de las intensidades de las imágenes, el umbral separa las clases deseadas.

6.1.1 Pun-Kapur El primer método empleado se denomina Pun-Kapur. Éste localiza el umbral utilizando la entropía del histograma. Pun Define dos entropías a posteriori, una para el objeto y otra para el fondo. Kapur hace una extensión de estas involucrando distribuciones de probabilidad.

$$H_b(t) = - \sum_{i=0}^t \frac{p_i}{P_t} \ln \left(\frac{p_i}{P_t} \right) \quad (21)$$

$$H_w(t) = - \sum_{i=t+1}^{l-1} \frac{p_i}{1-P_t} \ln \left(\frac{p_i}{1-P_t} \right) \quad (22)$$

$$H = H_b + H_w \quad (23)$$

Donde H_w es la entropía del objeto, H_b es la entropía del fondo, p_i es la probabilidad de un nivel de gris, P_t es la distribución de probabilidad del histograma, y el umbral t es localizado cuando H es máximo.

6.1.2 Iterativo El segundo algoritmo implementado se denomina iterativo. Para la localización del umbral se hacen comparaciones sucesivas entre dos umbrales hasta encontrar el adecuado, el método es el siguiente:

- El primer paso consiste en determinar los dos umbrales iniciales; el primero (U_0) se localiza en cero y el segundo (U_1) en la mediana de los niveles del histograma diferentes a cero.

$$U_0 = 0$$

$$U_1 = \text{mediana de los niveles diferentes a cero}$$

- Se calcula la diferencia entre U_1 y U_0 .

$$Dif = U_1 - U_0 \quad (24)$$

- Mientras que el valor absoluto de la diferencia sea mayor que uno, se calculan nuevamente los umbrales de la siguiente manera:

$$U_0 = U_1$$

$$U_1 = \frac{\text{Promedio}(\text{Mayores a } U_0) + \text{Promedio}(\text{Menores a } U_0)}{2} \quad (25)$$

- Se realiza la comparación de la diferencia hasta que sea menor o igual que uno y se obtiene el umbral adecuado.

$$\text{Umbral} = U_1$$

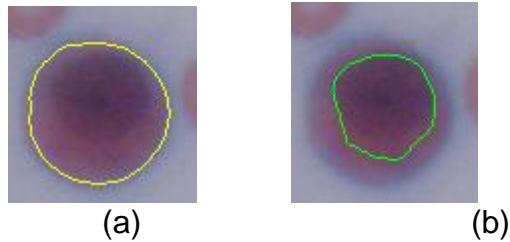
6.1.3 Triangular El tercer método de detección de umbrales se denomina triangular; este método detecta el umbral por medio de la construcción de triángulos entre los picos máximos (crestas) del histograma. Diseñado de la siguiente manera:

- Se detectan dos crestas sucesivas del histograma.
- Se trazan triángulos con cada uno de los niveles intermedios a éstas.
- El nivel que determine el triángulo con mayor altura es considerado umbral.

Con el fin de eliminar falsos picos se le aplicó un promediado a cada punto de histograma y sus vecinos, y en la localización de las crestas se utilizó la derivada.

Figura 17. Segmentación método Kapur más fraccionamiento de niveles de intensidad

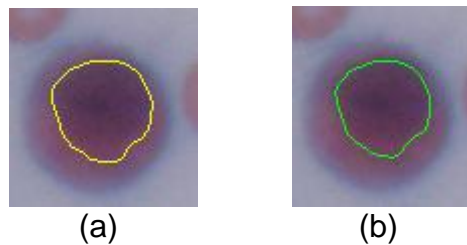
(a) Célula completa. (b) Núcleo



Utilizando un promedio de umbrales hallados mediante métodos ya descritos, morfología sobre imagen de intensidad y fraccionamiento de niveles de intensidad, se obtuvo el siguiente resultado:

Figura 18. Segmentación método promedio

(a) Célula completa. (b) Núcleo



Luego de observar los resultados obtenidos, se concluyó que los métodos de umbralización implementados no arrojaban resultados óptimos.

6.2 Descomposición en Componentes Principales

En algunas imágenes se pueden combinar linealmente las componentes de color y crear una única característica a partir de la cual segmentar, esta combinación lineal óptima se obtiene a partir de la descomposición en componentes principales.

En las combinaciones lineales se transforman las componentes R,G y B en una sola componente de la forma:

$$C = W_R R + W_G G + W_B B \quad (26)$$

Aplicada a todos los puntos de la imagen $f(x, y)$ de componentes $f_R(x, y)$, $f_G(x, y)$ y $f_B(x, y)$, resulta:

$$c(x, y) = w_R f_R(x, y) + w_G f_G(x, y) + w_B f_B(x, y) \quad (27)$$

En forma vectorial:

$$c(x, y) = w^T f(x, y) \quad (28)$$

siendo $w = (w_R, w_G, w_B)^T$.

Si w es un vector unitario, ($\|w\| = 1$), c es la proyección ortogonal de f sobre la recta en dirección de w .

Cálculo de la componente principal:

- 1) Se calcula la media de toda la imagen

$$\bar{f} = \frac{1}{MN} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M f(x, y) \quad (29)$$

- 2) Se calcula la matriz de varianza de color

$$s = \frac{1}{MN} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M (f(x, y) - \bar{f})(f(x, y) - \bar{f})^T \quad (30)$$

- 3) Se calculan los autovalores y autovectores de dicha matriz:

- Los autovalores de la matriz de covarianza, indican la varianza en la dirección de los correspondientes autovectores. Indican la proporción de la información original que contiene esa nueva característica.
- El autovector dominante (el de mayor autovalor) indica la orientación preferente de la distribución global.
- Debe tomarse w igual al autovector dominante de modo que: $c = w^T f(x, y)$

La matriz de covarianza expresa la relación existente entre cada componente color de cada píxel con sus otros componentes color y la relación con los componentes de los otros píxeles que constituyen la imagen, relación expresada por medio de la varianza y la covarianza. Después del cálculo de los valores y vectores característicos de esta matriz se realiza un cambio de coordenadas o si se desea se normaliza para una mejor visualización de los píxeles.

Específicamente, las siguientes ecuaciones muestran la simplicidad:

Matriz de Covarianza:

$$[\text{COV}]_{RGB} = \begin{bmatrix} \text{CRR} & \text{CGR} & \text{CBR} \\ \text{CRG} & \text{CGG} & \text{CBG} \\ \text{CRB} & \text{CGB} & \text{CBB} \end{bmatrix} \quad (31)$$

$$\text{CRR} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (R_i - \mu_R)^2 \quad (32)$$

$$\text{C}_{xy} = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i Y_i \right] - \mu_x \mu_y \quad (33)$$

$$\mu_R = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N R_i \quad (34)$$

Transformación:

$$[\text{cov}]_{RGB} E_i = \lambda_i E_i \quad (35)$$

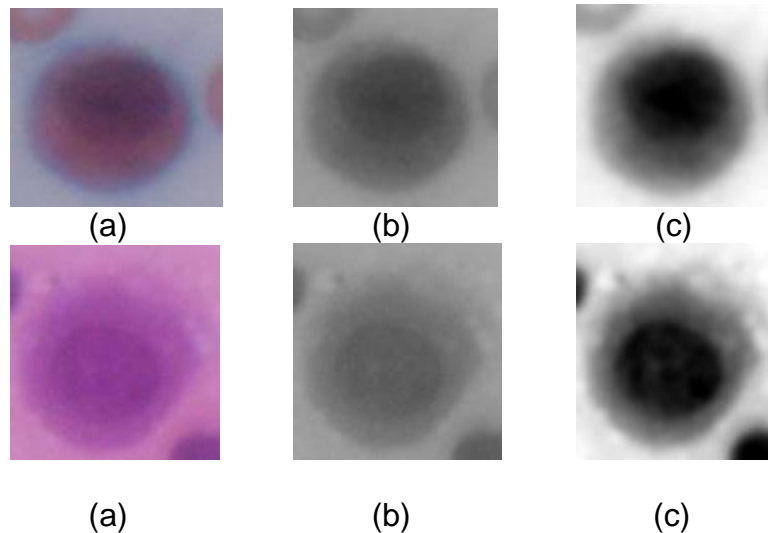
E_i = vector característico

λ_i = valor característico

En la figura 19 se observa la imagen obtenida a partir del Análisis de componentes principales para dos imágenes celulares, expresada como combinación lineal del vector característico hallado mediante las ecuaciones 31 a 35.

Figura 19. Análisis de Componentes Principales

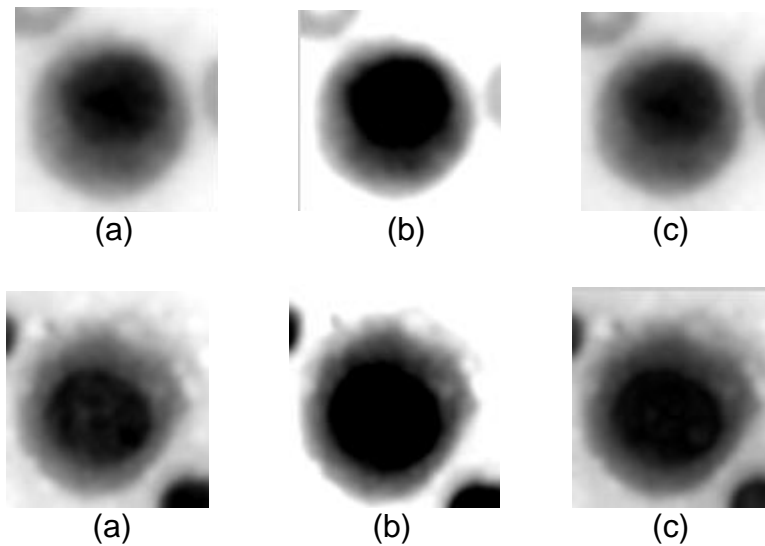
(a) Imagen Original. (b) Imagen de intensidad. (c) Componentes Principales



Además de hallar la imagen producto del análisis de componentes principales se utilizaron procedimientos complementarios (figura 20):

- Fraccionamiento de niveles de gris: Técnica que permitió una mayor distinción entre núcleo y citoplasma celular, ya que se ajustan los valores de la intensidad a un rango específico.
- Generación de una imagen de intensidad a partir de los planos R,G,B y la distancia de los píxeles de cada plano al centroide de una región inicial que forma parte del núcleo.

Figura 20. Ajuste de imágenes resultado de análisis de componentes principales (a) Componentes principales. (b) Imagen ajustada. (c) Imagen de intensidad resultante



6.3 CRECIMIENTO DE REGIONES

Para la segmentación de núcleos se utilizó Segmentación de Regiones por Agregación de píxeles, a partir de los 3 planos de color R, G, B con algunos ajustes necesarios para el buen funcionamiento.

Este procedimiento inicia con un conjunto de puntos generadores o semillas a partir de los cuales se van agregando píxeles vecinos mientras cumplan una propiedad de similitud, la cual es definida según la conveniencia para el tipo de imagen a segmentar.

Algunos de los aspectos importantes a tener en cuenta para la implementación de esta técnica son:

1. La elección apropiada de las semillas o puntos generadores para el crecimiento de la región.
2. El establecimiento del parámetro de comparación a utilizar para la agregación de nuevos píxeles a las regiones.

3. La condición que permite entrar nuevos píxeles a la región mientras sea menor a cierto umbral.
4. La determinación del umbral o valor que permite entrar píxeles a la región teniendo en cuenta el parámetro de comparación y la condición establecidos en 3 y 4.
5. Definición de estado para detener el algoritmo de crecimiento.

Debe resaltarse que existen ciertas diferencias en los procedimientos correspondientes a células individuales y células grupales o sábanas.

6.3.1 Selección de Semillas

- **Células individuales**

El punto semilla se obtuvo a partir del centroide de una región inicial que contiene una porción determinada de núcleo. Dicha región se halló mediante uso de un umbral hallado experimentalmente sobre las células que dieron como resultado de la etapa de pre-procesamiento.

- **Células grupales o racimos**

En este tipo de imágenes fue un poco más difícil el hallazgo de los diferentes puntos semillas (cada punto semilla corresponde a un núcleo). Se descartó la posibilidad de pedir al usuario la selección de una región inicial perteneciente a cada núcleo, y se optó por un procedimiento semi-automático que hiciera más fácil la interacción con el usuario.

Procedimiento inicial:

- Umbralización mediante algoritmo Kapur sobre la imagen de grises
- Aplicación de morfología matemática, para tratar de minimizar al máximo la porción de los posibles núcleos necesarios para encontrar los puntos semillas y separación de regiones resultado de la unión de varios núcleos.

Mediante este algoritmo no se encontró una combinación de operaciones morfológicas óptima para todas las imágenes clasificaban como sábanas, en la etapa de adquisición. Por lo tanto, se buscó un umbral experimental que detectara alguna porción de los posibles núcleos sobre la imagen resultado del análisis de componentes principales.

6.3.2 Parámetro de Comparación Inicialmente se definió el valor de la intensidad de los píxeles de la imagen.

Condición para agregación de píxeles

Se realizaron diferentes pruebas para el establecimiento de una condición óptima:

- a. Diferencia de intensidad del píxel actual perteneciente a la región e intensidad de algún píxel que corresponda a uno de sus vecinos (candidato para entrar). Por lo tanto, la condición de ingreso a la región siempre se daría entre los píxeles del borde de la región creciente y los vecinos de estos que no pertenecen a la región.
- b. Diferencia entre las intensidades de los píxeles vecinos al borde de la región creciente y una intensidad fija: "la del centroide del objeto(s) determinado(s) inicialmente que contiene una porción del núcleo", mencionado anteriormente.
- c. Diferencia de la intensidad de los píxeles vecinos del borde de la región creciente y un valor de intensidad promedio calculado teniendo en cuenta los píxeles de la región que está creciendo, por lo tanto, inicialmente este promedio correspondería al valor de intensidad del píxel con las coordenadas del centroide y a medida que la región crece se tendrán en cuenta estos nuevos píxeles entrantes para determinar este promedio.

Al evaluar la condición "a" la región perteneciente al citoplasma continuaba creciendo indefinidamente, ya que el citoplasma de las células estudiadas presentaba una coloración cada vez más clara a medida que se acercaba a la periferia.

La condición presentada en "b" funcionó para imágenes calculadas con arreglos en las intensidades de tal forma que la intensidad de los píxeles correspondientes a una región fueron valores cercanos casi constantes. Esta condición se implementó finalmente en crecimiento automático de células individuales. Debe aclararse la condición "c" era más conveniente si el crecimiento deseaba realizarse en imágenes en grises sin ningún tipo de ajuste en los valores de intensidad, ya que se ajusta el promedio de la región creciente y por lo tanto sería más exacta. Este último procedimiento se estableció para segmentación de núcleos de sábanas o racimos de células mesoteliales.

6.3.3 Umbral para agregación de píxeles que cumplan con la condición establecida Inicialmente se construyó una interfaz auxiliar que permitió tomar medidas de las células seleccionadas a priori, de acuerdo a la definición de color dada en función del tono, saturación y luminancia, se concluyó que a pesar de que el ojo humano percibe diferencia en el color, las células adquiridas presentan

igual matiz pero diferente luminancia y saturación, por lo tanto la utilización de un umbral fijo no servía para la totalidad de la muestra. Así por ejemplo gracias a pruebas experimentales, para rosadas se encontró un umbral de 20 y para rosadas se estableció un umbral mucho menor (8). Se estableció entonces un procedimiento que permitiera en teoría el cálculo automático del umbral, sin dependencia del color de las células analizadas:

- Se calcula un umbral suficientemente grande para que determinado porcentaje de píxeles que rodean al centroide y que naturalmente hacen parte del núcleo, entren a la región creciente.
- Teniendo una región inicial se calcula la máxima diferencia de intensidad de todos los píxeles de esta área con el centroide, estableciendo este valor como nuevo umbral de crecimiento.

Sin embargo, esta forma de calcular el umbral no produjo una segmentación exitosa, ya que era necesario sumarle un valor un delta al umbral, también determinado experimentalmente según la componente saturación de la célula.

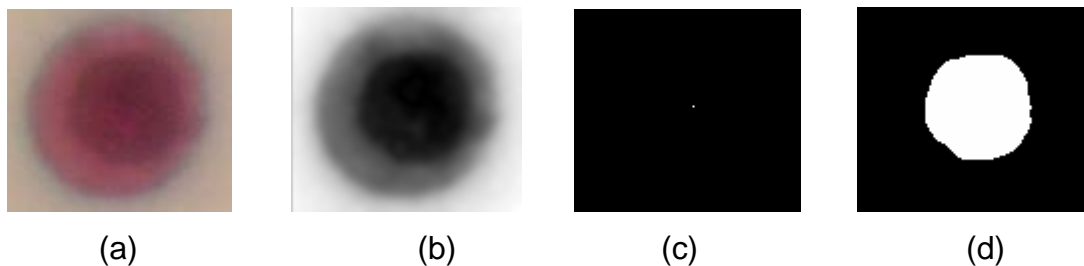
Finalmente se encontró de forma experimental el umbral adecuado para la imagen de grises generada a partir de las componentes RGB, la cual presenta valores muy cercanos y casi constantes para la región del núcleo.

6.3.4 Definición de estado para detención de algoritmo

Como condición de parada del algoritmo se estableció que si al hacer recorrer todos los vecinos de los píxeles del borde de la región creciente ninguno de ellos cumple la condición para entrar a la región, el algoritmo termina.

Resultados:

Figura 21. Método segmentación semi automática células individuales
(a) Imagen original. (b) Imagen sobre la cual se realiza el crecimiento (c) Semilla
(d) Imagen binaria de núcleo. (e) Borde Núcleo. (f) Imagen binaria de célula. (g)
Borde Célula



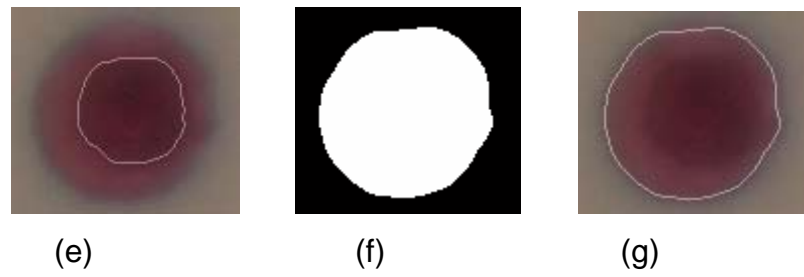
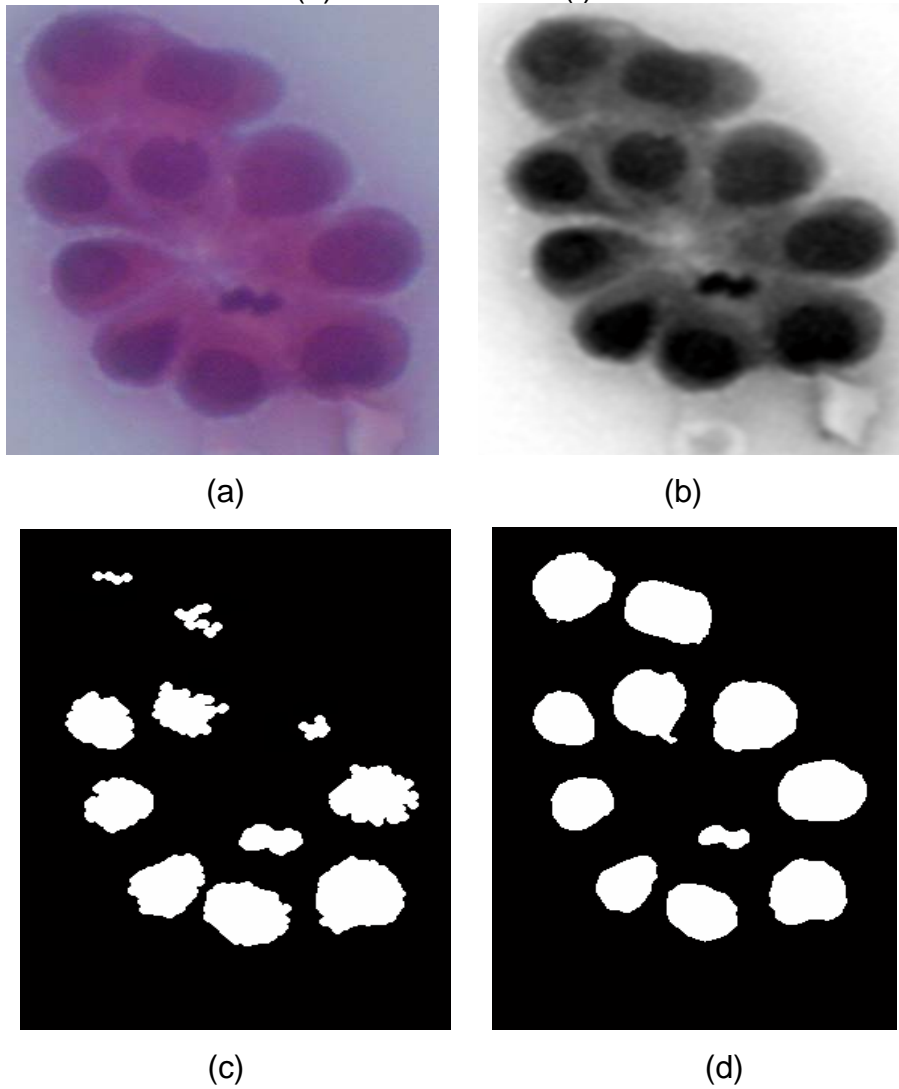
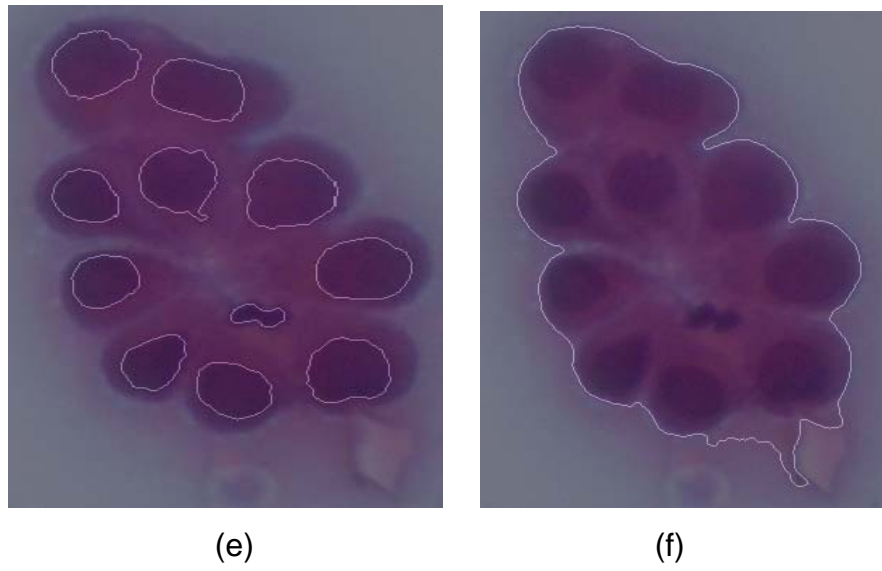


Figura 22. Método segmentación semi automática sábanas
 (a) Imagen original. (b) Imagen sobre la cual se realiza el crecimiento (c) Semilla
 (d) Imagen binaria de núcleo. (e) Borde Núcleo (f) Borde Célula





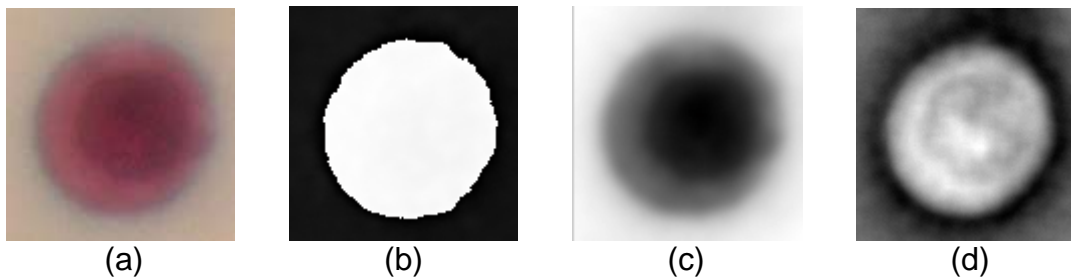
6.3.5 Otros procedimientos

➤ Crecimiento en el sistema HLS para la componente H (matiz).
 Con el fin de detectar toda el área de la célula dado que tanto núcleo como citoplasma presentan el mismo croma.
 Problemas encontrados: La células seleccionadas como individuales no se encuentran totalmente aisladas, así que partes de la imagen que tienen croma similar también se agregan a la región creciente.

➤ Crecimiento en el sistema HLS para componentes Saturación y Luminancia
 Se asociaron los valores de saturación y luminancia en una sola matriz, dicho algoritmo visualizaba bordes e irregularidades que el ojo humano no alcanza a percibir, detalles que para el efecto del trabajo no eran convenientes.

Figura 23. Crecimiento en HLS

(a) Imagen original. (b) Componente H. (c) Componente Luminancia (d) Componente saturación
 (e) Imagen LS. (f) Segmentación sobre H. (g) Segmentación sobre L (h) Segmentación sobre LS



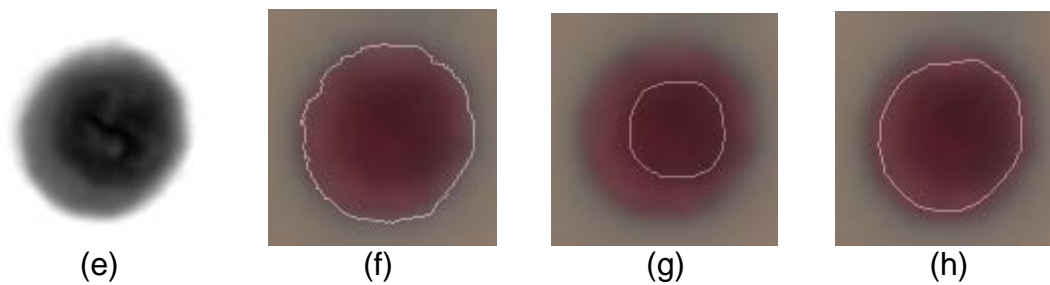
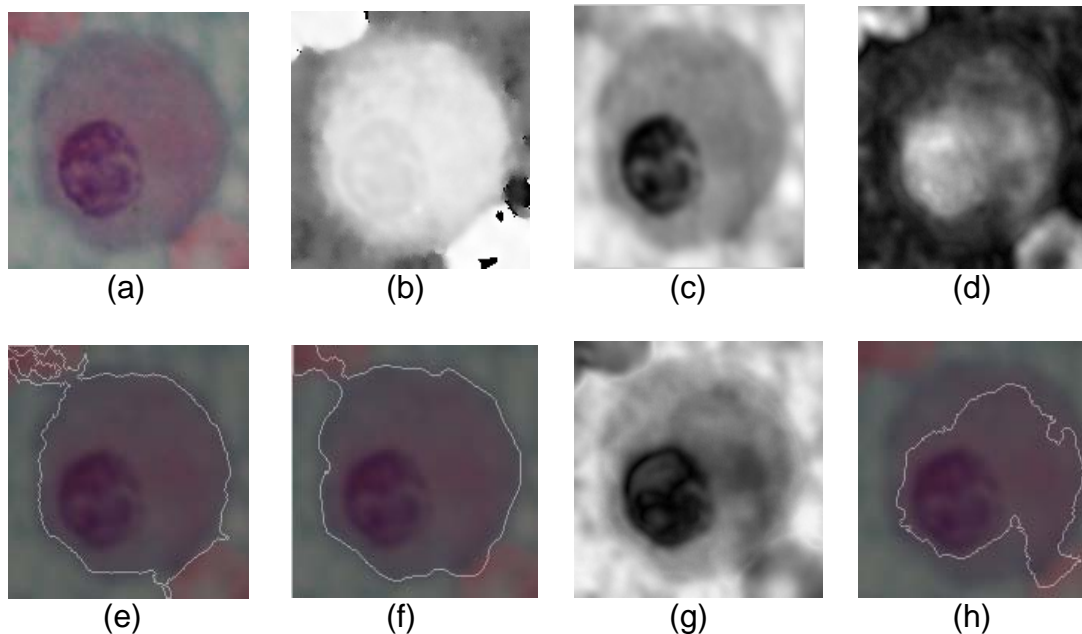


Figura 24. Crecimiento en HLS

(a) Imagen original. (b) Componente H. (c) Componente Luminancia (d) Componente saturación
 (e) Imagen LS. (f) Segmentación sobre H. (g) Segmentación sobre L (h) Segmentación sobre LS



- Crecimiento sobre algunas modificaciones para cada plano del sistema de color RGB

Se establece un umbral automático de crecimiento e intensidad promedio para cada plano (rojo, verde y azul). Se agrega un pixel de la imagen a la región creciente solo si cumple la condición de entrada para los 3 planos.

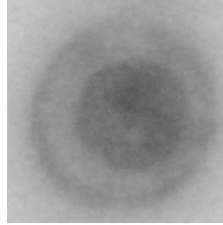
Los resultados observados fueron buenos, no se presenta problema con el umbral, porque es determinado automáticamente, sin embargo, se aclara que algoritmo que se implementó fue aquel que presentó mejores resultados.

Figura 25. Crecimiento RGB

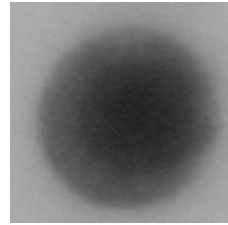
(a) Imagen original. (b) Plano R. (c) Plano G. (d) Plano B. (e) Resultado de la segmentación



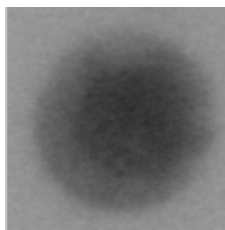
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

7. DESCRIPCIÓN

El resultado de la segmentación es un grupo de imágenes binarias, correspondientes a la región de núcleo, citoplasma y sus respectivos bordes. Éstas permiten extraer los diversos parámetros utilizados para la caracterización de las células mesoteliales no tumorales malignas.

Descripción de núcleo

- **Área:** calculada como el número de píxeles en blanco de la imagen binaria que contiene el núcleo.
- **Perímetro:** calculado como el número de píxeles en blanco de la imagen binaria que contiene el borde del núcleo.
- **Eje mayor o diámetro:** calculados como el eje mayor de la elipse con el segundo momento igual a la región del núcleo.
- **Excentricidad:** esta medida permite conocer la tendencia circular u oval del núcleo. Si un objeto presenta esta forma circular su excentricidad es cero y si presenta forma oval su valor será uno.
- **Intensidad promedio:** nivel de gris promedio de la Imagen en escala de grises que contiene el núcleo.
- **Firma:** Calculada como un vector que contiene la distancia de los puntos del contorno de la región de núcleo al centro de la misma. Se utiliza la varianza de la firma para describir la regularidad del núcleo, suponiendo un valor de varianza igual a cero para un círculo perfecto completamente regular.
- **Moda:** calculada como el nivel de grises de mayor ocurrencia en la región perteneciente al núcleo.
- **Promedio:** calculada como la media de los niveles de grises en la región perteneciente al núcleo.

Descripción de citoplasma

- **Área:** calculada como el número de píxeles en blanco de la imagen binaria que contiene el citoplasma.

- **Perímetro:** calculado como el número de píxeles en blanco de la imagen binaria que contiene el borde del citoplasma.
- **Eje mayor o diámetro:** calculado como la longitud del eje mayor de la elipse con el segundo momento igual a la región del citoplasma.
- **Relaciones Núcleo/Citoplasma:** llamada también Radio N/C, indica la proporción entre el tamaño del núcleo y el citoplasma; se calcula para el área, el perímetro y diámetro.

Con el fin de determinar las medidas del área, el perímetro y los ejes en las unidades utilizadas para la medición de las células (micras), se calculó una relación entre un píxel y la cantidad de micras contenidas en esta área.

Se utilizó una cámara de Neubauer*, de contaje celular y un microscopio, se tomaron fotos de sus cuadros interiores en donde las medidas en micras de los lados de éstos son conocidas. El cuadro interior más pequeño mide 62.5 micras y mediante técnicas de segmentación de imágenes se determinó que 62.5 micras equivalen a 247 píxeles, por lo tanto por regla de tres simple el lado del píxel mide 0.2530 micras y el área del mismo 0.064 micras².

En la siguiente figura, el lado del cuadrado mide 62.5 micras.

Figura 26. Cuadro interior más pequeño de la Cámara de Neubauer tomado a 40x.



Fuente: Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica

* La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro.

8. RECONOCIMIENTO

La etapa de reconocimiento se inicia con la clasificación del núcleo como regular o irregular. Para que el modelo pudiera tomar este tipo de decisión se pensó su solución por medio de una Red Neuronal, utilizando como entrada la varianza de la firma correspondiente al borde del núcleo, suponiendo una varianza entre cero y uno, igual a cero para regulares y aumentando hasta un valor de uno para irregulares, y una salida igual a -1 para regulares y 1 para irregulares, pero luego de tomadas las medidas para la totalidad de las células se concluyó que no existía un valor representativo de núcleos irregulares por lo tanto se planteó un Sistema Basado en el Conocimiento para la totalidad de la muestra obtenida a lo largo del desarrollo del proyecto.

8.1 SISTEMA BASADO EN EL CONOCIMIENTO

Para la clasificación de cada una de las células dentro de los parámetros de normalidad existentes, se implementó un Sistema Basado en el Conocimiento. Se construyó utilizando la siguiente arquitectura:

- Base de Conocimiento.
- Motor de Inferencia.
- Subsistema de Explicación.

8.1.1 Base de Conocimiento En su construcción se empleó una muestra de 81 imágenes, de las cuales se extrajeron 74 núcleos y 50 citoplasmas. A cada uno de estos se le calcularon los parámetros mencionados en el capítulo anterior. Después que los valores son almacenados en una base de datos, se evalúan los intervalos de las células mesoteliales.

Los parámetros almacenados en la base de conocimiento han sido agrupados de la siguiente manera:

- Forma del Núcleo.
- Relaciones Núcleo/Citoplasma. (Área, Perímetro, Eje Máximo).
- Medidas del Núcleo (Área, Perímetro, Eje Máximo, intensidad de grises promedio, excentricidad, centroide).

- Color del Núcleo (Rojo Promedio, Rojo Moda, Varianza Rojo, Verde Promedio, Verde Moda Verde, Varianza Verde, Azul Promedio, Azul Moda, Varianza Azul).
- Medidas del Citoplasma (Área, Perímetro, Eje Máximo, excentricidad, centroide).

8.2.2 Motor de Inferencia Para el diseño del motor de inferencia se utilizó la regla de Modus Ponens, que aplica el siguiente teorema:

Si $p(X) \rightarrow q(X)$ es verdadero

Si se confirma $p(a)$, entonces se concluye que $q(a)$ es verdadero. Se evalúan cada uno de los parámetros y se comparan con los intervalos almacenados en la Base de Conocimiento. Las reglas se definieron de la siguiente manera:

- Si Parámetros (rango normal) \rightarrow Célula con parámetros normales.
- Si Parámetros (fuera rango) \rightarrow Célula con parámetros sugestivos de malignidad.

8.2.3 Subsistema de Explicación Este se emplea cuando la célula presenta características que se encuentran que se encuentren dentro o fuera de los rangos de normalidad, le permite ver al médico patólogo qué parámetro no se cumplió; por ejemplo, cuando el área de un núcleo es demasiado grande respecto al citoplasma.

El subsistema de explicación rastrea los diferentes parámetros, si el parámetro no se cumple da las siguientes respuestas:

- La relación Área Núcleo/Área Citoplasma se encuentra por debajo del rango normal.
- La relación Área Núcleo/Área Citoplasma se encuentra por encima del rango normal
- Se presenta Hiperromatismo, sin embargo, revise el extendido de la placa.
- Se presenta Hiperromatismo
- El núcleo: Excéntrico
- El borde de núcleo: Irregular
- El tamaño de Célula: por encima de rangos normales
- La cromatina de núcleo: No Homogénea

Si los parámetros se cumplen, el sistema da las siguientes respuestas:

- La relación Área Núcleo/Área Citoplasma presenta un ligero aumento, sin embargo se encuentra en el rango normal
- La relación Área Núcleo/Área Citoplasma se encuentra en el rango normal
- Forma de Núcleo normal: Redondo/Oval
Forma de Núcleo no tiende a Redondo/Oval
- No se presenta Hiperchromatismo
- Forma de Célula normal: Redonda/Oval
Forma de Célula: No tiende a Redondo/Oval
- El núcleo: central
El núcleo: está ligeramente excéntrico
- El borde de núcleo: Regular
- El tamaño de Célula: Normal
- La cromatina de Núcleo: Homogénea

9. BASE DE DATOS

Las tablas utilizadas en el modelo entidad/relación son las siguientes:

- **Paciente:** Almacena los datos básicos de los pacientes. La relación con la tabla Imagen asigna las imágenes tomadas de placas de citología de líquido pleural al respectivo paciente.
- **Imagen:** Almacena la información de la imagen asociada a un paciente. Relacionada con las tablas Paciente y con Tabla Célula, esta última para tener el vínculo a los datos de las células que contiene la imagen.
- **Tipo_Imagen:** Contiene dos tipos posibles de imagen: célula individual y grupo de células, las cuales se relacionan con la tabla célula para identificar el tipo respectivo.
- **Célula:** Tabla que enlaza a una imagen guardada con las tablas Tipo_Imagen, Imagen, Núcleo, Citoplasma y Núcleos_Sábana. Con Tipo_Imagen, para determinar el tipo de imagen guardada; con Imagen, para guardar el dato de la imagen de la cual fue extraída; con Núcleo, Núcleos_Sábanas y Citoplasma, para relacionarlo con las medidas extraídas del núcleo, núcleos de grupos y el citoplasma respectivamente.
- **Núcleo:** Almacena la información de las medidas extraídas del núcleo. Se relaciona con la tabla Célula para identificar a qué célula pertenece.
- **Citoplasma:** Almacena los datos de los parámetros medidos del citoplasma de la célula.
- **Núcleos_Sábanas:** Almacena la información de las medidas extraídas de los núcleos de grupos de células.
- **Pos_Núcleo_Sáb:** Contiene dos tipos posibles de posición de núcleo normal o excéntrico. Está relacionada con la tabla Núcleos_Sábanas.

Tablas del Sistema Basado en el Conocimiento:

- **Límites:** Contiene los intervalos de las medidas extraídas de núcleos y citoplasmas de células individuales.

- **Copia_Núcleo:** Contiene la información de las medidas de los núcleos con los cuales se sacan los intervalos para la tabla Límites.
- **Copia_Citoplasma:** Contiene la información de las medidas de los citoplasmas con los cuales se sacan los intervalos para la tabla Límites.
- **Varianza:** Contiene la información de color del núcleo necesaria para sacar algunos intervalos de la tabla límites.

La siguiente figura muestra cada un de las tablas con su respectivas relaciones.

Figura 27. Base de Datos

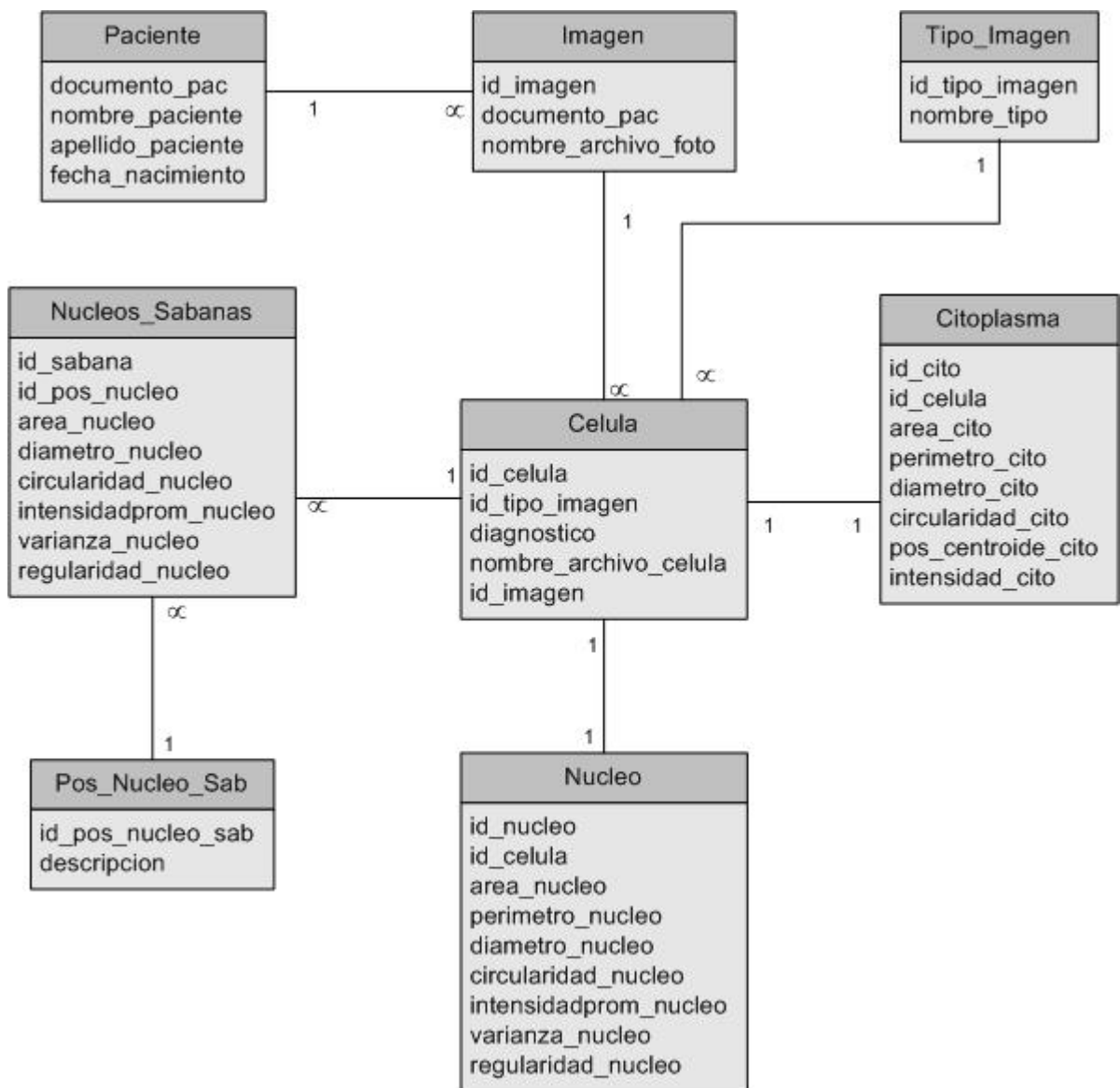
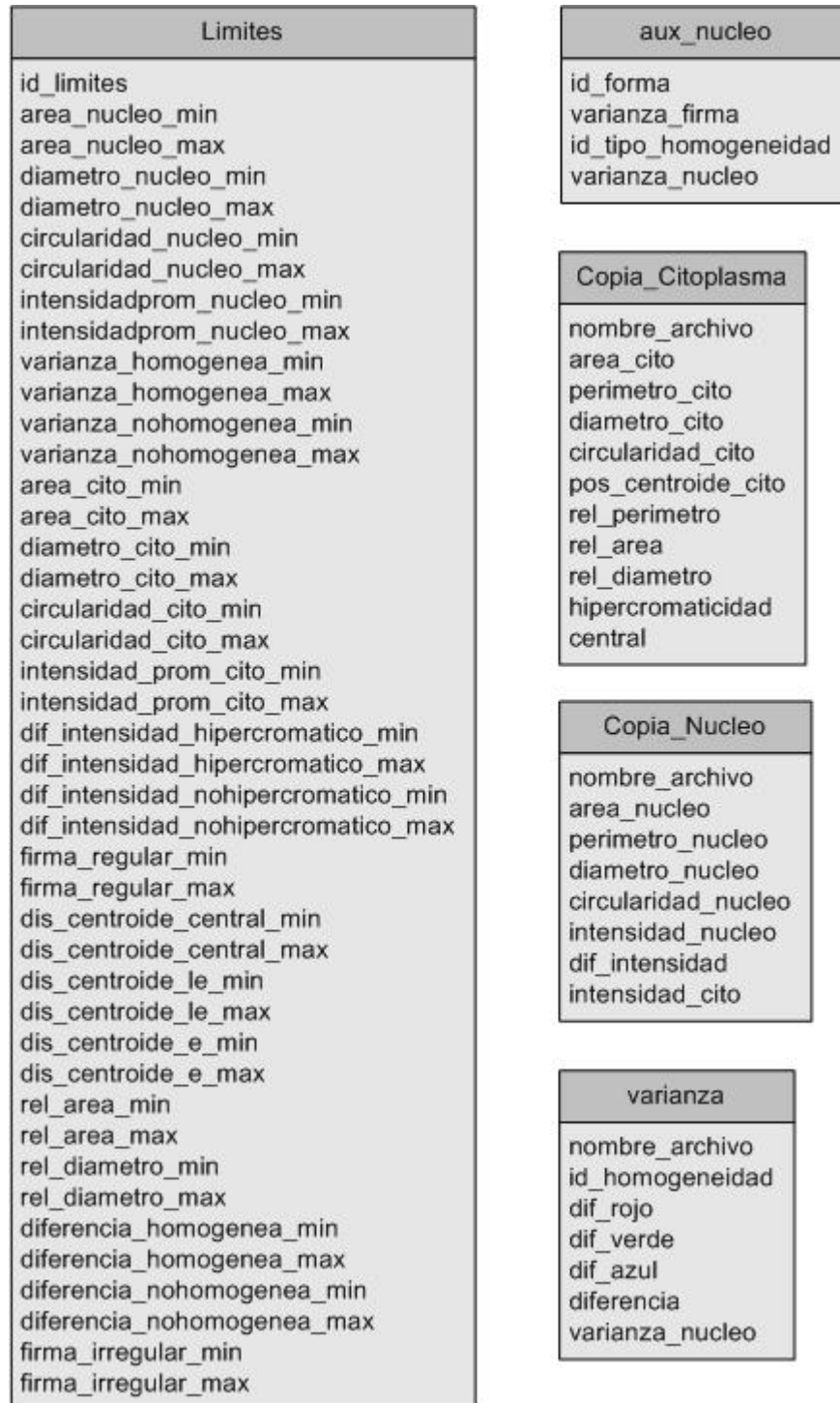


Figura 28. Sistema Basado en el conocimiento



10. MODELO COMPUTACIONAL

El Modelo Computacional permite, por medio de una serie de iteraciones, obtener las diferentes características de una Célula Mesotelial, además de un diagnóstico citológico a considerar por parte del patólogo.

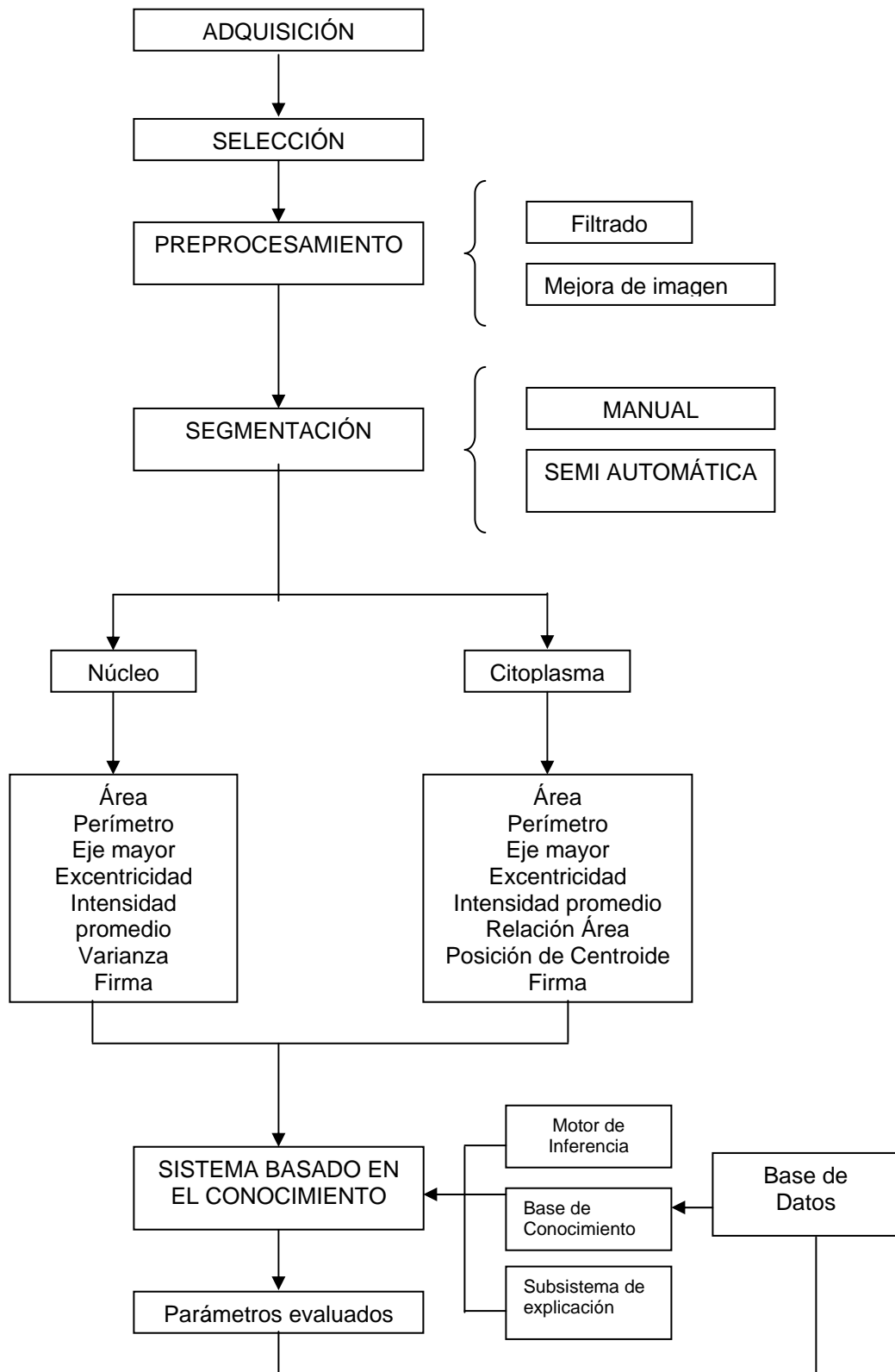
Es necesario que se sigan cada una de los pasos mencionados a continuación:

- Se realiza la adquisición de la imagen de acuerdo con el modelo explicado en el capítulo cuatro.
- En la imagen adquirida, se selecciona la célula individual o un grupo de células –racimos, sábanas- que será analizada.
- La imagen de la célula es preprocesada.
- Se detectan las regiones que corresponden al núcleo y al citoplasma.
- Se calculan los parámetros mencionados en el capítulo siete.
- El Sistema Basado en el Conocimiento clasifica las diferentes características de núcleo y citoplasma de acuerdo a los parámetros.
- Se guardan los resultados en la Base de Datos.

Si alguno de los pasos falla, o no es realizado conforme a este modelo, los parámetros no se evalúan correctamente, es responsabilidad del usuario elegir correctamente las regiones correspondientes a núcleo y célula, y otros datos requeridos a lo largo del proceso que dependen del usuario.

La siguiente figura presenta el esquema del Modelo Computacional.

Figura 29. Esquema del Modelo Computacional



11. RESULTADOS

Para la totalidad de la muestra se calcularon los intervalos de cada uno de los parámetros utilizados. Estos permiten determinar el desempeño del Sistema Basado en el Conocimiento. La Tabla 1 muestra los rangos encontrados, las unidades que expresan el área se encuentran en micras cuadradas, las longitudes en micras, los colores en nivel encontrado y los valores de distancia adimensionales.

Tabla 1. Parámetros Núcleo de Células Mesoteliales

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo
Área	38.49884256	94.52561344
Eje máximo	7.66050295	12.24032229
Excentricidad	0.17941713	0.71843948
Intensidad Promedio	42.16245136	95.13519200
Varianza en los tres planos de color	34.88712531	402.07
Varianza de la firma	0.281421689	24.78278726

Tabla 2. Parámetros Citoplasma de Células Mesoteliales

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo
Área	104.22857376	349.22832184
Eje máximo	11.90561499	21.99447925
Excentricidad	0.12847736	0.51027820
Intensidad Promedio	82.85960514	166.30759493
Distancia centroide Núcleo-Citoplasma	1	15
Relación Área: Núcleo/Citoplasma	0.21040438	0.41674687

Estos parámetros permiten estipular algunas de las características de una célula mesotelial no tumoral maligna. Núcleos que tienden a bajos niveles de gris, tamaño pequeño, redondos a ovales, centrales, ligeramente excéntricos, de contorno regular, generalmente de cromatina homogénea al igual que los citoplasmas, pequeños, redondos, y una relación N/C entre 1:5 y 1:2.

12. DISCUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se ha presentado un prototipo software pionero en la caracterización de Células Mesoteliales no tumorales de Citología de Fluido Pleural que apoya su diagnóstico citológico, basado en técnicas clásicas en el tratamiento digital de imágenes y la transición en la utilización de modelos de color habituales a espacios de representación adecuados, recientemente propuestos.

Se considera la segmentación de las imágenes celulares adquiridas como la etapa con mayor grado de dificultad dentro del tratamiento digital de la imagen y la construcción del prototipo software, ya que el médico patólogo apoya su decisión en las características que observa tanto de núcleo como de citoplasma, en orden de importancia y que son analizadas a partir de este proceso. Por lo tanto, se realizó la evaluación crítica de los resultados obtenidos en la implementación de cada una de las metodologías consideradas inicialmente como factibles en la obtención de éstas regiones, tales como umbralización del histograma de la imagen de grises, crecimiento de regiones en el espacio de color RGB y IHLS, segmentación de imágenes a color usando histogramas bi-variables sobre espacio de color IHLS.

El hallazgo de un umbral a partir del histograma de la imagen de grises y posterior binarización presentó buenos resultados en imágenes con alto contraste entre núcleo y citoplasma, característica difícil de encontrar en las células seleccionadas de la muestra adquirida y aunque se implementaron diversos procedimientos que permitieron mejorar significativamente la imagen: ajuste de valores de grises, aumento de contraste procesamiento de imágenes demás técnicas descritas en el capítulo 5, no se obtuvieron resultados óptimos en la totalidad de imágenes celulares.

El crecimiento de regiones a partir de un punto semilla teniendo como parámetro de comparación la intensidad de grises no tenía un punto de parada en la agregación de píxeles a la región creciente debido a la dificultad en el contraste mencionada en el párrafo anterior. Al establecer como condición de entrada la distancia euclidiana entre las tres componentes R, G, B se obtienen mejores resultados.

A través de la utilización del espacio de color IHLS para descripción de las células en función de su matiz, saturación y luminancia, de forma más intuitiva y más detallada que a través del espacio de color RGB, se concluyó que núcleos y citoplasmas presentan igual cromaticidad, razón por la cual no son factibles procedimientos como el crecimiento de regiones a partir de métricas en HLS (Ver Figuras 25 y 26).

Se realizó un avance significativo en la utilización de histogramas bivariantes cuya esencia es la separación entre las particiones cromática y acromática de las imágenes, cuya combinación basada en la componente saturación es un método interesante de segmentación a color, pero la estructura de los histogramas obtenidos para las células mesoteliales no permitieron concluir con éxito este procedimiento, es fundamental que exista diferencia clara entre el croma de núcleo y citoplasma para efectuar técnicas como ésta y no sobre imágenes de grises obtenidas a partir de la original.

Es claro que no es posible llevar a cabo una segmentación automática para imágenes de células que no se encuentran totalmente aisladas de otros componentes celulares que puedan presentar similar cromaticidad, sin embargo, si esta condición se presenta la segmentación es muy aproximada a la realidad.

Puede concluirse que al utilizar sistemas de color como el HLS, se establece una mejor aproximación a la percepción realizada por el ojo humano, se observan mayores detalles que el observador no alcanza a percibir y que se requieren de técnicas más avanzadas en el tratamiento digital de la imagen, presentando en algunos casos resultados no satisfactorios para el objetivo del proyecto. Razones como la anterior hicieron que se optará por equilibrar los diferentes algoritmos mencionados en el capítulo 6, de tal manera que los resultados retornados fueran correctos.

Para el cumplimiento de los objetivos específicos planteados al inicio del proyecto de investigación se estableció una población selectiva que permitiera extraer los criterios cualificables y cuantificables de las células mesoteliales no tumorales malignas y sus rangos de normalidad, sin embargo a lo largo de este capítulo se ha expuesto como principal problema la falta de contraste de las imágenes celulares, por lo tanto se recomienda establecer un protocolo estándar en la adquisición de las láminas de Citología de Fluido Pleural, tiempo de secado y colorantes utilizados, que permitirá uso de técnicas más avanzadas en el procesamiento digital de imágenes médicas.

El desarrollo del primer prototipo provee las bases necesarias para la generación de un producto completo hacia la caracterización de células tanto normales como tumorales malignas y pueda ayudar mucho más al experto en el área Patológica para emitir diagnósticos citológicos. Para tal fin se recomienda:

- Extender el número de reglas apoyadas en expertos para el motor de inferencia y posterior subsistema de explicación, base de la cual depende una excelente respuesta de parte del sistema.
- Incrementar la población de células mesoteliales normales para aumentar la precisión en la detección de rangos, y por lo tanto del conocimiento.

- Utilización de Redes neuronales y/o procesamiento en paralelo para clasificación de la regularidad del borde nuclear y crecimiento por división de regiones respectivamente.
- Uso de Técnicas de Segmentación a Color.

BIBLIOGRAFÍA

ACHA PIÑERO, Begoña. Segmentación y clasificación de imágenes en color: Aplicación al diagnóstico de quemaduras. Sevilla, 2002, 192 p. Tesis doctoral (Ingeniería de Telecomunicaciones). Universidad de Sevilla. Departamento de Ingeniería Electrónica. ÁREA DE TEORÍA DE LA SEÑAL Y COMUNICACIONES.

ALBA, José Luis. Métodos de análisis de Imágenes: Extracción de características. (on line). marzo 2006.
<http://www.gts.tsc.uvigo.es/pi/Analisis%20de%20imagenes.pdf>

ALFAGEME MICHAVILLA I. et al. Patología Pleural (en línea). Disponible en <http://tratado.uninet.edu/c020601.html>.

ANGULO, Jesús y SERRA, Jean. Segmentación de imágenes en color utilizando histogramas bi-variables en espacios de color polares luminancia/saturación/matiz. En: Computación y Sistemas. México. Vol. 8, No. 4 (Junio 2005); 18 p.

ATKINSON, Barbara F. Atlas de diagnóstico citopatológico. España: Editorial Elsevier S.A. 2005.

BARRANCO, F et al. Patología Pleural (on line)
<http://tratado.uninet.edu/c020602.html>

COCA PRIETO, Inmaculada; BOSCA CRESPO, Antonio y ABARCA COSTALAGO, Manuel. Derrame Pleural (on line)
<http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/derrapleu.pdf>

CRUZ MENA, Edgardo. Líquido pleural: Optimización de su aporte diagnóstico (en línea). Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 1997; 26:75-80. Disponible en <http://escuela.med.puc.cl/publicaciones/boletin/html/patologiaPleural/pleura02.html>

DUGGAN, MA; MASTERS, CB y ALEXANDER, F. Immunohistochemical differentiation of malignant mesothelioma, mesothelial hyperplasia and metastatic adenocarcinoma in serous effusions, utilizing staining for carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin. Acta Cytol 1987; 31:807-14.

FARIÑA GONZÁLES, J y RODRIGUEZ COSTA, J. Citopatología Respiratoria y Pleural. Madrid: Panamericana S.A, 1996.

FUNDAMENTOS DEL color (on line)

http://descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/57915842105571617400080/008591_2.pdf

GARCÍA AYALA, Ernesto et al. Diagnóstico Etiológico de la Efusión Pleural: Casos presentados entre 1986-1993.

GARCIA AYALA, Ernesto et al. Eficacia del Examen citológico de líquido pleural en el diagnóstico de neoplasias malignas que comprometen la pleura y su correlación con la biopsia pleural. En: Rev. UIS SALUD. Bucaramanga 17(1):19-27, Octubre 1989.

GARCIA AYALA, Ernesto y ZAMORA, Kléber. Eficacia de la biopsia pleural en el diagnóstico de pleuritis tuberculosa. En: Rev. UIS SALUD. Bucaramanga. Vol. 17 No. 1 (Octubre 1989); p. 29-32.

GONZÁLEZ BOMBARDIERE, Sergio. Contribución de la Biopsia Pleural al estudio de las enfermedades de la pleura (on line).
<http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/Boletin/html/patologiaPleural/pleura04.html>

GONZÁLEZ, Rafael C. y WOODS, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison Wesley / Diaz de Santos. 1996. p. 447-709.

GUZMÁN DE LEÓN, Alejandro. Procesamiento digital de imágenes colposcópicas. (on line). <http://itzamna.uam.mx/alex/proyecto/proyecto1.htm>

HANBURY, Allan. A 3D-polar Coordinate Colour Representation Well Adapted to Image Analysis. Vienna, 2004. 8 p.

_____. The Taming of the Hue, Saturation and Brightness Colour Space (on line). (París, Francia). <http://www.prip.tuwien.ac.at/~hanbury/CVWW02.pdf>
http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_04/seccion_04_044.html

JACOBSON, Ivar. BOOCH, Grady. RUMBAUGH, James. El Lenguaje Unificado de Modelado. Editorial Addison Wesley. 1999

_____. Proceso Unificado de Desarrollo de Software. Editorial Addison Wesley. 2000.

LE, Mattison et al. Pleural Effusions in the Medical ICU. Prevalence, Causes and Clinical Implications. En: Chest. Utah.Vol. 111,(1997); p.1018.

MANUAL MERCK DE INFORMACIÓN MÉDICA PARA EL HOGAR (on line). Merck Sharp & Dohme de España S.A. Madrid, España. 2005.

http://www.msd.com.pe/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_04/seccion_04_044.html.

MARTINEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Implementación de un Modelo Computacional para clasificación Normal – Displásica de las Células Escamosas de Citologías Cérvico Uterinas. Bucaramanga, 2004, 92 p. Trabajo de grado (Ingeniero de Sistemas). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicomecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Efusión Pleural Maligna (on line). <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/cuidados-medicos-apoyo/cardiopulmonares/HealthProfessional/page3>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Citología de localizaciones no ginecológicas, Ginebra. 1997.

PÁEZ, Silvia. ROA, Jairo H. Derrame Pleural (en línea). Ediciones Acta Médica Colombiana. 1994. Disponible en <http://www.aibarra.org/guias/3-19.htm>.

PÉREZ FRÍAS, Javier. PÉREZ RUIZ, Estela. Avances en patología pleural. Derrame pleural y empiema (en línea). Hospital Materno Infantil. Facultad de Medicina. Málaga. Disponible en http://www.comtf.es/pediatria/Congreso_AEP_2000/Ponencias-htm/Juan_P%C3%A9rez_Fr%C3%ADas.htm.

PERTUZE RIVERA, Julio. APARICIO RAMÍREZ, Rodrigo. Derrame Pleural Neoplásico (en línea). Boletín de la Escuela de Medicina, Universidad Católica de Chile. 1997. Disponible en <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/PatologiaPleural/DerramePleuralNeoplasico.html>.

RW, Light. Diagnostic principles in pleural diseases, citado por PORCEL, J. M. Manejo Práctico del Derrame Pleural. En: Anales de Medicina Interna. Madrid. Vol 19, No. 4 (2002); p. 205.

SA, Sahn. The pleura, citado por BARRANCO, F et al. Patología Pleural (on line) <http://tratado.uninet.edu/c020602.html>

SANCHO, J Ferrer. Marcadores tumorales en líquido pleural (en línea). Archivos de Bronconeumología. Volumen 36, Número 6, Junio 2000. Disponible en <http://www.archbronconeumol.org/cgi-bin/wdbcgi.exe/abn/mrevista.fulltext?pidet=10388>.

SEGMENTACIÓN DE imágenes. (on line) http://www.lcc.uma.es/~munozp/pi_cap6.pdf.

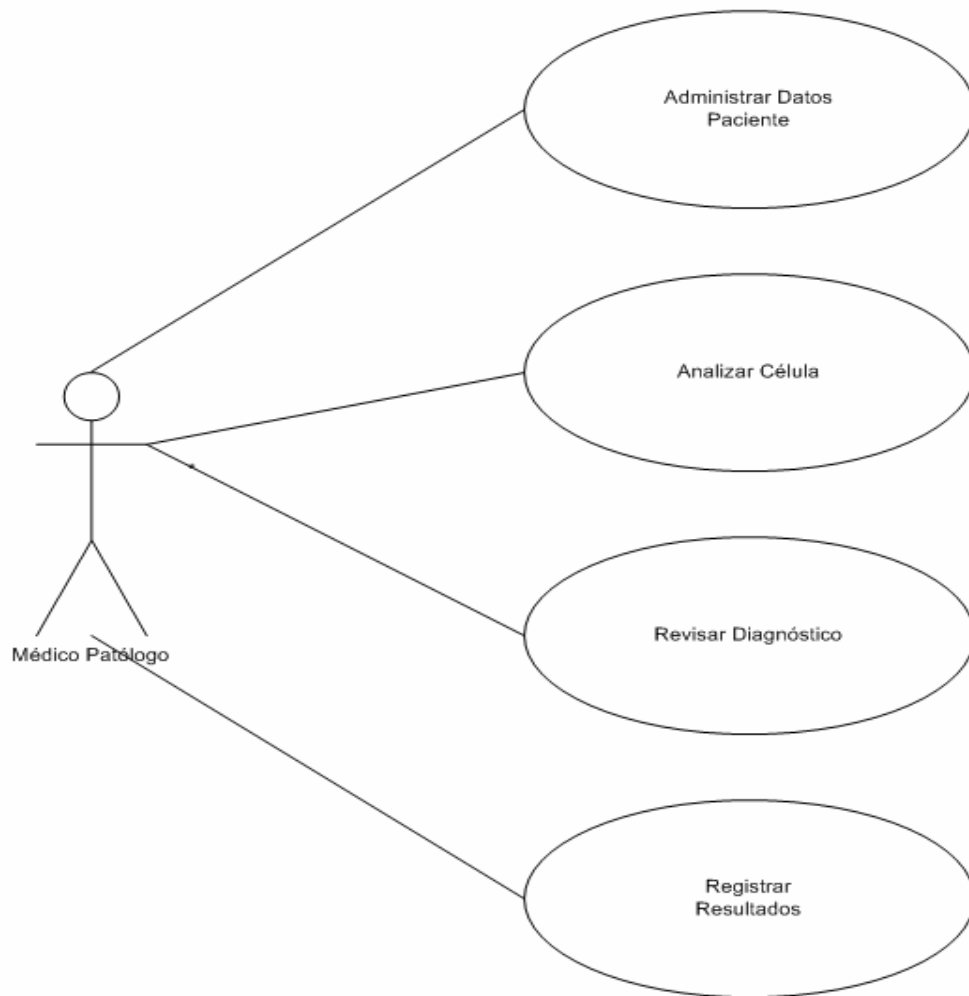
SEGMENTACION ORIENTADA a regiones. (on line). feb 2003.
<http://www.sav.us.es/formaciononline/asignaturas/asigpid/apartados/textos/recursos/crecimiento03/presenta/segmentacion/segmentacion.htm>

TRASTORNOS DEL Aparato Respiratorio: Trastornos de la pleura. (on line). 2005.
http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_04/seccion_04_044.html
WW, Johnston. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. En: Cancer. Vol. 56 (1985); p. 905-909.

ANEXO A. MODELO CASOS DE USO Y DE ANÁLISIS – INTERACCIÓN CON EL SISTEMA

En la figura 30 se pueden observar los casos de uso más representativos de los diferentes procesos que se llevan a cabo en la utilización del prototipo por parte del usuario y que fueron considerados dentro de la metodología de Proceso Unificado de Desarrollo para la realización del proyecto. Estos casos de uso son: caso de uso Administrar Datos Paciente, caso de uso Analizar Célula, caso de uso Revisar diagnóstico, caso de uso Registrar Resultados.

Figura 30. Diagrama de Casos de Uso



A continuación se presenta una descripción detallada de cada caso de uso, de sus requisitos, restricciones y escenarios:

- **CASO DE USO: ADMINISTRAR DATOS PACIENTE**

Descripción general

Permite al usuario gestionar información básica de pacientes

Requisitos:

- Capacidad de registrar datos
- Capacidad de modificar datos
- Capacidad de eliminar datos

Restricciones

- Registrar datos de un paciente antes de modificar y eliminar.
- Al utilizar modificación y eliminación de pacientes se alterarán los registros asociados.
- La información registrada debe ser consistente.

Escenarios

- El actor almacena datos del paciente

- **CASO DE USO: ANALIZAR CÉLULA**

Descripción general

Procesamiento interno que abstrae al usuario de los algoritmos propios del tratamiento digital de la imagen.

Restricciones

- El usuario puede analizar células con o sin asociación a pacientes.
- Si se opta por analizar células de un paciente determinado, los resultados se asociaran a dicho paciente, de lo contrario sólo visualizará resultados.
- Las células seleccionadas deben presentar un buen contraste entre núcleo y citoplasma ya sean células individuales o agrupadas.
- El usuario puede alternar el método de segmentación si el resultado no satisface sus expectativas o en caso contrario refinarlo.

Requisitos

- Capacidad de seleccionar célula o grupo de células.
- Capacidad de elegir método de segmentación.

Escenarios

- Seleccionar paciente.
- Elegir célula
- Escoger método

- **CASO DE USO: REVISAR DIAGNÓSTICO**

Descripción general

Verificación de resultados arrojados por el software

Restricciones

- Para óptimos resultados es responsabilidad del usuario la fijación final de núcleo y célula en el proceso de segmentación.

Requisitos

- Capacidad de visualización cuantitativa y cualitativa de Resultados.

Escenarios

- Desplegar resultados

- **CASO DE USO: REGISTRAR RESULTADOS**

Descripción general

Guarda resultados en la base de datos.

Requisitos

- Capacidad de almacenar resultados.

Restricciones

- La información almacenada es responsabilidad del usuario.

Escenarios

- El usuario guarda resultados obtenidos.

MODELO DE ANÁLISIS

En las siguientes figuras se muestran los diagramas de análisis que se realizaron para cada uno de los casos de uso, con el fin de ampliar aún más la funcionalidad de los mismos, éstos permitieron identificar las clases e interfaces necesarias para la integración del sistema, además de establecer un punto de partida para el manual de usuario.

Figura 31. Diagrama de análisis caso de uso: Administrar Datos Paciente

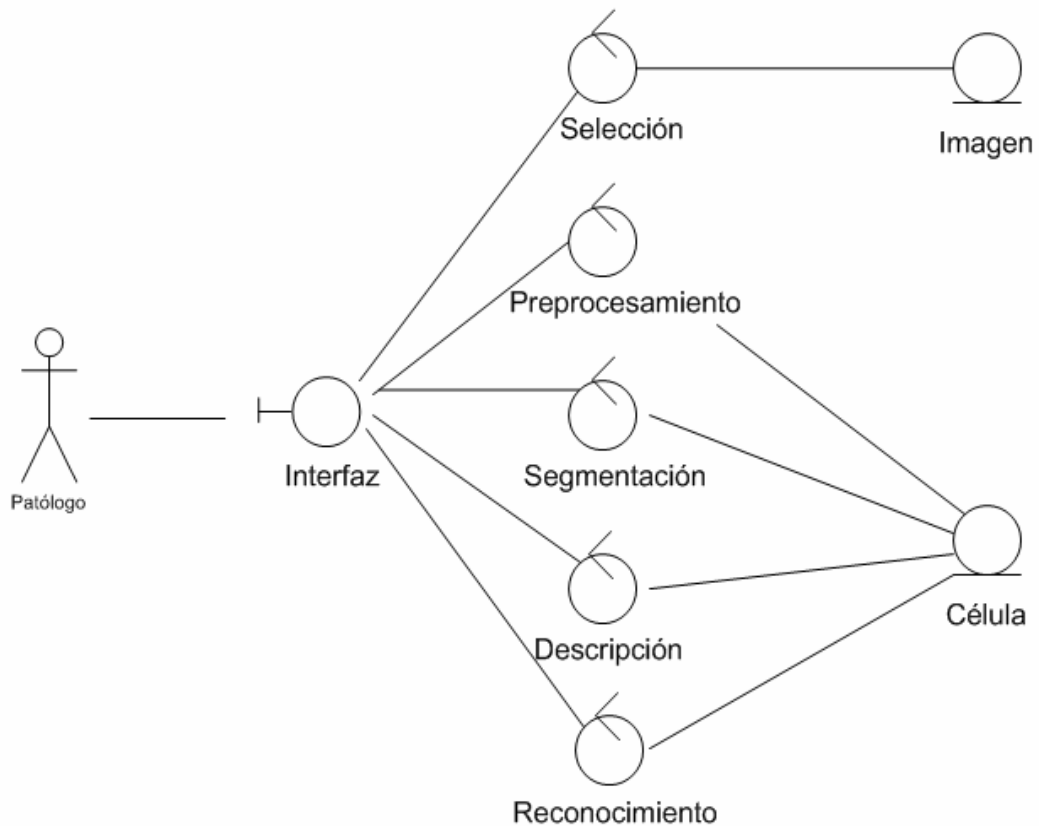


Figura 32. Diagrama de análisis caso de uso: Analizar Célula

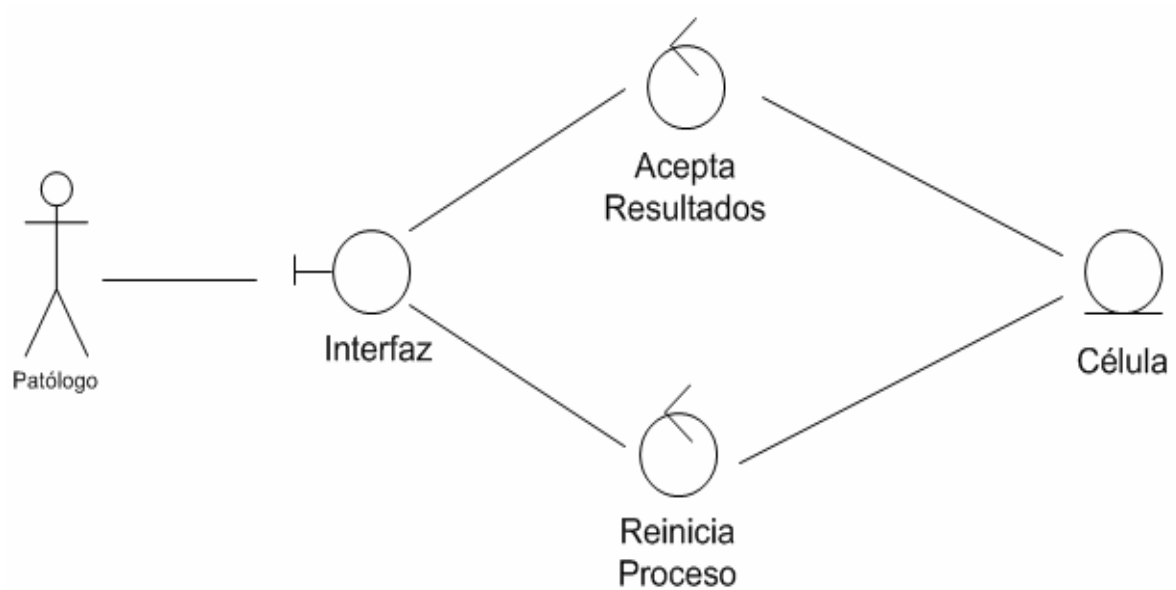
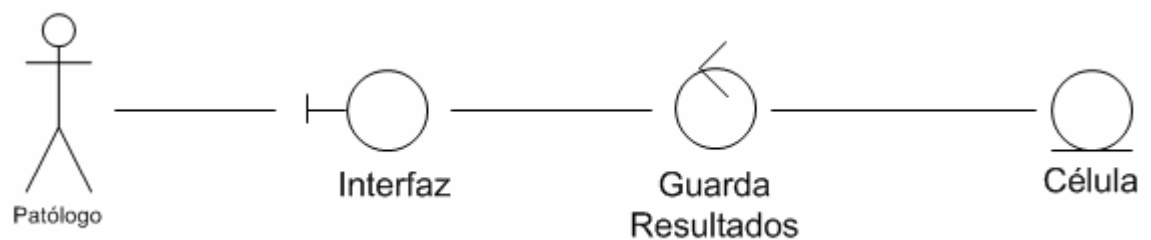
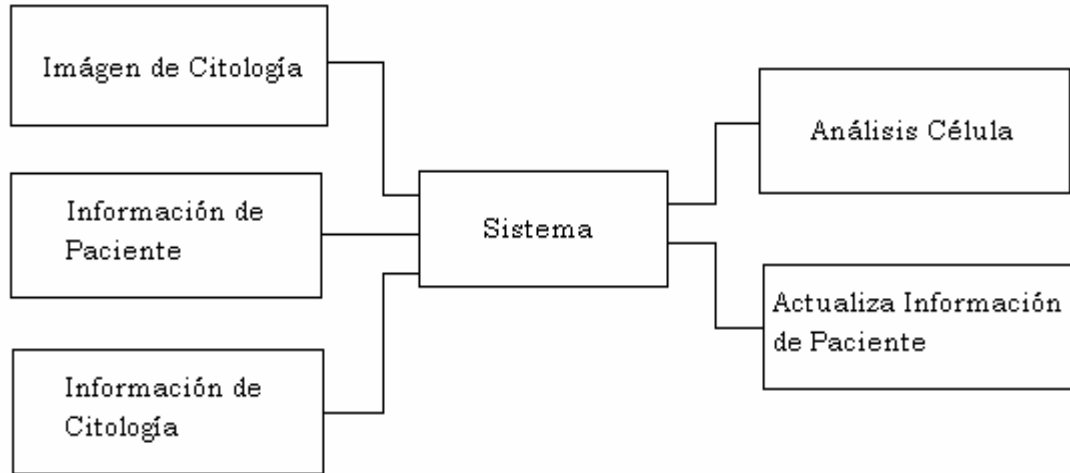


Figura 33. Diagrama de análisis caso de uso: Revisar Diagnóstico



De acuerdo a los diagramas realizados, en la Figura 33 se visualiza el diagrama de Entradas y Salidas que ayuda a establecer la estructura general que debe tener el sistema

Figura 34. Diagrama de Entradas y Salidas



ANEXO B. REQUERIMIENTOS DEL SISTEMA

Requerimientos de Hardware:

- Procesador: 1.4 GHz en adelante.
- Memoria RAM: 256 MB
- Disco Duro: 80 GB
- Unidad Cd Rom

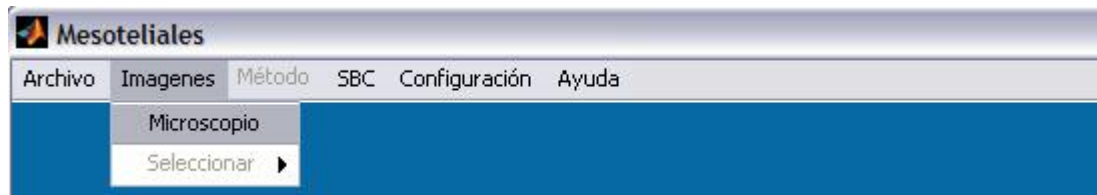
Requerimientos de Software:

- Motor de base de datos MySQL
- Matlab 7.1 Toolbox Image Processing

ANEXO C. MANUAL DE USUARIO

1 - INGRESO - Menú Inicial

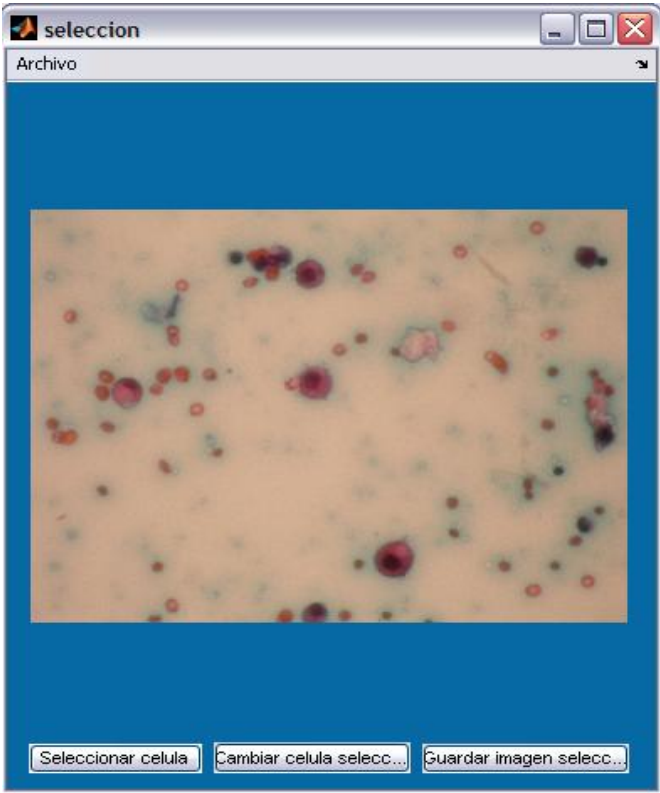
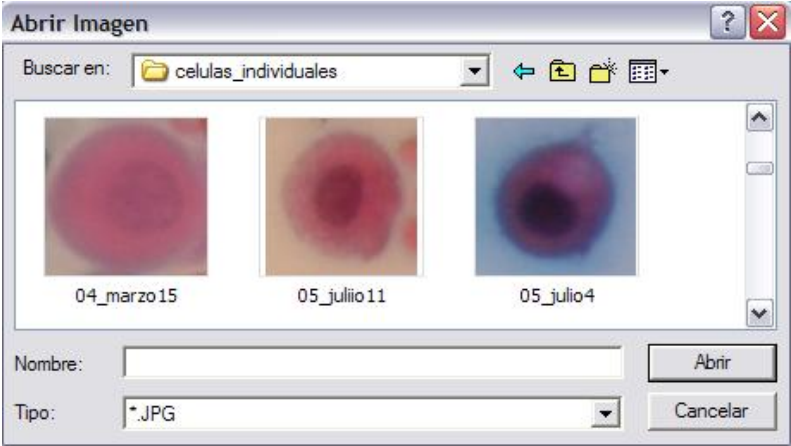
Si el ingreso se hace por medio de un usuario registrado o no, se habilita el menú Imágenes donde el usuario debe elegir un valor de aumento de microscopio que utilizó en la captura de la imagen y además debe decidir si desea importar la imagen de una célula individual o de grupos o "racimos de células" mesoteliales, para resultados óptimos.

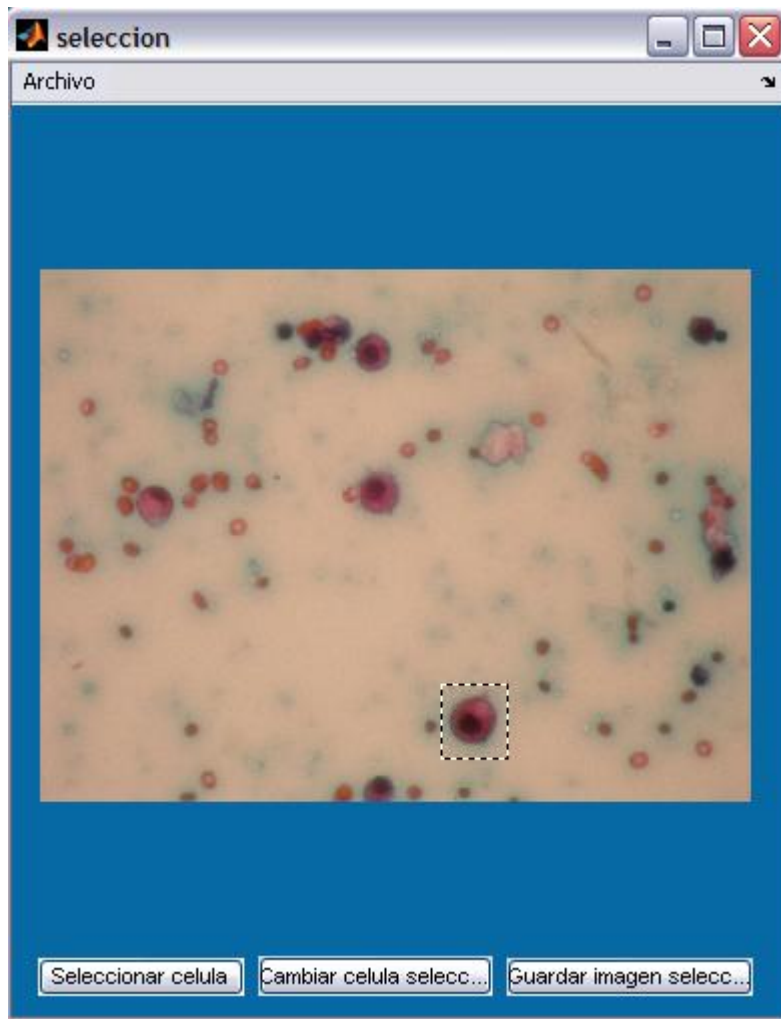


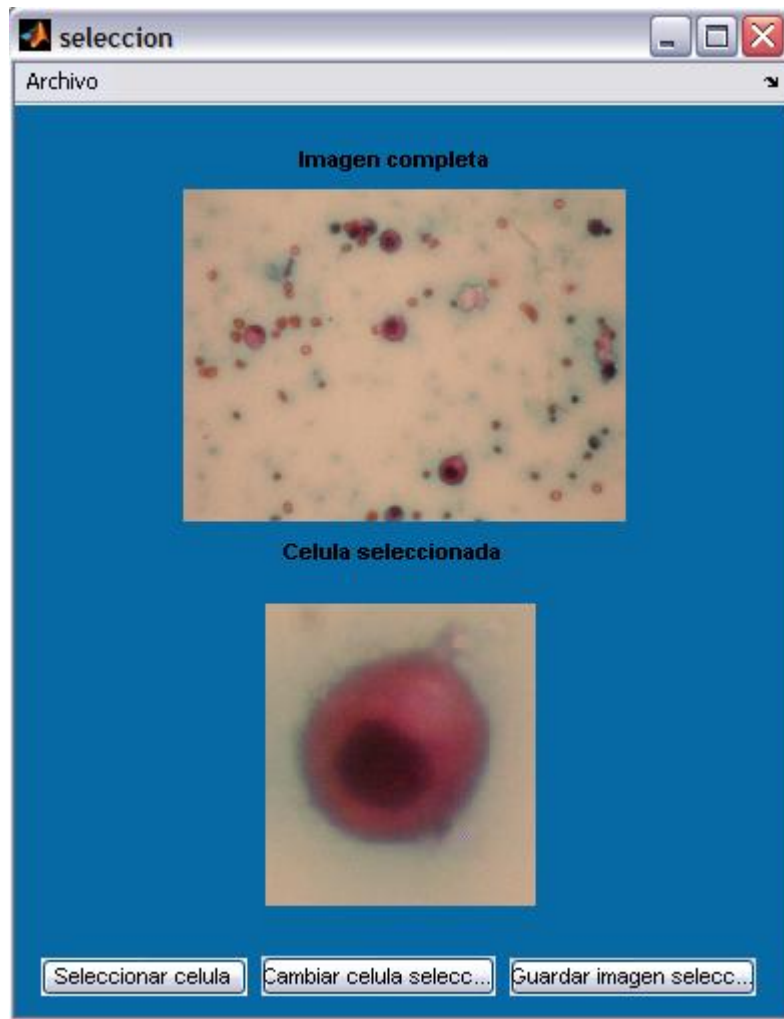
2.1 **Submenú Seleccionar**- Una vez el usuario ha elegido el aumento utilizado, se habilita el submenú seleccionar:



Cualquiera de las opciones elegidas, presenta al usuario una ventana que pide seleccionar la imagen que se utilizará en el software. La imagen importada se visualizará en una ventana auxiliar para facilitar este proceso.



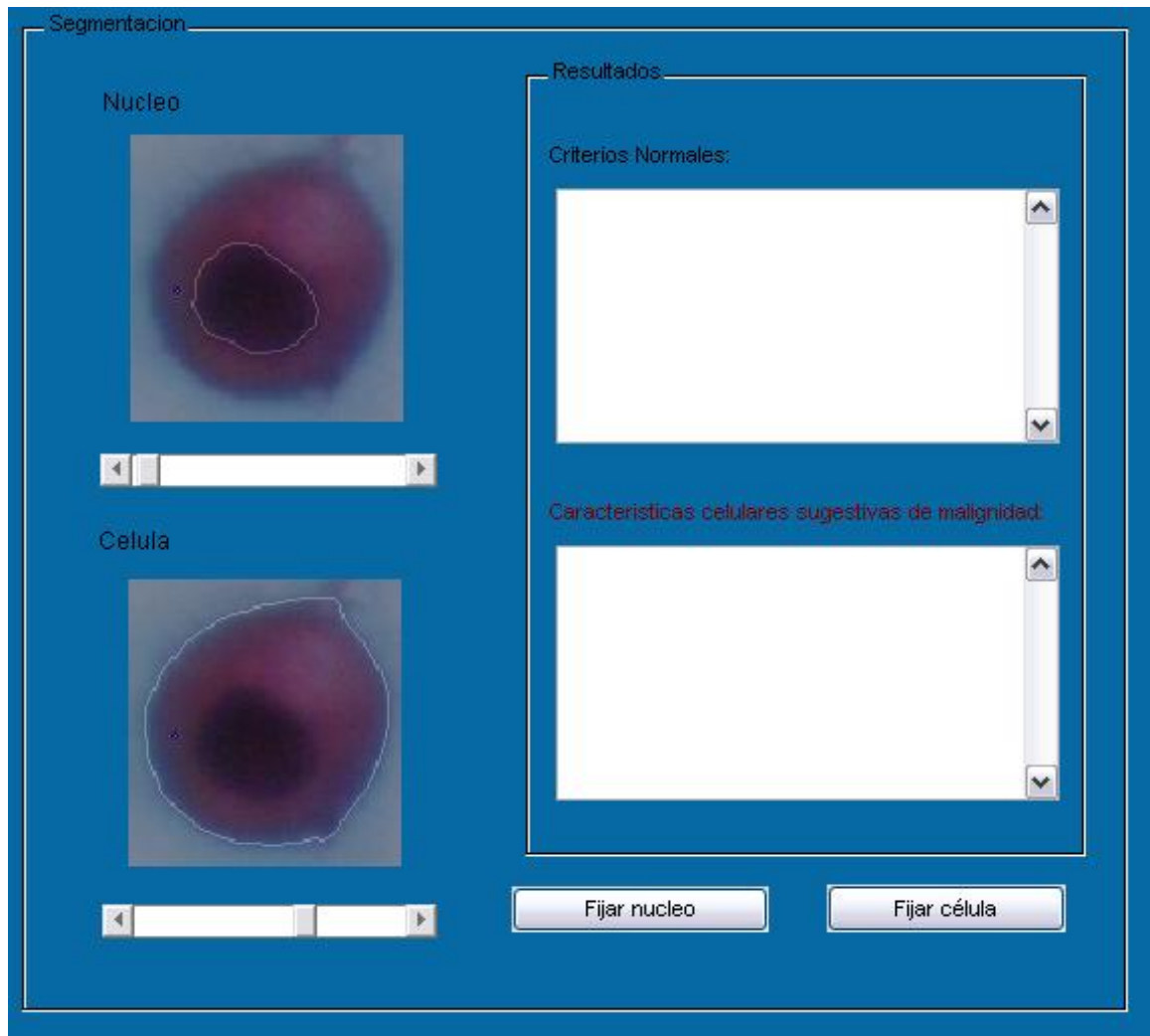




3 - MENÚ MÉTODO

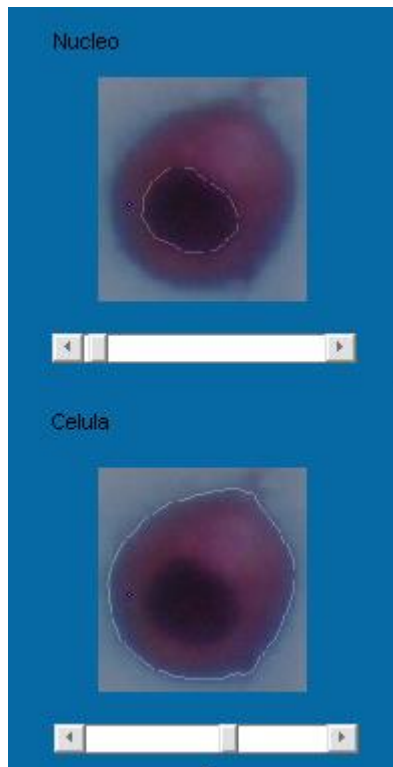
Este menú presenta dos opciones al usuario los Método manual y Método automático, además cuenta con el panel Segmentación donde se visualizarán los resultados de cada uno de estos dos métodos, los cuales podrá refinar mediante botones auxiliares.





3.1 Método Manual

Para encontrar las regiones correspondientes al núcleo y al citoplasma de la célula, se deben deslizar las barras auxiliares respectivas que aparecen debajo de cada una de las imágenes, la primera correspondiente al núcleo y la segunda a célula.

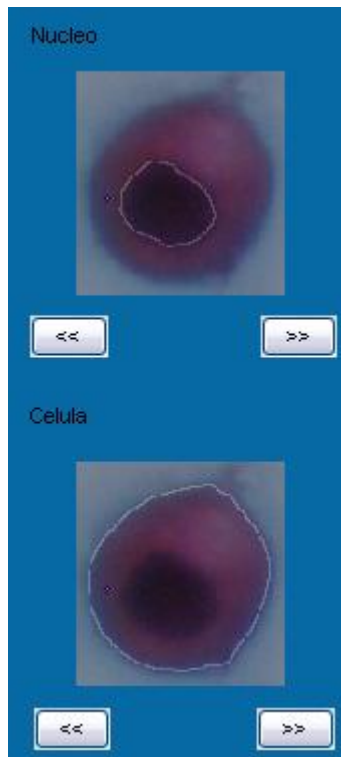


* Botones auxiliares: permiten una mayor aproximación, puede usarse el mouse para el desplazamiento de la barra o las teclas <-- -->



3.2 Método automático

El software muestra el resultado regiones de núcleo y célula encontradas, mediante el tratamiento digital de la imagen.



* Botones auxiliares: permiten una mayor aproximación, el botón << disminuye el contorno de la región y el botón >> la aumenta.



3.3 Fijar Núcleo y Fijar Célula

Luego de visualizar los resultados de cada uno de los métodos, el usuario puede elegir el núcleo y células resultado de cualquiera de los dos métodos de acuerdo a su predilección mediante los botones: Fijar Núcleo y Fijar Célula, una vez fijada la región no pueden realizarse cambios entre uno u otro método.



4. MENU COMPLEMENTARIO

A medida que el usuario se desplaza por los menús de la barra superior, se habilitan diferentes botones en el menú complementario, ubicado al lado izquierdo.



4.1 Datos Paciente: cuando se encuentra un paciente válido al inicio del proceso se habilita este botón que muestra una ventana en donde puede editarse la información del paciente que fue ingresada en el momento del registro, o si el usuario lo considera necesario, eliminar de forma definitiva los registros del paciente.



4.2 Estudiar Célula: una vez fijados núcleo y célula, se habilita este botón, que permitirá realizar el tratamiento de la imagen, medir cada uno de los parámetros correspondientes a núcleo y célula, y visualizar los resultados cualitativos de forma reducida y fácil de entender.



4.3 Tamaño real: este botón permite ver el resultado de los métodos manual y automático en el tamaño real de la imagen celular elegida al inicio, ampliando de forma considerable el zoom comparado con el mostrado en el panel segmentación. Se habilita de forma instantánea al elegir método automático, en caso contrario -método manual- debe utilizarse alguno de los botones auxiliares de núcleo o citoplasma.



4.4 Detalles cálculos: luego de hacer click en estudiar célula, habiendo fijado previamente núcleo y célula, en el panel segmentación aparecen los resultados cualitativos. Al hacer click en este botón el usuario puede visualizar los resultados cuantitativos, como tamaño de célula, área de núcleo.



5. Menú SBC

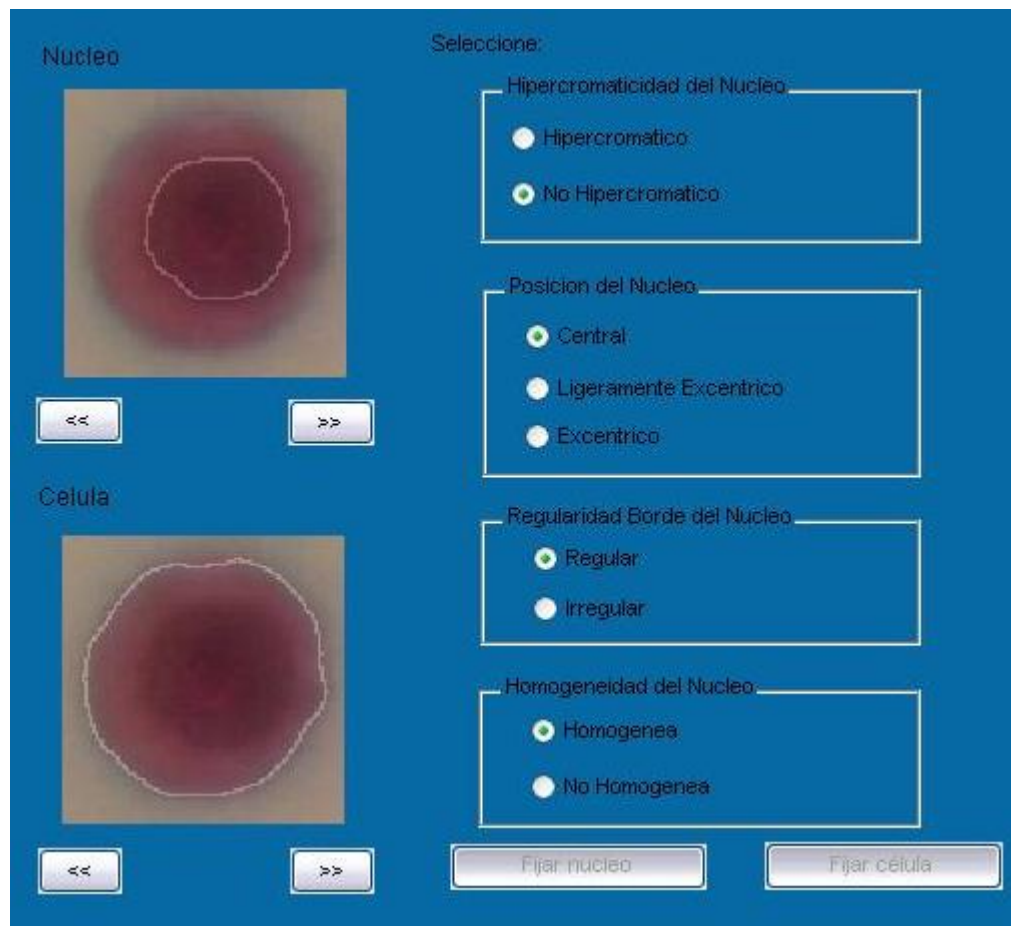
Dentro de este menú se presentan al usuario diferentes opciones: puede Permite su propio Sistema Basado en el Conocimiento (SBC) o utilizar el que se carga por defecto. El SBC permite definir los rangos de los parámetros que se evalúan al estudiar una célula específica. Submenús : Definir SBC a usar, Estudiar célula para SBC, Calcular límites para nuevo SBC.

Definir SBC a usar: permite al usuario definir con qué SBC quiere trabajar, si con el nuevo SBC, creado por el usuario o con el SBC por Defecto que trae el programa, en el primer caso se borrará el anterior sistema .



Estudiar célula para SBC: si el usuario selecciona un nuevo SBC, se le habilita un conjunto de botones, donde puede extraer y guardar medidas del núcleo y citoplasma de la célula que entrará a formar parte de la población para el SBC. Requiere que tanto el núcleo como el citoplasma hayan sido fijados con anterioridad.



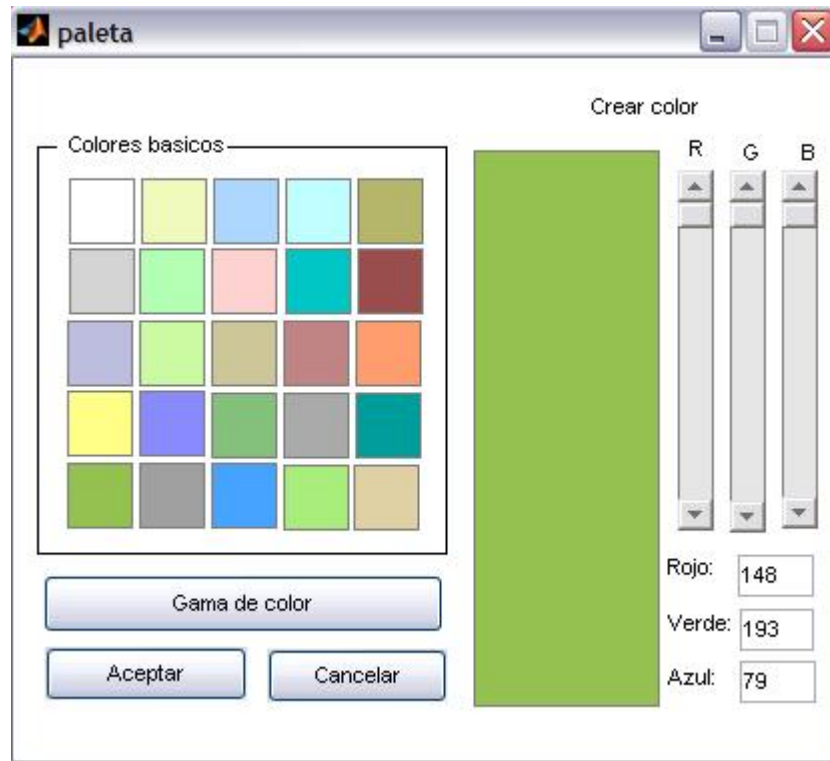


Calcular límites para Nuevo SBC: deshabilita el Submenú anterior Estudiar Célula para Nuevo SBC y hace los cálculos con las células que hayan sido estudiadas para SBC. Creándose así un nuevo SBC.



6. MENÚ CONFIGURACIÓN

Este menú se diseñó pensando en las preferencias del usuario, se habilita una paleta de colores, en donde el usuario puede cambiar el color de la ventana principal y de las ventanas auxiliares que se visualizan a lo largo del proceso.



7. MENÚ AYUDA

En este menú se encuentran: submenú Acerca de, el cual presenta información del grupo de personas involucradas en el desarrollo del proyecto, y submenú Ayuda, que visualiza esta herramienta.





8. MENSAJES

Los mensajes se construyeron con el propósito de orientar al usuario a lo largo de la interacción con el software

***Datos no válidos:** estos mensajes se desplegarán cuando el usuario ingrese datos incorrectos en los diferentes formularios, para asegurar consistencia en los datos que se guardarán, así por ejemplo: el nombre y apellidos son campos alfabéticos, el documento debe ser diferente de cero, el año debe ser numérico.



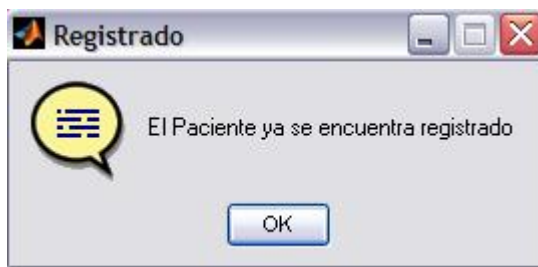
* **Faltan datos:** se despliega cuando no se acepten registros vacíos en un formulario, como nombre, documento de identidad.



* **Paciente no registrado:** este mensaje de error se presenta cuando el usuario haya elegido analizar célula de un paciente y el documento al cual quiera asociar los resultados sea un documento no existente.



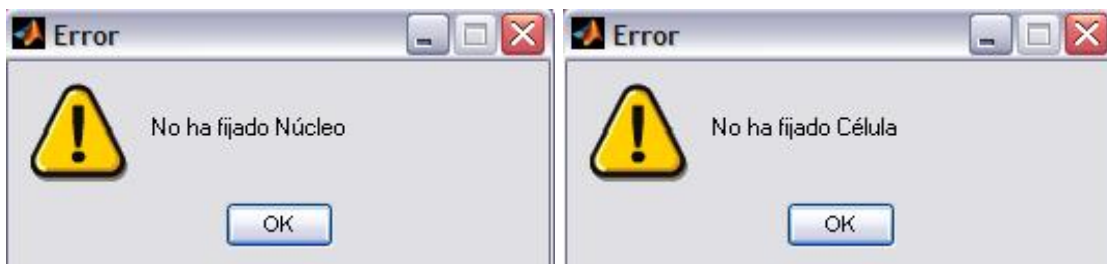
***Paciente ya se encuentra registrado:** mensaje que indica que se está realizando un registro de un paciente ya existente.



***Datos de paciente han sido modificados:** mensaje de confirmación luego de editar datos de un paciente, opción que se habilita en el botón del menú complementario datos de paciente.



***Núcleos y célula no fijos:** se le recuerda al usuario que debe fijar núcleo y célula para poder avanzar en el análisis celular y estudiar los diferentes parámetros.



* **Valor de aumento elegido:** pide al usuario confirmar el valor de aumento del microscopio que utilizó para la adquisición de la imagen, de este valor depende los resultados como tamaño de célula que se dan en micras.

