

ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DIGITALES MICROSCÓPICAS DE UNA
BIOPSIA COMO APOYO EN EL DIAGNOSTICO DE LA ANGIOGÉNESIS

LAURA PATRICIA MORENO HERNANDEZ

HERNAN DARIO GONZALEZ CARDENAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOMECHANICAS

ESCUELA DE INGENIERIA DE SISTEMAS E INFORMATICA

BUCARAMANGA

2011

ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DIGITALES MICROSCÓPICAS
DE UNA BIOPSIA COMO APOYO EN EL DIAGNOSTICO DE LA
ANGIOGÉNESIS

LAURA PATRICIA MORENO HERNANDEZ

HERNAN DARIO GONZALEZ CARDENAS

Trabajo de grado para optar el título de ingeniero de sistemas

Director: Víctor Eduardo Martínez Abaunza

Codirectora: Olga Mercedes Álvarez Ojeda

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOMECHANICAS
ESCUELA DE INGENIERIA DE SISTEMAS E INFORMATICA
BUCARAMANGA

2011



Dedicado a todas aquellas mujeres luchadoras contra el cáncer de mama, en especial a mi madre Luz Mariela quien fue mi mayor apoyo y mi gran inspiración para desarrollar este proyecto y siempre creyó en mí.

A mi padre Oscar Olinto (Q.E.P.D) quien estuvo conmigo apoyándome en todo mi proceso de desarrollo como estudiante y siempre quiso verme triunfar.

Y a mi familia en general, por entregarme su confianza y enseñarme la importancia de la educación y de educar.

Laura.



Dedicado a mis padres Luis y Gloria, en agradecimiento por ser un eje fundamental en la realización de mis sueños y metas, por ser la mezcla perfecta entre alma y razón, y por las continuas hazañas en el eterno oficio del amor.

A la Universidad Industrial de Santander, que desde los recovecos de mi memoria ha estado presente en mi familia y hogar, brindando alegrías, oportunidades y experiencias, entre estas, la historia de mi propia existencia.

Hernán.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por ser el apoyo más incondicional en todo mi proceso de desarrollo como ser humano y como estudiante, entregarme su confianza y ser el eje fundamental de mis decisiones.

Un gran agradecimiento a Victor Martinez, por todo el conocimiento compartido, por guiarnos durante todo este proceso de desarrollo y sobre todo ser un apoyo incondicional y enseñarnos el valor de ayudar a los demás por medio de la ciencia.

A la codirectora Olga Mercedes Alvarez, una gran médico que siempre ha creído en la aplicación de la tecnología en la ciencia para el desarrollo y el avance de las mismas.

A la escuela de Ingeniería de Sistemas por todo el acompañamiento durante toda mi carrera universitaria y brindarme la preparación suficiente para poder cumplir esta meta.

A mi compañero de proyecto por entregar parte de su tiempo, paciencia, conocimiento y esfuerzo en este proyecto y ante todo brindarme el apoyo incondicional como compañero y amigo.

Y a todas aquellas personas que siempre estuvieron a mi lado brindando la mejor de su energía e hicieron posible que nuestra meta pudiera concluirse.

Laura.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por ser una continua fuente de apoyo y conocimiento, teniendo siempre fe en mi desarrollo como ser activo y constructor de una sociedad en continuo mejoramiento.

Especial agradecimiento a Víctor Martínez, sin él y su conocimiento enseñado, este proyecto no habría sido posible. Por su continua lucha en busca del conocimiento lo hacen un excelente maestro y amigo.

A la doctora Olga Mercedes Álvarez, por lograr una simbiosis exitosa entre medicina y tecnología, reposando su confianza en la ingeniería, en este caso, la ingeniería de sistemas.

A mis compañeros dentro y fuera de la carrera, ya que sus esfuerzos por ayudarnos mutuamente y aprender conjuntamente dieron su fruto en este proyecto.

A mi compañera de proyecto, que me ha proporcionado sabiduría en sus experiencias de vida, y que implícitamente logro enseñarme que el mejor escudo en tiempos de dificultad es una sonrisa y una frente en alto.

A la entidad divina presente en todo lugar, que ha permitido todas las herramientas y oportunidades necesarias para escribir estas letras.

Hernán.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
1.3 DESCRIPCIÓN DE LA SITUACIÓN ACTUAL	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	21
2.2 IMPACTO.....	22
2.3 VIABILIDAD.....	23
3. MARCO TEORICO	24
3.1 ANGIOGÉNESIS	24
3.1.1 <i>Definición</i>	24
3.1.2 <i>Historia</i>	24
3.1.3 <i>Angiogénesis por movilización de células precursoras endoteliales de la medula ósea</i>	26
3.1.4 <i>Angiogénesis a partir de vasos preexistentes</i>	26
3.1.5 <i>Angiogénesis en carcinomas y procesos Neoplásicos</i>	26
3.1.6 <i>Factores de crecimiento</i>	27
3.1.7 <i>Inmunohistoquímica y el antígeno CD34</i>	28
3.2 LA MAMA.....	29
3.2.1 <i>Lesiones epiteliales benignas en la mama</i>	31
3.2.2 <i>Cáncer de mama</i>	32
3.2.3 <i>Factores de riesgo</i>	34
3.2.4 <i>El cáncer de mama y la angiogénesis</i>	35
3.3 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DIGITALES.....	37

3.3.1 Imagen Digital	37
3.3.2 Modelos de Color	38
3.3.3 Etapas	40
3.3.4 Técnicas de Pre Procesamiento y Segmentación	41
3.3.4.1 Ecuilización del Histograma:	41
3.3.4.2 Umbralización:.....	42
3.3.4.3 Crecimiento de Regiones	43
4. METODOLOGÍA DEL TRABAJO	44
4.1 FASES DEL PROTOTIPADO:	46
4.1.1 Análisis.	46
4.1.2 Diseño.	47
4.1.3 Implementación.	50
4.1.4 Implantación.	53
4.1.5 Actualización.	56
4.2 SEGUIMIENTO Y CONTROL	57
4.2.1 Especificación Detallada de Tareas:	58
4.2.2 Seguimiento de Tareas:	58
4.2.3 Gestión de Incidencias:	58
4.2.4 Gestión de Cambios de Requerimientos:	61
4.2.5 Finalización de la Tarea:.....	62
4.2.7 Aceptación:.....	63
4.3 FINALIZACIÓN DEL PROYECTO	63
5. CONCLUSIONES.....	78
6. BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1: COMPOSICIÓN DE LA MAMA</i>	30
<i>FIGURA 2. CARCINOMA DUCTAL IN SITU.....</i>	33
<i>FIGURA 3. CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU.....</i>	33
<i>FIGURA 4: BIOPSIA MEDICA CON ANTÍGENO CD34 RESALTANDO EN ROJO LOS MICROVASOS</i>	36
<i>FIGURA 5: REPRESENTACIÓN DE UNA IMAGEN DIGITAL COMO UNA MATRIZ</i>	38
<i>FIGURA 6: ESPACIO DE COLORES - CUBO RGB.....</i>	39
<i>FIGURA 7: ESPACIO DE COLORES – CONO DOBLE HSL</i>	40
<i>FIGURA 8: EJEMPLO DE ECUALIZACIÓN DEL HISTOGRAMA SOBRE ENTORNO MATLAB.....</i>	41
<i>FIGURA 9: EJEMPLO DE UMBRALIZACIÓN DE UNA IMAGEN, DE IZQUIERDA A DERECHA.....</i>	43
<i>FIGURA 10: EJEMPLO CRECIMIENTO DE REGIONES.....</i>	43
<i>FIGURA 11: DIAGRAMA DE ACTIVIDADES DE PROTOTIPADO.....</i>	45
<i>FIGURA 12. INTERFAZ GRÁFICA REQUERIMIENTOS</i>	49
<i>FIGURA 13 IMAGEN DE MUESTRA TOMADA POR LA CÁMARA PARA REALIZAR DESCOMPOSICIÓN POR LA CÁMARA.....</i>	51
<i>FIGURA 14 CAPA H DE LA IMAGEN DE MUESTRA</i>	51
<i>FIGURA 15 CAPA S DE LA IMAGEN DE MUESTRA.</i>	52
<i>FIGURA 16 CAPA L DE LA IMAGEN DE MUESTRA TOMADA.....</i>	52
<i>FIGURA 17 IMAGEN SIN EJECUCIÓN DEL CÓDIGO.</i>	18.
<i>IMAGEN EJECUTADA CON EL CÓDIGO.</i>	57

<i>FIGURA 19. SECUENCIA DE ACTIVIDADES DE SEGUIMIENTO Y CONTROL.</i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 20 DISTRIBUCIÓN FORMADA POR CADA VALOR EN A UN AUMENTO DE 40X.</i>	<i>60</i>
<i>FIGURA 21. DISTRIBUCIÓN DE CADA VALOR A UN AUMENTO DE 10X.</i>	<i>61</i>
<i>FIGURA 22. INTERFAZ GRAFICA PARA IMÁGENES EN AUMENTO A 40X.</i>	<i>62</i>
<i>FIGURA 23. INTERFAZ GRAFICA PARA IMÁGENES EN AUMENTO A 10X.</i>	<i>62</i>
<i>DIAGRAMAS DE FLUJO – SEGMENTACIÓN A ALTO AUMENTO 40X</i>	<i>64</i>
<i>DIAGRAMAS DE FLUJO – FILTRADO POR MEDIA Y DESVIACIÓN PARA ACEPTACIÓN DE LA IMAGEN EN SEGMENTACIÓN A ALTO AUMENTO.....</i>	<i>69</i>
<i>DIAGRAMAS DE FLUJO – SEGMENTACIÓN A ALTO AUMENTO 40X</i>	<i>71</i>

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DIGITALES MICROSCÓPICAS DE UNA BIOPSIA COMO APOYO EN EL DIAGNOSTICO DE LA ANGIOGÉNESIS¹

AUTORES²: Laura Patricia Moreno Hernández

Hernán Darío González Cárdenas

PALABRAS CLAVE: angiogénesis, conteo, Matlab, modelo de color, hsl, rgb, segmentación, tratamiento de imágenes digitales, carcinoma de mama.

En la actualidad el cáncer de mama junto con el cáncer de cuello uterino es la principal causa de muerte en mujeres entre los 35 y 64 años en América Latina esto es derivado a nuevas condiciones de vida en este continente. La cifra en nuestro país, crece anualmente, presentándose aproximadamente 355 casos en Santander y cerca de siete mil a lo largo de todo el territorio colombiano. La mayor parte de estos casos son incidencias de metástasis después de los tratamientos efectuados, a raíz de esto, se hace necesaria una nueva estrategia en la cual prevenir y combatir estas incidencias sean criterios que definan la sobrevivencia del paciente. Para esto, se pueden estudiar fenómenos como la angiogénesis, formación de vasos sanguíneos que alimentan el tumor y proporcionan una vía de escape hacia diferentes lugares del organismo donde pueden acentuarse nuevas lesiones. En este documento se presenta un algoritmo computacional el cual reconoce los vasos sanguíneos presentes en fotografías de muestras extraídas tratadas con el antígeno CD34 de pacientes en diferentes estadios tumorales y cada una en diferentes condiciones de la enfermedad, en el cual el reconocimiento se efectúa por medio de segmentación y tratamiento de las diferentes capas del modelo de color HSL.

¹ Trabajo de grado. Modalidad: Trabajo de investigación.

² Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática.

Director: Ing. Víctor Eduardo Martínez Abaunza Codirectora: Dr. Olga Mercedes Álvarez Ojeda

SUMMARY

TITLE: ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DIGITALES MICROSCÓPICAS DE UNA BIOPSIA COMO APOYO EN EL DIAGNOSTICO DE LA ANGIOGÉNESIS³

AUTHORS⁴: Laura Patricia Moreno Hernández

Hernán Darío González Cárdenas

KEY WORDS: angiogénesis, conteo, Matlab, color model hsl, rgb, segmentaion, digital images processing, breast carcinoma.

Currently breast cancer besides cervical cancer is the leading cause of death in women between 35 and 64 years in Latin America, in colombia the count of cases annually are approximately 355 in Santander and about seven thousand to throughout the country. Most of these, are incidences of metastases after treatment incurred as a result of this, this means a new strategy is needed, which prevent and combat such occurrences is a standard that defines the survival of the patient. For this, we can study phenomena such as angiogenesis, the formation of blood vessels feeding the tumor and providing an escape route to different parts of the body where they may be exacerbated further injury. This paper presents a computational algorithm which recognizes the blood vessels in samples taken from photographs of the CD34 antigen-treated patients at different stages of tumor and each in different conditions, which recognition are through the segmentation and treatment of the different layers of the HSL model.

³ Thesis Investigation

⁴ Phisycs and Mechanical engineering faculty, Systems Engineering and Informatic School.
Manager: Víctor Eduardo Martínez Abaunza, Co-manager: Dr. Olga Mercedes Álvarez Ojeda.

GLOSARIO

Nivel angiogénico: El nivel angiogénico indica la cantidad de vasos capilares encontrados en una muestra.

Antígeno cd34: antígeno utilizado como marcador para aislar los vasos sanguíneos de la estroma.

Neovascularización: Formación de nuevos vasos sanguíneos.

Lobulillos: parte que compone la estructura mamaria ubicada en la parte final del ducto mamario el cual comunica el lobulillo con el pezón.

Estroma: Tejido que sostiene y envuelve un órgano.

Carcinoma ductal insitu: carcinoma ubicado en el ducto mamario sin ser proliferativo hacia el estroma.

Carcinogenesis: Proceso de creación del cáncer

Carcinoma lobulillar in situ: carcinoma ubicado en los lobulillos mamarios

Hiperplasia: aumento de células que afectan el tamaño del órgano en donde se ubican.

Adenosis: aumento de tamaño de los lobulillos del seno

Hematopoyesis: es el proceso de formación, desarrollo y maduración que sufren los componentes de la sangre a partir de su célula madre.

INTRODUCCIÓN

En la medicina, el análisis y procesamiento de imágenes digitales microscópicas se ha convertido en un apoyo para la realización de diferentes estudios científicos que implican un alto grado de certeza y un mínimo margen de error. Los avances en procesamiento de imágenes microscópicas están transformando la comprensión de la angiogénesis y la evaluación de los medicamentos que estimulan o inhiben la angiogénesis en modelos preclínicos y las enfermedades humanas. El estudio de angiogénesis en el cáncer se ha aplicado desde los años sesenta encontrando relaciones directas entre el nivel de neovascularización y el crecimiento o expansión del carcinoma.

En la actualidad, y gracias al avance de la tecnología, se han podido establecer un vínculo entre la ciencia y la tecnología logrando resultados que favorecen el desarrollo de las mismas. Con la creación de herramientas que faciliten el conteo de vasos sanguíneos en muestras microscópicas se ha podido evaluar la eficacia de los inhibidores de la angiogénesis utilizados en el tratamiento del cáncer y de esta manera poder continuar y mejorar el estudio y desarrollo del mismo.

En el presente documento se mostrará cómo por medio de herramientas tecnológicas y la aplicación de algoritmos se puede desarrollar una herramienta que facilite el conteo y reconocimiento de vasos capilares sanguíneos en una muestra microscópica de una biopsia de cáncer de mama, contribuyendo con el estudio del cáncer.

1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

1.1 Objetivo General

Apoyar el diagnóstico de la angiogénesis, por medio de un análisis para la construcción de un algoritmo, que tenga como base de trabajo, el procesamiento de imágenes digitales microscópicas de una biopsia específica.

1.2 Objetivos Específicos

- 1.2.1 Obtener imágenes microscópicas de una biopsia específica para su posterior análisis.
- 1.2.2 Analizar las técnicas de preprocesamiento que se adecuen a las imágenes de una biopsia de mama.
- 1.2.3 Segmentar las imágenes obtenidas por medio de técnicas de procesamiento digital con el propósito de detectar las zonas de interés (células y capilares).
- 1.2.4 Construir un algoritmo para el reconocimiento de capilares sanguíneos presentes en la muestra para la generación de un índice de densidad poblacional de la misma, que soporte el diagnóstico de la angiogénesis en el paciente.
- 1.2.5 Implementar el algoritmo en el entorno de desarrollo integrado MATLAB con una interfaz adecuada para el uso de la herramienta.

1.3 Descripción de la situación actual

El papel que juega la angiogénesis en el estado y la evolución de carcinomas está siendo investigado con gran interés, ya que a partir de este fenómeno se puede pronosticar el comportamiento de un tumor en el organismo y si existe un riesgo latente de metástasis. Siendo ésta una variable pronóstica tan utilizada, es pertinente un estudio minucioso intratumoral para un mejor diagnóstico y tratamiento.

En la actualidad, el estudio del fenómeno de crecimiento de un tumor se basa en la medición de vascularización intratumoral, especialmente en lo que se denomina “áreas calientes” o “hot spots” donde se concentra la mayor parte de capilares sanguíneos. Las muestras son teñidas con Hematoxilina-Eosina y anticuerpos inmunoreactivos, para una mejor visibilidad de los vasos sanguíneos presentes en la muestra. Los tintes pueden diferir de acuerdo con el propósito del estudio.

El conteo o medición de la vascularización tiene como principal objetivo, determinar clones angiogénicos (vasos sanguíneos nuevos a partir de los preexistentes), pero este conteo puede variar según el observador, así que se han desarrollado técnicas para reducir la subjetividad del estudio. La principal y tomada como referencia para este proyecto es el conteo de Chalkley.

Para efectuar un estudio de un indicador angiogénico de una biopsia específica, el patólogo debe identificar las áreas calientes del tumor, y por medio del microscopio, efectúa el conteo de vascularización. De acuerdo con la experiencia del observador puede realizar una abstracción confiable del índice de neo vascularización.

La Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander no cuenta con un método o una política en la cual se utilice el índice angiogénico obtenido de una biopsia para el diagnóstico, pronóstico, o tratamiento del cáncer. Por esta razón

esta investigación tiene como propósito esencial contribuir al apoyo del diagnóstico y tratamiento del cáncer con esta información.

2. JUSTIFICACIÓN

2.1 Definición del Problema

El fenómeno de la angiogénesis es un proceso normal en el cual el organismo genera nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes; es un fenómeno normal del cuerpo que ocurre en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas crecimiento corporal y en el crecimiento tumoral.

Los tumores presentan el fenómeno de la angiogénesis por medio de la secreción de varias sustancias de naturaleza proteica y acción de hormonas y neurotransmisores como factores de crecimiento. El riesgo que este fenómeno implica es la posibilidad de que los nuevos vasos sanguíneos formados puedan portar células cancerosas en su interior, y sean transportados por el torrente sanguíneo, depositándose en otros lugares e iniciando un nuevo tumor. De acuerdo con diversas investigaciones⁵ se afirma que al realizar un análisis histológico de un tumor se puede encontrar evidencia de neo formación de vasos sanguíneos ligados con el tejido tumoral, información que puede ser extraída en un estudio de la biopsia del tumor.

Un índice de densidad neo vascular (angiogénico) puede constituir un factor pronóstico durante la evolución de la enfermedad neoplásica. Pero la mayoría de evaluaciones de este índice se hace por observación (métodos manuales) lo cual puede representar un sesgo en el resultado, ya que es un método subjetivo y

⁵ La medición de la angiogénesis tumoral como factor pronóstico eficaz para el cáncer de ovario.
Acta Obstetricia et Gynecologica vol. 13 numero 6 Diciembre 2000
Prognostic Significance of Microvessel Density in Breast Cancer of Thai Women
J Med Assoc Thai 2007 <http://www.medassocthai.org/journal>

variable. Con el fin de obtener una medición más subjetiva, se han desarrollado técnicas para reducir este sesgo, como lo es el conteo de Chalkley, una retícula especial con 25 puntos superpuestos cuyo objetivo es orientarla de modo que los puntos estén sobre la mayor cantidad de capilares sanguíneos presentes en la imagen observada, sin embargo es una técnica que requiere de disponibilidad de recursos humanos y de laboratorio calificados.

De allí nace la necesidad de construir un algoritmo que reduzca este sesgo, por medio del análisis y tratamiento de imágenes digitales se podrá lograr este objetivo, obteniendo y digitalizando imágenes de cortes intratumorales enfocándose principalmente en las denominadas “áreas calientes”, se obtendrán criterios fundamentales en la construcción de este algoritmo

2.2 Impacto

El impacto esperado con este proyecto será positivo para la comunidad investigativa de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander y para el grupo de investigación en ingeniería biomédica, ya que el índice angiogénico no se encuentra presente en ningún estudio de la región. Se espera que la herramienta desarrollada con este proyecto sea de gran ayuda para continuar la investigación de la angiogénesis en diagnóstico, pronóstico y tratamiento de carcinomas.

La posibilidad de contar con un índice de angiogénesis en las biopsias de cáncer de mama le aportará a los especialistas una medida objetiva, con la cual se le otorgue a la paciente un tratamiento adecuado al avance de la enfermedad.

2.3 Viabilidad

Se cuenta con el respaldo del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica y el Grupo de Oncología y Patología de Santander para el desarrollo de este proyecto, los cuales tienen los recursos humanos calificados para guiar el curso de la investigación. En cuanto infraestructura los grupos poseen tanto las licencias necesarias para trabajar con el software MATLAB, que cubre las necesidades y facilita en gran parte la manipulación de imágenes digitales, objetivo principal de este proyecto, como las muestras de biopsias y los microscopios para la adquisición de las imágenes.

La dirección de patología de la facultad de salud UIS, muestra un gran interés en el proyecto y garantiza recursos para respaldar el correcto desarrollo del proyecto, como equipos para la toma de muestras (cámaras, microscopios, láminas de biopsia), bibliografía y asesorías para una visión clara del problema y demanda de la solución.

3. MARCO TEORICO

3.1 ANGIOGÉNESIS

3.1.1 Definición

La Angiogénesis es un proceso normal del organismo que ocurre en adultos y niños, el cual consiste en la creación de nuevos vasos sanguíneos ya sea por vasos sanguíneos preexistentes o por movilización de células precursoras endoteliales procedentes de la medula. Aunque infrecuente, este proceso se presenta en regeneración de tejidos en procesos de curación de heridas, o en el revestimiento del útero en el ciclo menstrual. También está presente en la formación de vasos sanguíneos del feto, aunque este proceso es conocido como vasculogenesis.

Este proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos está presente también en lesiones neoplásicas y funciona por medio de la secreción de varias sustancias conocidas como factores de crecimiento, engañando al sistema de regeneración, haciéndose pasar por una “herida que nunca cura”⁶. El riesgo que implica la angiogénesis en estas lesiones es la alimentación que proveen al tumor, el cual crece y pueden aportar células lesionadas para ser transportadas por medio del torrente sanguíneo o linfático, depositándose en otros lugares e iniciando un nuevo tumor.

3.1.2 Historia

La historia del papel de la angiogénesis se remonta a los años sesenta cuando un oficial médico de la armada de Estados Unidos, el doctor Judah Folkman, descubre que células cancerosas inyectadas a una tiroides de conejo aislada en

⁶ SERVAN-SCHREIBER, David. El anticancer, “El cancer: una herida que no se cura”. Espasa. 2008.

una cámara de cristal no superaban el tamaño de la cabeza de un alfiler, pero cuando las inyectaba en ratones, estas células crecían rápidamente y se convertían en tumores mortales. De esta experiencia, el doctor Folkman comprende que ninguna célula viva es capaz de sobrevivir sin el sostén y alimento de diminutos vasos sanguíneos. Después de años continuos de investigación en ratones vivos elabora los conceptos básicos de la angiogénesis en el cáncer⁷:

- Los micro tumores no pueden convertirse en tumores sin una red de vasos sanguíneos que lo alimenten
- Para crear esta nueva red, los tumores producen una sustancia química denominada angiogénina que obliga a los vasos acercarse a los microtumores y formar nuevas ramificaciones.
- Las nuevas células cancerosas se dispersan por el cuerpo y generan nuevas ramificaciones.

Al igual que una colonia, los tumores primarios no dejan que los tumores alejados formados por metástasis se hagan tan grandes produciendo otra sustancia que paraliza el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en estos denominada angiostatina. Esto explica por qué aparecen nuevos tumores de repente, después de que se haya extirpado el tumor primario.

A pesar de críticas y hostilidad por parte de sus colegas debido a la simplicidad de su nueva teoría, en 1994, después de 20 años de trabajo, sus resultados aparecieron publicados en "Cell" y desde este día la angiogénesis se convierte en uno de los principales temas de investigación en oncología.

⁷ SERVAN-SCHREIBER, David. El anticancer, "El cancer: una herida que no se cura". España. 2008.

3.1.3 Angiogénesis por movilización de células precursoras endoteliales de la medula ósea

La angiogénesis se presenta de diferentes maneras, y una de ellas es por medio de células precursoras endoteliales (CPE) provenientes de la médula. Las células hematopoyéticas son células que al desplazarse al lugar de la lesión pueden convertirse en otra célula diferente para completar la formación del vaso sanguíneo. Estas CPE se movilizan a partir de la medula ósea y pueden migrar al lugar de la lesión o al lugar de crecimiento tumoral. En estos lugares, las CPE se diferencian y fortalecen una trama madura al unirse con vasos preexistentes.

3.1.4 Angiogénesis a partir de vasos preexistentes

En este proceso, las CPE no intervienen, sino que las células endoteliales procedentes de vasos ya preexistentes se hacen móviles y proliferan para formar pequeños brotes capilares. En ambos casos, la maduración de los vasos implica el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas para formar una capa periendothelial.

3.1.5 Angiogénesis en carcinomas y procesos Neoplásicos

Como se vio en la historia del descubrimiento de la angiogénesis⁸, este fenómeno puede considerarse como un factor predictivo en el desarrollo de la enfermedad debido a la relación que existe entre la densidad vascular en el carcinoma, estadio del tumor, tipo histológico y grado de malignidad. Por lo tanto un estudio de este

⁸ SÁNCHEZ SOCARRÁS, Violeida. PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL CRECIMIENTO TUMORAL. Revista Cubana de Investigación Biomédica 2001. Numero 20. Facultad de Ciencias Médicas "Julio Trigo López". 2001.

fenómeno en el desarrollo del cáncer toma un factor esencial en el riesgo de muerte del paciente. El proceso neoplásico presenta 2 fases:

1. Fase Pre vascular

Es el tumor sin la alimentación de vasos sanguíneos. Por lo tanto son muy pequeños (no más grandes que la cabeza de un alfiler) e imposible clínicamente detectables. Las células lesionadas pueden crecer de manera rápida, pero predomina la micro metástasis, ya que la vida celular se mantiene estable.

2. Fase Angiogénica

En esta fase el tumor ya tiene vasos sanguíneos que lo alimenten y a partir de este momento el tumor es detectable debido a su tamaño y los síntomas que presenta el portador. El mayor riesgo en esta fase es que los nuevos vasos sanguíneos proveen al tumor una vía de escape de células lesionadas por medio del torrente sanguíneo o linfático.

3.1.6 Factores de crecimiento

La angiogénesis se regula por medio de unas sustancias denominadas “factores de crecimiento”, estas pueden ser consideradas como “señales” químicas que se envían a través del cuerpo para regular todos los procesos ocurridos en el, como el ciclo y el crecimiento celular. En este caso, los carcinomas también utilizan estas “señales” para su crecimiento y posible esparcimiento por el organismo. Los principales factores que entran en juego en este proceso son:

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG): Este factor estimula la división y migración celular de las células endoteliales, induciendo la migración de células precursoras endoteliales desde la médula ósea hacia el lugar de formación del nuevo vaso, donde allí se diferencian entre células musculares lisas o células endoteliales.

Angiopoyetina: intervienen de 2 tipos, angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2. La angiopoyetina promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos en su etapa de maduración, ofreciendo estabilidad a la nueva estructura vascular. En la angiogénesis estimulada por carcinomas, el carcinoma bloquea el factor angiopoyetina 2, ya que esta se encarga de detener el proceso de formación de nuevos vasos, en pocas palabras, bloquea la señal del cuerpo para detener la angiogénesis, de esta forma, se siguen formando nuevos vasos sanguíneos y el tumor asegura su alimentación y subsistencia.

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF): Estimulan la proliferación de células endoteliales aumentando el índice de actividad mitótica, es decir aumenta el crecimiento de células para la formación de los nuevos vasos sanguíneos⁹.

3.1.7 Inmunohistoquímica y el antígeno CD34

Para este proyecto una de las herramientas principales para cumplir el objetivo del conteo de estos vasos sanguíneos es el uso de reactivos inmunohistoquímicos, y para este proyecto, específicamente, el antígeno CD34.

El uso de anticuerpos específicos en hispatología consta de complejas técnicas en las cuales, un anticuerpo específico puede transformar o acentuar visiblemente elementos encontrados en muestras tisulares o citológicas (tejidos de organismos, biología celular).

El antígeno marcador endotelial CD-34 es una glicoproteína transmembrana de cadena única, que se expresa en células madres hematopoyéticas, y fundamentalmente en el endotelio vascular. Este marcador lo hace perfecto para el propósito de marcar neo vasos, el fin de este proyecto, debido a la presencia de las células precursoras endoteliales en el proceso de la angiogénesis.

⁹SÁNCHEZ SOCARRÁS, Violeida. PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL CRECIMIENTO TUMORAL. Revista Cubana de Investigación Biomédica 2001. Numero 20. Facultad de Ciencias Médicas "Julio Trigo López". 2001.

En este proyecto el proceso de análisis y tinción de las muestras, se hizo por parte de la epidemióloga. En las fotografías analizadas para el desarrollo del algoritmo, se puede ver claramente la evidencia de vasos sanguíneos en color (marrón oscuro) respecto a los demás elementos tisulares (matriz extracelular, células, células cancerosas).

3.2 LA MAMA

En la anatomía humana, las mamas se ubican en el tórax de todos los individuos y se desarrollan en la región lateral del tronco femenino humano. Su estructura es casi totalmente simétrica, está compuesta de vasos arteriales, venosos y linfáticos, así como elementos nerviosos.

Contiene un sistema ductal principal el cual finaliza en conductos terminales con una formación mínima de lobulillos. Cada mama está compuesta por 6 a 9 lóbulos, los cuales están compuestos de lobulillos que terminan en docenas de diminutos bulbos o acini los cuales pueden producir leche. Estos ductos desembocan en el pezón, en el centro de la areola. La grasa rellena los espacios existentes alrededor de los lóbulos y los ductos. El tejido muscular se encarga de separar la mama de las costillas. En la figura 1 se observa la ubicación de cada uno de los componentes de la mama.

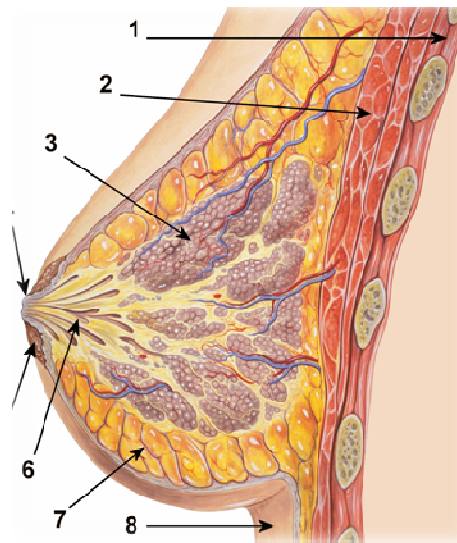


Figura 1: Composición de la mama¹⁰. 1. Caja torácica, 2. Músculos pectorales, 3. Lóbulos, 4. Superficie del pezón, 5. Aureola. 6. Conductos, 7. Tejido adiposo, 8. Piel

Existen dos tipos de células que componen los conductos y lobulillos de la mama: las células mioepiteliales, las cuales ayudan a la eyección de leche durante la lactancia y cumplen un papel importante en el mantenimiento de la función y estructura normal del lobulillo y de la membrana basal; y las células luminales las cuales se encargan de la producción de leche.

Compuesta por tres tipos diferentes de tejido: epitelio, estroma fibroso y tejido adiposo. De los cuales la cantidad de cada uno varía según la edad, por ejemplo en mujeres jóvenes son predominantes el epitelio y estroma, los cuales son reemplazados por grasa en mujeres de mayor edad.

¹⁰ <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases.asp?did=674&title=breast-cancer-pre-invasive-ductal-carcinoma;-ductal-carcinoma-in-situ;-dcis>.

3.2.1 Lesiones epiteliales benignas en la mama

Estas lesiones se dividen en tres: cambios mamarios no proliferativos, cambios proliferativos e hiperplasia atípica.¹¹ Cada uno de ellos con aumento de riesgo de mama respectivamente.

1. Cambios mamarios no proliferativos (cambios fibroquísticos): está compuesto por 3 tipos de cambios: **los quistes** que se forman por dilatación y desdoblamiento de los lobulillos; **la fibrosis** que consiste en la cicatrización y la inflamación que se produce cuando un quiste se rompe y libera material de secreción hacia el estroma adyacente; y **la adenosis** que consiste en el aumento de número de acini por lóbulo.
2. Cambios proliferativos sin alteraciones en las células (sin atipia): este grupo de trastornos se caracterizan por una proliferación del epitelio ductal y/o del estroma sin anomalías celulares las cuales indican malignidad. Dentro de estos cambios se encuentran: **la hiperplasia** epitelial moderada o florida que consiste en el aumento de capas celulares sobre la membrana basal; **la Adenosis esclerosante** la cual es el aumento en el número de acini ubicados en el conducto terminal en comparado con el número de acini ubicado en los lobulillos que no están afectados; **la lesión esclerosante compleja** esta lesión contiene cicatrices radiales, adenosis esclerosantes, papilomas e hiperplasia; y **los papilomas** los cuales están formados por múltiples células mioepiteliales y lumbinales.
3. Cambios proliferativos con alteraciones en la células (con atipia): La hiperplasia atípica es una proliferación celular, dentro de estos cambios se encuentra la hiperplasia ductal atípica (HDA) y la hiperplasia lobulillar atípica (HLA) las cuales consisten en el aumento de células ductales y lobulares respectivamente.

¹¹ KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; FAUSTO, Nelson. Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional, Enfermedades de sistemas orgánicos. España. Elsevier. 2005.

3.2.2 Cáncer de mama

El **cáncer de mama** se produce por la formación de quistes o fibromas malignos en el tejido mamario, y es la neoplasia maligna (carcinoma) no cutánea más común en mujeres. A principios de la década de 1980, se introdujo el cribado con mamografía el cual aumenta la detección de carcinomas invasores pequeños y carcinomas in situ, debido a que el cribado detectaba cánceres clínicamente no significativos el número de mujeres fallecidas por cáncer de mama se mantuvo constante durante esta década. Actualmente se espera que mueran por la enfermedad solo el 20% de las mujeres con cáncer de mama.

Clasificación de los carcinomas

Casi todos los tumores malignos de la mama son adenocarcinomas. Los carcinomas se dividen en carcinoma in situ y carcinoma invasor (infiltrante).

Carcinoma in situ: este carcinoma hace referencia a una población de células malignas ubicadas en los conductos y/o lobulillos limitada por la membrana basal. Se clasifica según su ubicación, si el carcinoma se encuentra en el ducto se habla de carcinoma ductal in situ (CDIS) y si se encuentra en el lobulillo se llama carcinoma lobulillar in situ (CLIS).

1. Carcinoma ductal in situ (CDIS): Entre los cánceres detectados por mamografía, casi la mitad son CDIS. Históricamente el CDIS se ha dividido en cinco subtipos arquitecturales: comedocarcinoma, solido, cribiforme, papilar y micropapilar. La mayoría de CDIS no pueden detectarse por palpación o inspección visual del tejido afectado.

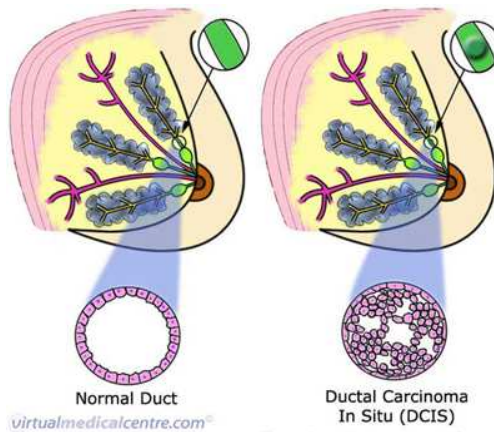


Figura 2. Carcinoma ductal in situ¹².

2. Carcinoma lobulillar in situ (CLIS): Este tipo de carcinoma es poco frecuente (1-6% de todos los carcinomas) ya que no se asocia a calcificaciones ni a una reacción del estroma. El CLIS es más común en mujeres jóvenes (del 80 al 90% de los casos se producen antes de la menopausia) y es frecuénteme multicéntrico y bilateral.

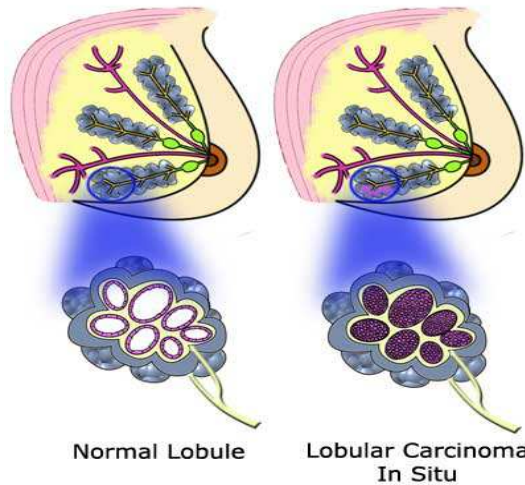


Figura 3. Carcinoma lobulillar in situ¹³

3. Carcinoma invasor (infiltrante): En este carcinoma las células neoplásicas ya han invadido mas allá de la membrana basal hasta el

¹² <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases.asp?did=674&title=breast-cancer-pre-invasive-ductal-carcinoma;-ductal-carcinoma-in-situ;-dcis>.

¹³ <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases.asp?did=674&title=breast-cancer-pre-invasive-ductal-carcinoma;-ductal-carcinoma-in-situ;-dcis>.

estroma, y de esta manera podrán invadir los vasos sanguíneos llegando, de esta manera, a los ganglios linfáticos regionales y a distancia. Existen diferentes tipos de carcinomas invasores tales como el *carcinoma invasor, tipo no especial (TNE; carcinoma ductal infiltrado)* es el más frecuente y la mayoría de carcinomas invasores son de este tipo, se presenta en los carcinomas ductales, de los cuales dependiendo de su grado pueden ser pobremente diferenciado (en el caso de los CDIS tipo comedo) y los de bajo grado suelen asociarse a carcinomas bien diferenciados; *Carcinoma lobulillar invasor*, estos tipos de carcinomas pueden ser bien y moderadamente diferenciados, y se asocian a un CLIS en la mayoría de casos; *carcinoma medular; carcinoma mucinoso (coloide)* se presenta con poca frecuencia y tiende a producirse en mujeres mayores y puede crecer lentamente durante varios años. Su pronóstico es ligeramente mejor comparado con los carcinomas de tipo no especial; *carcinoma tubular* están compuestos de túbulos bien formados y a veces se confunden con lesiones esclerosantes benignas; *carcinoma papilar invasor* este tipo de carcinomas son raros y representan el 1% o menos de todos los cánceres invasores, se observan más comúnmente en el CDIS; y *el carcinoma metaplásico* el cual incluyen una amplia variedad de tipos raros de cáncer de mama, se encuentran en menos del 1 % de todos los casos.

3.2.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo se combinan en un modelo estadístico para calcular el riesgo absoluto de una mujer individual de desarrollar cáncer en los siguientes 5 años o hacia los 90 años de edad. Actualmente existe una versión interactiva para realizar esta estadística dentro de la página web del National Cancer Institute el

cual esta diseñado para mujeres mayores de 35 años sin diagnostico previo de CLIS o CDIS y sin antecedentes familiares de mutación genética única.

Dentro de los factores de riesgo se encuentran:

1. Edad: La edad media diagnóstico es de 64 años, un 77% de los casos de cáncer se producen en mujeres mayores de 50 años de edad.
2. Menarquía: El riesgo de contraer cáncer de mama aumenta en un 20% en mujeres que la tienen antes de sus 11 años comparado con las mujeres que la tienen después de sus 14 años.
3. Primer nacimiento vivo: El riesgo en mujeres que obtienen el primer embarazo antes de los 20 años disminuye a la mitad en comparación con las mujeres que tienen su primer hijo después de los 35 años.
4. Familiares de primer grado con cáncer de mama: El riesgo de cáncer de mama aumenta con el número de familiares de primer grado afectadas (madre, hermana o hija).

Entre otros que no se han reconocido como factores principales debido a su rareza, dificultades para cuantificarlos o por la falta de estudios definitivos, tales como la exposición a estrógenos, la exposición a radiaciones, la obesidad, y demás.

3.2.4 El cáncer de mama y la angiogénesis

El estado de los ganglios linfáticos axilares ha sido el factor pronóstico más importante en el carcinoma de mama operable, pero esto no es suficiente para la variedad de los resultados de las enfermedades. Indicadores de pronósticos más precisos pueden ayudar en la selección de los pacientes con alto riesgo de reaparición de la enfermedad y de muerte los cuales son candidatos para aplicarles terapia adyuvante sistémica (quimio y radio terapia).

Algunos estudios han encontrado que la densidad de microvasos tumorales en cáncer de mama es un factor pronóstico independiente de la libre supervivencia a la enfermedad.

1. Angiogénesis en CDIS

Al realizar las muestras médicas de las biopsias de cáncer de mama, debido al corte y a la ubicación del capilar, se demuestra la existencia de dos patrones para el reconocimiento de los vasos capilares sanguíneos de las mismas. El primero se compone un mango o collar de microvasos adyacente a la membrana basal del ducto del CDIS, y el segundo se reconoce por un difuso aumento en los microvasos del estroma circundante envolvente de los espacios ductales como se muestra en la figura 2.

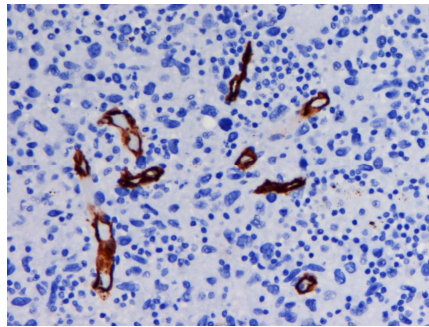


Figura 4: Biopsia medica con antígeno CD34 resaltando en rojo los microvasos¹⁴.

Cada mama contiene vasos sanguíneos y linfáticos. Los vasos linfáticos son los encargados de transportar linfa, la cual sale de los capilares sanguíneos, hasta desembocar en los ganglios linfáticos localizados en diferentes partes del cuerpo interconectados entre ellas tales como axilas, ingle, cuello, mediastino y abdomen. Debido a su ubicación el lugar mas

¹⁴ http://www.rcpaqapa.netcore.com.au/notices/IH06-3/IHD06-05_images.html

cercano sería en las axilas. Y de esta manera se produce la conexión entre el carcinoma y otras partes del cuerpo generando el proceso de metástasis.

3.3 Procesamiento de Imágenes Digitales

El constante crecimiento de recursos de cómputo permite crear soluciones efectivas en el procesamiento de imágenes digitales en varios campos de valor científico e investigativo, gracias a las múltiples posibilidades de manipulación que ofrece la imagen digital. El procesamiento de imágenes digitales contempla varias etapas para obtener los resultados deseados; adquisición, pre procesamiento, segmentación, descripción e interpretación.

3.3.1 Imagen Digital

El concepto de imagen se puede definir como una representación descriptiva de un objeto¹⁵, dependiendo del sistema de formación¹⁶ que se utilice para la imagen (luz blanca, rayos x, ondas acústicas, etc.) la imagen puede o no pertenecer al rango visible humano.

Una imagen digital es una matriz discreta, donde un punto de fila y columna identifica una propiedad de la imagen en ese mismo punto, si se utiliza un modelo a escala de grises esta propiedad será la intensidad del gris, si es un modelo de color RGB serán las diferentes intensidades combinadas de rojo, verde y azul. Cada punto de esta matriz o de la representación digital de una imagen se denomina pixel.

A partir de estos modelos las imágenes digitales se clasifican en³:

- **Monocromáticas:** ausentes de color, pueden ser en escala de grises o blanco y negro.

¹⁵ MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células Endocervicales. Tesis: maestría en informática y ciencias de la computación. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 2007

¹⁶ DE LA ROSA FLORES, Rafael. Procesamiento de imágenes digitales. Facultad de ciencias de la computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2007

- Falso color: cada pixel toma un color de acuerdo sus valores de una paleta de colores creada para un fin especial.
- Color Verdadero: los pixeles toman valores de intensidad de rojo, verde y azul.

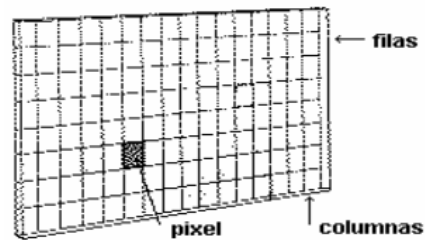


Figura 5: Representación de una imagen digital como una matriz¹⁷

3.3.2 Modelos de Color

Los modelos de color de una imagen digital ayudan a identificar los valores de color de un pixel de acuerdo a un sistema de coordenadas tridimensional y un subespacio de este para que cada color quede representado por un único punto de este sistema⁴.

Los modelos de color más usados en el área de procesamiento de imágenes digitales son el modelo RGB (Red, Green, Blue) y el modelo HSL (Hue, Saturation, Luminance) por su facilidad de manipulación. Existen otros modelos que son más orientados al hardware, como lo son CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Key) utilizado en impresoras a color o el YIQ (Y Luminance, In-phase, Quadrature) para televisión a color.

En el modelo RGB un color deseado es la composición de color de acuerdo con la intensidad de los colores primarios. En la Figura 2 se observa el espacio de puntos para un color determinado. En este modelo, se puede obtener un color de acuerdo con las componentes de un vector que se

¹⁷DE LA ROSA FLORES, Rafael. Procesamiento de imágenes digitales. Facultad de ciencias de la computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2007.

extiende desde el origen a cualquier punto del cubo¹⁸. En esta notación la intensidad de cada color se codifica con un byte, esta escala va de 0 a 255, partiendo que 0 es la ausencia de intensidad y 255 la máxima intensidad. Así pues el Rojo sería (255,0,0) el verde (0,255,0) y el azul (0,0,255). Diferentes valores en cada componente dan diferentes colores.

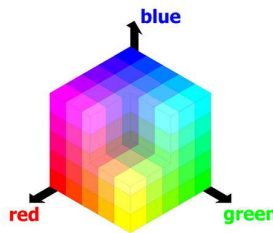


Figura 6: Espacio de colores - Cubo RGB. El vértice escondido detrás representa el negro, el centro gris y el vértice invisible delante el blanco. Se muestran las componentes del cubo de acuerdo al color Red (rojo), Blue (azul), Green (verde).¹⁹

El modelo HSL utiliza la tonalidad, la saturación y la intensidad de un color. Este modelo se representa gráficamente con un cono doble (Figura 3). La componente de la tonalidad se representa con un ángulo, la componente de la saturación representa la cantidad de color que ha sido diluido en el blanco, y la componente de intensidad representa la luminancia. Este modelo ha sido implementado a partir de la forma en la cual el ojo humano reconoce los colores.

¹⁸MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células Endocervicales. Tesis: maestría en informática y ciencias de la computación. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 2007

¹⁹ Adaptación de Wikipedia Extraída de flickr Autor: Ethan Hein <http://www.flickr.com/photos/ethanhein/>

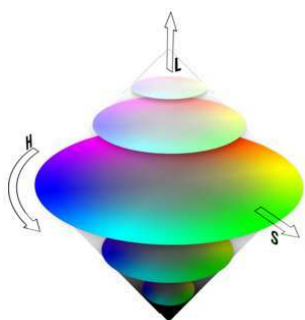


Figura 7: Espacio de colores – Cono doble HSL. La componente H representa la tonalidad, S la saturación y L la luminancia.²⁰

3.3.3 Etapas

El procesamiento de imágenes digitales se encarga de buscar un resultado deseado por medio de operaciones de tipo numérico a cada uno o un grupo de los elementos que conforman la imagen. Desde hace más de 40 años el estudio de imágenes digitales ha sido tema de estudio por sus aplicaciones investigativas y científicas, es por eso que las acciones que se llevan a cabo en este proceso han sido agrupadas en las siguientes etapas²¹:

- **Adquisición:** Acciones requeridas para obtener la imagen digital por medio de dispositivos electrónicos.
- **Pre procesamiento:** Operaciones de tipo numérico sobre la imagen con el fin de mejorar la misma. Estas operaciones pueden operar sobre la información frecuencial (Filtrado en dominio de la frecuencia) o directamente sobre el dominio espacial de la imagen (Filtrado en dominio del espacio).
- **Segmentación:** Separación de los objetos presentes en la imagen para su análisis individual.
- **Descripción:** Los objetos presentes presentan características que pueden ayudar al análisis de la imagen.

²⁰ Imagen Extraída de <http://wintopo.com/help/html/threshold-hsv.htm>

²¹ MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células Endocervicales. Tesis: maestría en informática y ciencias de la computación. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 2007.

- **Interpretación:** Teniendo las características de los objetos claros, se utilizan algoritmos que clasifiquen los objetos presentes en la imagen.

3.3.4 Técnicas de Pre Procesamiento y Segmentación

Debido a la esencia de este proyecto, se hace un especial énfasis a las técnicas comunes de pre procesamiento y segmentación que serán base para el desarrollo del mismo.

3.3.4.1 Ecuilización del Histograma: el histograma es una descripción grafica que muestra la ocurrencia de cada pixel en la imagen. La ecuilización del histograma ayuda a la distribución de la frecuencia de los pixeles a lo largo del histograma.

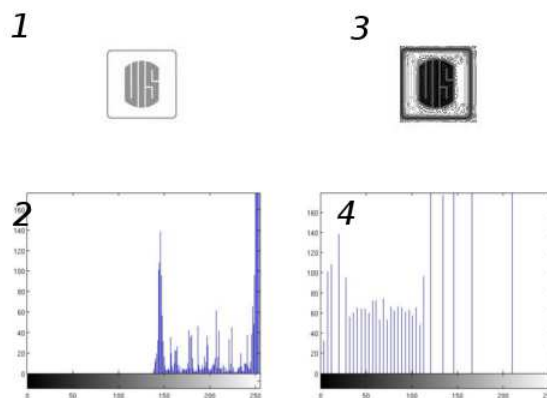


Figura 8: Ejemplo de ecuilización del histograma sobre entorno MATLAB 1. Imagen original en escala de grises, 2. Histograma de la Imagen original, 3. Resultado de la imagen después de ecuilizar su histograma, 4. Histograma Ecuilizado.

De acuerdo con la figura 4, se observa que el histograma ecuilizado presenta una distribución mas uniforme de pixeles dentro de los diferentes

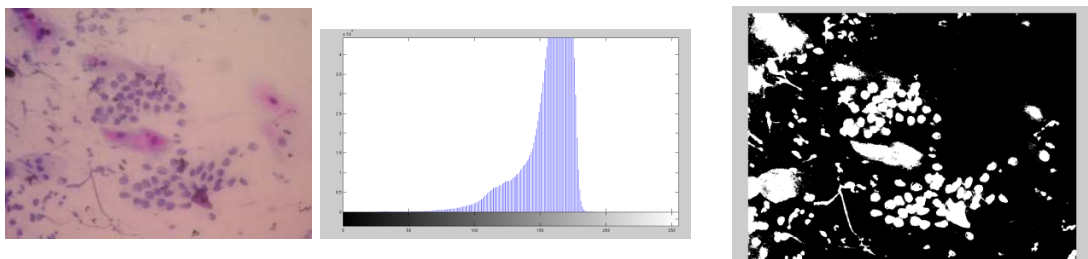
niveles de intensidad del gris de la imagen. La formula discreta de ecualizar el histograma se representa por:

$$m_k = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^k n_j \quad (1.1)$$

Donde k toma valores desde 0, 1,... intensidad total -1. El valor de n representa el tamaño total del histograma. De acuerdo con la ecuación anterior los nuevos niveles de intensidad se dan por la formula $S_k = M_k * q$ donde q es el numero de intensidades asociado.

El histograma puede ser un recurso muy práctico en la segmentación de la imagen ya que es posible identificar rasgos y operar sobre un grupo determinado de pixeles sin necesidad de complicados algoritmos que operen directamente sobre el espacio de la imagen.

3.3.4.2 Umbralización: Es la técnica más común para la segmentación de imágenes debido a su bajo consumo de recursos computacionales. Se basa en luminosidad semejante de los objetos presentes en la imagen, y al ser representados en el histograma mostraran modas dominantes separadas por un nivel denominado umbral²².



²² MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células Endocervicales. Tesis: maestría en informática y ciencias de la computación. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.

Figura 9: Ejemplo de umbralización de una imagen, de izquierda a derecha; 1. Imagen original, 2. Histograma de la imagen, 3. Imagen segmentada por medio de umbralización con un nivel U de 142.

Se puede encontrar el nivel Umbral de la siguiente manera⁹:

$$U = T[x, y, f(x, y), p(x, y)] \quad (1.2)$$

Donde $f(x, y)$ representa el nivel en el punto (x, y) y $p(x, y)$ una propiedad local en ese punto. Obteniendo U , se opera sobre la imagen bajo la condición de que cada elemento de la imagen umbralizada tiene el valor de 1 (blanco) si es mayor que el nivel del umbral, y 0 (negro) si es menor que este.

3.3.4.3 Crecimiento de Regiones: Esta técnica opera bajo el concepto de agrupar conjuntos de pixeles similares respecto a alguna propiedad⁹. El algoritmo parte esparciendo puntos semilla entre los pixeles de la imagen para comenzar los puntos de crecimiento de las regiones, así pues el numero de semillas insertadas en la imagen será igual o mayor que las regiones finales.

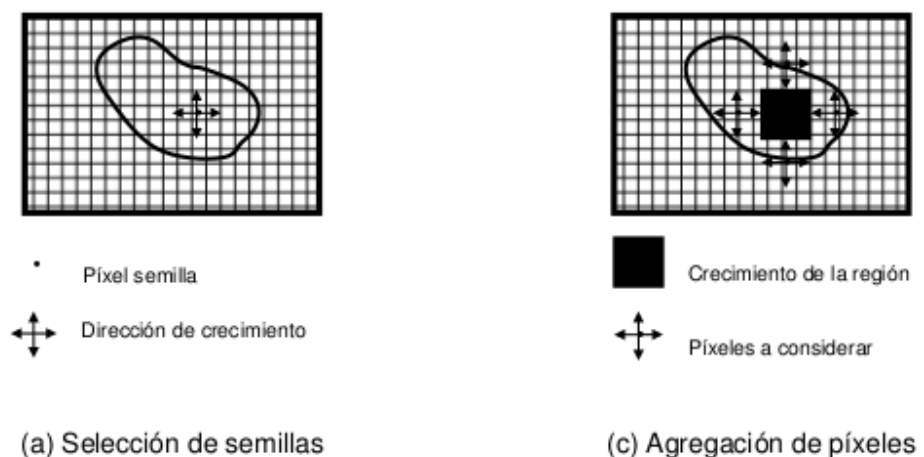


Figura 10: Ejemplo Crecimiento de regiones²³

²³ MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células

El criterio para agrupar píxeles dentro de una región puede variar de una aplicación a otra, sin embargo, para cada aplicación hay que tener en cuenta ciertos aspectos:

- Pueden surgir problemas si una semilla pertenece a un borde
- La elección de diferentes puntos semilla puede dar lugar a diferentes segmentaciones.
- En el crecimiento de regiones las ambigüedades respecto a bordes de regiones adyacentes pueden no resolverse correctamente.

Para tratar este tipo de problemas, hay que orientar al algoritmo para que las regiones crezcan de manera simultánea, tratando de que una sola región no domine el proceso.

4. METODOLOGÍA DEL TRABAJO

La estrategia utilizada para el desarrollo del proyecto es el prototipado evolutivo. El proceso de evaluación del prototipo se lleva a cabo en la actividad de seguimiento y control (Figura 8). El número de iteraciones depende de la evolución del proyecto.

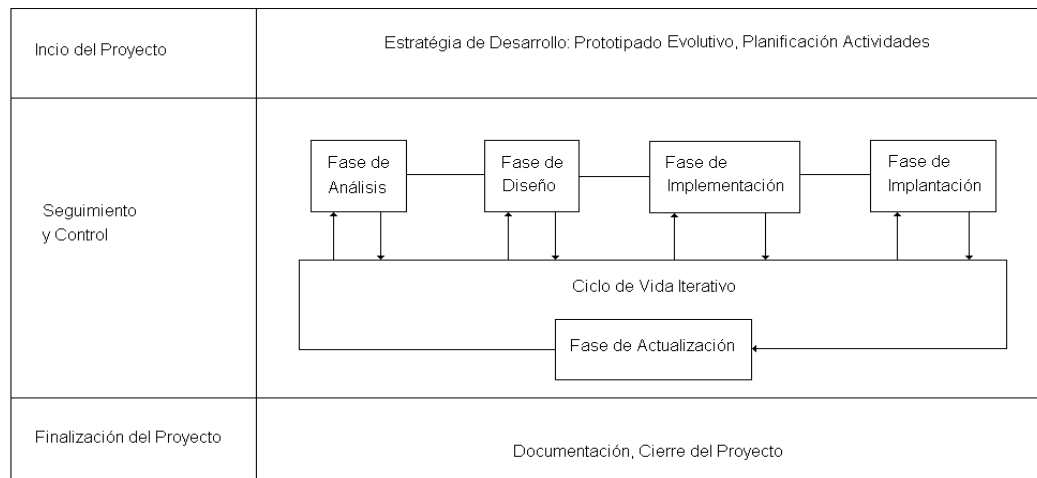


Figura 11: Diagrama de actividades de prototipado.

Un prototipo es un modelo (representación, demostración o simulación) fácilmente ampliable y modificable de un sistema planificado.

La técnica de prototipado consiste en modelar el producto final y se trata, simplemente, de probar el uso del modelo para evaluar mejor los requerimientos que se desea que se cumplan. Su desarrollo comienza elaborando un prototipo del producto final.

En el prototipado evolutivo se genera una primera versión con funcionalidad limitada y a medida que se comprueba si las funciones implementadas son las apropiadas, se corrigen, refinan o se añaden otras nuevas, iterando hasta llegar al sistema final.

La iteración ocurre cuando el prototipo se pone a punto para cumplir los objetivos, permitiendo al mismo tiempo que el desarrollador comprenda mejor lo que se necesita hacer.

4.1 Fases del prototipado:

4.1.1 Análisis.

En esta primera etapa se analizan los requerimientos básicos para el desarrollo del algoritmo y se estudia la factibilidad del proyecto.

Las siguientes actividades se realizaron con el fin de cumplir el primer objetivo específico el cual consiste en obtener imágenes microscópicas de una biopsia específica para su posterior análisis:

a. Investigación del marco teórico

Para la redacción del marco teórico era necesario realizar diferentes búsquedas en internet y en libros de medicina con el fin de obtener unanimidad y claridad en los conceptos aplicados.

b. Identificación de las herramientas software para implementar el algoritmo.

Después de estudiar las diferentes funciones que contiene la plataforma de desarrollo MATLAB para el proceso y análisis e imágenes, se escogió esta plataforma como herramienta de software para desarrollar el algoritmo a aplicar.

c. Identificación de la arquitectura hardware donde se va a implantar el proyecto.

Para la identificación de la arquitectura hardware se usó como patrón los requisitos necesarios para instalar y ejecutar la plataforma MATLAB.

d. Obtención de imágenes microscópicas de una biopsia específica.

Para la obtención de las imágenes, fue necesario solicitar la supervisión de la medico patóloga para decidir cuales muestras eran optimas para cumplir con el objetivo propuesto.

Usando los microscopios del departamento de patología de la facultad de medicina de la Universidad Industrial de Santander y en un principio usando la cámara Premier serie MA, con el software TSVIEW la cual fue reemplazada durante el proceso de estudio de las imágenes por la cámara de microscopio de referencia Moticam 2300 se obtuvieron las imágenes de una biopsia específica a analizar.

e. Análisis de las imágenes

En la etapa de análisis de imágenes, se identificaron los vasos capilares de cada muestra con un aumento de 10x, y para mejor detalle de la imagen se tomaron las imágenes con un aumento de 40x, con este aumento se podía identificar con detalle cada capilar y así realizar una clasificación de las imágenes obtenidas.

Con el fin de disminuir el margen de error se tomaron 50 muestras por cada aumento.

4.1.2 Diseño.

Durante esta fase se generan los modelos del contenido y del funcionamiento de tal manera que se llegue a un acuerdo para proceder a desarrollar el proyecto.

Las siguientes actividades son producto de analizar las técnicas de preprocesamiento que se adecúen a las imágenes de una biopsia de mama, segundo objetivo específico a realizar.

a. Estudio detallado de los requerimientos analizados.

A partir de los requerimientos obtenidos en las reuniones realizadas junto con la directora del departamento de patología y el análisis aplicado a cada una de las imágenes tomadas se generó una propuesta en la cual se determinó el alcance y se estiman el plazo y el costo del desarrollo del proyecto.

Se estableció la creación de una interfaz grafica para facilitar el uso de la herramienta que ejecutara el algoritmo, el cual se desarrolló por medio del recurso GUIDE contenido en las funciones de la plataforma MATLAB.

Esta interfaz consta de 2 zonas, la primera zona, es donde se muestran las imágenes que se trabajan en el algoritmo, y la segunda zona contiene los controles necesarios para obtener una respuesta por parte del algoritmo.

En la segunda zona se encuentra el botón “Buscar” (como se muestra en la figura 12) el cual ubica el archivo de la imagen a trabajar, permitiendo visualizar en la primera zona la imagen. Y por ultimo contiene un botón llamado “contar” el cual arroja la cantidad en el cuadro de texto llamado “salida” y la imagen tratada en la primera zona.

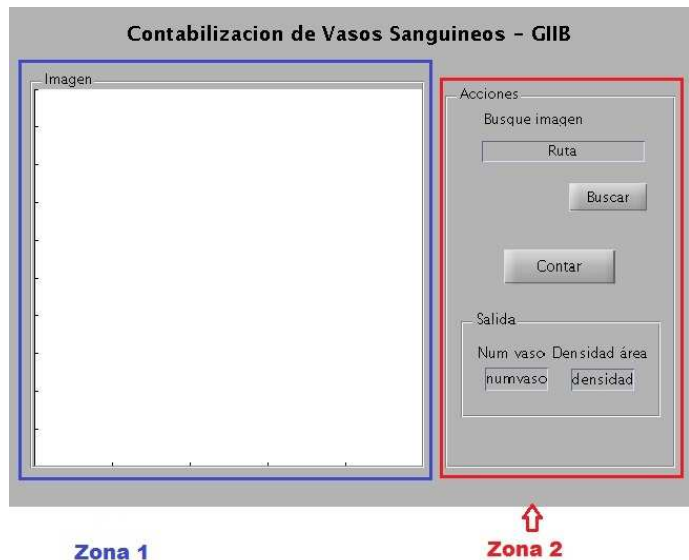


Figura 12. Interfaz gráfica requerimientos

b. Reconocimiento de criterios adecuados para pre procesamiento de las imágenes analizadas.

Al momento de analizar las imágenes tomadas y aplicándoles diferentes funciones propias de la plataforma MATLAB para la aplicación de las técnicas de procesamiento de imágenes digitales se concluye que el modelo de color **HSL** (*Hue, Saturation, Luminance*) es el más óptimo para el análisis y estudio de las mismas.

Según el rango de color de este modelo se observó que los valores de tonalidad manejan un rango aproximado por encima de los 330 y debajo de los 350 grados en las zonas oscuras y en las zonas claras un rango aproximado entre los 25 y 45 grados, estas zonas obedecen a un rojo claro, rojo que identifica a los elementos objetivo en la imagen, los vasos sanguíneos.

Si se hubiese tomado el modelo RGB predominaría siempre el R debido a que el antígeno cd34 resalta el color rojo de los capilares.

4.1.3 Implementación.

En esta etapa se desarrolla el prototipo y se realizan pruebas para asegurar el funcionamiento del mismo.

Con el fin de cumplir el tercer objetivo específico el cual consiste en segmentar las imágenes obtenidas por medio de técnicas de procesamiento digital con el propósito de detectar las zonas de interés (células y capilares) se realizaron las siguientes actividades:

a. Construcción del prototipo

Una vez establecidos los criterios para el procesamiento de las imágenes, se desarrolla el código a ejecutar realizando diferentes pruebas con una imagen de muestra observada en la figura 9 generando una descomposición por capas, y se observó como se muestra en la figura 11 que en la capa del tono (**H**) se destacan en primer plano los vasos capilares (objetivo) los cuales se distinguen como manchas de color oscuro en las zonas más claras del vaso, resaltándose en un tono marrón, esto es debido a que contienen valores relativamente bajos. En esta capa H no es conveniente confiar totalmente en la segmentación debido a que también se resaltaban zonas oscuras que no hacían parte del objetivo, pero de igual manera aportan información valiosa para un mejor filtrado

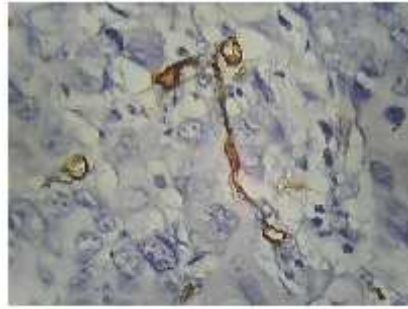


Figura 13 Imagen de muestra tomada por la cámara para realizar descomposición por la cámara Premier serie MA, con el software TSVIEW.

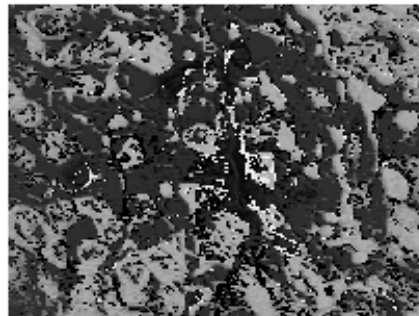


Figura 14 Capa H de la imagen de muestra

En el análisis de la capa de saturación (**S**) se observó el objetivo en un tono gris-blanco como se muestra en la figura 12, esto debido a que la saturación del tinte del cd34 comprende un rango de valores entre 20 y 60 grados aproximadamente, generando así los valores cercanos a 60 como las regiones más oscuras. A diferencia de la capa H, en esta capa las zonas indeseadas desaparecen del primer plano y se convierten en parte del fondo.

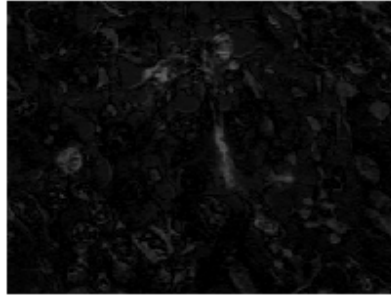


Figura 15 Capa S de la imagen de muestra.

En la capa de luminancia (L) se observó el objetivo en colores mas oscuros como se observa en la figura 13, y las zonas mas claras de la imagen original se pierden en el fondo resaltando las mas oscuras debido a que las zonas mas oscuras del vaso capilar presentan valores entre 30 y 40 grados en esta capa mientras que las claras presentan valores entre los 45 y 60 grados, estos son valores muy cercanos a los del fondo el cual comprende valores entre 60 y 75 grados aproximadamente.

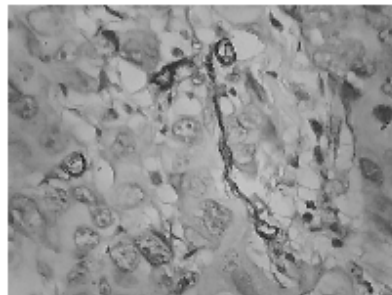


Figura 16 Capa L de la imagen de muestra tomada.

4.1.4 Implantación.

Ya construido el prototipo se pone en marcha y se implanta para que sea usado y probado y de esta manera cumplir con el cuarto objetivo específico planteado

4.1.4.1 Segmentación de las imágenes obtenidas para obtener las zonas de interés.

Después de obtener todos los resultados en las pruebas realizadas a cada una de las imágenes se concluyó que la umbralización, la cual es el éxito de una correcta segmentación, se aplica principalmente en la capa de saturación (**S**) (a pesar de algunos elementos emergentes), pero esto no significa que la información obtenida por las capas H y L se descarte por completo.

Para generar la estrategia de segmentación se basó en el modelo de color HSL estudiando el comportamiento de las áreas de interés (objetivos) obteniendo una nueva imagen binarizada en la cual se resalta solo el área de interés. Esta imagen binarizada se logra usando el conector “and” (&) entre las 3 capas umbralizadas, descrita en la ecuación 1.3:

$$I_n = \sim[l_u(h)] \& [l_u(s)] \& \sim[l_u(l)]. \quad (1.3)$$

Donde I_n es la imagen construida a partir de las 3 capas interactuando entre sí. l_u es la función que umbraliza la capa, así pues, la creación de I_n consta de la suma entre la umbralización de H negada, mas la umbralización de S mas la umbralización de L negada.

Teniendo en cuenta que esta operación es útil para el reconocimiento del objetivo pero no es suficientemente útil al momento de calcular el índice de densidad poblacional de la muestra por esta razón se eligen dos elementos estructurantes, uno tipo disco de radio 10 px y el otro tipo cuadrado de radio 2 px los cuales fueron creados con ayuda de la función STREL contenida dentro de las funciones de la plataforma MATLAB, a los cuales se le aplicaron las siguientes operaciones morfológicas:

- **Dilatación de la imagen binarizada:** esta operación se realizó con el elemento estructurante tipo disco generando unión entre huecos y puentes entre áreas cercanas.
- **Erosión de la imagen obtenida con la dilatación:** esta operación se realizó con el elemento estructurante tipo cuadrado eliminando las partículas del fondo.

Ya con este proceso realizado se crea completamente la segmentación de las imágenes y se procede a agregar este código generado en el archivo de formato Matlab para ser usado y probarlo en todas las imágenes obtenidas.

4.1.4.2 Seguimiento del prototipo.

Experimentando con varias imágenes, se puede apreciar una alta fidelidad entre la imagen segmentada y la imagen original, cabe resaltar que los vasos teñidos no son dibujados en su totalidad, ya que presentan ciertas discontinuidades en la iluminación la cual al momento de segmentar son tomados como parte del fondo.

Como sesgo adicional, se confirma que ciertos elementos presentes en la imagen que son marcados por el anticd34 pueden llegar a ser reconocido como un vaso, aunque en muy poca proporción. El ajuste

podrá hacerse si se implementa una estrategia de más en el continuo desarrollo del algoritmo.

4.1.4.3 Ajustes por errores.

Debido a el inconveniente mencionado anteriormente, fue necesario un mejoramiento de las imágenes usando la técnica de balance de blancos y realce de color obteniendo cambios mejorables para superar el inconveniente concluyendo la necesidad de utilizar una estrategia personal la cual consiste en realzar primero el color con el fin de mejorar la umbralización en la capa H, luego aplicar la técnica de balance de blancos y por ultimo aumentar el brillo mejorando la umbralización en la capa de saturación (S) y de brillo. El algoritmo presente en el código para corregir este error, es de propiedad intelectual de divakar roy, master en ingeniería computacional del Georgia Institute of Technology, quien dio su consentimiento para el uso del algoritmo en este proyecto.

Ya teniendo la estrategia a usar, se procede a realizar nuevamente las pruebas con las imágenes usadas como prueba teniendo como resultado los siguientes nuevos valores estáticos de umbralización: en la capa H se usa 0.1 y en la capa S se usa 0.2; observando un resultado mucho mejor.

4.1.4.4 Comparación de resultados obtenidos con los esperados.

Después de aplicar el algoritmo a las imágenes obtenidas de las muestras se observa que no es necesario generar una normalización sobre las imágenes tomadas en un plano cerrado ya que al momento de ser procesadas ellas ya muestran tener una distribución normal. Creando una facilidad para poder segmentarlas por lo tanto facilita en gran parte el trabajo esperado por parte de los desarrolladores.

4.1.4.5 Análisis y detección de los capilares sanguíneos.

ESTRATEGIA DE CONTEO DE VASOS SANGUINEOS

4.1.5 Actualización.

4.1.5.1 Evaluación del prototipo.

La evaluación se realiza en compañía del usuario el cual va usar los resultados entregados por el algoritmo para continuar con su investigación.

De esta manera se entrega al usuario el primer prototipo de

4.1.5.2 Ajustes al prototipo.

- Con el fin de obtener un mejor acercamiento entre la imagen observada a ojo humano y la imagen tomada con la cámara se implementó un código llamado autoenhancement obtenido en la URL <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24290-auto-enhancement-for-images> en cada una de las imágenes tomadas con la cámara Premier serie MA, con el software TSView tal como se muestra en la siguiente figura:

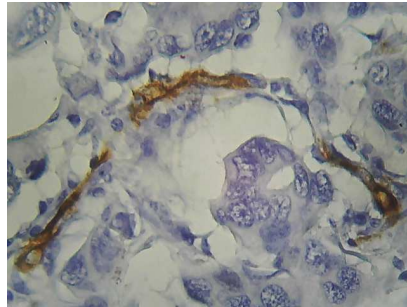


Figura 17 Imagen sin ejecución del código.

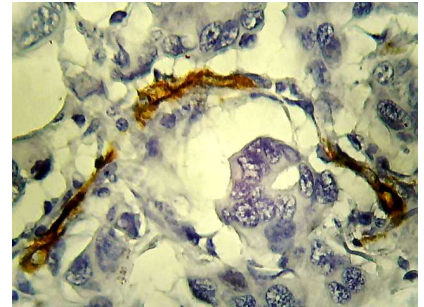


Figura 18. Imagen ejecutada con el código.

4.2 SEGUIMIENTO Y CONTROL

El seguimiento y control del proyecto tiene como objetivo la auditoría de todas las actividades de desarrollo del algoritmo. Las tareas propias del seguimiento y control del proyecto se realizan a medida que se ejecutan los procesos de Análisis, Diseño, Implementación, Implantación y Actualización.

Vale la pena decir que esta etapa de seguimiento y control del proyecto se realiza de manera interna a medida que se realizan las diferentes actividades mencionadas anteriormente



Figura 19. Secuencia de Actividades de Seguimiento y Control.

4.2.1 Especificación Detallada de Tareas: Documentación de los datos necesarios, esta documentación consta de las diferentes fuentes descritas en la bibliografía, todas relacionadas con procedimientos similares o relacionados con la angiogénesis y la computación.

4.2.2 Seguimiento de Tareas: Esta actividad se desarrollo con la ayuda del director, siempre atento como guía en las diferentes etapas de la construcción del algoritmo. Entre las tareas básicas podemos encontrar obtención y análisis de las imágenes requeridas, y por medio de este estudio e investigación, la creación y crecimiento de un algoritmo base.

4.2.3 Gestión de Incidencias:

- Durante la etapa de implantación, el equipo de patología de la escuela de medicina de la universidad adquirió la cámara de microscopio de referencia Moticam 2300, la cual permite tomar imágenes en mayor resolución adquiriendo mayor fidelidad en la obtención de los datos. Con la cual se procede a realizar las etapas de implementación obteniendo una correcta segmentación tanto en las imágenes a 10x como a 40x.
- Para mejorar el procesamiento de las imágenes tomadas a 10x se crea una nueva estrategia en la cual no es necesario tomar las 3 capas del modelo HSL, sino solo la capa (S) debido a que es la que determina la zona y la densidad de los vasos, haciendo prescindible el uso del elemento estructurante y las operaciones morfológicas. Cabe resaltar que para un mejor análisis y una ampliación en las herramientas a

desarrollar para las imágenes a 10X, se hace necesaria una resolución mayor a la trabajada (1024 x768) ya que los elementos teñidos por el anticd34 constan de unos pocos pixeles.

- Al realizar el primer paso de la fase de implantación el cual tiene como objetivo la segmentación de las imágenes obtenidas con el fin de obtener las zonas de interés, se observaron diferencias en el comportamiento de las distribuciones entre las imágenes a plano abierto (10x) y a plano cerrado (40x) y en los índices de umbralización entre las imágenes tomadas con la cámara Moticam 2300 y las tomadas anteriormente con la cámara Premier serie MA, con el software TSView; lo que implica una modificación en el algoritmo aplicado para las mismas.
- Para realizar la modificación del algoritmo fue necesario realizar pruebas con índices estáticos para determinar el mejor rango en los índices de umbralización, concluyendo la necesidad de ajustar los valores de umbral dependiendo del origen de la fotografía (plano abierto o plano cerrado).
- De esta manera se encuentran los siguientes valores para las capas:

H: 0.12

S: 0.4

L: 0.2
- Observando la distribución que forman las imágenes umbralizadas tanto a 40 x (figura 14), se encuentra una

coincidencia en su forma y valor de la media y la desviación estándar en las de alto aumento. Esta coincidencia sirvió en la creación de un filtro agregado en la segmentación de las imágenes a este aumento. El filtro consta básicamente de analizar la distribución normal que forma el histograma de la capa H en la imagen a analizar en los objetos reconocidos como vaso, si esta distribución no se ajusta en un 90% a un patrón histórico de imágenes que ya han sido aceptadas y que efectivamente reconocen los vasos, la imagen es descartada y se concluye que no hay vasos presentes.

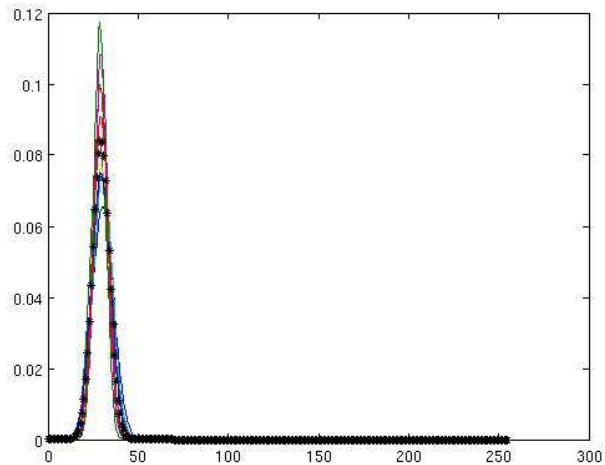


Figura 20 **Distribución formada por cada valor en a un aumento de 40x.**

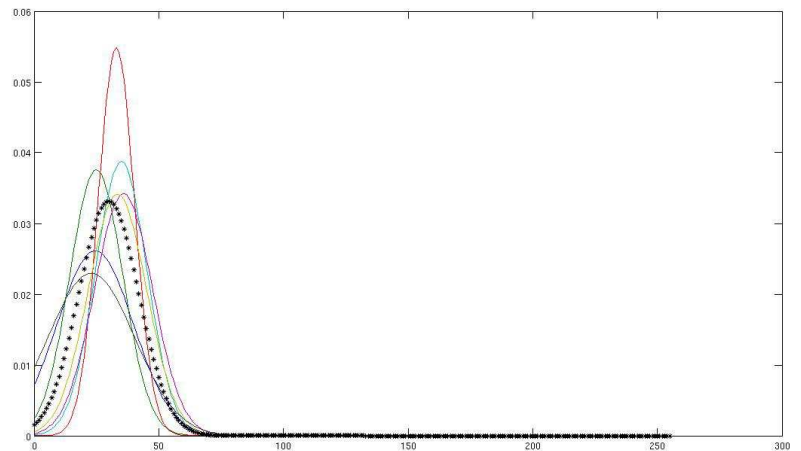


Figura 21. **Distribución de cada valor a un aumento de 10x.**

Sin embargo, se observa que estas similitudes entre los elementos segmentados no se encuentran en la segmentación a bajo aumento (Figura 15), esto es debido a que no todos los elementos reconocidos como vasos pertenecen a una distribución normal según el histograma de la capa de tonalidad H. Una vez más se justifica el sesgo como resultado de una resolución de las imágenes aún insuficiente para este tipo de aumento.

4.2.4 Gestión de Cambios de Requerimientos:

De acuerdo con las incidencias encontradas durante el desarrollo del proyecto se procede a realizar una modificación en la interfaz grafica creando por, necesidad, el botón MENU en el cual se indica si la imagen es de plano abierto (bajo aumento) o plano cerrado (alto aumento).

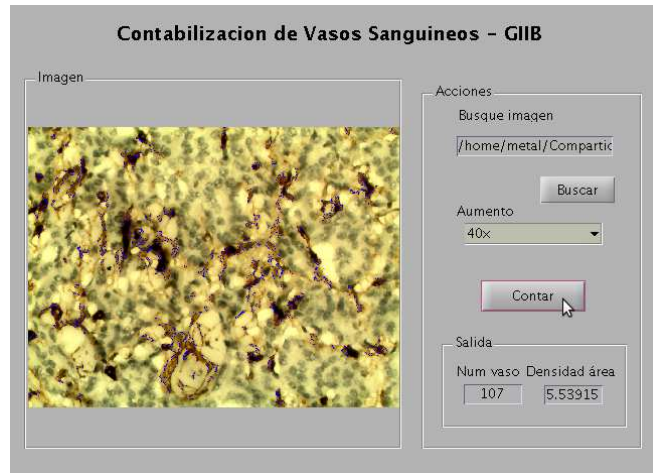


Figura 22. Interfaz grafica para imágenes en aumento a 40x.



Figura 23. Interfaz grafica para imágenes en aumento a 10x.

4.2.5 Finalización de la Tarea:

Con el cambio a los nuevos valores de las capas H S y L se corrigen los errores mostrados en la primera iteración del primer algoritmo generado.

4.2.6 Actualización y seguimiento

No se hace necesario un cambio de requerimientos ya que estos no interfieren con los objetivos descritos en un principio.

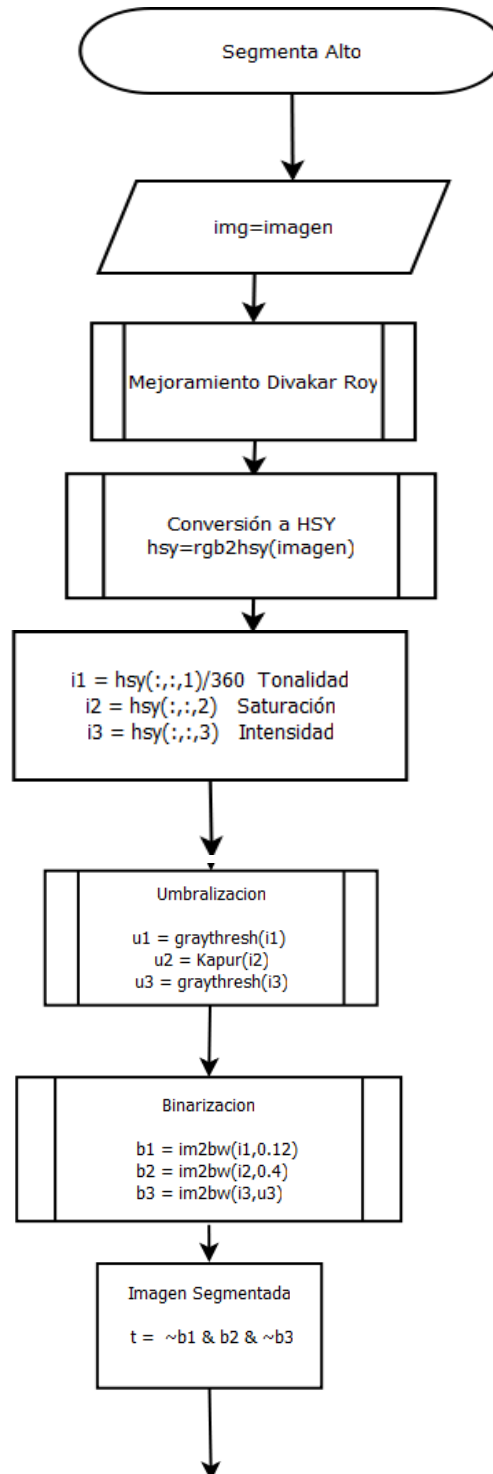
4.2.7 Aceptación:

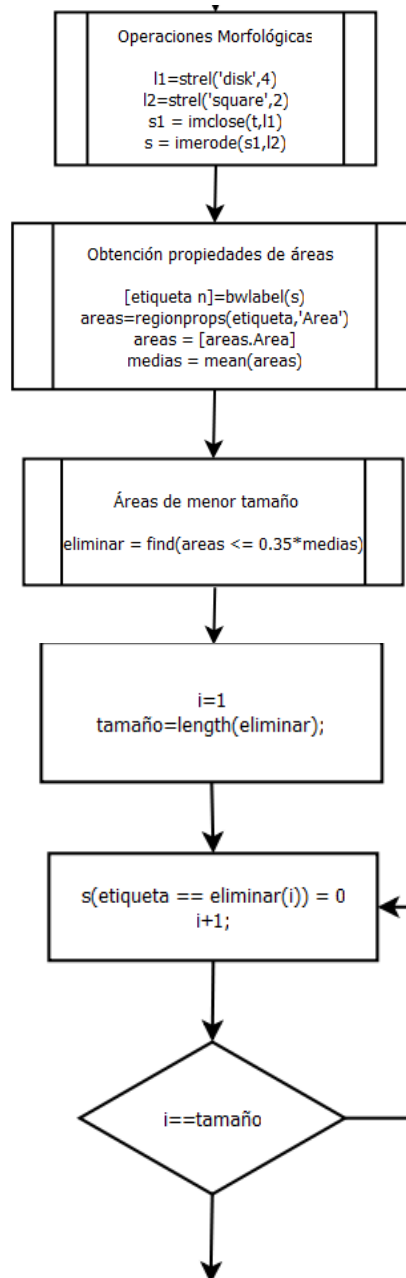
Al momento de realizar las pruebas con las modificaciones aplicadas se verificó el cumplimiento de todos los requerimientos de acuerdo al nuevo origen de las imágenes.

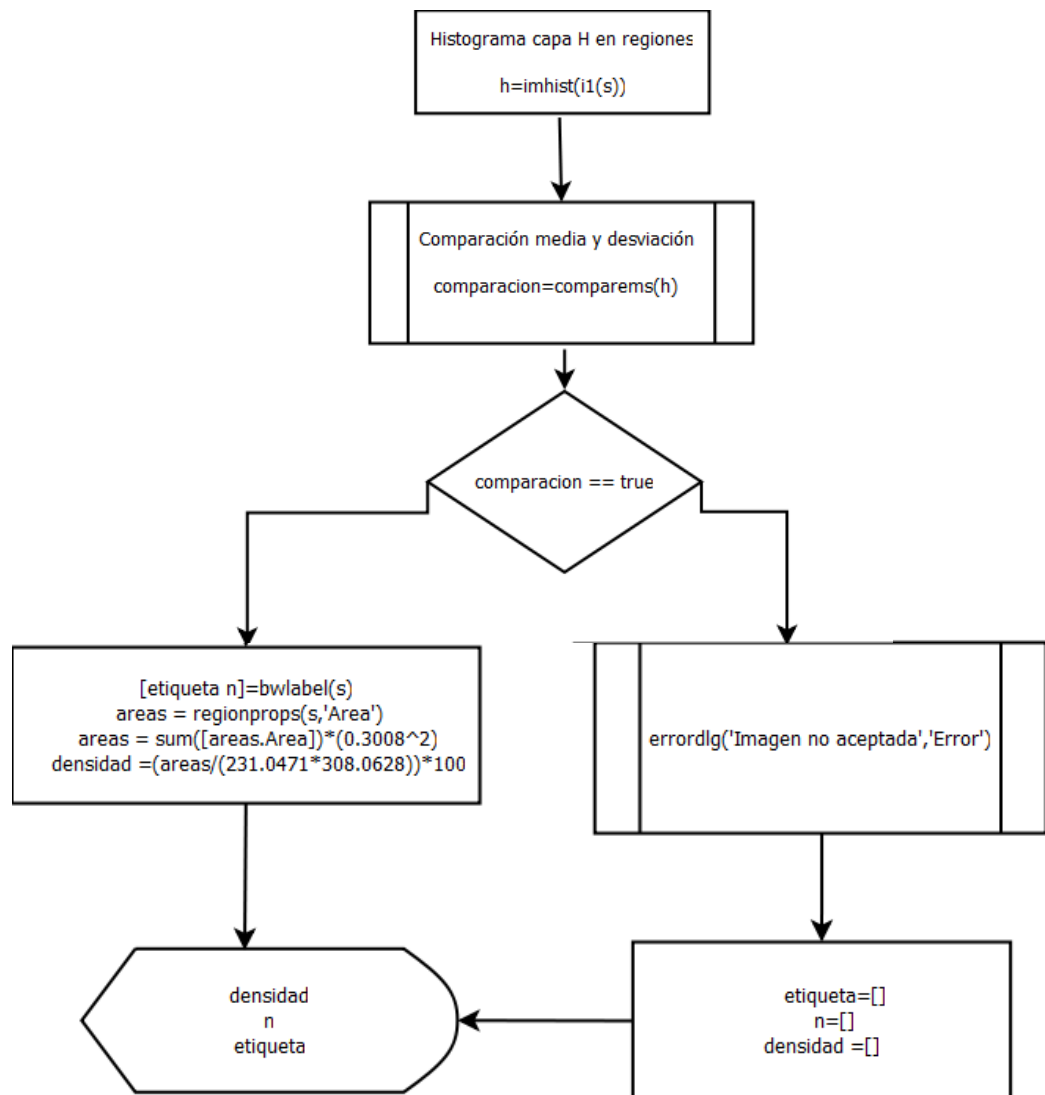
4.3 FINALIZACIÓN DEL PROYECTO

Finalmente se cumplen con los objetivos descritos para este proyecto, el algoritmo creado es un algoritmo que trabaja segmentación de los objetos teñidos por el antígeno CD34 por medio de los diferentes datos proporcionados por las diferentes capas H S L. La interfaz al usuario es una interfaz sencilla de usa y adecuada ya que permite visualizar las transformaciones de la imagen en una área diseñada para eso, los controles también están situados en un área específica, los cuales permitan buscar la imagen guardada en el equipo, seleccionar que aumento presenta la imagen, y por ultimo realizar el conteo, mostrando los resultados de cuantos vasos fueron encontrados y que densidad tienen de acuerdo al área de la fotografía.

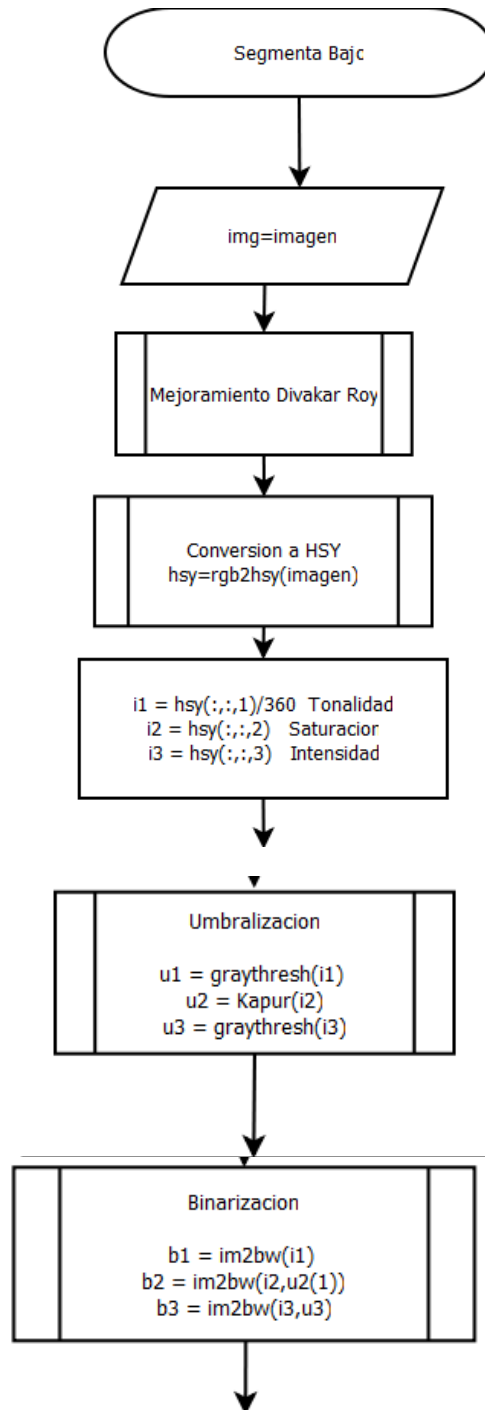
DIAGRAMAS DE FLUJO – Segmentación a alto aumento 40X

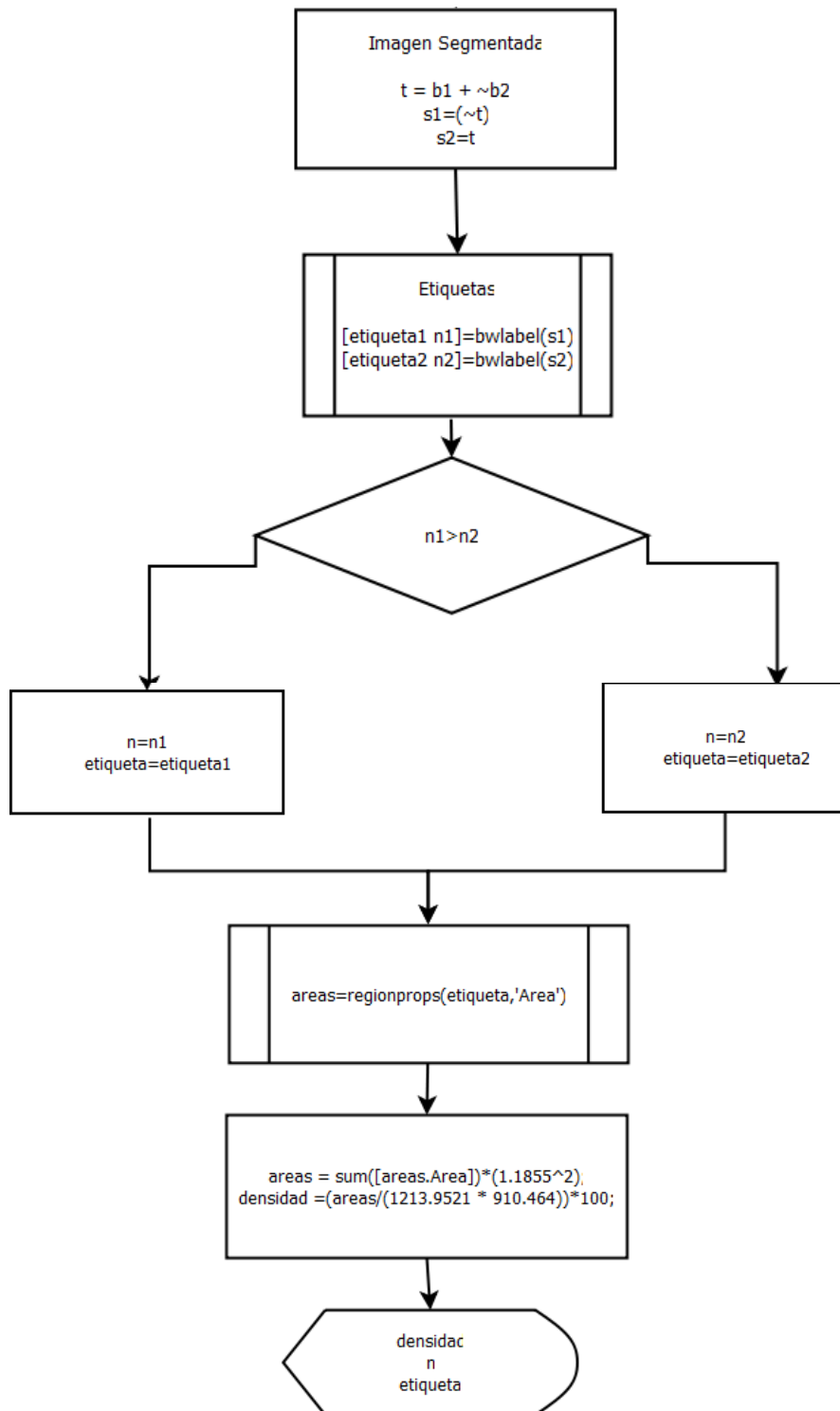




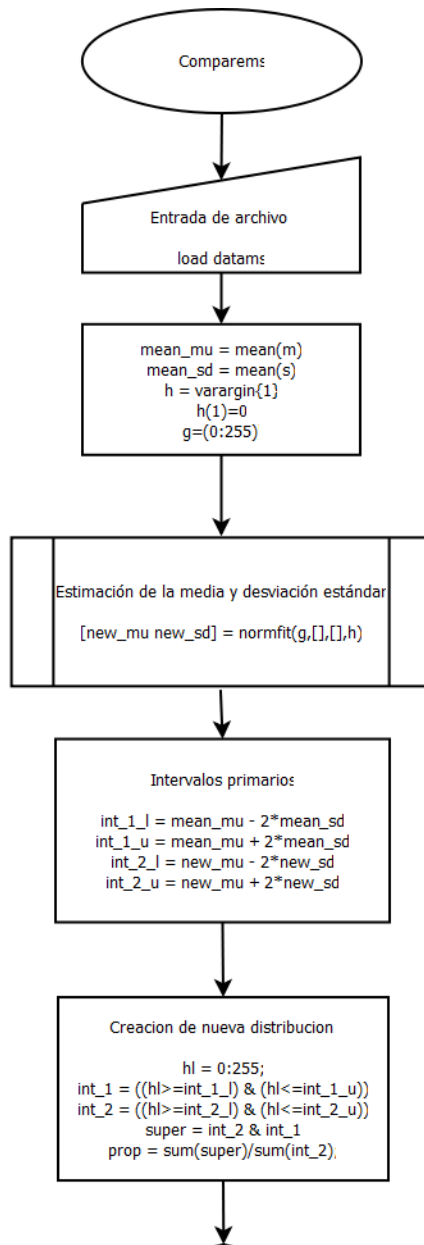


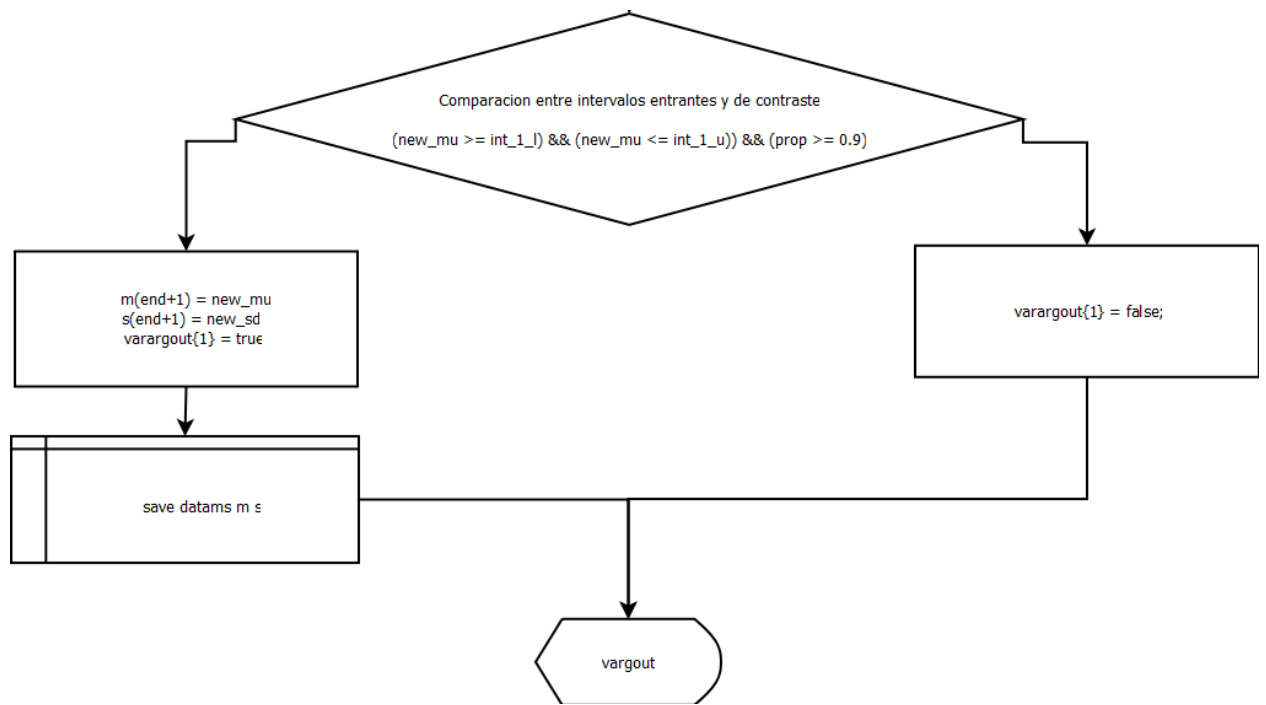
DIAGRAMAS DE FLUJO – Segmentación a bajo aumento 10X



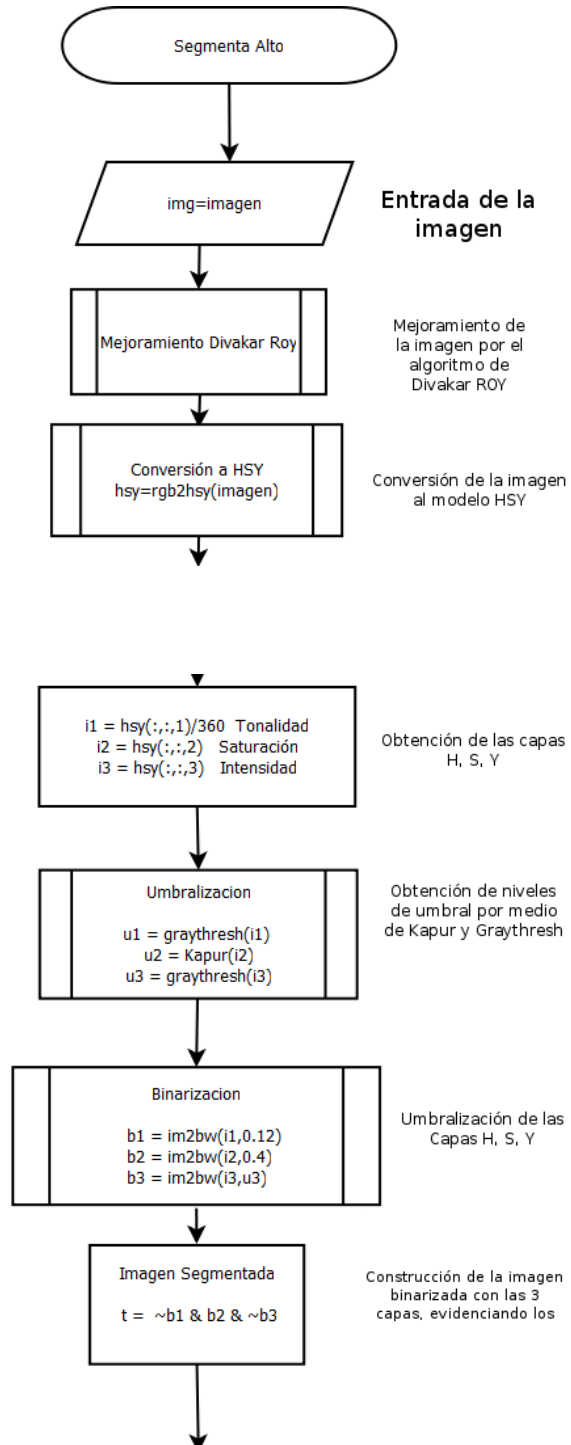


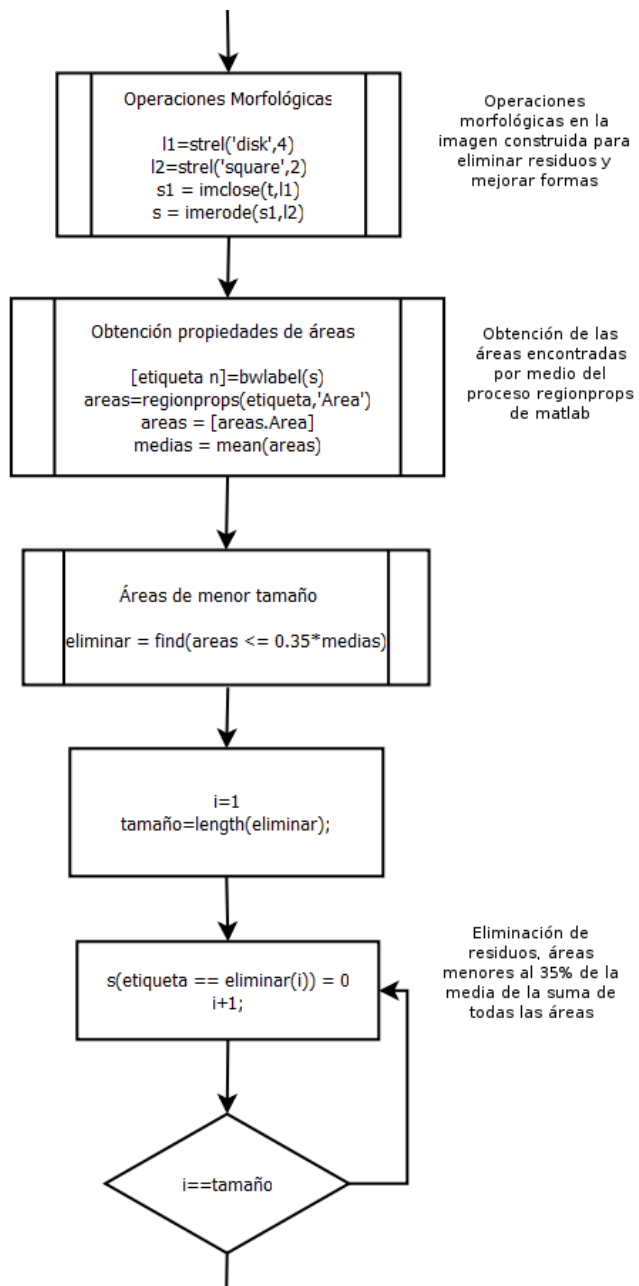
DIAGRAMAS DE FLUJO – Filtrado por media y desviación para aceptación de la imagen en segmentación a alto aumento.

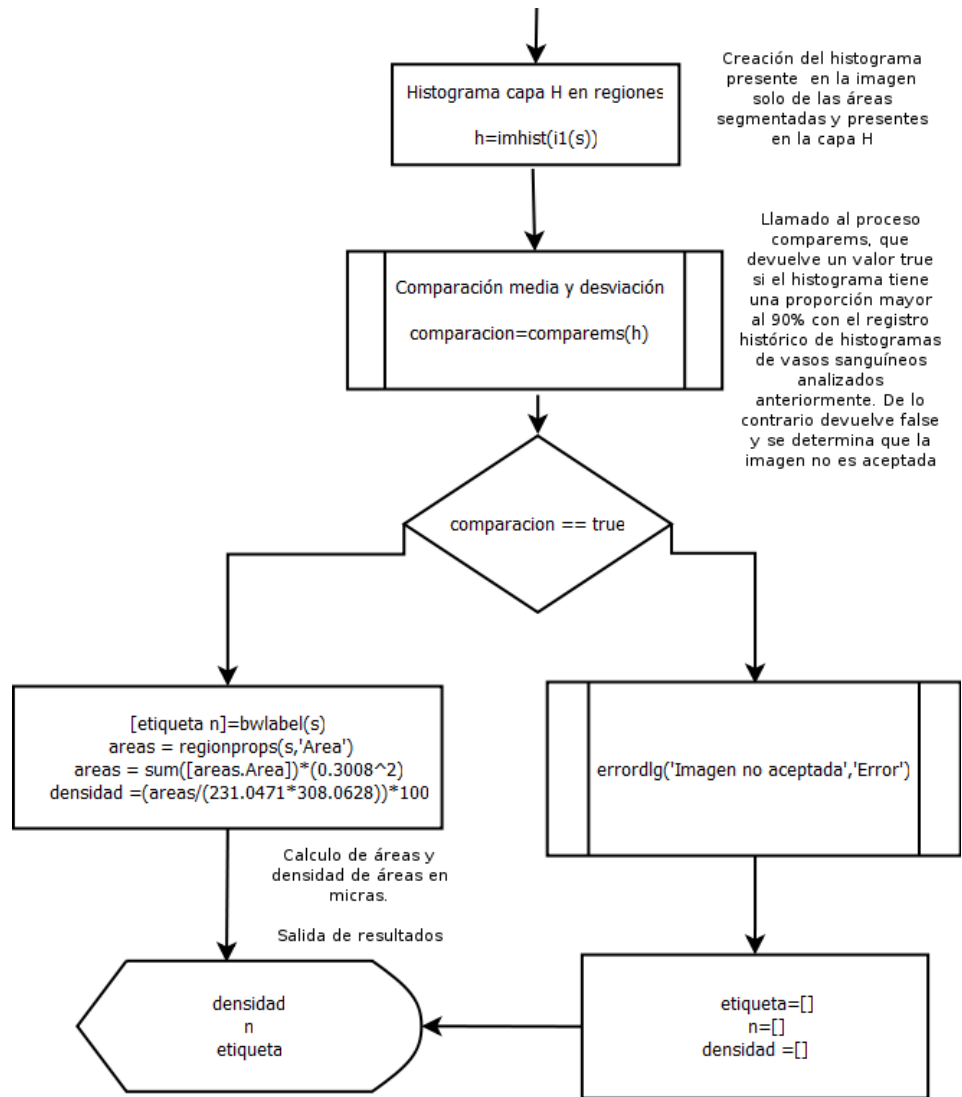




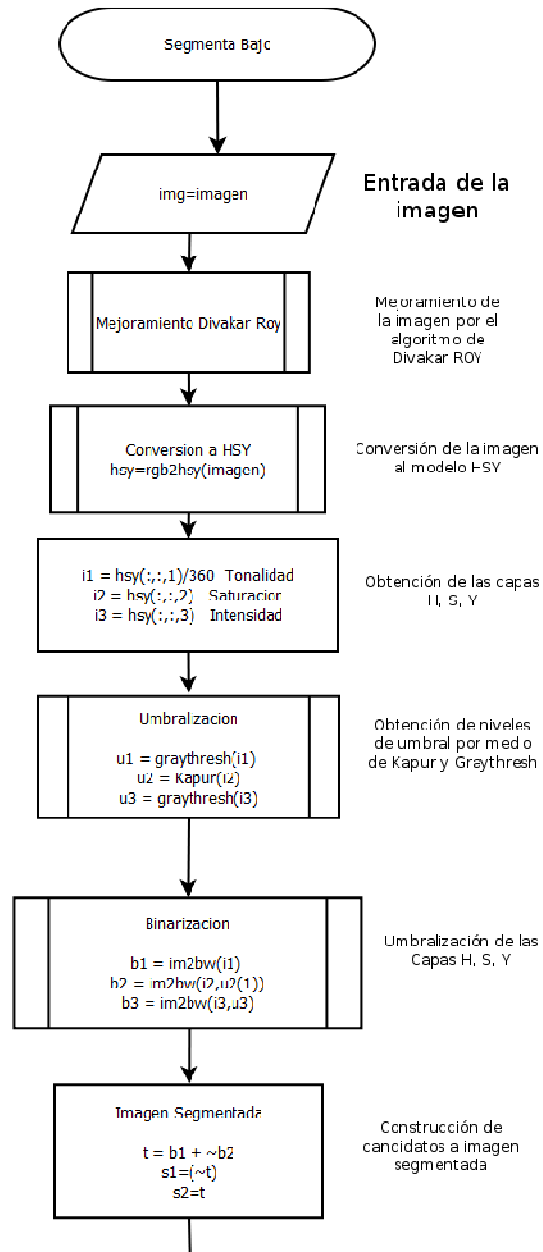
DIAGRAMAS DE FLUJO – Segmentación a alto aumento 40X

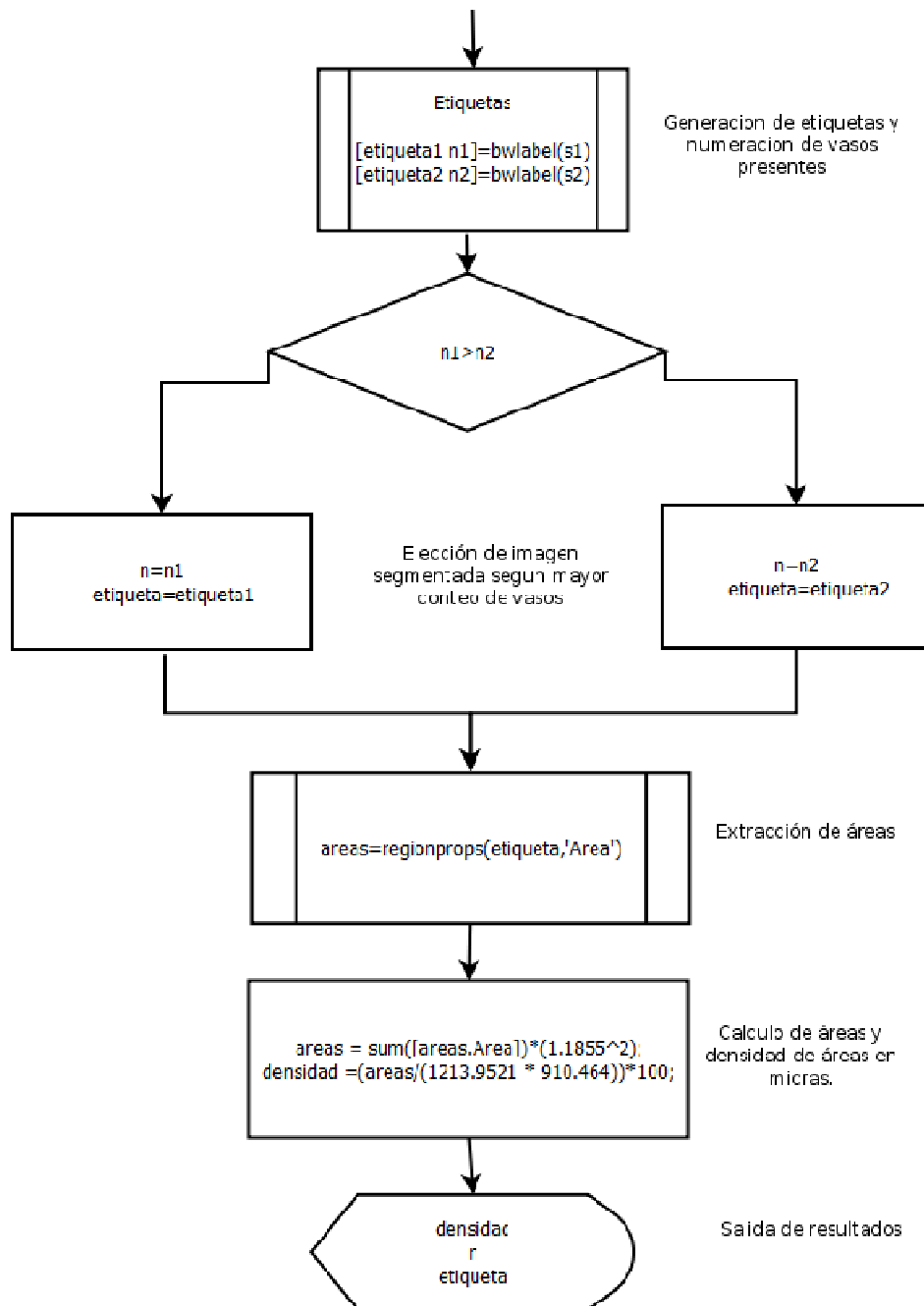






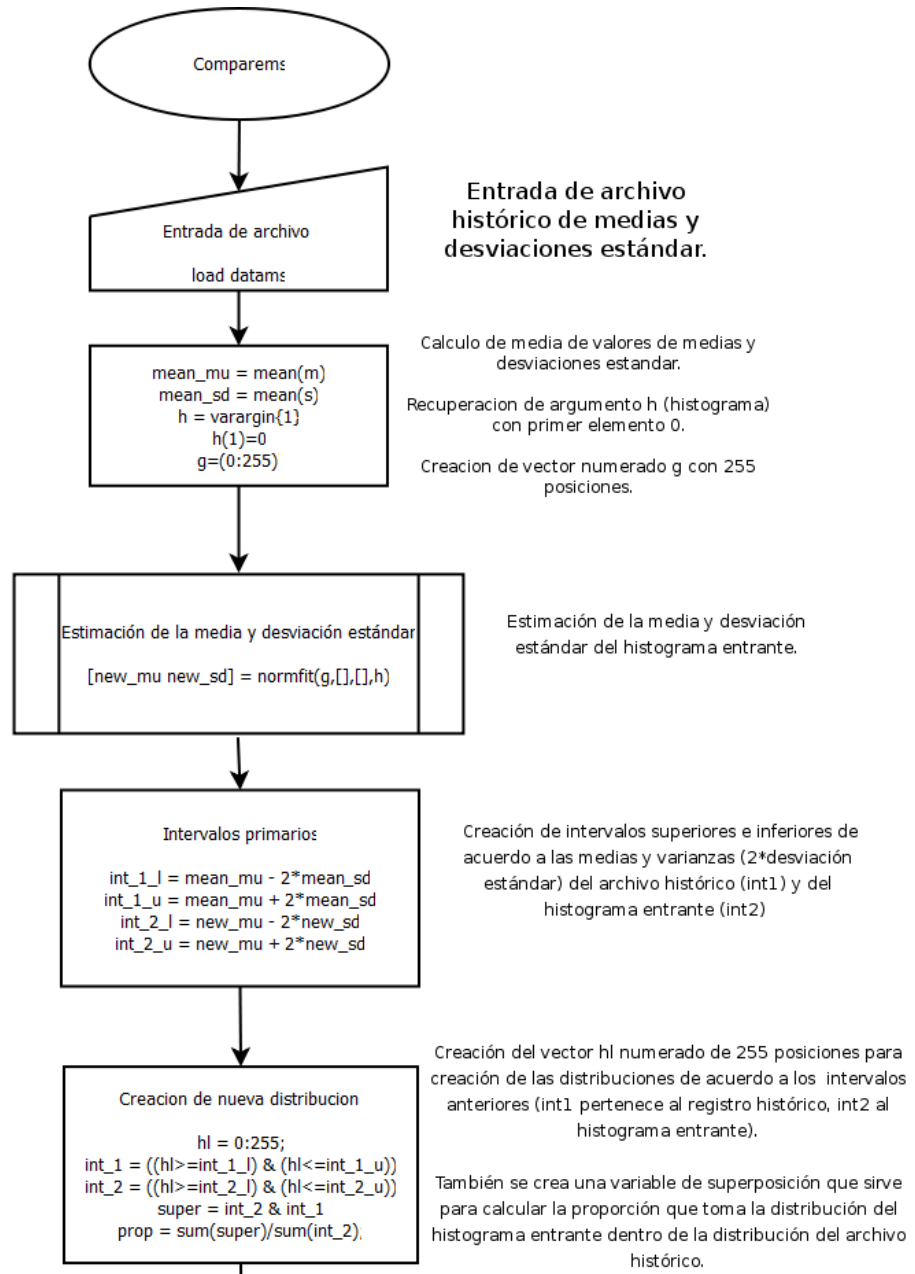
DIAGRAMAS DE FLUJO – Segmentación a bajo aumento 10X

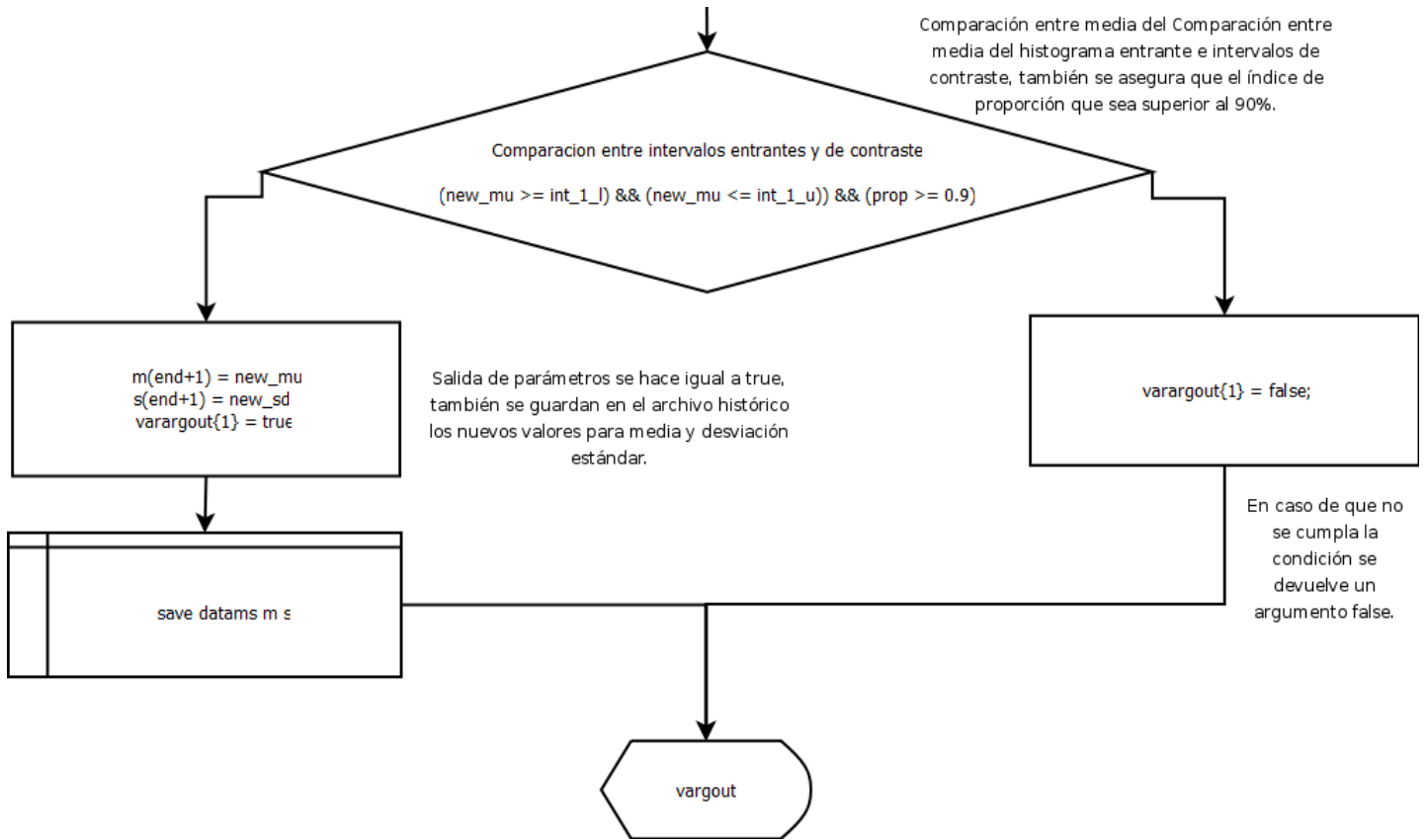




DIAGRAMAS DE FLUJO – Filtrado por media y desviación para aceptación de la imagen en segmentación a alto aumento.

5.





CONCLUSIONES

- En la experiencia adquirida en este proyecto se concluye que el algoritmo basado en segmentación por color en el modelo HSL es un algoritmo útil debido a la simplicidad con la que soluciona el problema de diferenciar los vasos capilares, convirtiéndolo en un algoritmo eficiente y capaz de ser ejecutado en cualquier computador de escritorio actual que tenga instalado matlab.
- Se concluye que el origen de cada imagen es un criterio a considerar en la segmentación, ya que dependiendo de cómo se captura la imagen, puede ser necesario un mejoramiento de la imagen para obtener mejores resultados. También es un parámetro que puede variar las condiciones de la segmentación significativamente, se recomienda trabajar con un solo origen y ajustar los parámetros de segmentación de acuerdo a este origen.
- Las imágenes a bajo aumento son difíciles de tratar si se trabajan a una baja resolución (640x480, 1024x768) ya que los elementos que conforman la imagen son del tamaño de unos pocos pixeles, que pueden perder forma o desaparecer en operaciones morfológicas de apertura. A pesar de que una imagen a bajo aumento es recomendable, ya que el patólogo no tendrá que hacer recorridos de mayor aumento para entender un poco el comportamiento global de la muestra a estudiar. Se considera una opción a mejorar en un futuro.
- El algoritmo reconoce los vasos de acuerdo al color, aunque en algunos casos se puede presentar un error en las áreas reconocidas como vasos, ya que la tinción del anticd34 puede evidenciar otros elementos de tonalidad, saturación y luminancia parecida a los vasos, esto puede ser corregido con descriptores de forma y una implementación de crecimiento de regiones. Se considera una opción a mejorar en un futuro.
- La estructura cámara-microscopio puede variar en la obtención de las imágenes, es recomendable usar una configuración donde el microscopio pueda emitir la mayor cantidad de luz en altos aumentos con la mayor

corrección de errores ópticos posible (en las fotografías tomadas, se evidencia una distorsión en las esquinas), y que la cámara pueda capturar la mayor cantidad de luz posible con mayor detalle, sin sesgos en la configuración de balance de blancos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ALFARO FERRERES, Luis; GARCÍA ROJO, Marcial; PURAS GIL, Ana Maria. Manual de telepatología. Club de Informática Aplicada de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Pamplona. 2001
2. DE LA ROSA FLORES, Rafael. Procesamiento de imágenes digitales. Facultad de ciencias de la computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2007
3. ESQUEDA ELIZONDO, Jose Jaime. Fundamentos de Procesamiento de Imágenes. Insituto Tecnologico de Cldudad Madero. 2002.
4. FOX, Stephen; GENERALI, Daniele; HARRIS, Adrian. Breast tumour angiogenesis. Breast cancer research. Vol 9 numero 6. 2007
5. GARTHER, Leslie; HIATT, James L. Histologia. Sistema circulatorio. Mexico. 1997.
6. HANSEN, Steinbjorn; GRABAU, Dorthe A; SORENSEN, Flemming b; BAK, Martin; VACH, Werner; ROSE, Carlsen. The Pronostic Value of Angiogenesis by Chalkley Counting in a Confirmatory Study Design on 836 Breast Cancer Patients. Clinical Cancer Research. Vol 6, 139-146. Enero 2000.
7. http://www.rcpagapa.netcore.com.au/notices/IH06-3/IHD06-05_images.html
8. <http://wintopo.com/help/html/threshold-hsv.htm>
9. <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases.asp?did=674&title=breast-cancer-pre-invasive-ductal-carcinoma;-ductal-carcinoma-in-situ;-dcis>.
10. <http://www.flickr.com/photos/ethanhein/>
11. KANJANAPANJAPOL, Siroj; PHUWAPRAISIRISAN, Samart. Prognostic significance of microvessel density in breast cancer of thai women. Journal of the medical Association of Thailand. Vol 90. Numero 2. 2007.
12. KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; FAUSTO, Nelson. Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional, Enfermedades de sistemas orgánicos. España. Elsevier. 2005

13. La medición de la angiogénesis tumoral como factor pronóstico eficaz para el cáncer de ovario. Acta Obstetricia et Gynecologica vol. 13 numero 6 Diciembre 2000
14. MARTÍNEZ ABAUNZA, Víctor Eduardo. Modelo computacional para caracterización de células Endocervicales. Tesis: maestría en informática y ciencias de la computación. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 2007
15. MERCHANT, F.A; AGGARWAL, S J; BOVIK, A.C. Semi-automatic morphological measurements of 2-D and 3-D microvascular images. Revista IEEE. 1994.
16. NIMEISTÖ, Antti; DUNMIRE, Valerie; YLI-HARJA, Olli; ZHANG, Wei; SHMULEVICH, Ilya. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. Revista IEEE, Transactions on medical imaging. Vol 24. Numero 4. 2005.
17. Prognostic Significance of Microvessel Density in Breast Cancer of Thai Women. J Med Assoc Thai 2007 <http://www.medassocthai.org/journal>
18. QUINN, CM; RICE, A. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. Journal of clinical pathology. Numero 55. Agosto 2002.
19. SÁNCHEZ SOCARRÁS, Violeida. PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL CRECIMIENTO TUMORAL. Revista Cubana de Investigación Biomédica 2001. Numero 20. Facultad de Ciencias Médicas "Julio Trigo López". 2001.

20.SERVAN-SCHREIBER, David. El anticancer, "El cancer: una herida que no se cura". Espasa. 2008.

21.VOGL, G; DIETZE, O; HAUSER-KRONBERGER, C. Histopathology. 2005. Numero 47.