

**DETECCIÓN DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO USANDO
TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES
MICROSCÓPICAS**

EDWIN ALBERTO SILVA CRUZ

Dir. ARTURO PLATA GÓMEZ

Codir. JORGE HUMBERTO ECHEVERRI PERICO

Codir. CÉSAR DUARTE GUALDRÓN



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS

ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES

BUCARAMANGA

2006

DETECCIÓN DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO USANDO TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS

EDWIN ALBERTO SILVA CRUZ

Ingeniero Electrónico

***Trabajo de Investigación Desarrollado como
requisito parcial
para optar al título***

Magíster en Ingeniería Electrónica

Director. ARTURO PLATA GÓMEZ

Codirector. JORGE HUMBERTO ECHEVERRI PERICO

Codirector. CÉSAR DUARTE GUALDRÓN



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS

ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES

BUCARAMANGA

2006

RESUMEN

TÍTULO:

*DETECCIÓN DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO USANDO TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS**

AUTOR:

*SILVA CRUZ, Edwin Alberto, Ing***

PALABRAS CLAVE:

Sistema de clasificación, procesamiento digital de imágenes, cáncer de cuello uterino, tamizaje, medio diagnóstico

DESCRIPCIÓN:

Se presentan los resultados del desarrollo de un sistema de detección de cáncer de cuello uterino a partir del procesamiento de imágenes de microscopía de citología cérvico uterina. En este trabajo se muestra la metodología usada, los algoritmos desarrollados, el sistema de clasificación y los resultados obtenidos, así como la comparación con la citología cérvico uterina convencional.

Las muestras usadas para el trabajo fueron obtenidas a partir de citologías cérvico uterinas, procesadas a través de un conjunto de 6 filtros cromáticos que brindan información de regiones espectrales específicas, con el fin de disponer de más información que la usual de 3 planos RGB.

El sistema captura las imágenes de las muestras, realiza una rutina de segmentación usando técnicas de procesamiento multiespectral, así como métodos estadísticos de crecimiento de regiones, con el fin de separar apropiadamente el material extracelular, el material citoplasmático y el material nuclear. A partir de las imágenes segmentadas, se obtienen parámetros que permiten discriminar entre una muestra normal y una anormal en el sistema Bethesda.

Para la clasificación se usa una red neuronal backpropagation con capas de 7, 5 y 1 neuronas. Esta salida de una neurona corresponde a una señal binaria correspondiente a la anomalía o normalidad de la muestra. Se descartó el uso de otros sistemas de clasificación tales como lógica fuzzy o clasificadores bayesianos debido a que la naturaleza multivariable del proceso impedía considerarlo como un problema de aprendizaje supervisado, condición importante en un método de clasificación fuzzy o bayesiano.

Previamente al entrenamiento de la red se hizo una validación de los datos de entrada usando análisis de componentes principales con el fin de determinar su efectiva utilidad como variable de clasificación, así como para evitar una alta colinealidad de los datos, factor importante en la elección de parámetros de entrada en una red neuronal de clasificación. Una fracción de las muestras es usada en el entrenamiento, dejando el conjunto restante para la validación.

Los resultados muestran una sensibilidad de entre 90 y 95% y una especificidad de entre 84 y 88%. Estos valores obtenidos muestran que el sistema puede ser aplicado como medio de tamizaje efectivo en el diagnóstico de cáncer de cuello uterino.

* Trabajo de investigación

** Facultad de ingenierías físico mecánicas, Maestría en Ingeniería, área electrónica. Director: Arturo Plata Gómez, PhD.

ABSTRACT

TÍTULO:

*CERVICAL CANCER DETECTION USING DIGITAL MICROSCOPY IMAGES PROCESSEMENT AND SEGMENTATION**

AUTHOR:

*SILVA CRUZ, Edwin Alberto, Eng***

KEYWORDS:

Classification system, digital images processing, cervical cancer, screening, diagnostic system

DESCRIPTION:

The results of the development of a system of cervical cancer detection using multispectral analysis of citologic microscopy images are presented. In this document the methodology used, the developed algorithms, the classification system and final considerations are presented, as well as the comparison between the automatic screening and the conventional cervical smear screening.

The samples used for this work were obtained from conventional cervical smears, processed through a system of 6 chromatic filters that give information about specific spectral regions, so to more information is obtained compared with the typical 3 layers of a RGB image.

The system captures the images of the samples, realizes a routine of segmentation using techniques of multispectral processing, as well as statistical methods of growth of regions, in order to properly separate the background, the cytoplasmatic material and the nuclear material. From the segmented images, there are obtained parameters used to discriminate between a normal sample and an abnormal one in the Bethesda system.

A backpropagation neural network is used for the classification. It has layers of 7, 5 and 1 neurons. The output is a binary signal consisting of the classification of the sample (normal or abnormal). There weren't used other classification systems such as fuzzy logic systems or Bayesian classification systems, due to the fact that there were a lot of variables and parameters that made it difficult to implement it using one of these methods. The complexity of the problem made it considered as an unsupervised learning problem, so a neural network was more suitable for the job.

Prior to the training of the neural network, a validation of the parameters was implemented, using principal component analysis so to determine their effective usefulness as a classification variable and to help a high colineality of the data, important factor in the election of the input parameters in a classification neural network. A part of the samples was used in the training, leaving the rest to the validation process.

The results show a sensibility between 90 and 95% and a specificity between 84 and 88%. These values show that the system may be used as an effective screening method in the diagnostic of cervical cancer.

* Research work

** Facultad de ingenierías físico mecánicas, Maestría en Ingeniería, área electrónica. Director: Arturo Plata Gómez, PhD.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	8
1. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES Y EVALUACIÓN DE IMÁGENES EN ÁREAS MÉDICAS	12
1.1. GENERALIDADES.....	12
1.2. REPRESENTACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES	15
1.3. ETAPAS DE UN SISTEMA DE CLASIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA.....	18
1.3.1. Adquisición	19
1.3.2. Procesamiento de imágenes digitales	21
1.3.2.1. Corrección de defectos en las imágenes:	21
1.3.2.2. Segmentación	30
1.3.3. Extracción de parámetros de imágenes digitales	39
1.3.4. Sistemas de clasificación	51
1.3.4.1. Clasificadores simples.....	51
1.3.4.2. Redes neuronales	53
1.3.4.3. Clasificadores bayesianos.....	60
1.3.4.4. Lógica fuzzy.....	63
2. CÁNCER.....	66
2.1. Generalidades del cáncer de cuello uterino	66
2.2. Carcinoma invasor de cérvix.....	70
2.3. Pruebas Diagnósticas.....	78
3. ETAPAS DE DESARROLLO DEL SISTEMA DE DETECCIÓN DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO...	95
3.1. ADQUISICIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS IMÁGENES CITOLÓGICAS.....	95
3.1.1. Captura de imágenes citológicas.....	96
3.1.2. Preprocesamiento de las imágenes y almacenamiento.....	102
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES DIGITALES	104
3.2.2. Extracción de parámetros.....	118
3.2.2.1. Extracción de parámetros estadísticos.....	119
3.2.2.2. Extracción de parámetros morfológicos	125
3.3. SELECCIÓN DE PARÁMETROS Y ENTRENAMIENTO Y VALIDACIÓN DE LAS REDES NEURONALES DE CLASIFICACIÓN	129
3.3.1. Selección de los parámetros de entrada de las redes neuronales.....	130
3.3.2. Entrenamiento de la red neuronal de clasificación	132
3.3.3. Validación de la red neuronal	134
3.3.4. Red neuronal de clasificación de estadíos.....	134
3.4. INTERFAZ GRÁFICA DE USUARIO	135
3.4.1. Interfaz de visualización y análisis	136
3.4.2. Interfaz de entrenamiento	137
3.5. APORTES ADICIONALES AL TRABAJO	137
4. RESULTADOS.....	140
4.1. ENTRENAMIENTO Y ANÁLISIS INICIAL.....	141
4.2. DISEÑO DE LA RED NEURONAL, ENTRENAMIENTO Y PRUEBAS FINALES	147
4.2.1. Arquitectura de la red neuronal.....	148
4.2.2. Entrenamiento de la red neuronal	150
4.2.2. Validación de la red neuronal	152
4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	156
4.3.1. Consideraciones preliminares	156
4.3.2. Obtención de parámetros.....	160
4.3.3. Parámetros obtenidos en un estudio local de citología vaginal	161
4.3. AJUSTES FINALES AL SISTEMA	165
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	166
REFERENCIAS	170

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de bloques de un sistema de clasificación automática de imágenes de microscopía	18
Figura 2. Diagrama de bloques de un sistema de captura de imágenes de microscopía	20
Figura 3. Montura tipo C	20
Figura 4. Corrección del ruido mediante promediado	22
Figura 5. Atenuación de contornos debido al uso de filtro de promediado	23
Figura 6. Efecto de distorsión producido por el filtro de promediado	24
Figura 7. Ruido shot y eliminación mediante filtro de mediana	26
Figura 8. Mejora de contraste en una imagen	28
Figura 9. Segmentación usando diferenciación de primer orden	32
Figura 10. Detección de bordes usando el operador Roberts	34
Figura 11. Detección de bordes usando operador Sobel	35
Figura 12. Segmentación por el método de Otsu	36
Figura 13. Segmentación por crecimiento de regiones	38
Figura 14. Localización del centroide en un objeto	41
Figura 15. Sección transversal de hierro con partículas intersticiales de grafito. Aproximación estadística del tamaño de las partículas	44
Figura 16. Transformada de Fourier de algunas imágenes	48
Figura 17. Imágenes de citologías de cuello uterino y sus respectivas transformadas de Fourier bidimensionales	49
Figura 18. Parámetros descriptores de una figura genérica S	50
Figura 19. Árbol de decisión	52
Figura 20. Arquitectura de una red neuronal	53
Figura 21. Arquitectura feedforward	55
Figura 22. Funciones de excitación	56
Figura 23. Distribución de probabilidades para una clasificación bayesiana	62
Figura 24. Conjunto de imágenes correspondientes a los filtros cromáticos	97
Figura 25. Respuesta cromática de los filtros	99
Figura 26. Imagen de una muestra citológica sin procesar	102
Figura 27. Imagen de una muestra citológica después de procesar (eliminación de ruido)	103
Figura 28. Segmentación de citologías usando el método de Otsu	107
Figura 29. Histogramas de algunas muestras analizadas	109
Figura 30. Segmentación de imágenes citológicas usando el método de histéresis	111
Figura 31. Segmentación por crecimiento de regiones	114
Figura 32. Segmentación de una imagen citológica	118
Figura 33. Imagen aumentada de una muestra normal y una muestra con carcinoma invasor	120
Figura 34. Variación de los niveles cromáticos en células de carcinoma	123
Figura 35. Aumento de la relación núcleo-citoplasma	124
Figura 36. Aumento del tamaño nuclear en un proceso maligno	125
Figura 37. Irregularidades en los contornos nucleares	126
Figura 38. Extracción y seguimiento de contornos	127
Figura 39. Entrenamiento de la red neuronal	142
Figura 40. Imágenes erróneamente clasificadas como anormales	144
Figura 41. Imágenes erróneamente clasificadas como normales	144
Figura 42. Entrenamiento de la red neuronal final	151

INTRODUCCIÓN

El propósito de esta investigación es encontrar alternativas válidas en la evaluación de los estados patológicos en un proceso neoplásico de cuello uterino. Para tal motivo, la investigación está enmarcada en el área de diagnóstico médico, cuyo nivel de desarrollo es bajo actualmente en Latinoamérica y, particularmente, en Colombia.

El diagnóstico de cáncer de cuello uterino presenta dos serios inconvenientes que motivan la realización de esta investigación. El primer inconveniente es el nivel de subjetividad subyacente a una evaluación humana de imágenes microscópicas, sumado a que los estándares de evaluación están constantemente cambiando, dificultando aun más el diagnóstico. Por otra parte, el diagnóstico requiere de un profesional adecuadamente especializado en el área de patología, y, como se puede ver en estudios estadísticos, en Colombia la cobertura médica no es suficiente para llevar a cabo las evaluaciones. Este hecho se puede ver particularmente crítico en poblaciones de regiones rurales o suburbanas.

Debido a estas razones, la tendencia actual a nivel mundial es la incorporación de tecnologías aplicadas para el tamizaje de las células tumorales que no requieran de la intervención de un especialista. Una alternativa importante consiste en

realizar análisis automático de las imágenes microscópicas digitales mediante un sistema de procesamiento digital y una red neuronal de clasificación.

Algunos parámetros importantes visualizados en la microscopía como indicadores de la presencia tumoral son la pérdida de polarización epitelial, alteración del tamaño y forma del núcleo celular, presencia de nucleolos y otros órganos anómalos y cambio de coloración de la célula. Mediante procesos morfológicos y selectivos es posible determinar patrones como el contorno celular, coloración de la célula, curvatura del epitelio, relación núcleo/citoplasma y detección de nucleolos celulares. Por otra parte, un procesamiento de adecuación del contorno celular haciendo aproximación elipsoidal, que se acerca al modelo morfológico, permite un acercamiento a la esfericidad de la célula mediante la relación R/r (R , radio mayor; r , radio menor), tal como se observa en estudios previos de detección de patologías displásicas en la vejiga, particularmente el cáncer de vejiga.

El análisis mediante procesamiento digital de las imágenes microscópicas representa algunas ventajas frente a los sistemas que abordan el problema usando la caracterización de otros parámetros físico-químicos. Al hacer un acercamiento desde la visión utilizada por el procesamiento realizado por un experto humano, es posible correlacionar más fácilmente y desarrollar correcciones en el sistema de segmentación de manera más adecuada, agregando parámetros de medición que no son estimados en el procesamiento realizado por un experto humano, como modelamiento en sistemas de representación en dominio espectral (transformada de Fourier en dos dimensiones

o transformada Walsch) o determinación cuantitativa de mediciones de tonos, desviaciones estándar, densidades y texturas, que sólo son evaluadas aproximadamente por el ojo humano.

También hay otra ventaja importante en el uso de sistemas de procesamiento digital de imágenes que consiste en la posibilidad de almacenar la información en formato digital, de modo que se puede estudiar posteriormente más detenidamente por un experto humano sin deterioro de la información, teniendo en cuenta que la calidad de las muestras se deteriora a medida que aumenta el período transcurrido entre su obtención y la realización de exámenes. Cuando se hacen evaluaciones por fluorescencia o impedancia eléctrica, la muestra analizada es eliminada como desecho al final del proceso, debido a que la manipulación a la que ha sido sujeta impide su análisis microscópico celular, limitando así abruptamente la capacidad de medición y correlación de datos.

Mediante el diseño y evaluación de un dispositivo de detección y tamizaje de cáncer de cuello uterino por procesamiento y análisis de imágenes microscópicas se espera fortalecer la línea de investigación en cáncer actualmente propuesta en el entorno de bioingeniería de la Universidad Industrial de Santander.

Como complemento y fortalecimiento de este trabajo, el autor realizó la dirección y asesoría de trabajos de pregrado en áreas relacionadas con la detección de patologías a partir de la evaluación de imágenes digitales de microscopía, así como el diseño y la construcción de un sistema de control automático de captura

de imágenes microscópicas (desplazamiento de la platina, control del foco, algoritmos de autoenfoco). De esta forma se espera que se continúe el desarrollo de investigación en esta importante área, especialmente teniendo en cuenta que la tendencia actual en el nivel mundial es similar.

1. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES Y EVALUACIÓN DE IMÁGENES EN ÁREAS MÉDICAS

1.1. GENERALIDADES

El descubrimiento de los rayos X inició una nueva especialidad médica conocida como radiología, a comienzos del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta la segunda guerra mundial que el estudio de los rayos X tuvo avances considerables. El uso extensivo de imágenes radiológicas durante la guerra, así como el desarrollo de equipos de cómputo y nuevas técnicas de obtención de imágenes como ultrasonido y resonancia magnética nuclear se combinaron para incrementar el uso y aplicación de las imágenes en diagnóstico médico, particularmente en los últimos 30 años.

A partir del uso de imágenes radiológicas, el desarrollo tecnológico se orientó a la visualización en tiempo real, mediante pantallas de fluorescencia, empleo de medios contrastantes para estudios en vías circulatorias, sistemas digestivos y gastrointestinales, intensificadores de imágenes que permitían la reducción de la exposición a rayos X, desarrollo de cámaras gamma, ultrasonido y ecógrafos, entre otros medios diagnósticos.

Estos distintos medios para diagnóstico médico involucran la transducción de señales para su adecuada visualización. Debido a esto, cada vez es más importante el impacto del procesamiento digital de señales, incluyendo imágenes, en el área de ayuda diagnóstica médica. En la actualidad la investigación está enfocada en el desarrollo de sistemas automáticos para la determinación de patologías, algoritmos y transformadas adecuadas para el tratamiento de imágenes médicas y diseño y montaje de estructuras globales de intercomunicación de instituciones médicas a nivel mundial.

Las imágenes digitales son cada vez más extensivamente usadas en la medicina, debido a la facilidad de procesamiento, almacenamiento y transmisión de datos. Este hecho se hace evidente con la cada vez más amplia utilización del formato DICOM como herramienta indispensable en la digitalización de datos en instituciones médicas y educativas a nivel mundial. Las imágenes digitales tienen en la actualidad relevancia importante en los siguientes campos:

- Resonancia magnética molecular
- Ultrasonido
- Ecografía y ecodoppler
- Radiología
- Medios diagnósticos en histología
- Medios diagnósticos en patología
- Genética (alineación de códigos genéticos, identificación de parámetros)

- Farmacología (determinación del efecto de medicamentos a nivel interno)

Adicionalmente, la necesidad del desarrollo de tecnologías conducentes a la aplicación de conocimiento multidisciplinario hace que los esfuerzos mundiales se enfoquen en el trabajo conjunto entre las diferentes áreas del conocimiento, resaltando la importancia de la bioingeniería en la actualidad científica.

En el campo de la determinación de parámetros, extracción de características, diagnóstico de patologías y evaluación morfológica, el procesamiento digital de imágenes ha estado involucrado en el estudio de imágenes hematológicas, imágenes microscópicas de diversos tejidos, imágenes termográficas, imágenes de tomografía, radiología y ecografía, imágenes de microscopía electrónica de estructuras como proteínas, genes o microestructuras celulares. Es indudable el apoyo que representa el procesamiento digital de imágenes en el desarrollo de sistemas de evaluación automática de imágenes en el campo de la medicina y su prospecto en el futuro cercano.

El desarrollo de sistemas automáticos de clasificación de patologías incluye el diseño de un sistema efectivo de detección de cáncer de cuello uterino a partir de muestras citológicas, principalmente debido a la incidencia elevada del cáncer de cuello uterino. Lamentablemente, muchas dificultades inherentes al proceso de segmentación, especialmente la separación de núcleos y citoplasmas, ocasionan que hasta ahora ningún sistema de detección de cáncer de cuello uterino tenga

resultados que permitan validarlo como mecanismo fiable de clasificación [4], [24], [25], [28].

1.2. REPRESENTACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES

☑ Reseña

Cada vez es más importante el papel del procesamiento digital en diversas áreas como la industria, ingeniería y medicina. En las últimas 3 décadas el avance en este campo ha sido significativo, debido a las necesidades surgidas en las diversas ramas del conocimiento y al abrupto desarrollo de sistemas con alta capacidad de almacenamiento y cómputo.

Inicialmente, el procesamiento digital de imágenes está estrechamente ligado con el procesamiento digital de señales de una y dos dimensiones. Para ser más preciso, una imagen digital monocromática corresponde a una señal digital de dos dimensiones. Sin embargo, en el procesamiento digital de imágenes se involucran otras disciplinas, como la teoría de información, inteligencia artificial, estadística para reconocimiento de patrones, teoría de comunicaciones y microelectrónica.

☑ Introducción

Una imagen digital es una señal bidimensional (2D), generalmente una función de intensidad de dos variables espaciales. Algunas imágenes digitales usuales son fotografías, capturas de video, imágenes de radar y sonar, rayos X, cortes de TAC (tomografía), imágenes reconstruidas de ecógrafos o ecodopplers, entre otras.

Una imagen digital consiste en el muestreo en el dominio espacial y una cuantización de los valores de intensidad. El muestreo produce un arreglo finito bidimensional de distribución uniforme sobre el campo de visión y la cuantización restringe los valores muestreados a un rango finito. De esta forma se convierten los datos análogos reales a datos digitales, adecuados para el procesamiento computacional y el almacenamiento.

☑ Representación de imágenes monocromáticas

Una imagen monocromática $f(x,y)$ es un arreglo bidimensional de niveles de intensidad, en el cual $f(x,y)$ corresponde a un entero, típicamente entre 0 y 2^n-1 . Cada elemento del arreglo es denominado píxel.

$$f(x, y) = \begin{pmatrix} f(0, 0) & f(0, 1) & \dots & f(0, N-1) \\ f(1, 0) & f(1, 1) & & f(1, N-1) \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ f(M-1, 0) & f(M-1, 1) & \dots & f(M-1, N-1) \end{pmatrix}$$

Este arreglo corresponde a una imagen digital de tamaño $M \times N$, siendo M el número de filas y N el número de columnas de la señal.

Si consideramos una imagen típica de resolución 512×512 , se tiene que el tamaño del arreglo bidimensional, para una cuantización de 8 bits, es de 262.144 bytes.

☑ Representación de imágenes policromáticas

Una imagen policromática es típicamente representada por una tripleta de valores, cada uno correspondiente a un canal de color, como en la usual representación RGB. Los valores individuales son usualmente cuantizados en 8 bits, obteniéndose un nivel de cuantización total de 24 bits. Sistemas de representación más avanzados involucran un tercer canal, correspondiente a la transparencia, con lo cual la cuantización aumenta a 32 bits.

La representación más conocida es la RGB. Los colores rojo, verde y azul se combinan para obtener un total de 2^{24} colores posibles (aproximadamente 16 millones). Sin embargo, hay otros modelos de representación de color usados, como el HSV o el CMY.

☑ Formatos de almacenamiento y compresión de imágenes

Debido a que la naturaleza de las imágenes digitales como arreglos de señales bidimensionales implica requerimientos elevados de capacidad de almacenamiento, se han desarrollado diversos formatos de almacenamiento y compresión que se adecuen a las necesidades particulares de cada aplicación.

A continuación se reseñan algunos formatos ampliamente utilizados.

<i>Formato</i>	<i>Extensión</i>
Mapa de bits	.bmp
GIF y GIF animado	.gif

JPEG	.jpg , .jpeg
Mapa de bits portátil	.pgm
PNG	.png
Formato portátil de cualquier mapa	.pnm
Formato de imagen postscript	.ps
TIFF	.tif , .tiff

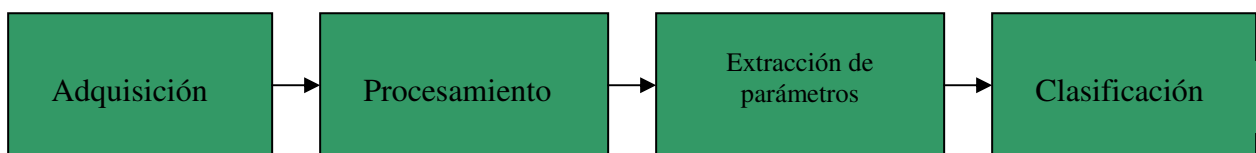
Para encontrar información adicional, ver [3], [6], [16], [29].

1.3. ETAPAS DE UN SISTEMA DE CLASIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA

Un sistema de clasificación automática de imágenes de microscopía está compuesto por varias etapas.

- Adquisición de imágenes
- Procesamiento
- Extracción de parámetros
- Sistema de clasificación

Figura 1. Diagrama de bloques de un sistema de clasificación automática de imágenes de microscopía



El diagrama de bloques de la figura 1 muestra un sistema simple de clasificación automática de imágenes de microscopía. Existen sistemas más complejos en los cuales hay realimentación, debido a que el microscopio cuenta con un sistema de posicionamiento x, y y control de foco automáticos¹.

1.3.1. Adquisición

La etapa de adquisición consiste en la adecuada captura de las imágenes de microscopía y su almacenamiento en formato digital. Normalmente, esto se hace usando un sistema que permita la salida alterna de la luz proveniente de la muestra. Existen diversos tipos de monturas que permiten el acople del microscopio con el dispositivo de captura. Una de estas monturas es la montura tipo C, que es un acople de rosca de una pulgada y distancia de 17,526mm al sensor. Un elemento de captura de imágenes digitales, como una cámara CCD o CMOS, convenientemente situado permite la adecuada captura de las imágenes de microscopía. Para esto se deben tener en cuenta las especificaciones de la montura y, de ser necesario, ajustar el sistema mediante el diseño y montura de las lentes requeridas.

El sistema de adquisición de imágenes además del dispositivo de captura está conformado por una tarjeta de video o *frame grabber*, que permite la entrada de

¹ En la actualidad el autor de este proyecto se encuentra dirigiendo un trabajo de pregrado consistente en la automatización de un microscopio óptico, de modo que las capturas digitales de una muestra se realicen usando este sistema

los datos en el sistema de cómputo. La tarjeta puede ser un dispositivo sencillo de captura de video o una tarjeta digitalizadora, con mejores prestaciones pero más elevado costo.

Figura 2. Diagrama de bloques de un sistema de captura de imágenes de microscopía

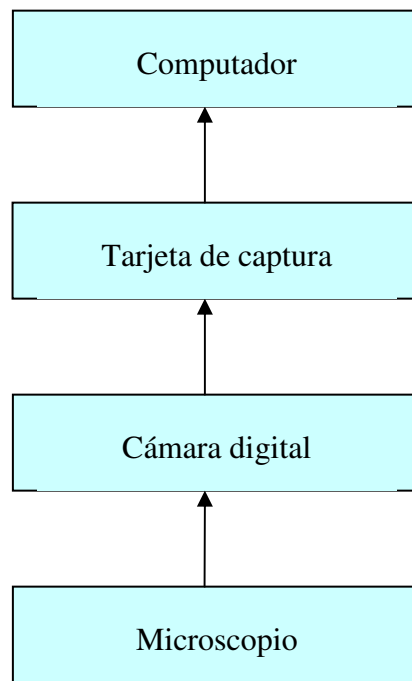


Figura 3. Montura tipo C²



² Imagen tomada de www.microscopeworld.com

1.3.2. Procesamiento de imágenes digitales

El procesamiento básico de imágenes digitales corresponde al desarrollo de algunas etapas que permiten acondicionarlas para su adecuada visualización o procesamiento posterior. Estas etapas se pueden generalizar en:

1.3.2.1. Corrección de defectos en las imágenes:

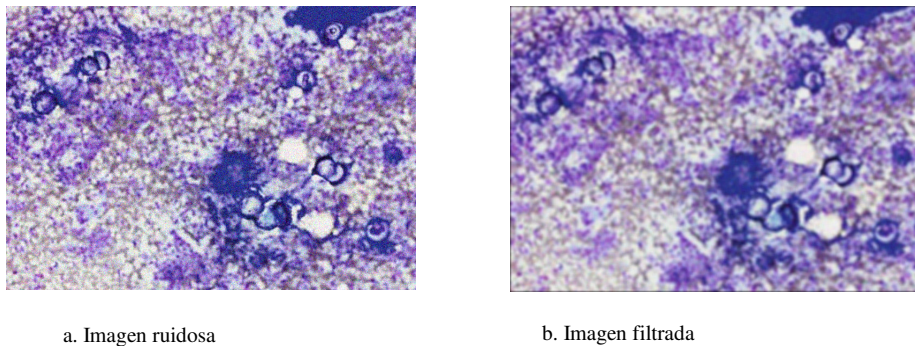
En esta etapa se realizan los procedimientos adecuados para la corrección de defectos ocasionados por los sensores, iluminación defectuosa y otros factores externos.

- a. Imágenes ruidosas: El factor más incidente en el ruido presente en las imágenes digitales es la deficiencia de luz, ocasionada bien sea por inadecuada iluminación o por insuficiente tiempo de exposición . Si bien en algunos casos estos factores pueden ser atenuados o, incluso, eliminados en el proceso de captura de la imagen, hay ocasiones en las cuales no hay control sobre la iluminación (iluminación solar, imágenes de fluorescencia o fosforescencia, por ejemplo) o sobre el tiempo de exposición (procesos biológicos de tiempos reducidos, por ejemplo). En estos casos, es necesario realizar procesamiento para la eliminación del ruido de la imagen.

Para un mejor entendimiento del procesamiento digital para la reducción de ruido en imágenes, es preciso considerar que en una imagen digital

raramente se encuentran detalles suficientemente pequeños como para involucrar un solo píxel. Adicionalmente, la imagen digital está compuesta por regiones cuyas estructuras morfológicas y cromáticas tienen poca variación relativa en su proximidad. De esta forma, es posible realizar algoritmos de ponderación que incluyen promediado, integración, mediana y otras funciones que involucren la proximidad de los píxeles [16], [31].

Figura 4. Corrección del ruido mediante promediado³



En la figura 4a se muestra una imagen ruidosa de un extendido citológico. Este ruido puede obedecer a distintas causas, como fenómenos ópticos en la microscopía o defectos en el sistema de adquisición. En la figura 4b se muestra la imagen corregida mediante el uso de un filtro promediador, usando una máscara de 7x7 así:

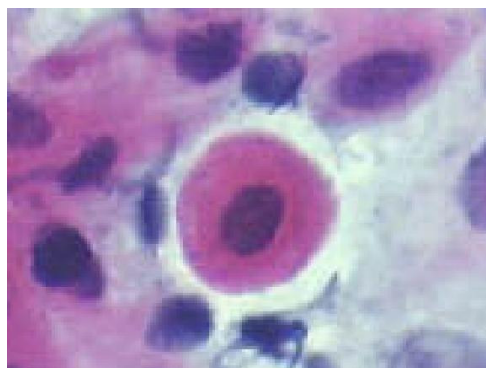
³ Tomada de Kocjan, C, *Fine needle aspiration cytology*. La imagen filtrada fue obtenida usando *Matlab 6.3*

$$h = \begin{bmatrix} 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \\ 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 & 0,0204 \end{bmatrix}$$

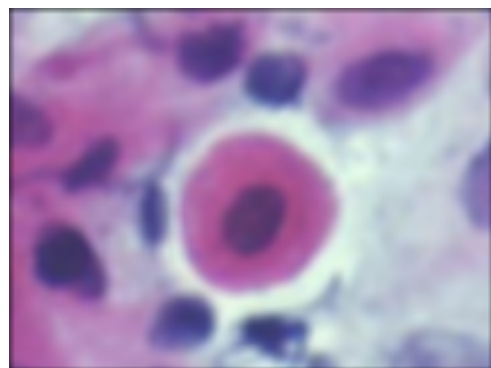
h es el filtro usado para el promediado. El valor de 0,0204 se obtiene dividiendo 1 entre la cantidad de elementos de la máscara, que es 49, para que el filtro quede normalizado.

El uso de filtros promediadores para la eliminación de ruido tiene el gran inconveniente de que hace más difusos los contornos, lo cual dificulta los procesos de segmentación o seguimiento de contornos.

Figura 5. Atenuación de contornos debido al uso de filtro de promediado⁴



a. Imagen normal

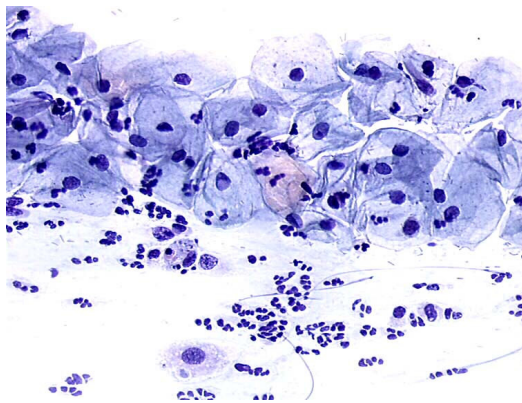


a. Imagen promediada (máscara 15x15)

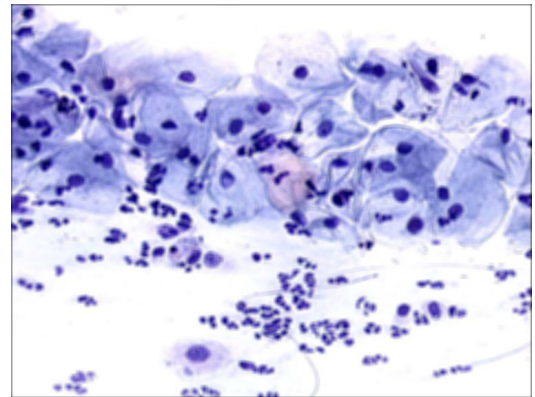
⁴ Tomada de J. C. Prella, http://www.geocities.com/jcprolla/case_12B_answer_2002.html. La imagen filtrada fue obtenida usando *Matlab 6.3*

Como se observa en la figura 5b, hay atenuación de contraste en la imagen, debido al efecto de filtro pasabajo en el promediado. Esta atenuación puede reducirse mediante la ponderación adecuada de la matriz de promediado, dando mayor peso a los píxeles más cercanos al píxel evaluado. La ponderación se realiza mediante la aplicación de ecuaciones matemáticas, como aproximación estadística gaussiana o ponderaciones de Savitsky y Golay.

Figura 6. Efecto de distorsión producido por el filtro de promediado⁵



a. Imagen normal



b. Imagen filtrada

Adicionalmente, el filtrado promediador produce otro tipo de aberraciones, que son los efectos de distorsión, consistentes en la alteración morfológica de los elementos en la imagen. Este efecto de distorsión se puede observar en la figura 6b, pues se puede determinar que, además de las atenuaciones en los contornos, los núcleos celulares son alterados significativamente.

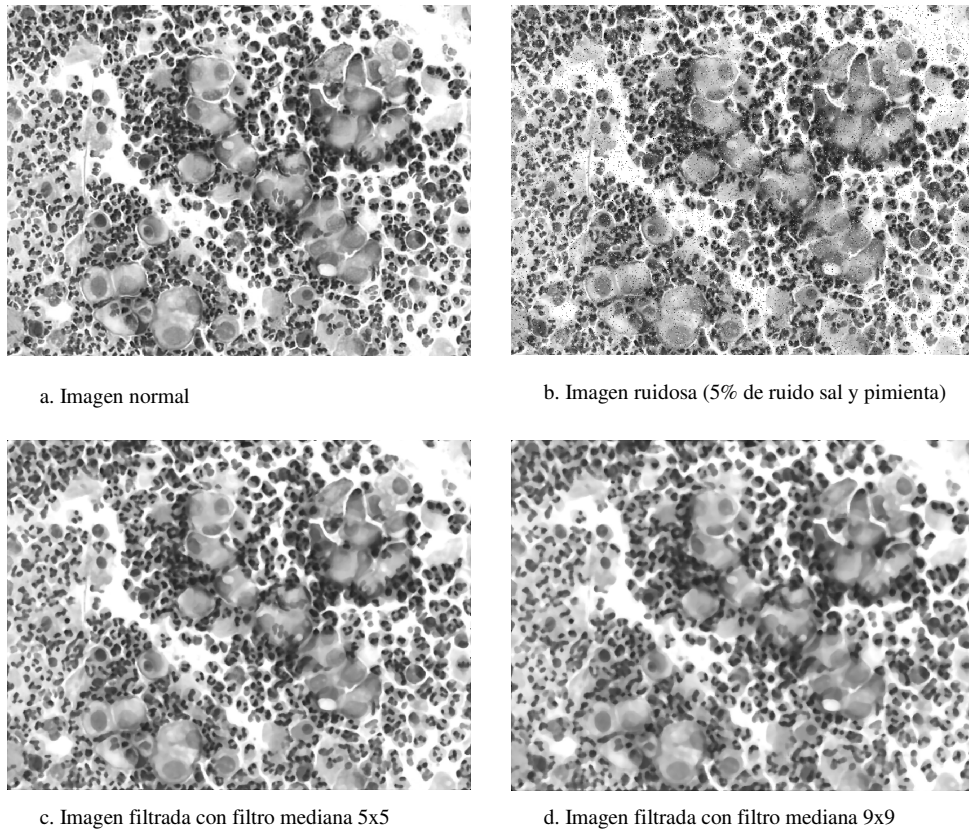
⁵ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. La imagen filtrada fue obtenida usando Matlab 6.3

En general, es recomendable evitar el uso de filtro promediador como técnica de reducción de ruido en una imagen citológica siempre que sea posible, puesto que la segmentación núcleo-citoplasma se dificulta y, por otra parte, la actividad genética en los núcleos es un parámetro importante en la determinación de una posible anomalía celular. Esta actividad genética se manifiesta en la microscopía óptica como una textura rugosa en los núcleos, que sería eliminada o, por lo menos, significativamente atenuada si se usa un filtro promediador.

Por otra parte, hay tipos de ruido cuyo tratamiento mediante filtros de promediado no es adecuado, como el ruido producido por la umbralización o minimización de ciertos píxeles, posiblemente debido al deterioro de sensores en el dispositivo de captura o a fenómenos interferométricos inherentes al proceso. En estos casos es más viable el uso de filtros no lineales, como filtros de mediana, en los cuales el valor de cada píxel, luego de la transformación, corresponde a la mediana del conjunto constituido por el píxel mismo y un conjunto de píxeles vecinos en una celda de proximidad [29], [31].

En la siguiente figura se muestra una imagen con ruido *shot* y su filtrado por método de mediana.

Figura 7. Ruido *shot* y eliminación mediante filtro de mediana⁶



- b. Efectos de movimiento: Las imágenes pueden tener otros defectos, tales como atenuación debido al movimiento o a la captura desenfocada. Los procesos descritos previamente no son apropiados para la eliminación de este tipo de defectos sin perder información importante de la imagen. Cuando el ruido presente por efectos de movimiento puede ser caracterizado, es posible usar una aproximación de máxima entropía para la eliminación de los artefactos. Los métodos de máxima entropía representan una aproximación de cómputo para la eliminación de ruido

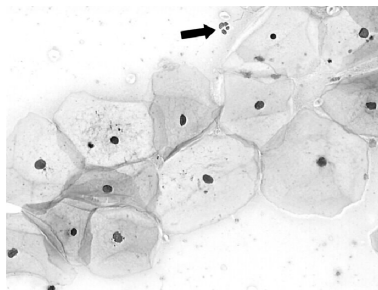
⁶ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. Las imágenes filtradas fueron obtenidas usando *Matlab* 6.3

basada en el conocimiento previo de las características del ruido, de manera que puede ser eliminado para obtener la imagen original. El método convencional consiste en imaginar la imagen como un conjunto de N píxeles conteniendo un total de M fotones ($M \gg N$). El número de fotones en un píxel dado es P_i , donde i corresponde a la identificación de cada píxel. Es una convención, pues la localización de cada píxel puede ser dada por las variables x , y , para el posicionamiento horizontal y vertical. La imagen tiene valores normalizados de intensidad dados por $p_i = P_i/M$. Se asume que esta imagen normalizada es una aproximación de la imagen real, teniendo en cuenta los defectos de la imagen. El método de eliminación de artefactos es alterar los valores de intensidad para alcanzar los niveles máximos de entropía, siendo estas alteraciones sujetas a ciertas restricciones. Esto se hace de acuerdo con consideraciones estadísticas y aproximaciones bayesianas.

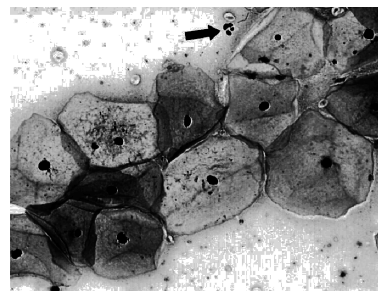
Para aproximar la máxima entropía en la imagen, la solución directa consiste en asignar a cada píxel el nivel promedio de intensidad M/N . Claramente, esta solución no conduce a resultados aceptables, de manera que se aplican restricciones a la asignación de niveles. Estas restricciones pueden ser basadas en aproximaciones de ruido por chi cuadrado, restricciones de acuerdo con la suma de las diferencias absolutas o reglas de ponderación. Otras restricciones son obvias, pero deben ser tenidas en cuenta, como el hecho de que un píxel no puede tener un nivel negativo de fotones en su intensidad [31].

- c. Limitaciones de contraste: Un sistema de captura de imágenes típicamente digitaliza los valores usando cuantización de 8 bits, para un máximo posible de 256 niveles. Si el rango de variación inherente a la imagen es menor al rango dinámico del sistema de captura, circuitería y digitalización, el número de niveles posibles se reduce. Esta reducción implica que la imagen tiene limitaciones para su visualización y procesamiento. Mediante un procedimiento de mejora de contraste y expansión del histograma, es posible adecuar la imagen para obtener características más apropiadas para su estudio [31].

Figura 8. Mejora de contraste en una imagen⁷



a. Imagen normal



b. Expansión del histograma

En la figura anterior se observa una imagen (a) en la cual el histograma está limitado a un rango reducido. Mediante la expansión del histograma se obtiene la imagen b, que permite discriminar visualmente de una manera más sencilla la región citoplasmática. En la imagen inicial esto era más complicado debido a la limitación del rango dinámico en la imagen. Es

⁷ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. Las imágenes filtradas fueron obtenidas usando *Matlab 6.3*

importante señalar, sin embargo, que estas técnicas de mejoramiento del contraste a partir del histograma son únicamente métodos de interpolación que no permiten obtener información adicional en una imagen. Debido a esto, se debe intentar conseguir que el sistema de captura esté bien calibrado y las condiciones de iluminación sean óptimas para garantizar la mayor excursión posible del rango dinámico en una imagen.

Mediante la realización de operaciones de extensión y modificación del histograma, es posible además realizar mejoras en imágenes policromáticas, sea por la modificación de uno o varios planos de color.

d. Otras aberraciones y defectos en la imagen: Algunos otros defectos que se pueden atenuar o eliminar en una imagen son:

- Iluminación no uniforme
- Fondo (background) de la imagen no deseado
- Distorsión geométrica (por efectos ópticos o por la perspectiva de la captura)
- Errores de alineación
- Aberraciones morfológicas

En microscopía las tres primeras fuentes de error mencionadas son muy frecuentes.

Iluminación no uniforme: La iluminación no uniforme se encuentra cuando hay deterioro de los sistemas ópticos, aunque un microscopio planacromático reduce este error de manera significativa. Sin embargo, es normal encontrar que en las esquinas de las imágenes la iluminación es relativamente inferior a la presente en las regiones centrales, debido a las aberraciones ocasionadas por la óptica del microscopio.

Fondo no deseado: El fondo no deseado en una imagen de microscopía biológica es natural, tanto por la presencia de artefactos y ruidos en la lámina, como por la inclusión de material biológico adicional, tal como muestras sanguíneas en una citología cervical.

Distorsión geométrica: La naturaleza óptica de un sistema de microscopía ocasiona una ligera aberración geométrica, especialmente observada en las esquinas de las imágenes. Esta aberración es disminuida notablemente debido a que la imagen proyectada en la matriz CCD o CMOS es apenas una fracción del haz completo proveniente del microscopio.

1.3.2.2. Segmentación

En la sección anterior se mostraron algunas técnicas efectivas para la reducción de ruido en una imagen. Posteriormente es necesario segmentarla con el fin de caracterizar adecuadamente las regiones presentes en ella. La segmentación más

sencilla corresponde a la separación entre objetos de interés y fondo en una imagen (*foreground* y *background*) [14], [15], [31]. En general, una muestra de tejido biológico puede segmentarse en tres regiones principales: material extracelular, material citoplasmático y material nuclear. El material extracelular no incluye únicamente los espacios vacíos entre las células, sino también algunos elementos no propiamente constituyentes de los citoplasmas, como mucosas y otros fluidos biológicos.

a. Detección de bordes

La detección de bordes consiste en el uso de técnicas computacionales que permiten definir las fronteras entre las regiones en una imagen digital. Estas técnicas se basan en el hecho de que las dos regiones fundamentales (*background* y *foreground*) generalmente presentan características cromáticas distintas que permiten el uso de algoritmos para la detección de sus fronteras.

- Diferenciación de primer y segundo orden: En una imagen de microscopía de una muestra celular en tonos grises se espera que la región extracelular tenga niveles de gris más elevados que los de una región nuclear o citoplasmática, de modo que un algoritmo de diferenciación en primer o segundo orden (gradiente y laplaciano, respectivamente) puede ser útil en la definición de estas fronteras. En el caso de la diferenciación de primer orden, los niveles altos

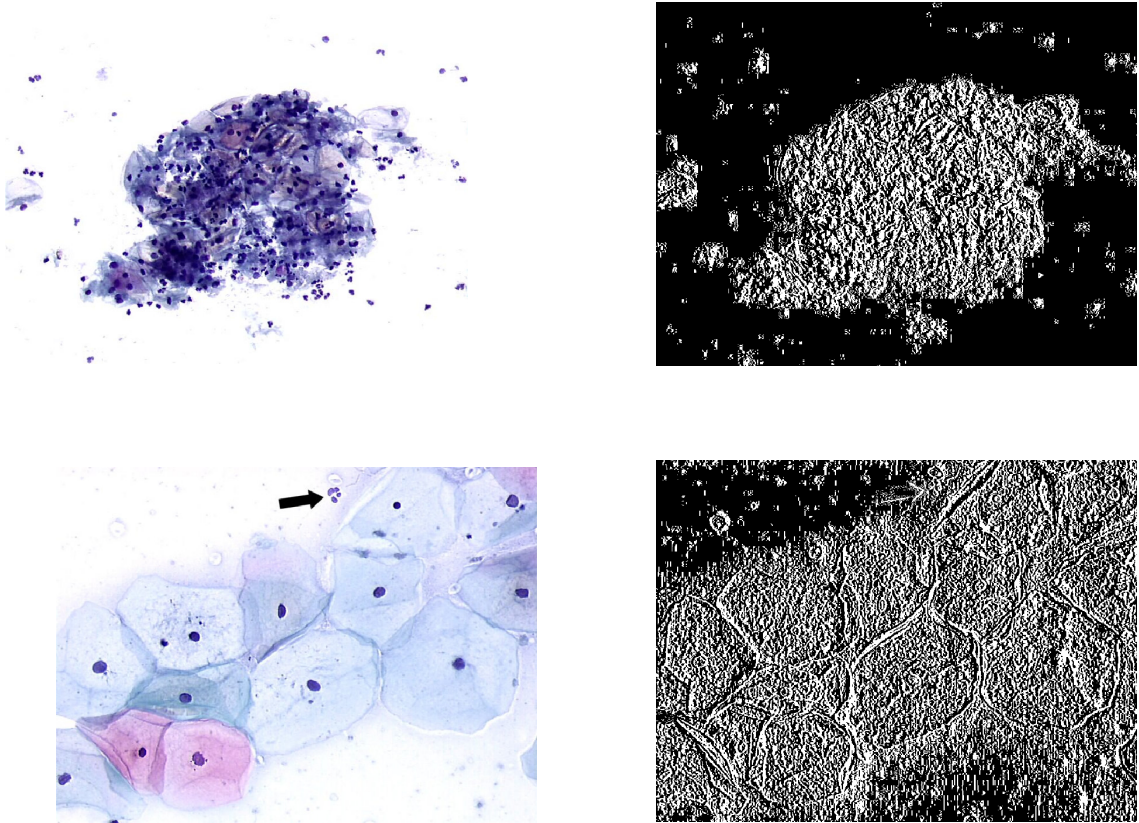
corresponden a posibles puntos de frontera. En la derivación de segundo orden los cruces por cero son posibles puntos de frontera.

El gradiente está definido por la siguiente expresión:

$$|\vec{\nabla}g| = \sqrt{\left(\frac{\partial g}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial g}{\partial y}\right)^2}$$

donde $\frac{\partial g}{\partial x}$ y $\frac{\partial g}{\partial y}$ son las derivadas direccionales de la matriz bidimensional [14].

Figura 9. Segmentación usando diferenciación de primer orden⁸



Como se observa en las figuras anteriores, la segmentación usando diferenciación de primer orden puede ser aplicable únicamente en el caso de imágenes en las cuales el contraste cromático entre la región extracelular y la región de interés sea notable (primera figura), lamentablemente, existen casos en los cuales la segmentación no es recomendable usando esta técnica, debido al pobre contraste entre las regiones (segunda figura).

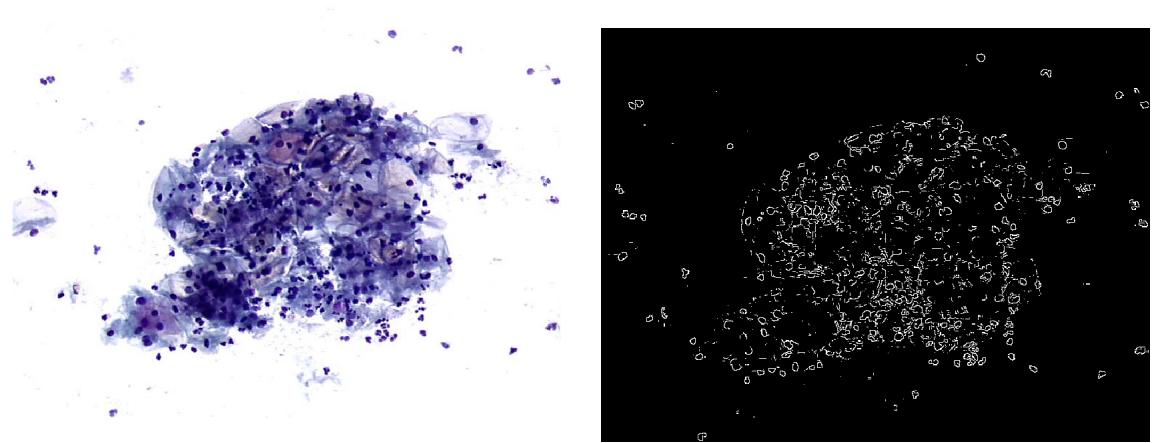
- Operador Roberts: Es también conocido como operador Roberts cross, debido al patrón en cruz usado.

Si se asume que $g(p,q)$ es una imagen digital, el valor del operador Roberts está definido así [14]:

$$r(p_0, q_0) = \sqrt{(g(p_0, q_0) - g(p_{0+1}, q_{0+1}))^2 + (g(p_{0+1}, q_0) - g(p_0, q_{0+1}))^2}$$

⁸ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. Las imágenes segmentadas fueron obtenidas usando *Matlab 6.3*

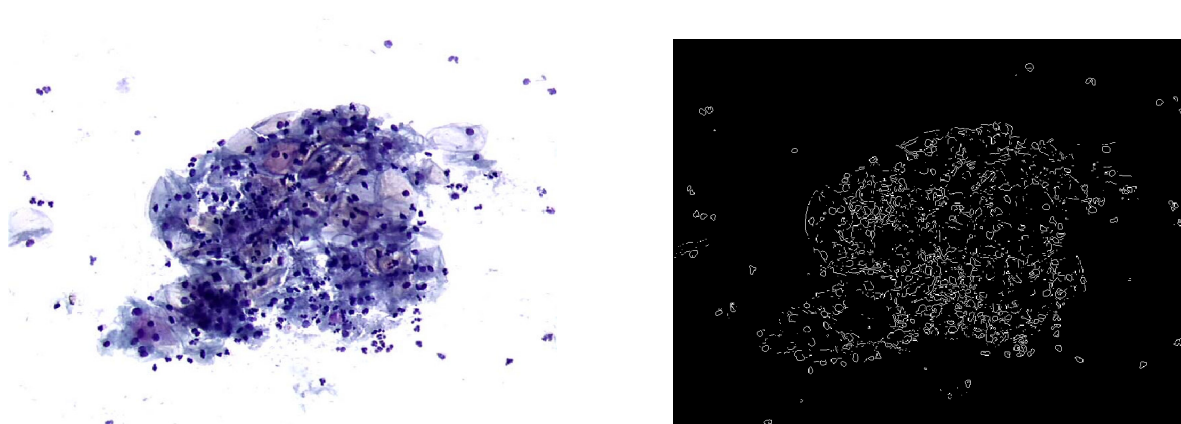
Figura 10. Detección de bordes usando el operador Roberts⁹



- Operadores Sobel, Prewitt y Kirsch: Estos operadores usan varios filtros lineales que son combinados con las imágenes. Posteriormente se usa un criterio discriminador, como el nivel máximo o una umbralización del gradiente del resultado obtenido. La ventaja del uso de varios filtros lineales en mayor escala es que se obtiene una salida mucho menos ruidosa, pero al costo de la pérdida de resolución en la imagen. Para ver información más detallada sobre el uso de estos operadores, [14].

⁹ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. La detección de bordes fue obtenida usando Matlab 6.3

Figura 11. Detección de bordes usando operador Sobel¹⁰

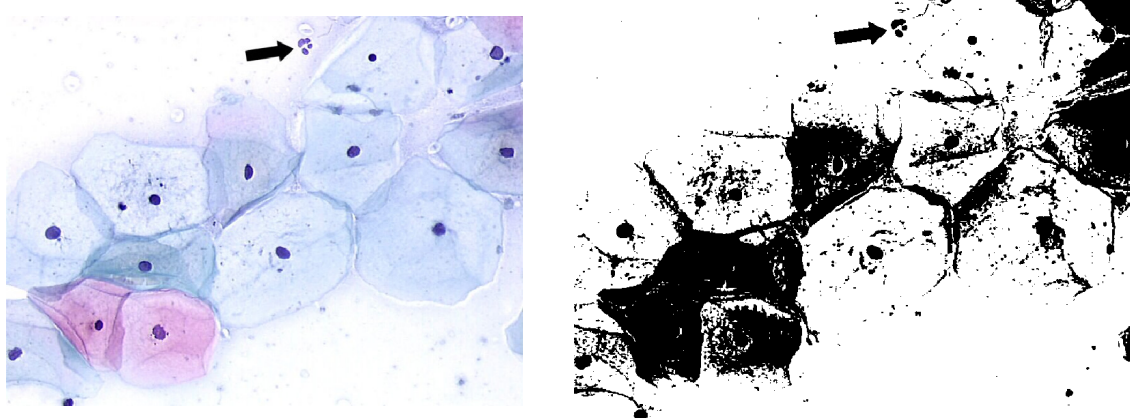


b. Umbralización de la imagen

La umbralización de la imagen como técnica de segmentación consiste en determinar un valor de umbral (*threshold*) que se usa para discriminar las regiones. Este procedimiento genera una imagen binaria, en la cual un valor corresponde al *background* y otro al *foreground*. Debido a que las imágenes no son completamente uniformes y además hay ruido en ellas, generalmente se debe realizar una rutina de transformaciones morfológicas que elimine los artefactos indeseados en la segmentación [14], [31]. El umbral puede ser determinado manualmente o por distintos métodos, como histéresis o método de Otsu.

¹⁰ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. La detección de bordes fue obtenida usando *Matlab 6.3*

Figura 12. Segmentación por el método de Otsu¹¹



En la figura anterior se puede observar cómo la segmentación por umbralización simple usando el método de Otsu puede presentar problemas en imágenes en las cuales la diferencia de niveles de color entre la región de interés y el fondo de la imagen no sea significativa.

c. Método de crecimiento de regiones

En la literatura se pueden encontrar extensas aplicaciones de procesamiento de imágenes multiespectrales, así como las técnicas usadas para la segmentación [18], [27], [34]. Algunas de ellas incluyen métodos clásicos de segmentación de imágenes monocromáticas, mientras que otros se basan exclusivamente en técnicas conjuntas, que requieren de dos o más de las imágenes multiespectrales para la segmentación. Adicionalmente, es posible

¹¹ Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. La segmentación fue obtenida usando *Matlab 6.3*

usar técnicas que usen los dos métodos, de modo que la segmentación es más adecuada.

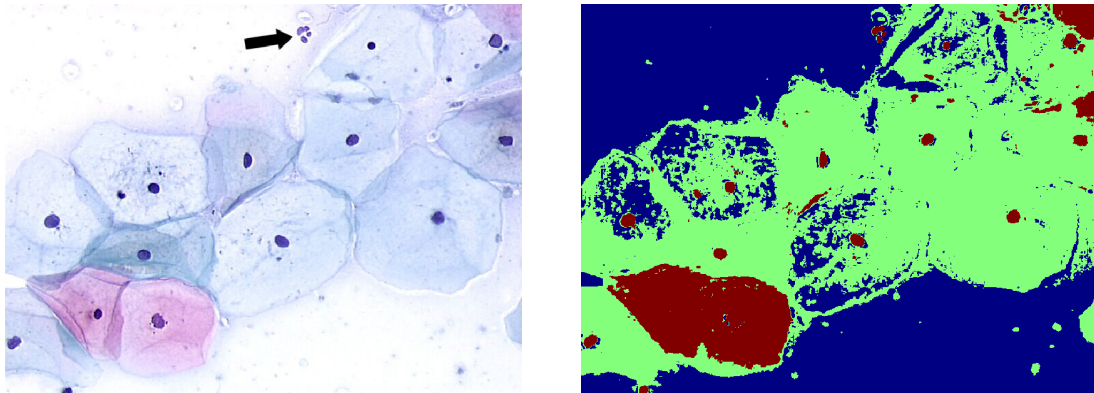
La clasificación de patrones consiste en separar grupos a partir de un conjunto inicial determinado. Para tal efecto, se asume que cada grupo debe tener ciertas características determinadas. En el caso de que se conozca exactamente el criterio que permita discriminar los grupos, el problema se conoce como clasificación supervisada, mientras que si no se conocen las etiquetas (*labels*) de cada grupo, se conoce como clasificación no supervisada (*unsupervised pattern recognition*).

Este último caso puede ser abordado por técnicas como agrupamiento de racimos (*clustering*). El agrupamiento de racimos es un método de clasificación no supervisada dado un grado de similitud entre los componentes de cada grupo [18], [19], [36]. En general, consiste en organizar los elementos en grupo de tal forma que la similitud de un elemento particular de un grupo es mayor con los otros elementos del mismo grupo que con los elementos de grupos distintos. El principal inconveniente consiste en que no es posible conocer *a priori* el número de grupos ni la estructura de datos de entrada, de modo que no hay un criterio válido exclusivo como discriminador de grupos.

Hay dos formas de implementar algoritmos de agrupamiento de racimos. La primera se llama paramétrica, y consiste en ajustar el conjunto de datos a una aproximación estadística dada; la segunda se llama no paramétrica,

consistente en agrupar los conjuntos de manera que los elementos internos posean fuertes similitudes entre sí. Por otra parte, los algoritmos no paramétricos pueden incluir criterios importantes además de la similitud inherente entre los elementos, como la distancia de un elemento particular cuando se evalúa su pertenencia o no a un grupo en alguna de las iteraciones (métodos dependientes de las vecindades) [36].

Figura 13. Segmentación por crecimiento de regiones¹²



Como se puede observar en la figura anterior, el método de crecimiento de regiones es el que tiene mejores resultados para una imagen con poco contraste entre las regiones. Posteriormente se debe usar un criterio que permita discriminar entre las regiones encontradas con el fin de caracterizar completamente la imagen.

¹² Tomada de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. La segmentación fue obtenida usando *Matlab 7.2*

1.3.3. Extracción de parámetros de imágenes digitales

El análisis de imágenes digitales involucra la extracción de características de la imagen, como medición de patrones, determinación de parámetros, clasificación, segmentación. De esta forma, el análisis de imágenes corresponde a la aplicación de algoritmos posteriores al procesamiento de la imagen realizado para el mejoramiento de sus características y la eliminación de ruido y estructuras indeseadas.

Las mediciones que se pueden realizar en el análisis de imágenes digitales se pueden agrupar en: brillo, localización, tamaño y forma [31].

- Medición de brillo

Como se ha observado previamente, el nivel de cada píxel está dado por un número entero, generalmente entre 0 y 255 (para 8 bits de cuantización), aunque es posible tener niveles de cuantización mayores de acuerdo con el dispositivo de captura. Algunos dispositivos adicionalmente presentan niveles dados por números reales, cuya conversión a números enteros se realiza mediante la aplicación de algoritmos de transformación, usando cuantización simple si el valor numérico es una función lineal de la cantidad de luz o funciones de linealización en caso contrario. La utilización de números reales se basa en el hecho de que hay parámetros que inciden en el nivel de la señal como la transformación entre el

número de fotones incidentes y el nivel representado, que sigue una ecuación no necesariamente lineal [31].

Para una adecuada medición de intensidad en una imagen digital, es preciso tener en cuenta consideraciones como la calibración de los niveles, que depende de la sensibilidad del dispositivo de captura, cantidad de iluminación, región de linealidad de los sensores y distribución de la iluminación, entre otros factores. Para una imagen policromática, el problema de la calibración es amplificado debido a que hay cuantización para cada uno de los planos de color.

Por otra parte, los niveles de intensidad no dependen únicamente de las condiciones controladas del sistema. Un dispositivo de fluorescencia, por ejemplo, ilumina con un haz láser un tejido o espécimen. Las condiciones de tintura del tejido hacen que haya variaciones del nivel de intensidad capturado por el dispositivo, de modo que la calibración debe incluir estos factores externos.

Debido a estas razones, el proceso de calibración involucra el uso de técnicas estadísticas, probabilísticas, comparación de regiones y comparación entre imágenes, entre otros métodos adicionales.

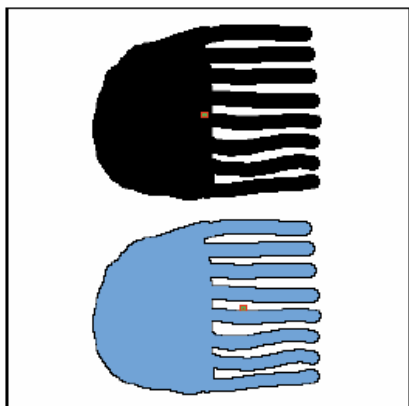
- Medición de localización

La medición de localización puede ser un proceso sencillo, de acuerdo con los requerimientos del sistema. Por ejemplo, la obtención del punto medio de un objeto en una imagen puede requerir un procedimiento elemental como el promedio de sus valores máximos y mínimos en cada una de las coordenadas x , y . Sin embargo, la localización está dada por números enteros correspondientes a

las coordenadas de los píxeles en las imágenes. Para realizar una conversión entre la localización del píxel y la localización real en unidades de medida, es necesario hacer una conversión de datos. Esta calibración puede ser un proceso complejo, pues depende de factores varios como la localización de la cámara, la perspectiva de la captura y el movimiento del objeto. A menudo, la simple utilización de un parámetro de calibración como un objeto conocido es suficiente para realizar la conversión, pero esto introduce un error acumulativo a medida que las imágenes varíen a partir de una imagen original calibrada [31].

Para determinar la posición de un objeto regular, el promedio de los valores máximos y mínimos de sus puntos extremos puede ser suficiente. Pero en el caso de un objeto irregular, este mecanismo puede conducir a errores elevados, de manera que se usan otros más precisos como la determinación del centroide del objeto. La precisión aumenta si se usan todos los píxeles del objeto, no únicamente los correspondientes a la frontera, como se muestra en la siguiente figura.

Figura 14. Localización del centroide en un objeto¹³



- a. Usando todos los píxeles del objeto
- b. Usando sólo los píxeles correspondientes a la frontera

¹³ Tomado de Russ, J., *The image processing handbook*, tercera edición

El centroide se calcula por las siguientes fórmulas:

$$C.G._x = \frac{\sum x_i}{Área}$$

$$C.G._y = \frac{\sum y_i}{Área}$$

Cercanamente ligada a la determinación del centroide, se tiene el cálculo de la orientación del objeto. Existen muchos parámetros usados para obtener aproximadamente la orientación del objeto, como el máximo diámetro de Feret, que consiste en la orientación de la línea trazada entre los píxeles más alejados del objeto, la orientación del diámetro mayor de una elipse que circunscriba exactamente al objeto, entre otros métodos. Sin embargo, existen métodos más precisos para determinar la orientación del objeto, pues no están limitados a unos pocos píxeles del objeto, sino que involucran la totalidad de los píxeles.

El eje de momento de un objeto está definido como la línea alrededor de la cual el objeto, si fuese cortado por ella, tendría un menor momento de rotación. El procedimiento para obtener el eje de momento de un objeto es sencillo, e involucra únicamente la sumatoria de las coordenadas de los píxeles y el producto de las coordenadas de los píxeles del objeto.

$$\begin{aligned}
S_x &= \sum x_i \\
S_y &= \sum y_i \\
S_{xx} &= \sum x_i^2 \\
S_{yy} &= \sum y_i^2 \\
S_{xy} &= \sum x_i y_i
\end{aligned}$$

Una vez obtenidos estos valores, mediante las siguientes fórmulas se obtienen los momentos sobre los ejes x, y y el ángulo del eje de momento.

$$\begin{aligned}
M_{xx} &= S_{xx} - \frac{S_x^2}{Área} \\
M_{yy} &= S_{yy} - \frac{S_y^2}{Área} \\
M_{xy} &= S_{xy} - \frac{S_x S_y}{Área} \\
\theta &= \tan^{-1} \left(\frac{M_{xx} - M_{yy} + \sqrt{(M_{xx} - M_{yy})^2 + 4M_{xy}^2}}{2M_{xy}} \right)
\end{aligned}$$

Además de las características de localización inherentes al objeto en sí mismo, existen otros parámetros igualmente importantes como su relación con respecto a otros objetos y la alineación de los objetos. Para una reseña más extensa, ver [6].

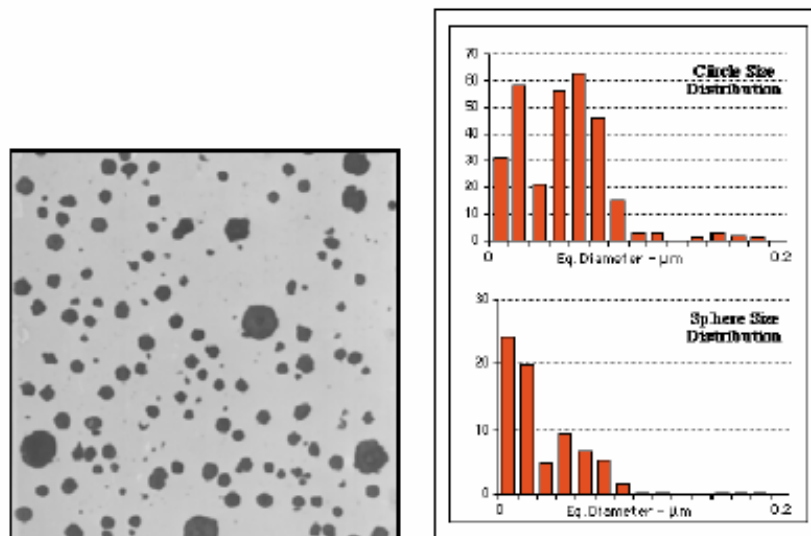
- Medición de tamaño

La medición del tamaño de un objeto bidimensional en una imagen es un proceso sencillo, consistente únicamente en el conteo de la cantidad de píxeles en el objeto. Este proceso se complica enormemente cuando la representación del objeto en la imagen consiste únicamente en la proyección bidimensional o el corte

planar de un objeto tridimensional cuyas dimensiones no son conocidas. En estos casos, se requiere de patrones de referencia, así como de un conjunto de imágenes correspondientes a diferentes perspectivas y cortes del objeto, para, por aproximación estadística, estimar el volumen real del objeto.

Un ejemplo del uso de aproximación estadística para la estimación del volumen se muestra en la siguiente figura. Se presenta un corte correspondiente a la sección transversal de un material de hierro con partículas intersticiales de grafito. Estas partículas tienen una forma casi esférica, pero la dimensión medida directamente en la imagen no corresponde necesariamente a la realidad, pues cada partícula puede haber sido seccionada cerca de la región ecuatorial o cerca de su polo, de manera que es necesario hacer una consideración estadística del tamaño real de la partícula teniendo en cuenta la distribución probabilística del corte [31].

Figura 15. Sección transversal de hierro con partículas intersticiales de grafito. Aproximación estadística del tamaño de las partículas¹⁴



¹⁴ Tomado de Russ, J., *The image processing handbook*, tercera edición

La aproximación estimada es adecuada cuando se puede determinar previamente la forma del objeto a medir, como en el ejemplo anterior, en la medición de volúmenes celulares o de estructuras en suspensión. Sin embargo, el problema es más complejo cuando no se tiene conocimiento previo de la forma general del objeto. Adicionalmente, se requiere hacer otras estimaciones cuando los objetos tienen huecos en su representación bidimensional, pues estos huecos bien pueden ser vacuidades en el interior del objeto tridimensional o indentaciones o invaginaciones en el objeto. Estos problemas específicos requieren de aproximaciones estadísticas más complejas que, necesariamente, implican errores adicionales en la estimación.

- Medición de forma

La medición de la forma de un objeto es uno de los problemas más complicados en el procesamiento digital de imágenes, debido a que los resultados numéricos no necesariamente guardan relación con la estimación de forma hecha por el observador humano [31]. Debido a que existe una gran cantidad de descriptores de dimensiones en un objeto, es posible establecer centenares de parámetros de forma consistentes en la combinación de relaciones entre estos descriptores. Sin embargo, existen algunos convencionalmente definidos como la redondez, parámetro de forma, relación de aspecto, elongación, convexidad, solidez, compactación, radio de modificación y extensión. Para la definición de un descriptor de forma es necesario que éste guarde relación con los parámetros de

interés buscados en un objeto, de manera que puedan ser usados como parámetros de clasificación, segmentación y reconocimiento en un sistema autónomo.

- Dominio espectral

En el procesamiento digital de imágenes se usan transformadas en dos dimensiones como la transformada de Fourier y la transformada de coseno, entre muchas otras. La utilidad de la transformación al dominio espectral no está dada únicamente en la extracción de características de la imagen o el mejoramiento de ésta, pues también puede ser aplicada a la comprensión, codificación y almacenamiento.

Transformada de Fourier

La transformada de Fourier es la más ampliamente utilizada en el procesamiento digital de imágenes [11], [16], [31]. Esto obedece a que es la transformada más conocida y al desarrollo del algoritmo de transformada rápida de Fourier que permite realizar el cómputo en tiempo reducido.

La transformada de Fourier continua en una dimensión está dada por la siguiente fórmula:

$$F(u) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-2\pi j u x} dx$$

donde $f(x)$ es la señal original y $F(u)$ es la transformada de Fourier de la señal.

Para reconstruir la señal original se aplica la siguiente fórmula, teniendo en cuenta la propiedad de dualidad de la transformada de Fourier:

$$f(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(u) e^{2\pi j u x} du$$

En el caso de señales digitales, la transformada de Fourier se define de la siguiente manera:

$$F(u) = \frac{1}{N} \sum_{x=0}^{N-1} f(x) e^{-2\pi j u x / N}$$

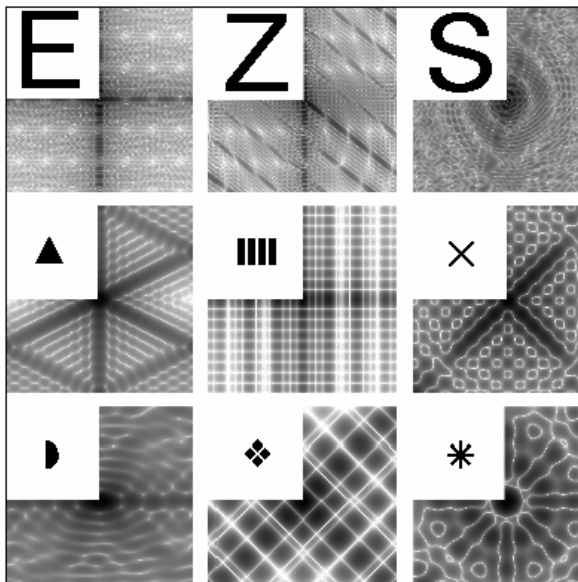
donde N es la dimensión de la señal original.

La señal original se reconstruye mediante la siguiente fórmula:

$$f(x) = \sum_{u=0}^{N-1} F(u) e^{j 2\pi u x / N}$$

En el caso de la transformada de Fourier en dos dimensiones, se trata de la aplicación cíclica de la transformada de Fourier en una dimensión, de manera que se obtiene una señal bidimensional de dimensiones iguales a las de la imagen original. Para obtener información más completa acerca de esta transformada, ver [16], [29].

Figura 16. Transformada de Fourier de algunas imágenes¹⁵



En la figura se muestra un conjunto de imágenes y su respectiva transformación espectral (la imagen está superpuesta al segundo cuadrante de la transformada). Se puede observar cómo la transformada de Fourier permite identificar a grandes rasgos algunas características de la imagen, como su orientación y la repetición de algunos parámetros periódicos.

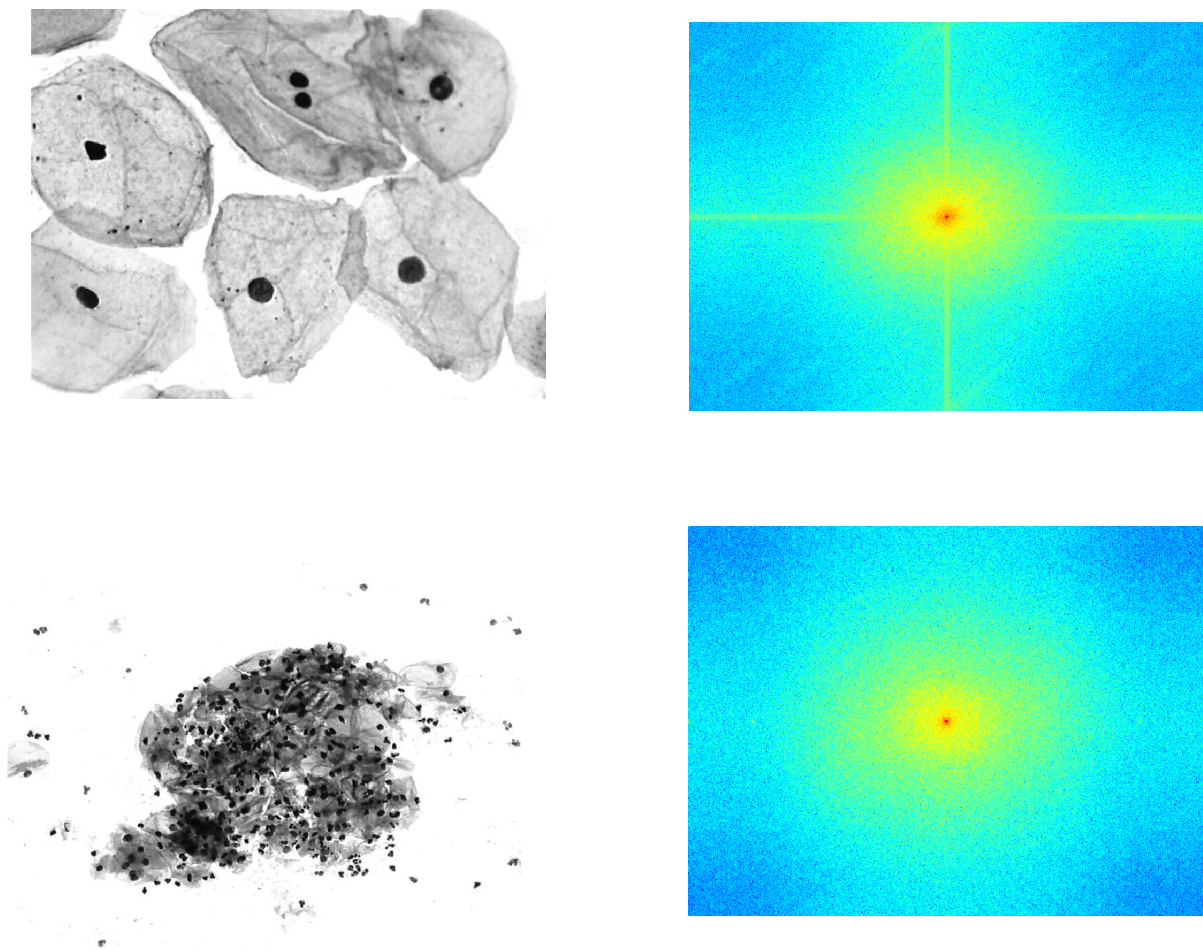
Medición de imágenes en el dominio espectral

La imagen anterior muestra cómo es posible representar repeticiones periódicas en una imagen mediante un pico en el componente espectral correspondiente a la frecuencia de repetición, orientado según la fase de la misma. En una imagen real,

¹⁵ Tomado de Russ, J., *The image processing handbook*, tercera edición

las repeticiones periódicas están superpuestas con otras estructuras no periódicas que tendrán contenido espectral igualmente representado en la transformada. Sin embargo, generalmente es más sencillo identificar los umbrales que determinan la periodicidad en el dominio espectral que intentar reconocer las periodicidades en el dominio espacial [31].

Figura 17. Imágenes de citologías de cuello uterino y sus respectivas transformadas de Fourier bidimensionales¹⁶

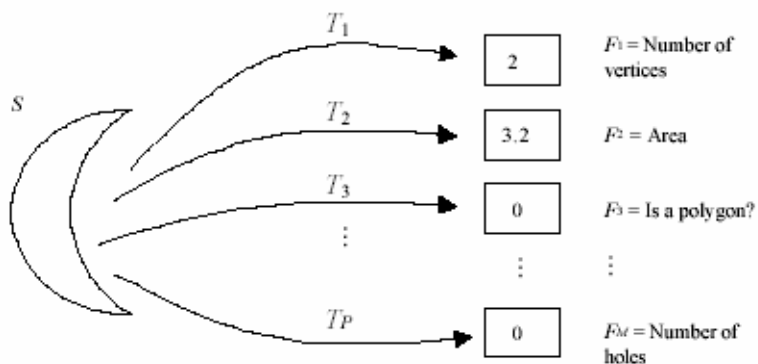


¹⁶ Tomadas de Frappart L et al, *Cytopathology of the uterine cervix*. Las transformadas de Fourier fueron calculadas y visualizadas usando *Matlab 6.3*. Las imágenes de las transformadas de Fourier están en escala logarítmica y mapa falso de color

Las figuras anteriores muestran una imagen correspondiente a microscopía usando citologías de cuello uterino, así como las transformadas de Fourier de las imágenes. Se puede observar cómo la dispersión en la transformada de Fourier, así como su orientación pueden ser usadas para determinar la orientación de la imagen en el dominio espacial, así como el promedio de los tamaños nucleares.

Actualmente, además de los parámetros reseñados, se hace uso extensivo de otros métodos como dimensión fractal, análisis armónico y descriptores topológicos en el procesamiento digital de imágenes.

Figura 18. Parámetros descriptores de una figura genérica S¹⁷



En la figura anterior se muestra una figura S y su descripción mediante algunos parámetros numéricos que corresponden al número de vértices, área, forma y número de orificios. Estos parámetros pueden servir como discriminantes adecuados en un sistema automático de reconocimiento de patrones y

¹⁷ Tomada de Fontoura, L; Marcondes, R; *Shape analysis and classification*, 2000

segmentación de objetos mediante el uso de lógica fuzzy, redes neuronales u otros métodos [31].

1.3.4. Sistemas de clasificación

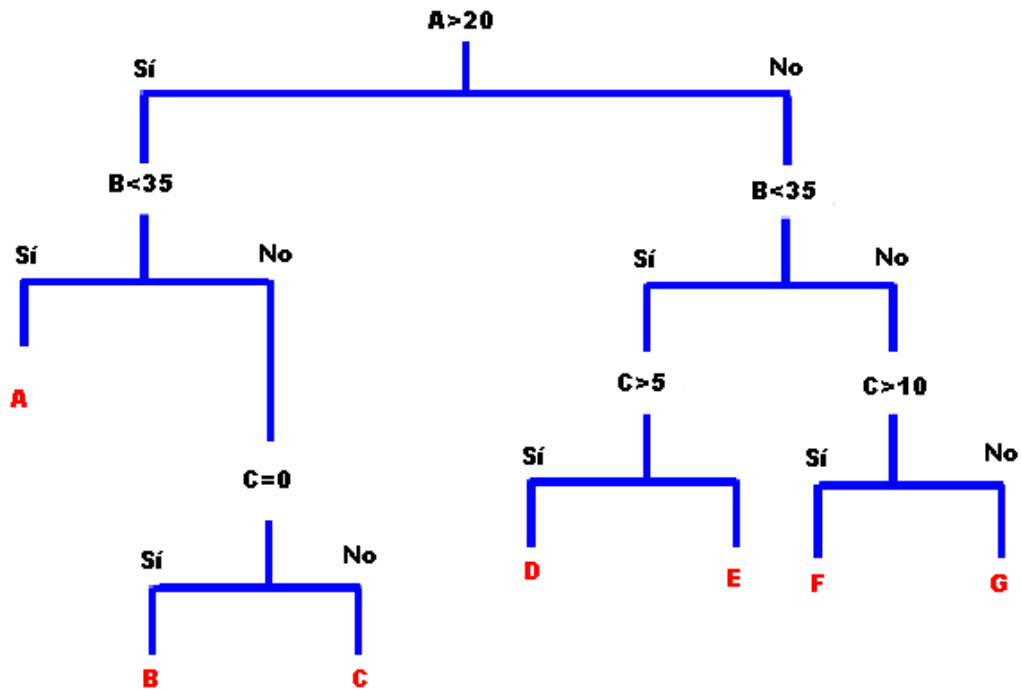
Un sistema de clasificación sirve para determinar a qué grupo pertenece un individuo o muestra de acuerdo con unos parámetros dados. Esto es, por ejemplo, un problema consistente en definir la mayoría de edad de un individuo en Colombia de acuerdo con el parámetro de su fecha de nacimiento. Si su edad es mayor o igual que 18 años, es mayor de edad. En caso contrario, no.

Existen diversos tipos de sistemas de clasificación, cuyo uso depende de la complejidad y tipo de problema [19], [21], [22], [33].

1.3.4.1. Clasificadores simples

Un clasificador simple consiste en un sistema de nodos, generalmente organizados en un árbol de decisión, en el cual en cada nodo existe una posible salida. Para efectos computacionales, los nodos normalmente son binarios, aunque existen diversas topologías y complejidades usadas. La decisión tomada en cada nodo caracteriza cada tipo de clasificador. Existen clasificadores cuya decisión depende de la aproximación a una plantilla determinada (*template matching*), clasificadores que minimizan una distancia, como el clasificador de Minkowski, clasificadores por fronteras de decisión o clasificadores cuya salida depende de una función lineal discriminante.

Figura 19. Árbol de decisión



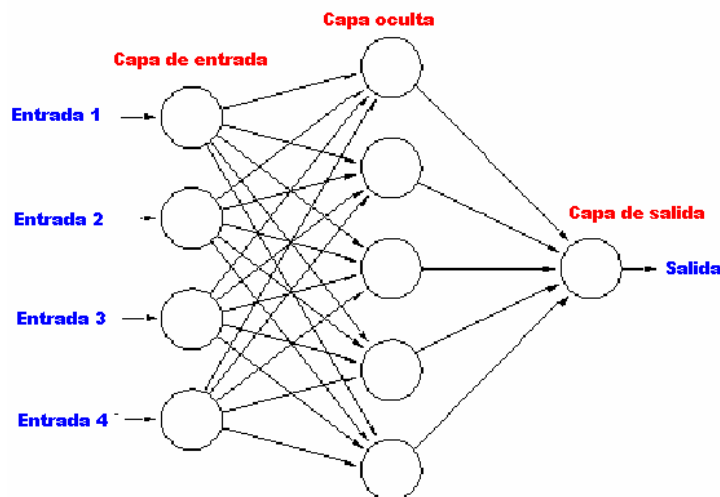
En la figura anterior se muestra un árbol de decisión, en el cual la salida de cada nodo depende de una frontera de decisión determinada previamente. Este tipo de árbol no depende de entrenamiento, al contrario de los sistemas basados en minimización de distancias, en los cuales un conjunto de datos de entrenamiento sirve para, mediante la ejecución de algoritmos de minimización, adecuar los parámetros de decisión.

Los clasificadores simples normalmente se usan en problemas en los cuales la discriminación es relativamente sencilla, debido a que cada parámetro de entrada es un elemento de discernimiento amplio y el número de parámetros es reducido.

1.3.4.2. Redes neuronales

Las redes neuronales están basadas en la arquitectura del sistema nervioso biológico. Consiste en un sistema de elementos simples operando en paralelo. En general, una red neuronal es entrenada de manera que un conjunto de datos de entrada conduzca a una salida, en la cual la similitud entre los datos de entrada y un patrón dado por el conjunto de entrenamiento permita el adecuado funcionamiento de la red. Algunos otros tipos de redes lineales y redes Hopfield son diseñadas directamente, sin procesos de entrenamiento.

Figura 20. Arquitectura de una red neuronal¹⁸



En la figura anterior se observa una red neuronal con cuatro entradas y una capa oculta de cinco neuronas. Diversos métodos de entrenamiento permiten modificar las ponderaciones de los pesos y los *bias* (valor numérico que se añade a cada

¹⁸ Imagen adaptada de http://smig.usgs.gov/SMIG/features_0902/tualatin_ann.fig3.gif

entrada ponderada) de cada neurona, de modo que se minimice la función de error.

Existen diversos tipos de redes neuronales, como las redes backpropagation, redes de base radial, redes de auto organización y aprendizaje, redes recurrentes y redes Hopfield. En esta sección sólo se enfatizará en las redes backpropagation, usadas en el desarrollo del software, para encontrar más información ver [1], [11], [23], [35].

Redes neuronales backpropagation

Generalidades

Las redes neuronales backpropagation reciben su nombre debido a la forma como es calculado el gradiente en una red neuronal multicapa de característica no lineal (es calculado hacia atrás). La red neuronal backpropagation es óptima cuando el problema consiste en la aproximación de un sistema que no puede ser definido con funciones lineales. En general, es posible aproximar cualquier función no lineal con un número finito de discontinuidades si se usa una red neuronal backpropagation con una capa sigmoidea (un tipo de función de excitación, muy usada debido a su derivabilidad en todo el intervalo).

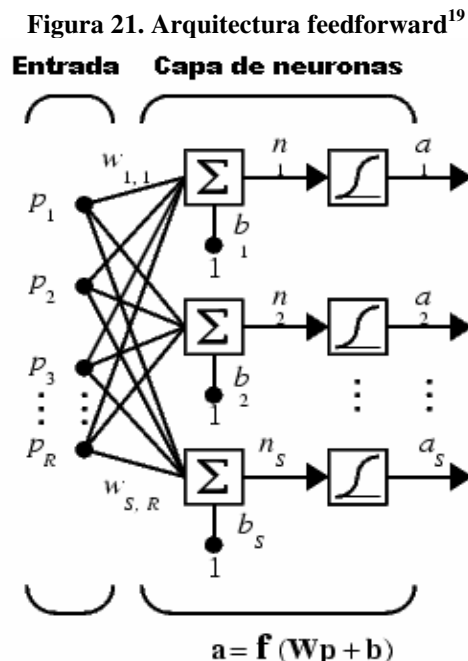
Una red neuronal backpropagation convenientemente entrenada tiende a dar aproximaciones adecuadas cuando la entrada es un conjunto de datos nunca visto (no usado en el entrenamiento). Es decir, es altamente inmune al ruido, de modo que una entrada similar a otra usada en el entrenamiento, en general produce la misma salida. Esto hace que sea posible entrenar la red con apenas una fracción

del conjunto total de datos disponibles, dejando el resto para la validación de resultados.

Estas características hacen que una red neuronal sea excelente en un sistema de clasificación basado en parámetros extraídos de una imagen digital, puesto que la naturaleza de las imágenes digitales hace que los parámetros tengan cierta variabilidad, pero la alta inmunidad al ruido de la red backpropagation disminuye notablemente sus consecuencias negativas [35].

Arquitectura de una red neuronal backpropagation

Generalmente una red neuronal backpropagation usa como arquitectura una red multicapa feedforward.

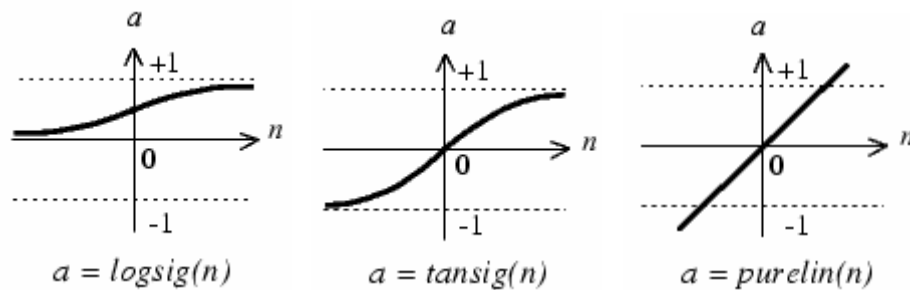


¹⁹ Figura adaptada de *Neural Network Toolbox, Matlab 7.3*.

Una red feedforward normalmente está compuesta por una o más capas de neuronas con funciones de excitación sigmoideas y una capa con función de excitación lineal. Sin embargo, muchas veces se usa una primera capa con función de excitación lineal debido a la excursión de los datos de entrada, de modo que no se sature una función sigmoidea o tansig [35].

Funciones de excitación

Figura 22. Funciones de excitación²⁰



En la figura anterior se observan los tres tipos de funciones de excitación normalmente usados en una red neuronal backpropagation. Normalmente se usan estas funciones de excitación debido a que son completamente derivables, con lo cual la velocidad de convergencia del entrenamiento aumenta considerablemente, ya que se requiere del cálculo del gradiente en los principales métodos de minimización usados para el entrenamiento [35].

²⁰ Figuras tomadas de *Neural Network Toolbox, Matlab 7.3*.

Entrenamiento de una red neuronal backpropagation

El método más básico e inicialmente usado en el entrenamiento de las redes neuronales backpropagation es el *batch training*, consistente en que los pesos de las neuronas son modificados de acuerdo con el cálculo del gradiente. Una versión con mejor convergencia es el *batch gradient descent*, en el cual los pesos son modificados en la dirección del negativo del gradiente calculado para la función objetivo. Si la modificación de los pesos no sólo depende del gradiente actual, sino las variaciones precedentes, normalmente la convergencia es mejor; esto es llamado *batch gradient descent with momentum*. La ponderación que tienen las variaciones precedentes depende de las reglas de entrenamiento y es un valor numérico entre 0 y 1 (sin incluir 0, puesto que esto sería el mismo *batch gradient descent*) llamado momentum.

Otros métodos más rápidos han sido desarrollados y se pueden resumir en:

- Rata variable de aprendizaje: Uno de los mayores inconvenientes que tiene el uso de una rata constante de aprendizaje es que un valor muy pequeño hace que la convergencia sea muy lenta y un valor muy grande ocasiona oscilaciones e inestabilidades en la función objetivo. En general, en las primeras épocas de entrenamiento es idéntico que los métodos de gradiente simple, pero cuando el error en una época excede cierto valor en relación con el anterior, la rata de aprendizaje es disminuida, de modo que las oscilaciones tienden a desaparecer.

- **Backpropagation elástico:** Como se reseñó previamente, muchas redes backpropagation usan funciones de excitación sigmoideas en sus capas ocultas. Estas funciones tienen el inconveniente de que cuando los datos de entrada son de una magnitud considerable la pendiente de la curva es muy baja, de modo que la derivada tiende a hacerse pequeña a partir de ciertos umbrales. Esto hace que la magnitud del gradiente sea muy pequeña, lo que ocasiona que las variaciones de los pesos en las neuronas en épocas sucesivas de entrenamiento sean muy pequeñas, limitando enormemente la convergencia. El entrenamiento elástico sólo considera el signo de la gradiente para el cálculo del peso en las neuronas y la ponderación del cambio depende del comportamiento del signo del gradiente en las iteraciones previas.
- **Algoritmos de gradiente conjugado:** Los algoritmos de gradiente siguen la dirección negativa del gradiente, lo cual hace que la función objetivo decrezca rápidamente. Sin embargo, esta dirección negativa generalmente no es la que garantiza la mejor convergencia. En los algoritmos de gradiente conjugada los pesos siguen la dirección del gradiente conjugado, que generalmente es de mejor convergencia que el gradiente simple. Adicionalmente, en la mayoría de los algoritmos de gradiente conjugada la tasa de aprendizaje es modificada en cada iteración de acuerdo con parámetros determinados.
- **Algoritmos Quasi-Newton:** Los algoritmos de Newton están basados en la siguiente ecuación:

$$x_{k+1} = x_k - A_k^{-1} g_k$$

Donde A_k es la matriz hessiana de los índices de la función objetivo en los valores actuales de pesos y *bias*.

Lamentablemente, el cálculo de las segundas derivadas para la matriz hessiana generalmente es muy complejo, lo cual aumentaría enormemente el costo computacional, haciendo que no se justifique la mejor convergencia a cambio de un tiempo de cálculo elevado.

Debido a esto, los métodos quasi-Newton usan aproximaciones a la segunda derivada que eviten el cálculo de la matriz hessiana.

Generalmente estos métodos tienen mejor convergencia que los métodos de gradiente y gradiente conjugada.

- Método Levenberg-Marquardt: El método Levenberg-Marquardt usa aproximaciones a la segunda derivada. La matriz hessiana puede ser aproximada según la siguiente ecuación cuando la función objetivo se acerca a una suma de cuadrados (bastante común debido a la arquitectura multicapa de la red).

$$H = J^T J$$

$$g = J^T e$$

Donde J es la matriz jacobiana, g es el gradiente y e es el vector de errores.

El método de Levenberg-Marquardt usa estas aproximaciones de acuerdo con la siguiente ecuación iterativa:

$$x_{k+1} = x_k - (J^T J + \mu I)^{-1} J^T e$$

Si se observa la ecuación se puede notar que cuando μ es 0 la iteración es idéntica al método de Newton y cuando μ es grande la iteración es igual a la de gradiente con una tasa de aprendizaje pequeña. El método de Newton es óptimo cuando la función error se acerca a cero. Entonces, la idea básica del algoritmo es pasar gradualmente del método de gradiente al método de Newton. Esto se hace reduciendo en cada iteración el valor del escalar μ . La reducción (o aumento, en caso de una iteración que conduzca al aumento del error) depende del cálculo de error en cada iteración.

Para ver más información acerca de las redes neuronales backpropagation y sus aplicaciones [1], [11], [23], [35].

1.3.4.3. Clasificadores bayesianos

Generalidades

Muchas veces en los problemas de clasificación y reconocimiento no existe información a priori que facilite el proceso de discernimiento. Esto es, por ejemplo, el problema de determinar el sexo de una persona que entra a la universidad en un momento dado. Debido a que existe un número más o menos igual de mujeres

y de hombres en la UIS, los únicos criterios que se pueden tomar obedecen a apreciaciones instantáneas, como apariencia física, vestuario y movimientos de la persona para intentar determinar su sexo. En cambio si se plantea ese mismo problema en la entrada de La Merced, institución educativa para señoritas en Bucaramanga, existe información adicional que hace que se pueda presumir a priori que un individuo aleatorio se puede clasificar como mujer. Esto, por supuesto, no garantiza que no haya error, pero al menos se reduce considerablemente debido a que la cantidad de mujeres que entran es mucho mayor que la cantidad de hombres.

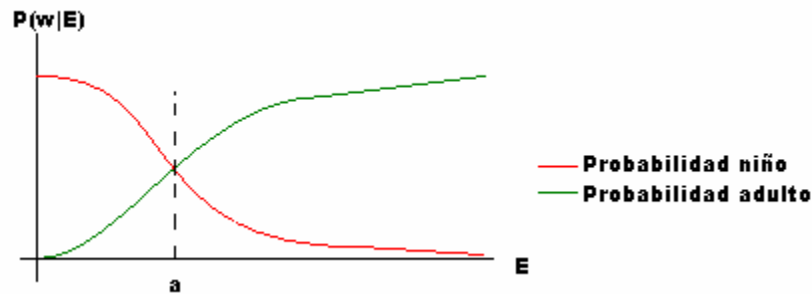
Este ejemplo simple permite entender un poco el mecanismo de los clasificadores bayesianos.

Reglas de decisión

Las reglas de decisión en los clasificadores bayesianos consisten en el conjunto de comandos usados para discriminar una región de acuerdo con las densidades probabilísticas previamente encontradas [20], [22].

Para aclarar este concepto, supóngase que existe un parámetro continuo x usado para la estimación de la clasificación, por ejemplo la estatura para la determinación de la edad de una persona en dos rangos: niño y adulto (asúmase que la desviación estándar de la estatura es muy pequeña para reducir errores en la clasificación).

Figura 23. Distribución de probabilidades para una clasificación bayesiana



En la anterior figura se observa la distribución de probabilidades para la clasificación de un individuo como niño o adulto de acuerdo con la variable continua E (estatura). Hasta un valor a es más probable que el individuo sea niño; a partir de este valor es más probable que el individuo sea adulto. Entonces un sistema bayesiano toma el valor de E y, si es menor que a , la clasificación es niño y si es mayor que a la clasificación es adulto.

Este ejemplo sencillo puede ser extrapolado para un sistema en el cual las posibles regiones de clasificación no sean sólo dos añadiendo las distribuciones de probabilidad para cada una de las regiones. Adicionalmente, es posible que se usen más parámetros de evaluación (para el ejemplo anterior, supóngase que se añada también la variable de masa corporal). En este caso la gráfica se convierte en tridimensional, pues se debe agregar otra dimensión. Incluso, por supuesto, puede haber muchos más parámetros de decisión, pero no se pueden visualizar en una gráfica por la naturaleza de la representación de un sistema n -dimensional. Las distribuciones de probabilidad son obtenidas de un conjunto de datos usados para el entrenamiento del sistema.

El principal inconveniente que tienen los sistemas de clasificación bayesianos es que son drásticamente limitados cuando el conjunto de parámetros es elevado, pues el cálculo de las distribuciones de probabilidad en el rango de excursión de datos para todos los parámetros puede ser muy dispendioso y requiere de un conjunto de entrenamiento muy grande. Por otra parte, según se observa en [21], una red neuronal debidamente entrenada tiene un comportamiento que simula y mejora los resultados de un sistema por clasificadores bayesianos.

1.3.4.4. Lógica fuzzy

La lógica fuzzy está relacionada con la teoría de los grupos dispersos, en la cual la clasificación está determinada por fronteras difusas entre las distintas regiones. Es decir, no existe un límite determinado que fije con certeza la frontera entre las regiones. La principal ventaja de esta aproximación como método de clasificación está en que se acerca a la forma como el razonamiento humano hace la discriminación en un proceso de clasificación y reconocimiento.

El siguiente ejemplo permitirá una primera aproximación a la lógica fuzzy: Supóngase que se va a evaluar la compra de un libro de acuerdo con dos variables: calidad del libro y precio del mismo. Una aproximación usando técnicas no difusas podría ser la siguiente:

$$E = \frac{C}{P}$$

Donde E es la evaluación, C es la calidad y P es el precio (usando ponderaciones numéricas para estas variables).

Una aproximación difusa es distinta. Se podría definir que la calidad es buena o mala y el precio es alto o bajo y, en vez de obtener un resultado numérico para la ponderación, establecer un conjunto de algoritmos de evaluación:

- Calidad buena, precio bajo: evaluación excelente
- Calidad buena, precio alto: evaluación buena
- Calidad mala, precio bajo: evaluación regular
- Calidad mala, precio alto: evaluación mala

En la lógica fuzzy se debe determinar el conjunto de reglas que permitan definir cada una de las clasificaciones (calidad y precio), de manera que, una vez obtenidas estas clasificaciones, se determine la evaluación final.

Este sencillo mecanismo hace que la lógica fuzzy tenga muchas ventajas, incluyendo la fácil comprensión, la capacidad de aproximar sistemas no lineales, la inmunidad al ruido y, como se mencionó previamente, la analogía con el discernimiento realizado por el razonamiento humano.

La lógica fuzzy también tiene algunos inconvenientes. El principal de todos está en que la definición de las reglas de lógica fuzzy (en el ejemplo anterior, definir cuándo la calidad es buena o mala y cuándo el precio es alto o bajo) no necesariamente es directa y sencilla. Por otra parte, puede existir dificultad en realizar una analogía matemática con el resultado obtenido (en el ejemplo anterior, qué significa numéricamente que la evaluación sea excelente o buena o regular o mala).

2. CÁNCER

2.1. Generalidades del cáncer de cuello uterino

El carcinoma cervical tiene su origen, tanto en el canal endocervical como en el orificio cervical externo, especialmente en la unión escamocolumnar; un estudio de la Universidad del Valle encuentra compromiso de la zona de transformación en la unión escamocolumnar en el 82%, mientras que la unión escamocolumnar y el endocérnix se comprometen en el 10% y el endocérnix solo en un 8%; esto demuestra claramente cómo debe dirigirse la toma de la citología. El carcinoma escamocelular (epidermoide) comprende aproximadamente entre el 85% y 90% de los cánceres cervicales mientras que un 10% corresponde al adenocarcinoma. El carcinoma adenoescamoso y carcinoma de células pequeñas son relativamente raros. Los sarcomas primarios se describen ocasionalmente y los linfomas malignos primarios y secundarios, se han reportado en forma aislada

Para el carcinoma escamocelular, la lesión precursora es la displasia o el carcinoma in-situ, consideradas como neoplasias intra epiteliales (NIC), que tienen la probabilidad de progresar a carcinoma invasor. Este proceso puede ser considerablemente lento, observándose en algunas series que entre un 30% y 70% desarrollarán la forma invasora en un período de 10 a 12 años; sin embargo,

en cerca de un 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de carcinoma in-situ a su forma invasora en un período menor a un año.

Para convertirse en invasor, el tumor se debe abrir paso a través de la lámina basal del epitelio e invadir el estroma. Al extenderse el tumor puede finalmente manifestarse como ulceración, tumor exofítico o extensa infiltración de los tejidos subyacentes como vejiga urinaria o recto. Adicionalmente a la invasión local, el cáncer de cérvix puede difundirse a ganglios linfáticos o por vía sanguínea. Su diseminación generalmente es función de su extensión y de la progresión tumoral, por lo cual es posible observar pequeños tumores con metástasis a distancia.

Generalmente se maneja el criterio de que la mayor parte de las displasias son diagnosticadas en la mujer después de los 20 años de edad, el carcinoma in-situ entre los 30 a 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 años. Sin embargo, estas relaciones descienden en edad en la medida que se extienden en forma masiva los programas de tamizaje para la detección precoz. [58]

La mujer desde su vida intrauterina presenta constantes modificaciones del epitelio cérvico-vaginal, siendo así que antes del quinto mes de desarrollo intrauterino, la vagina y el exocérnix son cubiertos por epitelio columnar, después de lo cual el epitelio escamoso reemplaza al epitelio columnar en vagina y exocérnix. Durante la adolescencia y en el primer embarazo, el epitelio escamoso reemplaza al epitelio columnar vía metaplasia formándose una nueva unión escamo-columnar, progresivamente más próxima al orificio cervical externo. Esta

nueva unión escamo-columnar, llamada zona de transformación, es la más susceptible al efecto carcinogénico de los agentes transmitidos sexualmente. Entre estos agentes se han involucrado en diferentes épocas al virus del papiloma humano (VPH), Trichomonas, Chlamydia, y D.N.A del espermatozoide.

Las observaciones de varios estudios sugieren que después de la infección por virus del papiloma humano (VPH), muchos individuos no desarrollan signos clínicos o síntomas, pero guardan el virus por períodos variables. Los cambios morfológicos que ocurren en las células epiteliales durante la infección por el VPH se relacionan con neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC-I). Muchas de estas lesiones regresarán espontáneamente pero una pequeña proporción progresará a NIC de alto grado (NIC II-III) y a cáncer invasivo. Se estima que se requieren 4 a 5 años para la transición de NIC-I a NIC-III, 9 a 10 años de NIC-III a carcinoma invasivo subclínico y 4 a 5 años de invasivo subclínico a cáncer invasivo sintomático [39], [44], [54]

Los estimados anteriores se basan en datos de estudios de seguimiento y de registros selectos y programas de tamizaje. La existencia de un continuo morfológico de cambios progresivos y consecutivos llevando hasta cáncer cervical invasivo ha cambiado recientemente. Se ha propuesto que NIC-I y NIC-III pueden ser dos entidades separadas y que solamente NIC II-III son precursores reales de cáncer cervical. Lo anterior cambia los criterios de Hall y Walton sobre la tendencia de la enfermedad a progresar en cualquiera de sus etapas, a través

del tiempo, hacia estadios más avanzados, lo cual aún es motivo de controversia.

En la actualidad se considera que el cáncer cérvicouterino es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento. Sin embargo, éste sigue siendo uno de los principales tumores en la mujer, y contribuye con un número nada despreciable de defunciones a nivel mundial.

La lesión escamosa intraepitelial del cuello uterino varía desde un crecimiento anormal mínimo (bajo grado), que corresponde a lesiones que afectan solo el tercio inferior del epitelio, progresando en espesor hasta llegar a las capas más superficiales del epitelio (alto grado), donde las alteraciones afectan desde los dos tercios del epitelio, hasta todo el espesor del mismo. La actividad mitótica en estas lesiones se encuentra limitada a la capa basal y a las capas celulares por encima de ella.

Las anormalidades que fundamentalmente se observan en el epitelio con lesión escamosa intraepitelial corresponden a pérdida de estratificación y polaridad, ausencia de diferenciación y maduración, aumento de la relación Núcleo-Citoplasma, alteraciones nucleares como hiper cromatismo, distribución anormal de la cromatina y aumento de mitosis.

Algunos autores incluyen dentro de las lesiones intra epiteliales de bajo grado a las asociadas al VPHL, correspondientes a formación de coilocitos y discariocitos, pero en la actualidad se prefiere reportar estos cambios independientemente a las lesiones escamosas de bajo grado, porque son cambios que pueden desaparecer con el tratamiento o en forma espontánea.

El carcinoma cervical, por su extensión, se clasifica en cáncer in-situ cuando aún no ha rebasado la lámina basal epitelial, por lo que al igual que las displasias no presenta signos clínicos. Cuando rebasa la lámina basal e invade el estroma, se convierte en carcinoma invasor, el cual puede manifestarse en tres formas diferentes: Exofítico o fungiforme, infiltrativo y ulcerado, siendo la primera la más común. Histológicamente el 90% son de tipo epidermoide; por el tipo celular pueden ser de células grandes con o sin producción de queratina y de células pequeñas. Los grados histológicos se clasifican de acuerdo a la diferenciación de sus células.

2.2. Carcinoma invasor de cérvix

Estadios

Los estadios clínicos para el carcinoma de cérvix son definidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) o el American Joint Committee on Cancer's (AJCC) de acuerdo a la clasificación TNM. [47], [53]

La clasificación TNM, definida por FIGO, tiene en cuenta las características del tumor, su diseminación a ganglios linfáticos y la presencia de metástasis.

Tumor primario (T)

TX: Tumor primario en que no se evalúa su agresividad

T0: Sin evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ

T1/I: Carcinoma de cérvix confinado al útero (incluye extensión al cuerpo)

T1a/IA: Carcinoma invasor solamente diagnosticado por examen microscópico.

La invasión estromal debe tener un máximo de 5 mm. de profundidad medidos desde la base del epitelio y una extensión de 7 mm. o menos. El compromiso del espacio vascular, venoso o linfático no afecta la clasificación. Todas las lesiones visibles macroscópicamente incluso con invasión superficial son T1b/IB.

T1a1/IA1: Invasión estromal con una profundidad de 3 mm. o menos y 7 mm. o menos de extensión superficial.

T1a2/IA2: Invasión del estroma entre 3mm. y 5 mm., con extensión horizontal de 7 mm. o menos.

T1b/IB: Lesión clínicamente visible confinada al cérvix o lesión microscópica como T1a2/IA2.

T1b1/IB1: Lesión clínicamente visible de 4 cm. o menos en su mayor diámetro.

T1b2/IB2: Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm. en su mayor diámetro.

T2/II: Carcinoma de cérvix que invade más allá del útero, pero no compromete la pared pélvica ni el tercio inferior de la vagina.

T2a/IIa: Tumor sin compromiso de parametrios.

T2b/IIb: Tumor con compromiso de parametrios.

T3/III: El tumor se extiende a la pared pélvica y/o compromete el tercio inferior de la vagina, y/o causa hidronefrosis o disfunción renal.

T3a/IIIA: El tumor compromete el tercio inferior de la vagina pero no se extiende a la pared pélvica.

T3b/IIIB: El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o disfunción renal.

T4/IVA: El tumor invade mucosa de vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis (el edema de la ampolla no es criterio suficiente para clasificar el tumor como T4).

N: Ganglios linfáticos regionales.

NX: Ganglios linfáticos regionales no evaluados.

N0: No existen metástasis a ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en ganglios linfáticos regionales.

M: Metástasis a distancia.

MX: Metástasis a distancia no evaluadas.

M0: No existen metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

Agrupamiento por estadíos (AJCC)

Estado 0: Corresponde a un carcinoma in-situ (intraepitelial). No hay invasión estromal. Corresponde a los grupos Tis, N0, M0

Estado IA1: T1a1, N0, M0

Estado IA2: T1a2, N0, M0

Estado IB1: T1b1, N0, M0

Estado IB2: T1b2, N0, M0

Estado IIA: T2a, N0, M0

Estado IIB: T2b, N0, M0

Estado IIIA: T3a, N0, M0

Estado IIIB: T1, N1, M0 - T2, N1, M0 - T3a, N1, M0 - T3b, Cualquier N, M0

Estado IVA: T4, Cualquier N, M0

Estado IVB: Cualquier T, Cualquier N, M1

Estadificación (FIGO)

Estado I: Es un carcinoma estrictamente confinado al cérvix; sin extensión a cuerpo uterino.

Estado IA: Carcinoma invasor únicamente identificado microscópicamente. Todas las lesiones que se identifiquen macroscópicamente, aún con invasión superficial, son tumores estado Ib. La invasión está limitada a menos de 5 mm de profundidad y no más de 7 mm de extensión superficial.

Estado IA1: La invasión del estroma tiene una profundidad no mayor de 3 mm. y un diámetro hasta 7 mm

Estado IA2: La invasión del estroma tiene más de 3 mm, pero no más de 5 mm, de profundidad y una extensión superficial no mayor de 7 mm

Estado IB: La lesión clínica está confinada al cérvix.

Estado IB1: Lesiones no mayores de 4 cm. de diámetro.

Estado IB2: Lesiones mayores de 4cm.

Estado II

Se extiende más allá del cérvix, pero no se extiende a la pared pélvica. Compromete los dos tercios superiores de vagina.

Estado IIA: No existe compromiso de parametrios. Compromete los dos tercios superiores de vagina.

Estado IIB: Compromiso obvio de parametrios, pero no la pared pélvica.

Estado III

En el estado III, el carcinoma se extiende a la pared pélvica. En el examen rectal, no se identifica espacio libre entre el tumor y la pared pélvica. Compromete el tercio inferior de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis o disfunción renal se incluyen, excepto aquellos producidos por otras causas.

Estado IIIA: No hay extensión a la pared pélvica, pero compromete el tercio inferior de la vagina.

Estado IIIB: Se extiende a la pared pélvica, o hay hidronefrosis o disfunción renal.

Estado IV

En el estado IV se clasifican aquellos tumores que se extienden más allá de la verdadera pelvis o ha comprometido clínicamente la mucosa de la vejiga urinaria o del recto.

Estado IVA: Diseminación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.

Estado IVB: Diseminación a órganos distantes.

La enfermedad recurrente (recidiva) significa que el cáncer ha vuelto después de haber sido tratado. Puede ocurrir en el propio cérvix o aparecer en otra localización.

	Incid %	Sobr %
O Carcinoma in situ, carcinoma intraepitelial		
I Carcinoma confinado al cérvix		
IA Carcinoma preclínico de cérvix (diagnóstico únicamente por microscopio)	16	94
IA1 Invasión de estroma < 3.0 mm profundidad y 7.0 mm ancho		
IA2 Lesiones > 3.0 mm profundidad, pero no más de 5 mm de profundidad de invasión desde la base del epitelio y no más de 7 mm de ancho		
IB Lesiones más grandes que en el estado IA2, sin importar si son clínicamente vistas	37	80
IB1 Lesiones clínicas menores de 4 cm de diámetro		
IB2 Lesiones clínicas >4.0 cm diámetro		
II 2/3 superiores de la vagina, con infiltración limitada		
Involucramiento de la vagina, mas no del parametrio	8	67
IIA		
IIB Infiltración del parametrio, mas no de la pared externa	16	64
III Involucramiento de la base de la vagina o extensión a la pared pélvica lateral; todos los casos con hidronefrosis o fallas de los riñones		
Involucramiento de la base de la vagina, pero sin afectar la pared pélvica lateral	3	
III		
A		
IIIB Involucramiento de uno o ambos parametrios afuera de la pared lateral o hidronefrosis	13	38
IV Extensión más allá del pelvis		
IVA Involucramiento de la mucosa externa	3	
IVB Metástasis distante	5	11
Total:		68

2.3. Pruebas Diagnósticas

Generalidades

La citología cervico-vaginal (c.c.v) es uno de los más exitosos sucesos de la medicina preventiva. Cumple considerablemente con los requisitos exigidos para una prueba de screening (tamizaje), porque es de bajo costo, sencilla, aceptada por la paciente por su ausencia de riesgo e indolora, aceptada por la comunidad científica por su adecuada sensibilidad y especificidad, aunque en una prueba de tamizaje óptima se deberían tener valores más altos de sensibilidad.

El carcinoma de cuello uterino es uno de los flagelos que golpea duramente la humanidad de los países en desarrollo, por su elevada incidencia y alta cuota de morbilidad y mortalidad, está es la razón más importante para ahondar en el tema, para exponerlo de forma precisa y práctica a las generaciones médicas interesadas. En Colombia para 1992 las mujeres mayores de 18 años sumaban 9·500.000 y de éstas sólo 1·000.000 asistían a la toma de citología (Ministerio de Salud, Colombia).

Examen preventivo de cáncer

El examen ginecológico es uno de los exámenes más importantes para la salud de la mujer: es normal que existan miedos y ansiedades para su realización, de ahí la importancia que el equipo de salud esté en capacidad de responder la mayoría de

las preguntas que las mujeres puedan tener. El examen no solamente se utiliza para diagnosticar la enfermedad, sino principalmente para determinar los factores de riesgo que tiene la mujer para el desarrollo del cáncer. Todas las mujeres, independientemente de la edad a la que hayan iniciado actividad sexual, deben realizarse el examen anualmente.

El examen ginecológico, es un examen físico completo que incluye examen de mamas y ginecológico. Este último consiste en examen externo de vulva, especuloscopia para visualizar paredes vaginales y cuello uterino. Este tipo de examen también debe ser realizado en mujeres vírgenes, teniendo en cuenta las diversas técnicas que existen para tal fin; lo importante es que el médico debe previamente indagar si la paciente es o no virgen.

Citología cervicouterina

La citología cérvico-vaginal es un test de tamizaje diseñado para identificar pacientes quienes podrían tener lesiones premalignas y malignas ocultas que requieren evaluación cuidadosa posterior. La citología tiene todas las cualidades necesarias de una buena técnica de tamizaje, por ser fácil de realizar, aceptado por las pacientes, económico, sensible y específico; sin embargo en ocasiones es pobremente entendido y severamente cuestionado. La significativa caída de la tasa de cáncer invasivo del cuello uterino en los países donde el tamizaje citológico es aplicado en gran escala, es un testimonio de la eficacia del extendido cervical.

Desde 1940, el porcentaje de muertes en mujeres con cáncer cervical ha decrecido un 70%, en gran parte porque muchas mujeres se han sometido a un test de Papanicolaou. Aunque no es infalible, este test detecta el 95% de cánceres cervicales y, lo que es más importante, los detecta en un estado en el que todavía no se ven a simple vista y, por lo tanto, pueden ser tratados y, casi invariablemente, curados. Ocasionalmente el Papanicolaou puede identificar un cáncer endometrial o de ovarios. [48]

Una paciente con citología anormal de alto riesgo (según la clasificación de Bethesda), debe ser evaluada con colposcopia y biopsia. Pacientes con citología de bajo riesgo, debe ser sometidas a control periódico, aunque en ciertos estudios se ha observado que pacientes con citología de bajo riesgo e infección por VPH de los tipos 16, 18 y 31, tienen mayor probabilidad de desarrollar neoplasias intraepiteliales o carcinomas microinvasores. Por esta razón, el riesgo de desarrollar lesiones de alto grado se incrementa de 11 a 16.9 veces.

Frecuencia de la citología cervicouterina

La citología vaginal de acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer (Nov. 1988) se recomienda sea tomada anualmente a "Todas las mujeres que sean o hayan sido activas sexualmente o que hayan alcanzado los 18 años de edad, conjunto con un examen pélvico. Después que una mujer haya tenido tres o mas exámenes anuales consecutivos normales satisfactorios, el test puede ser hecho menos frecuente a discreción de su médico más aún si es catalogada de bajo riesgo". En

otros países se ha sugerido dejar de realizar el estudio a partir de los 50 años. El alto número de mujeres mayores de esta edad con neoplasia cervical en nuestro país, así como la reducida sensibilidad del examen en Colombia [45], obligan a mantener una conducta activa de búsqueda de la lesión independientemente de la edad.

Está demostrado que el tamizaje masivo disminuye la incidencia de cáncer de cérvix, donde, en algunos países, el carcinoma Estado la1 descendió de una tasa de 16.5/100000 a 9.7/100000 mujeres a riesgo y la incidencia global cae en un 27.4% en un promedio de 8 años (1985 – 1993). En Japón la tasa de mortalidad cae desde que se inició el programa en 1961 hasta 1994 de 12.1/100000 a 4.0/100000 mujeres; sin embargo existen problemas que no permiten descender más las tasas, como la falta de fomento en tamizaje, lento incremento en número de citologías y cobertura a mujeres jóvenes. Hoy en día el programa se orienta adicionalmente a tamizaje de cuerpo uterino para mujeres de alto riesgo (mayores de 50 años, infertilidad, postmenopausia, mujeres con menstruaciones irregulares o sangrados atípicos). [60]

Otro tema, muy importante de discusión, es el intervalo entre citologías cuando existen dos resultados negativos consecutivos; en varios países europeos este es de tres años, sin embargo en Suiza, donde la mortalidad es muy baja y el 78% de las mujeres se tamiza espontáneamente, se recomienda mantener este control cada dos años, pero no refieren si incluyen mujeres de alto riesgo. Bélgica es otro

país donde la mortalidad se redujo a 4.0/100000 mujeres, estableciendo que el cáncer de cérvix es el primer cáncer donde el tamizaje redujo efectivamente la mortalidad y se siguen realizando controles bianuales. Lo referido en la bibliografía muestra que en países de alta cultura preventiva como Suiza y Bélgica, el tamizaje se realiza cada dos años en caso de obtener resultados negativos; nuestro país se ha caracterizado por muy baja acción promocional y preventiva, por tener grupos poblacionales de bajo nivel educativo y persistir creencias negativas con respecto a la citología, además de existir alta movilidad de la población, lo cual se constituyen en fuertes motivos para considerar que el período entre la toma de citologías debe ser de un año. [55]

A nivel mundial, y con el fin de ampliar coberturas y mejorar la calidad del tamizaje en cáncer, se proponen estrategias orientadas a mujeres de bajos recursos y mayores de 40 años, consistentes en levantar mapas de riesgo, mejorar el examen clínico, establecer reuniones periódicas y distribución de la literatura; el esfuerzo vale la pena porque a medida que se implementan medidas educativas, aumenta la utilización del tamizaje. Este tipo de estrategias evitan que se presenten resultados desalentadores como en México, donde entre 1980 y 1995 se presentaron 62000 muertes, principalmente debido a las bajas coberturas y el uso tardío de los servicios en mujeres de alto riesgo. [61]

Son consideradas pacientes de alto riesgo para desarrollar lesiones intraepiteliales y cáncer cervical todas aquellas mujeres que iniciaron relaciones sexuales antes de los 18 años, tuvieron múltiples compañeros sexuales, su compañero sexual es

promiscuo, antecedente de infección por virus del papiloma humano y tabaquismo. Son de bajo riesgo las célibes y cuando ambos compañeros son monógamos. Las pacientes histerectomizadas por patología benigna son consideradas de riesgo bajo.

La eficacia de la citología en los tamizajes es dependiente de la calidad de la muestra. La citología ha sido informada, en algunas series, como técnicamente inadecuada en el 12.3%, y los hallazgos podrían subestimar las lesiones Intraepiteliales en el 17.5% de los casos. Se ha estimado que entre el 15 al 25% de los pacientes con lesiones Intraepiteliales tienen resultados normales. Tales resultados pueden ser minimizados aplicando una técnica adecuada para obtener la muestra citológica. En el laboratorio de la Secretaría Departamental de Salud de Santander, se calculó, para 1999, en 13% los extendidos realizados inadecuadamente, con probabilidad de dejar de diagnosticar 2.5 lesiones Intraepiteliales por cada 1000 citologías realizadas. [61]

La zona de transformación, la cual esta entre el epitelio escamoso del exocérvis y el epitelio columnar del endocérvis es el sitio mas común para el desarrollo de lesiones Intraepiteliales. Los resultados falsos negativos se deben en general a muestras inadecuadas de la zona de transformación, que frecuentemente progresa en el canal endocervical en la mujer post-menopáusica. Siempre debe tomarse muestra del canal endocervical con cepillo y se complementa con la espátula para el exocérvis.

En un estudio practicado por el Doctor Carlos Cuello enfatiza lo anterior cuando demuestra que citologías tomadas por personal entrenado frente a personal inexperto la relación de citologías no satisfactorias es de 1/100 frente a 40/100 señalando cuales son las causas mas frecuentes de muestras no satisfactorias.

[43]

Para obtener mejores resultados se recomienda practicarse la citología mínimo cinco días antes de la menstruación; evitar duchas vaginales, cremas vaginales, y relaciones sexuales desde tres días antes.

Existen múltiples pasos para que una citología conduzca a un exitoso manejo:

- a) Toma Adecuada: Debe tomarse muestras celulares de la unión escamocolumnar, de la zona de transformación y del canal endocervical.
- b) Adecuada Fijación: Debe fijarse en el instante de haber terminado la toma citológica.
- c) Practicar la Interconsulta: Se debe enviar un informe característico de una interconsulta médica.
- d) Citotecnólogos: Se debe contar con un grupo de Citotecnólogos calificados, sin sobrecargas de lecturas, y con un plan de educación médica continuada.

- e) Informe Citológico: Que proporcione tanto al clínico como al patólogo una efectiva comunicación.
- f) Conocimientos Clínicos Suficientes: Los que permiten una adecuada interpretación citológica y a su vez una conducta adecuada.
- g) Conocimientos clínicos suficientes: La persona encargada de tomar las muestras debe estar entrenada en las características clínicas de las lesiones y la importancia de una adecuada historia clínica.

Si se es fiel a estos pasos los falsos negativos que podrían ser hasta del orden del 50% pueden disminuirse por debajo de un 5 %.

Antes de realizar la toma de citología, es preciso tener en cuenta los siguientes parámetros:

- a) No se deben tener relaciones sexuales en las 24 horas anteriores a la toma.
- b) No debe administrarse ningún medicamento por vía vaginal en las últimas 24 horas.
- c) No deben realizarse lavados vaginales.
- d) La muestra se toma en posición ginecológica, antes de cualquier otro procedimiento o exploración, se coloca un espejo vaginal sin lubricante ya que éste puede interferir con el estudio de las células.

- e) El procedimiento no debe generar dolor a la paciente.
- f) La muestra se debe obtener de 2 sitios diferentes para estudio tumoral: porción externa del cérvix, mediante raspado con espátula. Canal endocervical, mediante cepillo apropiado por rotación del instrumento.
- g) Cuando la muestra es para estudio hormonal, se tomará de la parte superior y lateral de la vagina.

Para la toma de la muestra, se recomienda la utilización de espéculos desechables de plástico, previamente humedecidos con solución salina normal, para facilitar su introducción, sin ocasionar molestias.

La muestra del canal endocervical es la más importante, ya que abarca el sitio donde con mayor frecuencia se inician las lesiones previas al cáncer cervicouterino. Si no se recogen células de esta zona, el estudio es inútil para la detección del cáncer. Para obtener las células se utilizan instrumentos muy sencillos; como espátulas de madera o plástico con borde cortante y cepillos milimétricos o espirales plásticas que suavemente recogen las células; no se recomienda el uso de hisopos de algodón, por la afinidad que presentan las células malignas por la celulosa, lo cual genera numerosos falsos negativos. En un trabajo realizado en la población mexicana en más de 9,000 casos, se demostró que los mejores resultados se obtienen con los cepillos y espirales. Ocasionalmente después de la toma puede presentarse un ligero sangrado, que cede en forma espontánea. Las células recogidas deben extenderse cuidadosamente en forma paralela, para que se adhieran sobre una lámina

portaobjeto; de inmediato, antes que el extendido empiece a secarse, se procede a la fijación de la muestra. Es importante que la lámina utilizada para el extendido, esté previamente numerada con el código asignado a la paciente, ya sea con lápiz de cera o en lo posible con lápiz de punta de diamante. No se recomienda la utilización de cintas adhesivas, que originan riesgos de accidente al tratar de ser retiradas y alteran los reactivos; tampoco se recomienda marcar con instrumentos de tinta.

Fijación de la citología:

Las fijaciones más comunes son las de alcohol-éter consiste en la introducción del portaobjeto en una solución de alcohol etílico de 96 y éter a partes iguales, que tiene un pH de 6.8 a 7, por eso debe cambiarse la solución con cierta frecuencia, pues la evaporación del éter forma ácido acético capaz de acidificar el fijador, lo que cambiaría la capacidad tintorial de las células. También pueden fijarse sólo con alcohol etílico al 96%. Se sumerge la placa dentro del líquido seleccionado dando un tiempo de fijación de 15 minutos como mínimo y 6 días como máximo. Puede usarse también como fijador la nebulización del frotis con una mezcla de alcohol isopropílico y una materia plástica (Polietilenglicol) que se distribuye comercialmente en aerosol; para una buena fijación se debe colocar el nebulizador frente al portaobjetos a una distancia de 20 - 30 cm para evitar barrer las células. Se deja secar al aire aproximadamente siete minutos antes de transportar o colorear.

Embalaje

La lámina se introduce en un sobre o carterita diseñada especialmente para transportar placas de vidrio, para su manejo y envío. Es importante que la lámina o el sobre estén identificados con el nombre de la paciente; es esencial que la muestra se acompañe de los datos clínicos necesarios para una correcta y más completa evaluación; no importa el tiempo que transcurra antes de llegar la muestra al laboratorio, ya que las células adecuadamente fijadas duran indefinidamente, sin embargo se recomienda hacerlo en el menor tiempo posible.

En el laboratorio

A nivel de laboratorio son varios los pasos que deben realizarse cuidadosamente para obtener adecuada calidad:

A cada citología se le asigna un número progresivo de identificación y se registra cada caso en sistema computarizado para control y referencia futura, verificando previamente que el código del la paciente en la placa corresponde con el código asignado en el formato de datos clínicos.

El extendido se tiñe con los colorantes propuestos en la técnica de Papanicolaou para diferenciar más fácilmente los componentes de las células y sus cambios. Los reactivos utilizados en la coloración, deben ser filtrados diariamente, con papel

adecuado para tal fin, evitando así los contaminantes. Los extendidos se cubren con resina acrílica para proporcionar un adecuado medio refringente.

La citóloga revisará todo el extendido que debe contener entre 50 mil y 300 mil células, de acuerdo a los parámetros indicados posteriormente. Esta es una labor muy cuidadosa, que en promedio requiere de 10 minutos por placa. Debe ser realizada sólo por personal altamente capacitado y responsable, que labore con adecuadas condiciones ambientales, buen equipo óptico y sitio de trabajo ergonómico; además no debe haber recargo en el número de extendidos diarios y control de efectos distractores. Es probable que muchos de los falsos negativos sean debidos a la monotonía y la fatiga de este trabajo más que a la falta de experiencia.

El patólogo realizará control de calidad mínimo al 10% de los casos reportados por las citólogas como negativos, porcentaje que puede incrementar hasta un 20% según criterio técnico. La supervisión se realizará al 100% de los casos anormales o positivos, donde debe corroborar el diagnóstico e indicar recomendaciones en los casos que lo considere prudente. También supervisará el 100% de las citologías referidas como inadecuadas, para recomendar los correctivos necesarios a las unidades de salud.

Sistema Bethesda

En ese intento por unificar criterios sobre terminología en citología cervical, el National Cancer Institute estableció una reunión de trabajo en Bethesda, Maryland, en 1988. El segundo taller se celebró en abril de 1991, a esa nomenclatura se le designa usualmente " Sistema de Bethesda". [47]

En cuanto al sistema Bethesda para el reporte diagnóstico citológico se reconoce que:

1. Proporciona una efectiva comunicación entre el citólogo y el médico.
2. Facilita la correlación Citológica-Histopatológica.
3. Facilita la investigación epidemiológica, biológica y patológica de la enfermedad cervical.
4. Proporciona datos para análisis estadísticos y comparaciones nacionales e internacionales.

El sistema Bethesda introdujo nuevos términos como fueron:

- Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado que abarca lesiones cervicales del tipo displasia leve o N.I.C I e infección por virus del papiloma humano.
- Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado. Que corresponden a displasia moderada, severa y carcinoma in Situ (CIS), como, N.I.C II, N.I.C III.

El sistema Bethesda limita el uso del término "atipia celulares" a aquellos casos en los cuales los hallazgos citológicos son de significancia indeterminada. "Atipia" no debe ser usado como un diagnóstico para definir cambios celulares inflamatorios, preneoplásicos, o neoplásicos. Para ayudar al clínico en un reporte que incluya la palabra "atípico" debe hacer una recomendación para una evaluación adicional que puede ayudar a determinar la significancia de las células atípicas. Por ejemplo "Células escamosas atípicas de significancia no determinada (Ascus o Agus), asociadas con atrofia la recomendación puede ser "sugerimos administrar estrógenos y repetir la citología.

Anormalidades De Las Células Epiteliales

- Coilocitosis: El diagnóstico de infección por virus del Papiloma en citologías cervico-uterinas sólo debe ser emitido cuando se observan *coilocitos* o *disqueratocitos*. El cambio citológico diagnóstico del v.p.h es la célula coilocítica, cuyas características morfológicas completas se consideran patognomónicas de la infección. Los coilocitos son células superficiales o intermedias con un gran espacio vacío irregular rodeando completamente el núcleo.

Características de coilocitos:

1. Halo perinuclear amplio irregular
2. Condensación citoplasmática periférica.

3. Agrandamiento, hipercromasia y angulaciones nucleares con o sin multinucleación.

- El segundo tipo de célula asociado a la infección son los *disqueratocitos*, pequeñas células queratinizantes con núcleos picnóticos agrupadas en nidos o sabanas.

Características de los disqueratocitos:

1. acúmulos-celulares.
2. núcleos-picnoticos.
3. citoplasma acidofilo intenso.

- El tercer tipo de célula asociado es la *parabasal*. Difícil de diferenciar de células provenientes de lesiones de alto grado, su apariencia es más de tipo degenerativo que neoplásico. son

Características morfológicas:

1. citoplasma denso sucio.
2. halo perinuclear pequeño.
3. núcleos atípicos sin angulaciones.

Interpretación:

Los resultados de la prueba pueden ser diversos: “negativo” o “normal” cuando las células son normales y no ha habido cambios en ellas, “irregular” o “anormal” cuando las células son ligeramente anormales. Una prueba “anormal” se debe muchas veces a una ligera inflamación del cuello uterino. Por lo general, estas células vuelven a la normalidad sin tratamiento alguno. Normalmente, el médico recomienda que se haga una prueba citológica vaginal a los 3 o 6 meses para ver si ha habido cambios en las células. Su médico podrá hacerle una biopsia para confirmar los resultados de la prueba. En el caso de la detección de características más indicadoras de un proceso displásico, se cataloga como “sospechoso”-displasia. Cuando existe alteración celular: Esta alteración puede encontrarse en tres etapas:

- Displasia leve: Cuando hay células anormales en la superficie del cuello uterino, lo que puede indicar que hay una inflamación. Por lo general se requiere que se repita la prueba cada 3 o 6 meses
- Displasia moderada: Cuando hay una mayor concentración de células anormales en la superficie del cuello uterino. El tratamiento indicado suele ser congelamiento de las células anormales o la terapia con rayo láser. Deberá realizarse nuevas pruebas después del tratamiento.
- Displasia grave: Cuando ocurren serios cambios en las células de la superficie del cuello uterino. El tratamiento adecuado suele ser la conización u otros

métodos diversos de tratamientos. En relación con la displasia, es necesario tener en cuenta lo siguiente:

- ✓ La displasia no es cáncer.
- ✓ La evolución de la displasia es imprevisible: a veces mejora sin tratamiento médico. Otras veces persiste o empeora. Por eso es muy importante hacerse la prueba citológica con regularidad.
- ✓ Las mujeres entre 25 y 35 años de edad corren un riesgo mayor de tener esta enfermedad. “Carcinoma in situ” o “cáncer invasor”. Un resultado positivo de la prueba citológica indica la presencia de células cancerosas in situ (cáncer localizado solamente en la capa superior del tejido, sin invadir tejidos profundos) o un cáncer invasor (tumor maligno que destruye los tejidos normales cercanos). Tanto el carcinoma in situ como el cáncer invasor requerirán tratamiento, pero previamente deberá realizarse una biopsia para determinar el tipo de células. La prueba citológica vaginal permite el diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino.

3. ETAPAS DE DESARROLLO DEL SISTEMA DE DETECCIÓN DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

3.1. ADQUISICIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS IMÁGENES CITOLÓGICAS

El sistema de adquisición y almacenamiento de imágenes citológicas consta de un microscopio con seis filtros ópticos pasabanda, una tarjeta de adquisición de video *Meteor* de *Matrox* con su respectivo software de control y un computador personal con el programa *Matlab* 6.3. y 7.2

Microscopio

Microscopio American Optics con 6 filtros cromáticos

Tarjeta de adquisición de video

Tarjeta Meteor de Matrox

Computador personal

Computador Pentium III, 128 MB RAM (captura)

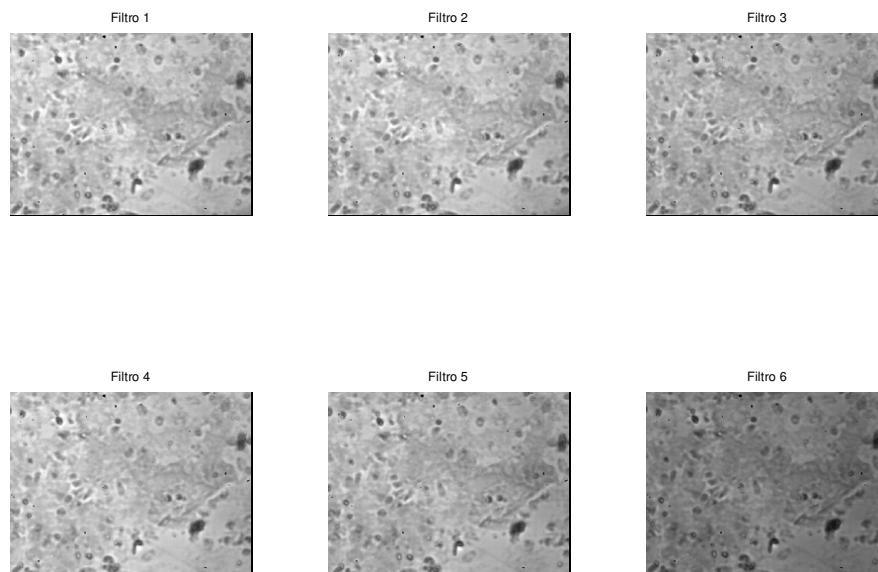
Computador Pentium IV, 512 MB RAM, 3 GHz (procesamiento)

3.1.1. Captura de imágenes citológicas

Para realizar la captura de imágenes citológicas, la lámina portaobjetos se sitúa en el microscopio, se ajustan los parámetros de intensidad luminosa, aumento (40x) y foco y se realiza una búsqueda de una región de interés en la lámina. Las características de una región de interés son las siguientes: el extendido debe ser uniforme, el espesor de la muestra debe ser pequeño (con el fin de evitar traslape excesivo en la imagen que impida su adecuada visualización), suficientes células en el campo de visión y no deben incluirse imágenes que presenten artefactos que deterioren la calidad de la muestra, como rayones en el portaobjetos, muestras sanguíneas de espesor excesivo o suciedad en la lámina. Con el fin de obtener información suficiente para un análisis adecuado, se deben seleccionar al menos seis regiones de interés por cada lámina citológica que incluyan tanto células exocervicales como células endocervicales.

Cada captura digital consta de seis imágenes monocromáticas correspondientes a los seis filtros cromáticos así:

Figura 24. Conjunto de imágenes correspondientes a los filtros cromáticos



Se decidió utilizar conjuntos multiespectrales teniendo en cuenta la actual investigación en esta área para el desarrollo de aplicaciones de sistemas de detección de anomalías, particularmente cáncer, según se observa en [27], [34]

Para efectos de conveniencia en el análisis automático de cada conjunto de imágenes, el formato determinado para el almacenamiento es como se muestra en el siguiente ejemplo:

Nombre de la imagen: 12.5.tif

Muestra 12, filtro 5, formato 'tif'

De esta manera el algoritmo puede reconocer los conjuntos de imágenes y diferenciar, de acuerdo con el segundo índice, los 6 filtros cromáticos en cada muestra.

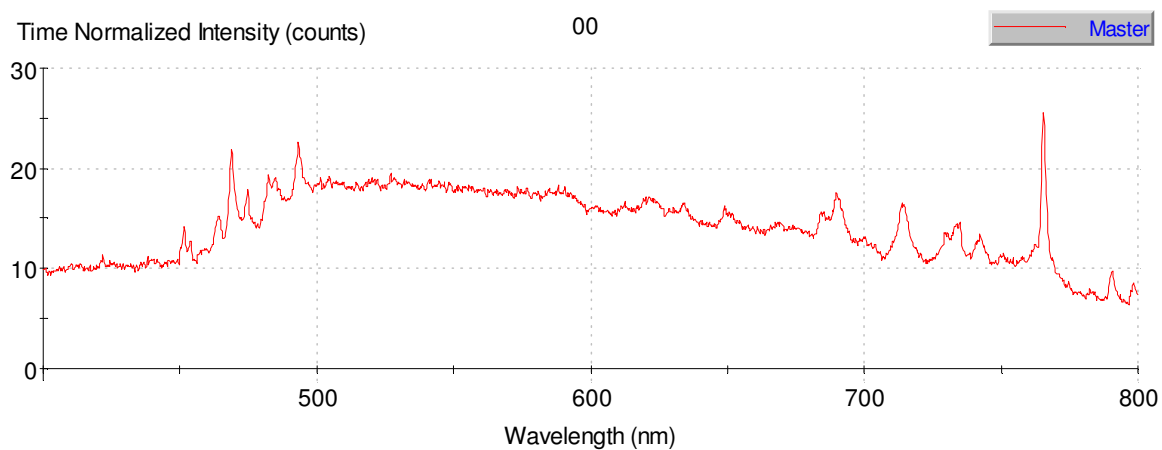
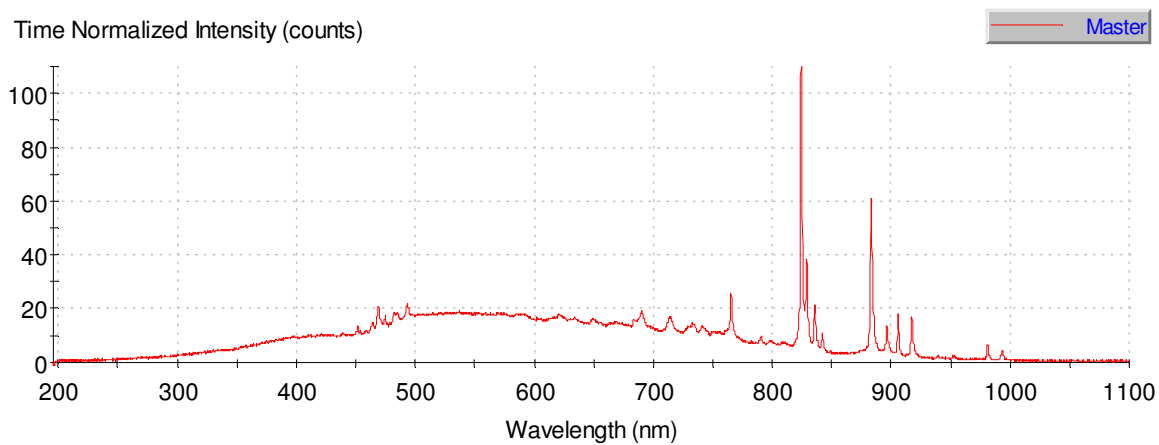
Se usó el formato TIFF (*.tif) debido a que se requiere de un formato de almacenamiento estándar que comprima datos sin pérdida de información, aunque podría usarse cualquier otro formato estándar de almacenamiento de imágenes teniendo en cuenta los posibles errores debidos a la reducción en la calidad de la imagen.

Es importante señalar que debido a la rutina de discriminación manual de las imágenes citológicas, selección de los filtros cromáticos y almacenamiento de los datos, además del rigor consistente en mantener inalterados los parámetros del microscopio (diafragma, condensador, iluminación, entre otros), la captura de las muestras demandó de un tiempo promedio de 45 minutos por lámina citológica, para un total de 80 horas en todo el conjunto almacenado. Por otra parte, de acuerdo con recomendaciones médicas de seguridad, el uso del microscopio no se excedió de 3 horas/día, de manera que el tiempo total de la etapa de captura y almacenamiento de imágenes fue de aproximadamente un mes y medio.

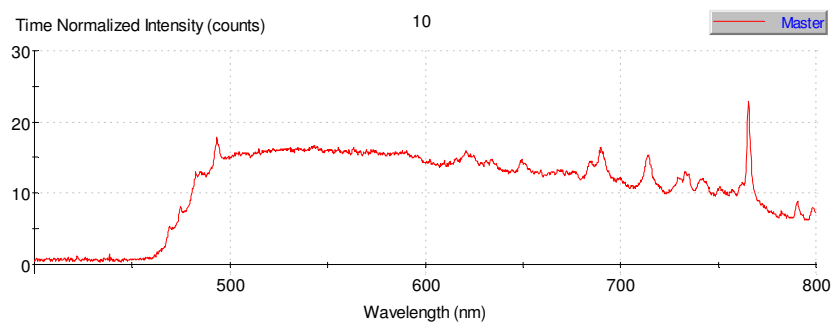
Como parte del trabajo previo a la captura de las imágenes citológicas, se realizó la caracterización de los filtros cromáticos usados para el procesamiento multiespectral, usando una fuente de luz halógena debido a su adecuada distribución espectral. A continuación se reseñan los resultados obtenidos.

Figura 25. Respuesta cromática de los filtros

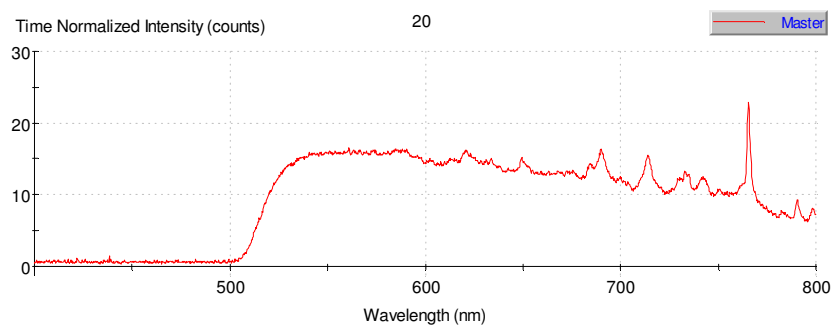
- Fuente halógena



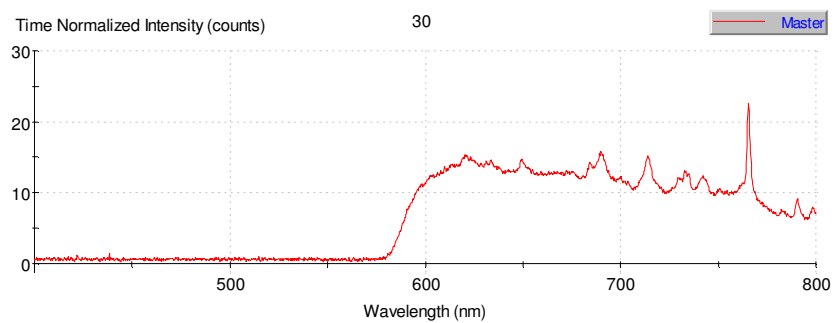
- Filtro 1



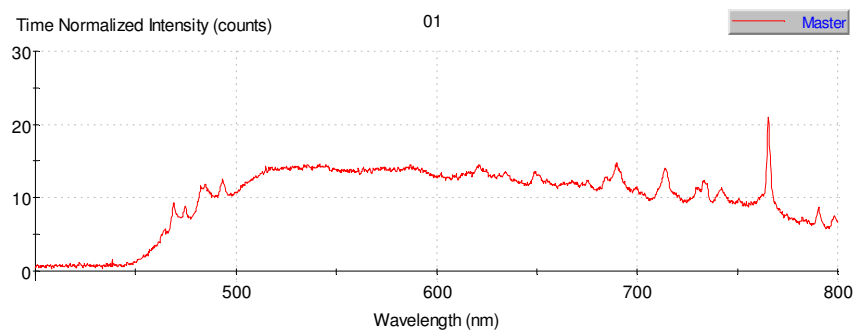
- Filtro 2



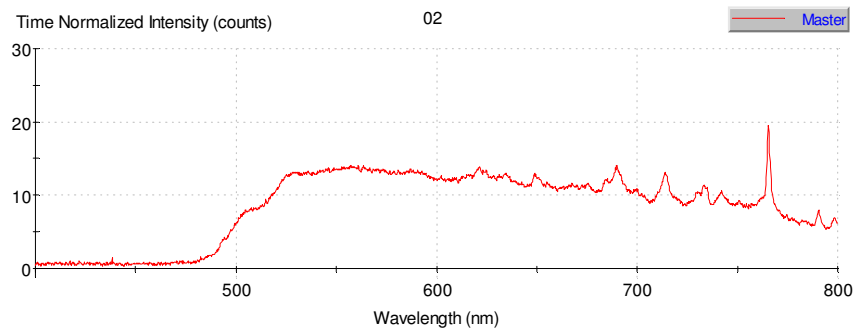
- Filtro 3



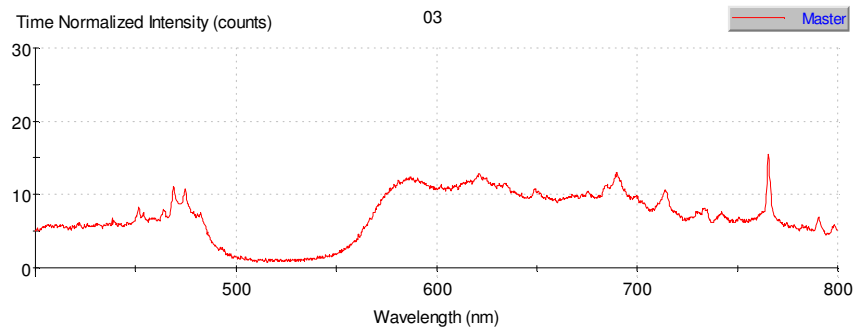
- Filtro 4



- Filtro 5



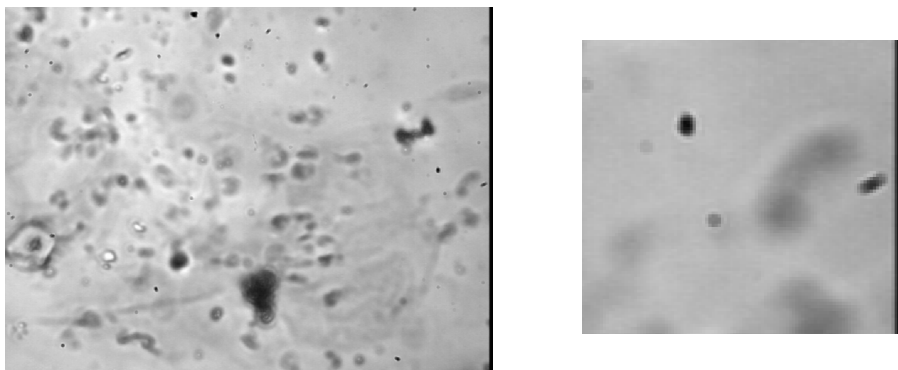
- Filtro 6



No se incluye la respuesta cromática más allá del orden de 800 nm debido a que la cámara digital cuenta con filtros que eliminan estas longitudes de onda para evitar la saturación.

3.1.2. Preprocesamiento de las imágenes y almacenamiento

Figura 26. Imagen de una muestra citológica sin procesar

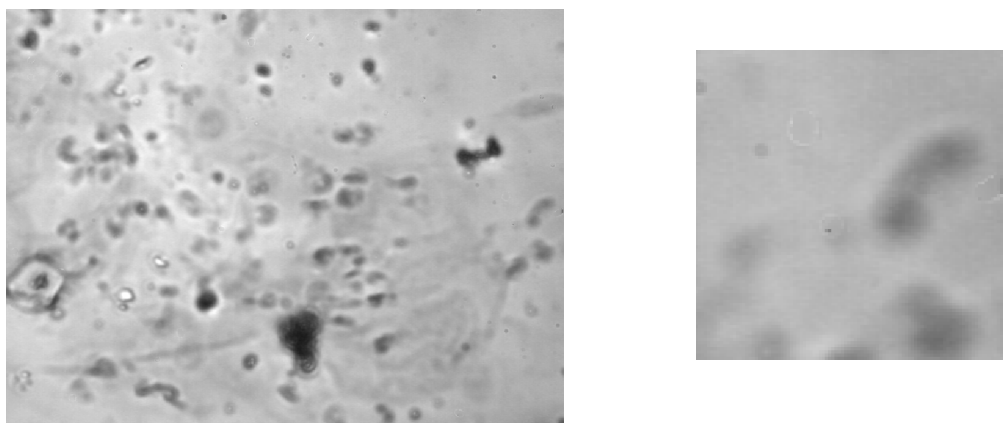


En la figura anterior se muestra la captura de una muestra en un extendido citológico completo (480*640 píxeles) y la imagen aumentada de una región en la captura. Inicialmente, se puede observar que hay una franja negra en la zona inferior de la imagen y otra en la zona derecha; adicionalmente, debido a imperfecciones en la cámara CCD (sensores deteriorados), hay pequeñas regiones oscuras en la imagen, correspondientes a ruido tipo pimienta. Teniendo en cuenta estos defectos en la imagen, se desarrolló el algoritmo *correc_imagenes.m* (anexado en el CD), que descarta las franjas oscuras de la imagen, dejando una imagen final de 477*634 píxeles y realiza una adecuación mediante mecanismos de interpolación que elimina el ruido tipo pimienta, como se muestra en la imagen corregida. Finalmente, el algoritmo almacena todas las imágenes corregidas de la carpeta seleccionada en archivos nuevos, cuyo nombre es igual al original salvo por la inclusión de la letra c como encabezado con el fin

de diferenciar fácilmente las imágenes i.e. La imagen original 34.3.tif queda corregida y almacenada como c34.3.tif.

El algoritmo desarrollado para la corrección del ruido tipo pimienta en la imagen tiene la ventaja de que no altera la calidad en el detalle de la imagen.

Figura 27. Imagen de una muestra citológica después de procesar (eliminación de ruido)



Los conjuntos de imágenes fueron almacenados en conjuntos de directorios indexados de tal manera que jerárquicamente estuviese implícito el diagnóstico patológico de cada extendido, el número de identificación de cada lámina y la procedencia de cada lámina (PROFAMILIA o Liga Santandereana Contra el Cáncer). De esta forma es posible posteriormente seleccionar aleatoriamente los conjuntos de imágenes para el entrenamiento y validación del sistema de clasificación teniendo en cuenta no sólo el estadio de clasificación sino también teniendo en cuenta otros parámetros importantes que optimicen el resultado.

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES DIGITALES

El procesamiento de las imágenes citológicas es el conjunto de transformaciones y análisis que permiten eliminar ruido y artefactos de las imágenes, separar el material extracelular, diferenciar el contenido de los núcleos y citoplasmas en las células y determinar información adecuada para obtener los parámetros usados en las redes neuronales de clasificación.

3.2.1. Procesamiento preliminar

Antes de iniciar las rutinas propias de procesamiento de imágenes, un algoritmo realiza la revisión de los archivos contenidos en el directorio seleccionado, con el fin de obtener una lista final con los archivos válidos para el análisis.

Inicialmente, se extraen los nombres de todos los archivos contenidos en el directorio. Posteriormente, se seleccionan únicamente los archivos con extensión *tif*, debido a que fue el formato digital usado para las capturas. Con una pequeña modificación, es posible hacer que se reconozca cualquier otro formato de almacenamiento digital.

A continuación, se verifica que existan conjuntos de seis imágenes con la nomenclatura usada (x.1, x.2, x.3 y así sucesivamente para los seis filtros), puesto que se requieren para el procesamiento posterior. En el caso de que alguno de los conjuntos no tenga las seis imágenes requeridas, queda descartado para el análisis y se genera una advertencia al usuario.

Es de señalar que no se implementó una rutina que verifique que la nomenclatura esté correctamente usada (es decir, la extensión .1 para el primer filtro, .2 para el

segundo y así), de manera que si involuntariamente el usuario almacenó las imágenes con nombres cruzados, el algoritmo arrojará resultados erróneos. La implementación de esta rutina no es compleja, pues algunos algoritmos de correlación, localización de puntos análogos y revisión de niveles de intensidad permiten garantizar que las seis imágenes son correspondientes y además están almacenadas en el orden requerido. El inconveniente está en que el costo computacional de estas rutinas es elevado, aumentando drásticamente el tiempo de procesamiento.

El resultado de esta rutina previa es una estructura de datos donde están almacenados los nombres de los grupos de imágenes válidos para el análisis. Esta estructura es usada posteriormente en las etapas de segmentación y extracción de parámetros.

3.2.2. Segmentación

La primera etapa del proceso de segmentación consiste en excluir el material extracelular en las imágenes. En general el material extracelular tiene niveles de intensidad luminosa menores que los encontrados en los citoplasmas y los núcleos de las células en una muestra biológica debido a que las regiones extracelulares absorben y dispersan menos luz. En el caso de las muestras citológicas no se encontró esta generalidad, puesto que, a diferencia de los extendidos biológicos normales, se presentan elementos que inducen transformaciones indeseadas en la imagen, como mucosa vaginal y restos sanguíneos. Por otra parte, los niveles absolutos de intensidad cromática en las

muestras citológicas medidos por los sensores no son estables a causa de las pequeñas variaciones en la iluminación y la distribución de la tinción papanicolaou en el extendido.

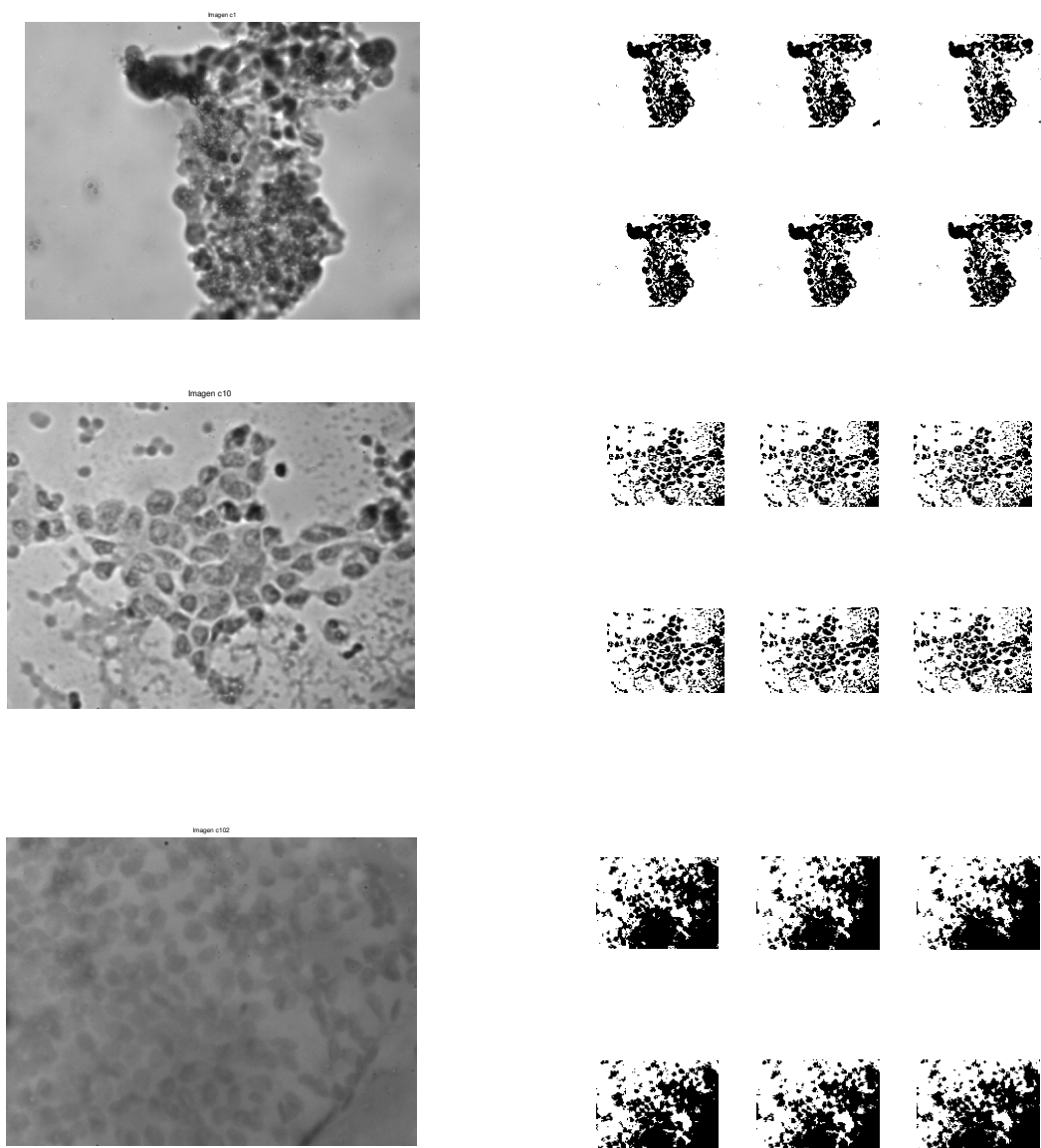
A continuación se reseñan las rutinas planteadas para la segmentación de las imágenes. Se descartó el uso de técnicas consistentes en la detección del borde citoplasmático y nuclear, debido a que algunas pruebas preliminares mostraron que los resultados no eran apropiados para la segmentación (ver sección 1.3.2.2)

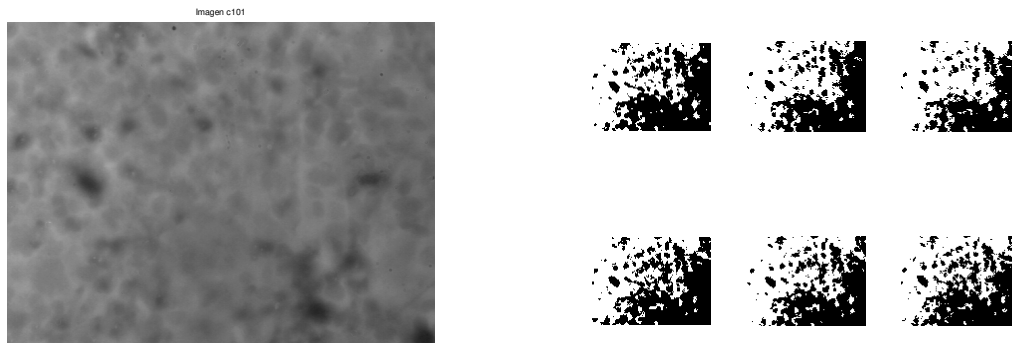
- **Métodos absolutos de segmentación**

Inicialmente se realizaron algunas pruebas de segmentación automática usando el comando *graythresh*. Este comando aplica el método de Otsu que usa criterios de minimización de la varianza cruzada entre los píxeles blancos y negros para obtener el nivel de umbral adecuado.

El algoritmo se encuentra en formato digital en la documentación adjunta. A continuación se muestran algunos resultados.

Figura 28. Segmentación de citologías usando el método de Otsu

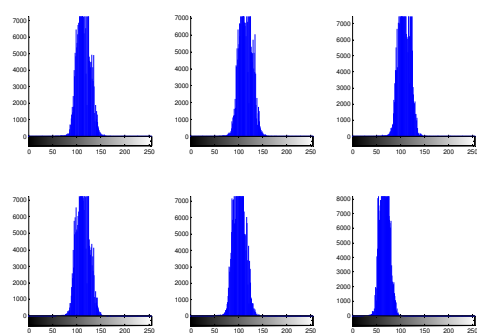
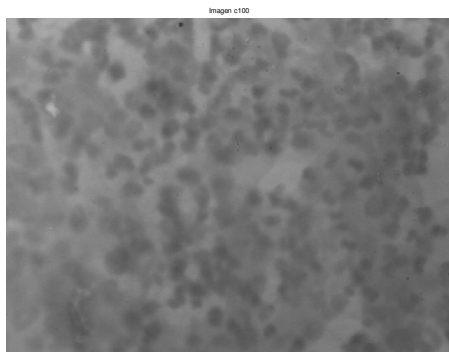
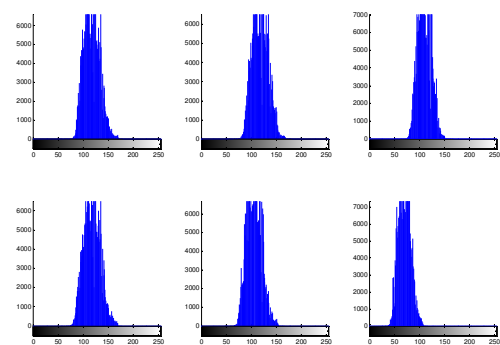
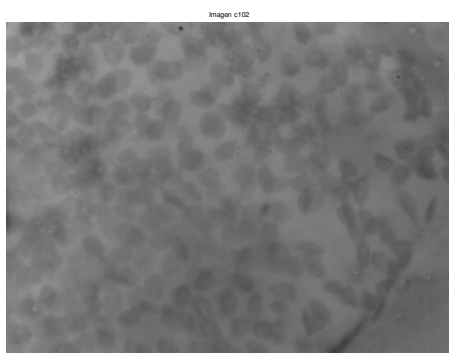
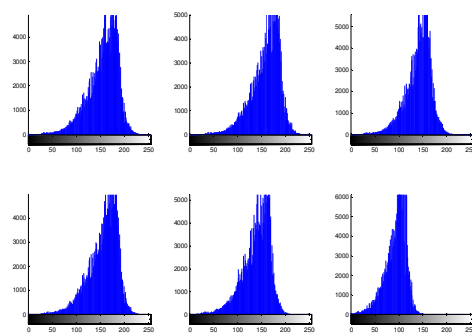
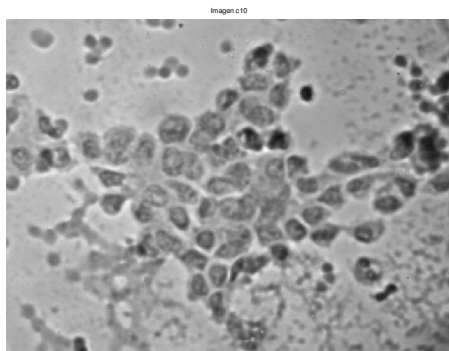
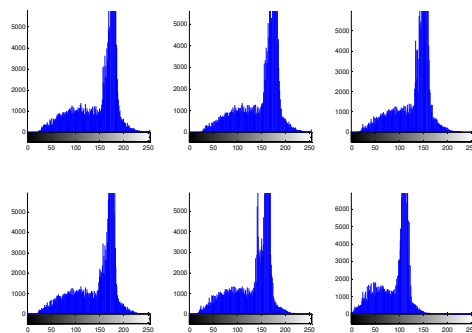
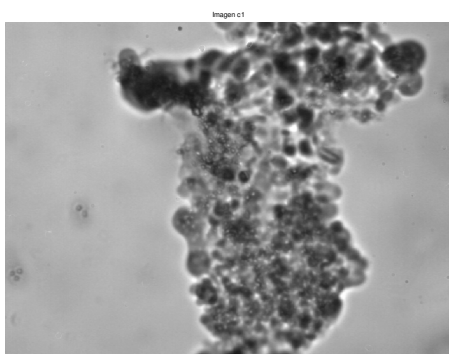




Como se puede observar, las dos primeras muestras la segmentación usando el método de Otsu es aceptable, puesto que con un sencillo procesamiento posterior se pueden eliminar las regiones incorrectamente clasificadas como *background* en las imágenes. Sin embargo, si se observa la segmentación realizada en las dos últimas muestras, es posible determinar que hay un alto índice de error, de modo que queda descartada la viabilidad de la aplicación de este método como técnica de segmentación en las muestras utilizadas.

Posteriormente se realizó un análisis de los histogramas en las muestras, con el fin de determinar la viabilidad de la aplicación de otros métodos, tales como modelamiento de regiones, consistentes en que previamente se debe asumir que cada una de las dos regiones (*background* y región de interés) tiene un histograma con comportamiento estadístico gaussiano. A continuación se muestran los resultados.

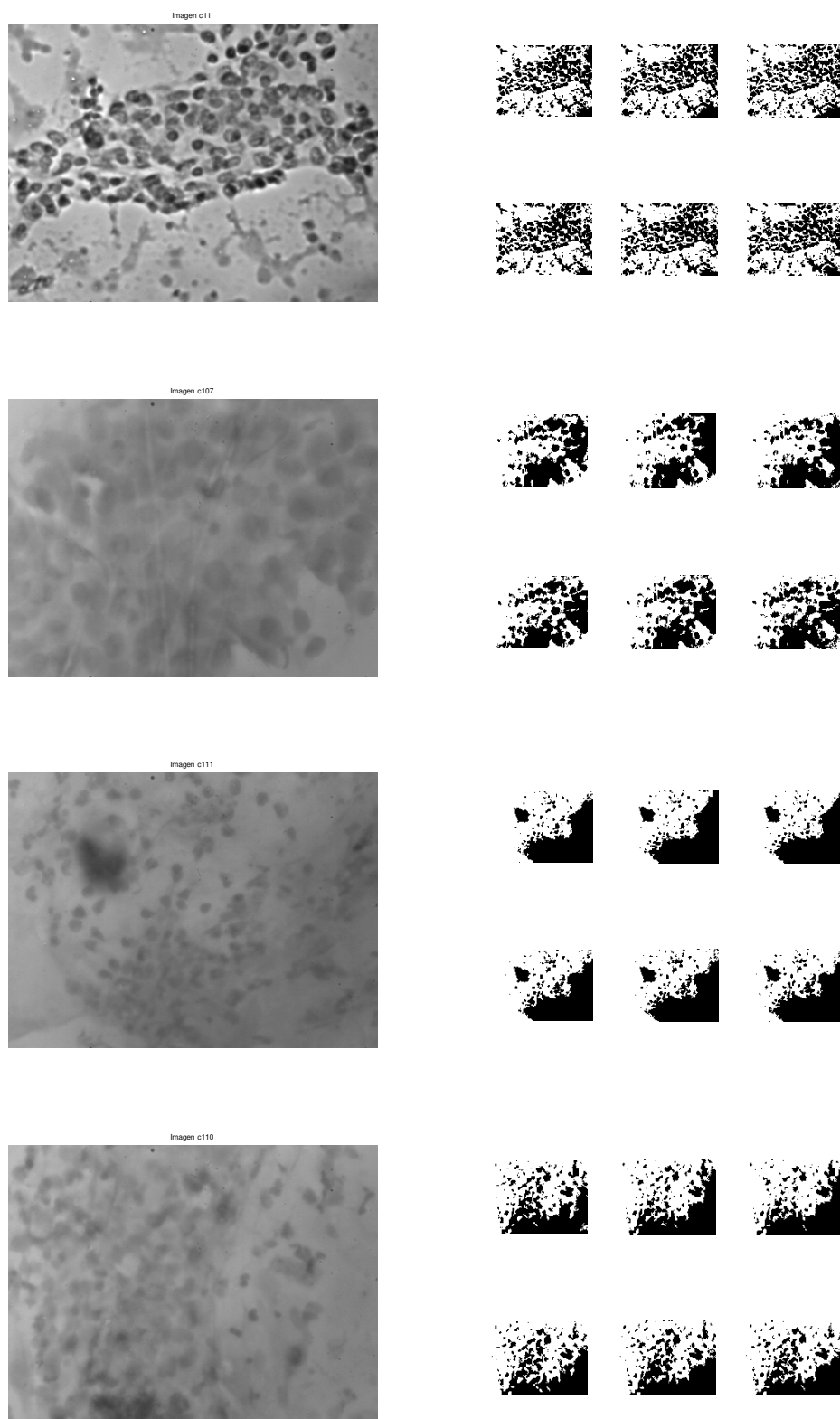
Figura 29. Histogramas de algunas muestras analizadas



Estos histogramas muestran que sólo en la primera muestra existe una clara distribución gaussiana para cada una de las regiones en las imágenes. Teniendo en cuenta esto, se mostró inviable la utilización de métodos de modelamiento de regiones.

A continuación se realizó otro procesamiento consistente en realizar la ecualización de los histogramas de las imágenes de cada muestra, con el fin de intentar corregir los errores producidos por las diferencias de iluminación (hay que reseñar, sin embargo, que la ecualización de histograma puede producir resultados no deseados cuando el contenido completo de la imagen es de material citoplasmático y nuclear, es decir, no hay material extracelular, o cuando la mucosa vaginal se extiende a todo el campo de visión; por cuanto porciones relativamente opacas se elevan a niveles considerables y pueden ser discriminados por los algoritmos de segmentación como *background*). Posteriormente se realiza una rutina de segmentación por umbrales usando una curva de histéresis de aproximación. El algoritmo completo está en formato digital en la documentación adjunta. A continuación se muestran los resultados.

Figura 30. Segmentación de imágenes citológicas usando el método de histéresis



Nuevamente se encontró que los algoritmos presentan buenos resultados en la segmentación cuando hay una clara y definida zona de material extracelular, pero presentan serias dificultades cuando la mayor parte del contenido de la imagen es material citoplasmático y nuclear. Esto es coherente con la naturaleza de los algoritmos de segmentación probados, por cuanto todos ellos asumen que en cada imagen necesariamente hay un *background* que se debe descartar (ceros en una matriz lógica) y unos objetos o regiones de interés que se deben clasificar (unos en una matriz lógica).

Tras analizar los resultados previos, se descartó realizar pruebas más complejas basadas en el mismo principio, como algunos enfoques de minimización de covarianzas sujetas a ciertas restricciones, como asumir *a priori* que el promedio de los niveles cromáticos de los píxeles de las esquinas de la imagen es cercano a los niveles de la zona considerada como *background*, por cuanto se presumió que nuevamente habría problemas significativos en imágenes cuyo contenido completo fuera celular. Por otra parte, debido a la naturaleza de las imágenes citológicas y a la metodología del trabajo, consistente en usar capturas digitales comunes no sujetas a restricciones, no se puede garantizar que en las esquinas necesariamente aparezca información del *background*.

Por otra parte, es importante señalar que todos los algoritmos previamente usados basan su discriminación exclusivamente en la información cromática individual de cada píxel. Esta aproximación induce muchos errores, ya que, por ejemplo, existen intersticios en los citoplasmas y en los núcleos que son erróneamente

clasificados como material extracelular si no se tiene en cuenta la posición relativa de estos elementos. Entonces se hizo necesario recurrir a métodos más robustos que permitan la segmentación adecuada de las imágenes.

- **Métodos relativos y segmentación multiespectral**

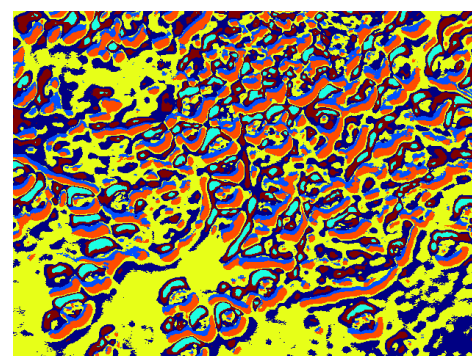
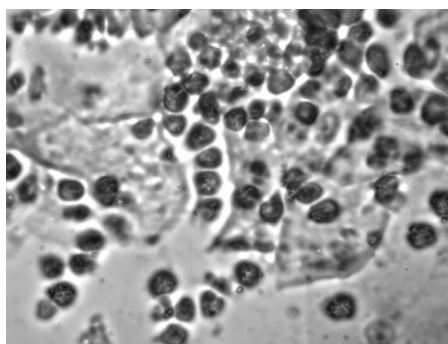
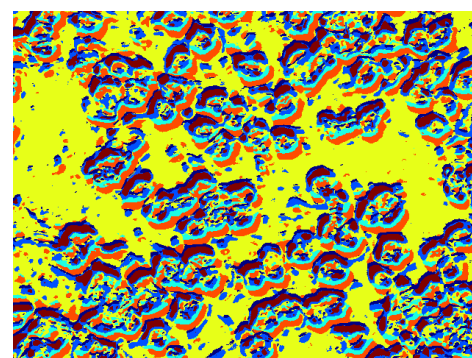
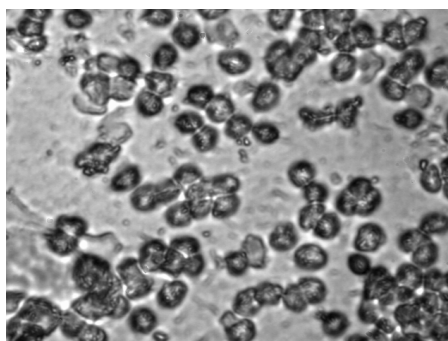
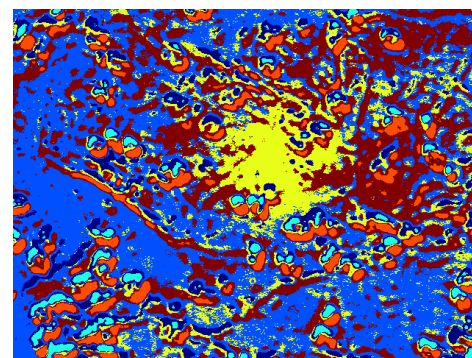
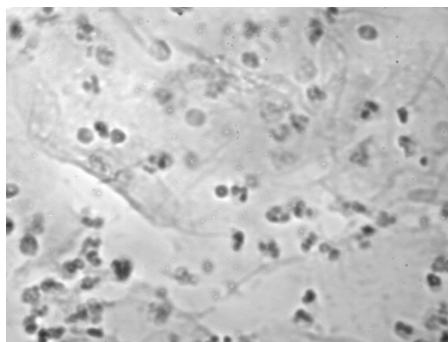
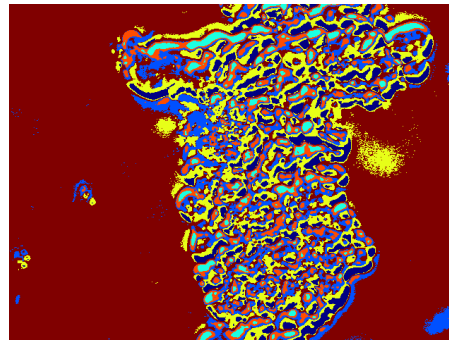
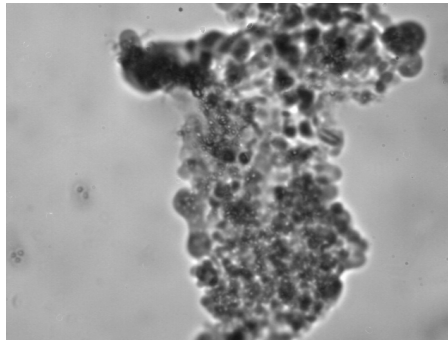
En la sección 1.3.2.2. se reseñan los fundamentos de la segmentación usando métodos de crecimiento de regiones.

El algoritmo que se usó para la segmentación está basado en una rutina de segmentación por crecimiento estadístico de regiones de acuerdo con un proceso que incluye criterios como distancias euclidianas y similitud de niveles en los planos cromáticos (teniendo como entendido que son seis planos cromáticos y no 3 planos RGB). Esta rutina de segmentación, sumada a otros criterios como umbralización de niveles y operaciones morfológicas binarias permite separar la información nuclear de la imagen completa.

El algoritmo de crecimiento de regiones inicia asumiendo un total de 6 grupos posibles. En principio, deberían ser sólo tres, pero dada la naturaleza aleatoria de la localización de las semillas iniciales, esto puede ocasionar la eliminación de alguno de los grupos, con las consecuentes fallas posteriores.

A continuación se muestran algunos resultados de la segmentación por crecimiento de regiones.

Figura 31. Segmentación por crecimiento de regiones



En las imágenes anteriores se muestran conjuntos de muestras citológicas así como su segmentación por crecimiento de regiones. Los colores en la segmentación son generados por un mapa falso de color, pues sólo corresponden a la etiqueta generada por los algoritmos de segmentación. Esta etiqueta, por sí sola, no sirve para determinar a qué tipo de región corresponde. Es decir, por ejemplo, la etiqueta número 1 puede ser correspondiente a una región citoplasmática, mientras que en otra imagen puede ser una región extracelular. Es así que en la primera y en la segunda imagen segmentada mostradas en la figura anterior, el color rojo segmenta material extracelular, y en la tercera y la cuarta segmenta material nuclear.

Debido a esto, se deben establecer unos criterios que indiquen efectivamente a qué tipo de región corresponde cada etiqueta. Para esto, se utilizan algunos métodos tradicionales de segmentación de imágenes monocromáticas, como segmentación por umbrales variables (que dependen, en gran medida, de la región de interés seleccionada por el usuario previamente); así como otros criterios de niveles cromáticos en algunos de los planos usados.

La estrategia para la selección de estos criterios es un poco compleja. Inicialmente, se pueden tomar variables como los promedios cromáticos de cada región etiquetada y, de acuerdo con ello, decidir a qué grupo corresponde. El problema es que esto no es, en general, sencillo, puesto que si se contase con una estimación cercana de los niveles cromáticos correspondientes a regiones nucleares, citoplasmáticas y extracelulares, no habría necesidad de utilizar estos algoritmos de agrupamiento por racimos. Por otra parte, tal como lo reseñan

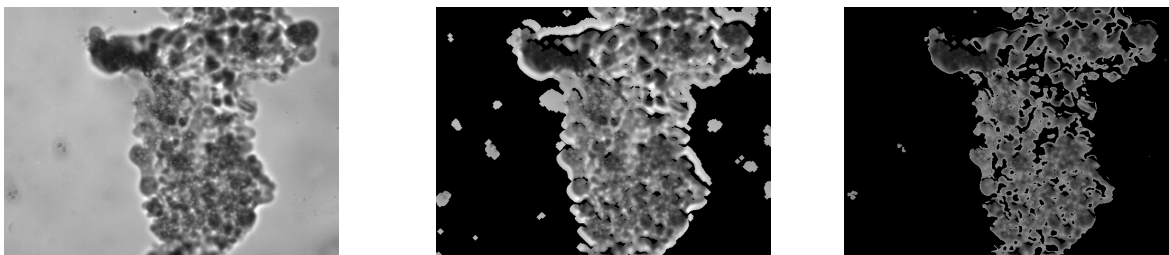
Bamford y Novell [4], [5], el principal inconveniente en la segmentación adecuada de material nuclear y citoplasmático de extendidos citológicos preparados por el proceso de Papanicolau está dado en el hecho de que el citoplasma absorbe parte considerable de la tinción. Algunos fenómenos inevitables en un extendido de esta naturaleza son el plegamiento del citoplasma, especialmente en células maduras, lo cual, en observación por microscopía óptica, fácilmente puede confundirse con material nuclear. Otros autores como MacAulay [24] han descrito exitosos algoritmos diseñados para la segmentación de los núcleos en un extendido citológico, pero usando otras tinciones como la Feulgen-Thionin y naranja, además de técnicas de preparación de muestra delgada que, lamentablemente, aumentan drásticamente (entre 10 y 15 veces) el costo de cada preparación. Teniendo en cuenta estos inconvenientes, la metodología para discriminar las regiones consistió en realizar la separación por racimos de un conjunto de aproximadamente 100 muestras. Para cada racimo obtenido, se tabularon algunas variables, como los centroides y promedios cromáticos (usando cada uno de los seis filtros). Manualmente, además, mediante la comparación entre la imagen completa y la imagen segmentada de color falso, se estableció para cada racimo la correspondencia adecuada (material nuclear, citoplasmático y extracelular). Con el conjunto de datos obtenido se realizaron dos pruebas. La primera consistió en el entrenamiento de una red neuronal cuyas entradas fueron todas las variables medidas, previamente procesadas y normalizadas, y su salida la estimación de la zona correspondiente. La arquitectura de esta red neuronal fue backpropagation, con 8 entradas, dos capas intermedias de 3 y 4 neuronas y 4 salidas. Se entrenó esta red neuronal con la mitad de las muestras y con la mitad restante se realizó la

validación, obteniéndose resultados insatisfactorios. Los algoritmos diseñados para esto están adjuntos en la documentación digital, con los nombres *racimos.m* y *redracimos.m*. Mediante una revisión del proceso, se pudo plantear la posibilidad de que la mayor posibilidad de error está dada por la presencia de zonas de alta luminosidad en la frontera entre los núcleos y los citoplasmas. Esta alta luminosidad es provocada por la curvatura de los núcleos, que ocasiona que los citoplasmas se deformen y, por efectos ópticos de convergencia, muestren un elevado brillo, generalmente asociado con el material extracelular. En consecuencia, se realizó una segunda prueba, en la cual el usuario, mediante la selección de una región de interés, indica alguna zona con estas características o, en caso de que no las haya, material extracelular. La prueba consiste en la evaluación completa de los datos tabulados y, de acuerdo con los mismos, la generación de una estructura lógica que permitió discriminar las regiones mediante la evaluación de las variables. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con la clasificación por red neuronal, pero con un costo computacional considerablemente menor.

Los datos obtenidos por el agrupamiento por racimos son adecuados posteriormente por algoritmos de operaciones morfológicas que permiten la eliminación de ruidos y artefactos.

Al final, se obtiene un resultado como el que se muestra a continuación.

Figura 32. Segmentación de una imagen citológica



En la figura anterior se muestra una imagen citológica (izquierda), eliminación del material extracelular (mitad) y segmentación de material nuclear (derecha). Como se puede observar, el algoritmo puede segmentar adecuadamente las imágenes citológicas separando el material extracelular, núcleos y citoplasmas (imagen mitad – imagen derecha). Los datos generados se almacenan en una estructura consistente en los campos siguientes: Nombre, Datos1, Datos2, Datos3, Datos4, Datos5, Datos6, DatosN1, DatosN2, DatosN3, DatosN4, DatosN5 y DatosN6, que corresponden, respectivamente, al nombre del conjunto de imágenes, matrices de imágenes sin material extracelular de cada plano cromático y matrices nucleares de cada plano cromático.

Para ver más información acerca de segmentación de imágenes de células, [4],[5],[24],[27],[30].

3.2.2. Extracción de parámetros

En la etapa de extracción de parámetros se requiere encontrar de un conjunto de variables que sean suficientes para discriminar, por el método de clasificación seleccionado, las diferentes muestras, de modo que permitan describir

completamente el fenómeno. Los criterios que se deben tener en cuenta para la selección de los parámetros son que sirvan como elemento discriminatorio, que su ortogonalidad sea alta (con el fin de eliminar redundancia) y que su cálculo computacional sea lo más simple posible (para disminuir tiempo de procesamiento) [33].

3.2.2.1. Extracción de parámetros estadísticos

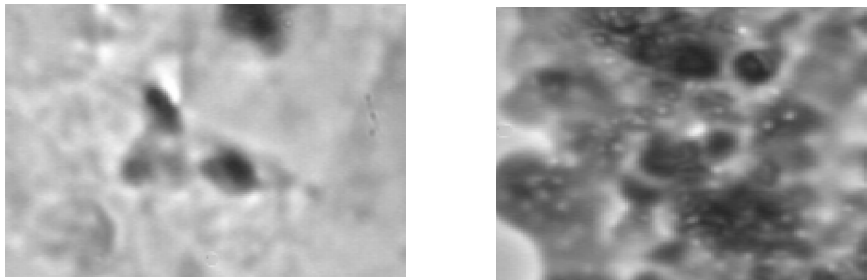
Los parámetros estadísticos seleccionados para el entrenamiento de la red neuronal de clasificación están determinados por las características citoplasmáticas y nucleares que permiten la evaluación de la muestra citológica por un especialista y por otros parámetros elegidos debido a la variabilidad observada entre muestras normales y anormales.

A continuación se reseñan los parámetros estadísticos generados por el algoritmo *ext_param_estad.m* utilizados posteriormente en la clasificación por redes neuronales.

- Desviación estándar de niveles en núcleos: La desviación estándar de los niveles de intensidad en los núcleos es un indicador indirecto de la dispersión cromática. Esta dispersión cromática es producida por la cromatina en los núcleos celulares. El aumento de la cromatina muestra la actividad genética de la célula, la cual es elevada durante los procesos de división celular y en células altamente diferenciadas (posibles patologías). En la imagen izquierda se observan núcleos normales, cuyos niveles

cromáticos son bastante uniformes, de manera que la desviación estándar de los niveles de intensidad en los núcleos es relativamente baja. Por otra parte, en la imagen derecha se observan núcleos de células malignas en un carcinoma invasor. Las texturas aparentes en los núcleos producen una elevación considerable de los valores de desviación estándar en los niveles cromáticos nucleares.

Figura 33. Imagen aumentada de una muestra normal y una muestra con carcinoma invasor



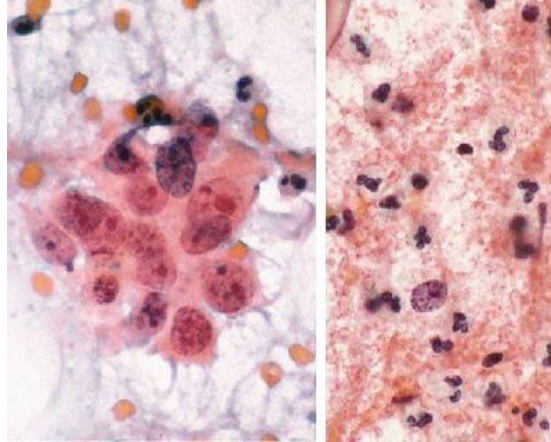
Los algoritmos para el cálculo de la desviación estándar en imágenes disponibles en *Matlab 7.0* no son aplicables para el cálculo, por cuanto realizan la operación en toda la matriz sin excluir las regiones descartadas. Es decir, incluso si la matriz cuenta con valores de cero en las regiones que no se deben considerar, el comando `std2` no puede asumir que esto corresponde a regiones descartadas. Debido a esto, fue necesario realizar la implementación completa de un algoritmo que permitiese hacer el cálculo.

- Desviación estándar de niveles en citoplasmas: Algunos criterios de malignidad celular incluyen variaciones morfológicas en núcleo y citoplasma, así como proliferación de nucleolos en la célula. Lamentablemente, la resolución de las imágenes no es suficiente para encontrar detalles pequeños como los nucleolos celulares y utilizar un aumento mayor (100x) implicaría un oneroso costo en términos de campo de visión que reduciría la cobertura del sistema completo. Sin embargo, experimentalmente se encontró, mediante correlación visual entre la imagen en la cámara y la imagen proyectada en el ocular, que aparece cierta textura particular en los citoplasmas de células con proliferación de nucleolos. Esta textura puede ser indirectamente cuantificada mediante diversos parámetros como descriptores de Fourier, filtrado y umbralizado espectral, análisis de histograma o desviación estándar de los niveles de intensidad. Se escogió como parámetro la desviación estándar de niveles debido a su bajo costo computacional y su efectiva utilidad en la discriminación de texturas citoplasmáticas.
- Promedio cromático de los niveles nucleares: La hipercromía nuclear es la tinción relativamente más oscura de los núcleos observados por microscopía óptica. Esto obedece a una mayor fijación de las tinturas (papanicolau) en los núcleos, producto de una mayor concentración de ADN nuclear. Las células malignas, además de un aumento en su concentración de ADN, presentan mayor cantidad de material genético ampliamente distribuido, lo cual origina un aumento del tamaño nuclear,

núcleos poliploides e hiperchromía. Por estas razones, la cuantificación del nivel cromático promedio en los núcleos es un parámetro que ayuda a la clasificación del estado celular. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este parámetro por sí solo no es un indicador directo de una patología, pues el aumento de tinción nuclear ocurre también en células benignas como las células columnares del endocérnix y en procesos naturales como división celular. Experimentalmente se encontró una diferenciación parcial entre células malignas y células benignas mediante la medición de este parámetro, aunque es necesario incluir otras variables en la clasificación final debido a que hay una alta variabilidad debido a factores externos como el grosor del extendido, distribución de la tinción y atenuaciones producidas por mucosa vaginal.

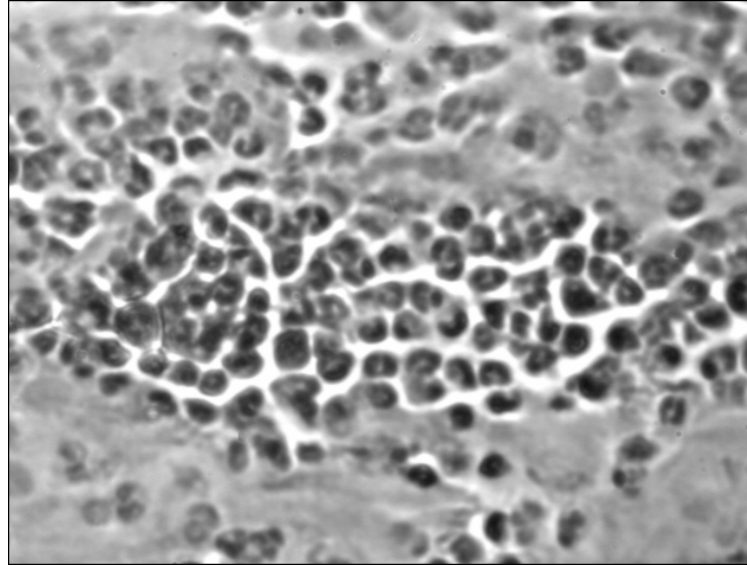
- Promedio cromático de los niveles citoplasmáticos: La caracterización de los niveles cromáticos en los citoplasmas permite normalizar los valores promedio de niveles cromáticos nucleares. Adicionalmente, en los procesos malignos en ocasiones se encuentran inclusiones citoplasmáticas eosinófilas o cianófilas que causan una variación notable en los planos cromáticos de los citoplasmas. En la figura se muestra una imagen RGB correspondiente a una muestra de carcinoma de cerviz (no se visualizan las imágenes capturadas debido a la dificultad para encontrar variaciones cromáticas en conjuntos multispectrales evaluados por el ojo humano). Se puede observar la coloración particular en los citoplasmas celulares.

Figura 34. Variación de los niveles cromáticos en células de carcinoma



- Relación núcleo-citoplasma: En las células normales la relación núcleo-citoplasma se mantiene en niveles relativamente uniformes. El aumento considerable de la relación núcleo-citoplasma es un indicador claro de una posible malignidad que no sólo sirve para la detección de una anomalía, sino además permite aproximar el grado de diferenciación de las células cancerosas. Por otra parte, el parámetro de tamaño nuclear no es adecuado por sí solo en muchos casos, pues hay variaciones nucleares en procesos de división celular y debido a factores adicionales como irradiación, procesos inflamatorios (motivo por el cual una lesión en el cuello uterino puede dificultar la caracterización de una patología cancerosa), metaplasias y regeneración celular. La relación núcleo-citoplasma, en cambio, es relativamente estable durante estos procesos (es decir, el citoplasma aumenta aproximadamente en la misma relación que el núcleo). En la figura 35 se observa este aumento de relación núcleo citoplasma en un proceso maligno.

Figura 35. Aumento de la relación núcleo-citoplasma



- Análisis de los histogramas citoplasmáticos y nucleares: Mediante análisis realizados a partir de experimentación con los histogramas nucleares y citoplasmáticos se encontró que la distribución relativa de las intensidades en los núcleos y citoplasmas es variable y representativa del estado general de las células en el extendido. El análisis de histograma es una técnica ampliamente utilizada en la determinación de descriptores para clasificación de patrones en imágenes digitales. En este caso en particular, el análisis de histograma fue una técnica apropiada y de bajo costo computacional para determinar parámetros de clasificación. El histograma de cada área (nuclear y citoplasmática) fue separado por umbrales en regiones, con el fin de calcular las distribuciones relativas de los niveles de intensidad en el conjunto total de la muestra. Una de las principales ventajas del uso de la distribución del histograma como criterio de discriminación es que tiende a

atenuar el efecto negativo de la variación de la iluminación en otros parámetros, como promedio cromático.

3.2.2.2. Extracción de parámetros morfológicos

- **Tamaño nuclear:** Como criterio normalmente aceptado, se considera que las células cuyos núcleos presenten una hipertrofia nuclear (aumento excesivo de tamaño) mayor a 12 micrones son sospechosas de malignidad. Una de las razones de este crecimiento nuclear es la poliploidia ocasionada por el aumento de ADN, pero también otros factores como el aumento de nucleoproteínas y del agua fijada en el núcleo (edema nuclear funcional). Sin embargo, existen variaciones considerables en los tamaños de núcleos normales durante el ciclo mitótico, iniciando en la metafase y concluyendo en la profase, cuando el tamaño nuclear es máximo.

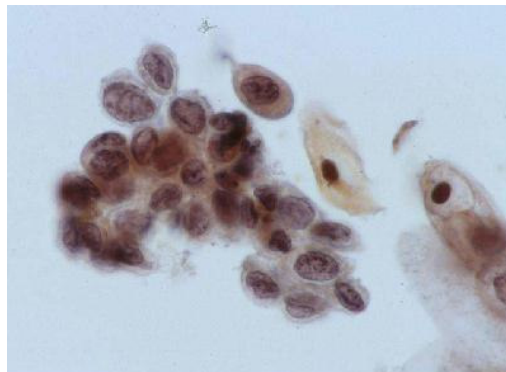
Figura 36. Aumento del tamaño nuclear en un proceso maligno



- **Circularidad:** La relación perímetro/área es un descriptor morfológico generalmente aceptado. Este descriptor permite caracterizar indirectamente

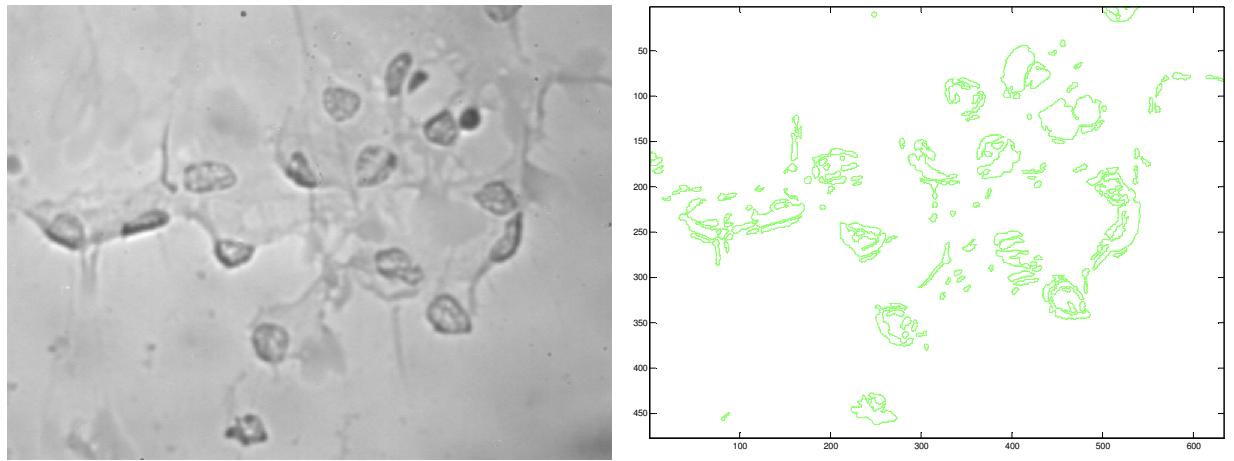
algunas propiedades morfológicas como la redondez, grado de orientación y rugosidades en el contorno del objeto. Es conveniente, sin embargo, modificar este parámetro por otro más usado que es la circularidad, consistente en la relación perímetro cuadrado/área, que es un valor normalizado y carente de unidades. Este parámetro es importante debido a que un indicador de malignidad celular es la presencia de núcleos con borde irregular y grueso. Con el microscopio electrónico se puede observar que los bordes nucleares de células malignas presentan indentaciones e invaginaciones, que, en el caso de la microscopía óptica, ocasionan el aumento del perímetro nuclear en relación con un área específica. Es preciso considerar, sin embargo, que este parámetro no es completamente suficiente descriptor de la irregularidad nuclear, por cuanto la relación perímetro cuadrado/área también aumenta cuando los núcleos son alargados, de manera que a continuación se reseña otro parámetro descriptor de la regularidad nuclear.

Figura 37. Irregularidades en los contornos nucleares



- Análisis del contorno nuclear y citoplasmático: Debido a que el parámetro de circularidad no es completamente suficiente para describir la irregularidad nuclear, el algoritmo *ext_param_morf.m* incluye una rutina de extracción de los contornos nucleares y celulares, eliminación de ruido y seguimiento y parametrización de los contornos.

Figura 38. Extracción y seguimiento de contornos



En la figura izquierda se muestra una imagen de una muestra citoplasmática y en la figura derecha se puede observar la visualización de los datos de contornos paramétricos en coordenadas x, y. El algoritmo extrae los contornos y realiza seguimiento con el fin de obtener los valores paramétricos, que son almacenados en una estructura de datos. La estructura de datos está conformada por los vectores ordenados de las coordenadas x e y de cada contorno.

Posteriormente se hace una transformación de Fourier a cada contorno, se hace un filtrado pasa-alto de la transformación espectral y se usa como parámetro descriptor la desviación estándar de los niveles espectrales restantes.

Inicialmente se realizaron pruebas de interpolación *spline* de los contornos, con el fin de atenuar los efectos de esquinas aparentes producidas por el pixelado de las imágenes, especialmente en los contornos representados por un número reducido de datos. Además, debido a la naturaleza matricial de la representación de imágenes digitales, una línea recta, por ejemplo, no aparece en general como un conjunto de datos colineales, de manera que hay un error intrínseco en la obtención de resultados.

El desarrollo de los procedimientos de análisis de contornos es uno de los más exigentes en términos de costo computacional y de memoria de todo el sistema. Teniendo en cuenta esta consideración, se realizaron pruebas de ortogonalidad de variables con el fin de determinar la viabilidad de eliminar este parámetro en el sistema final. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que no había alta correlación intrínseca entre el parámetro de análisis de contornos nucleares y citoplasmáticos y otro parámetro o conjunto de parámetros. Adicionalmente, debido a que el hecho de que no haya colinealidad de una variable no garantiza que sea indispensable como descriptor de clasificación, se realizaron entrenamientos y validaciones de las redes neuronales descartando los parámetros de análisis de contornos,

y se concluyó que no son descriptores prescindibles, por cuanto mejoran notablemente los resultados.

Esto es consistente con la información de patología del cáncer que muestra que una de las características más importantes en la evaluación de malignidad celular es el contorno nuclear, pues presenta engrosamientos e irregularidades en un proceso maligno. Adicionalmente, algunos citoplasmas displásicos tienen pseudocilios en su morfología; y estas características son descritas con cierta precisión en el análisis del contorno citoplasmático.

3.3. SELECCIÓN DE PARÁMETROS Y ENTRENAMIENTO Y VALIDACIÓN DE LAS REDES NEURONALES DE CLASIFICACIÓN

En la sección 1.3.4. se reseñan algunos sistemas de clasificación comúnmente usados y se mostró cómo el más frecuentemente aplicado en un problema de clasificación de imágenes digitales es usando redes neuronales. Debido a esto y a las limitaciones inherentes a otros métodos, como clasificadores bayesianos y lógica fuzzy, se decidió usar un sistema de clasificación por redes neuronales. A continuación se muestra el desarrollo del sistema de clasificación usado para la clasificación de las muestras citológicas.

3.3.1. Selección de los parámetros de entrada de las redes neuronales

En las etapas anteriores de extracción de parámetros se encontró un conjunto elevado de variables descriptoras de acuerdo con las características estadísticas y morfológicas de los tejidos. El conjunto de variables encontrado es descriptor apropiado de la posible malignidad celular en una muestra citológica. Sin embargo, este conjunto completo de variables no necesariamente es ortogonal, puesto que es posible que exista alguna relación altamente lineal entre variables o conjuntos de variables encontradas. En un análisis inicial, de hecho, se descartaron algunos descriptores debido a que mostraban poca ortogonalidad con otros descriptores caracterizados. Esta aproximación, sin embargo, no es adecuada, por cuanto obedece únicamente a criterios limitados de eliminación de variables. En consecuencia, se realizó una rutina de descomposición de valores singulares para computar los componentes principales de dispersión en las variables de entrada. El algoritmo diseñado para esto está adjunto en la información digital. Esta rutina está ya efectuada directamente por un algoritmo de *Matlab 7.0*, y consiste en la multiplicación de los vectores de entrada por una matriz cuyas filas son los eigenvectores de la matriz de covarianza de los datos de entrada. Las variables de entrada cuya contribución a la varianza total de los datos es menor que un umbral predeterminado son eliminadas. El procedimiento requiere que el conjunto de datos sea al menos igual que el número de variables de entrada (aunque es recomendable usar un conjunto de datos mayor), pero además se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: los datos analizados para el análisis de ortogonalidad deben ser representativos de las

diversas posibilidades de clasificación de resultados, la media de cada variable de entrada debe ser cercana a cero (con el fin de evitar errores producidos por una desacertada ponderación de los datos) y usar un conjunto de datos de entrada que exceda ampliamente, si es posible, el límite mínimo requerido.

El resultado del análisis inicial de los componentes principales en los vectores de entrada en un conjunto total de 80 entradas permitió inicialmente reducir a 30 parámetros para las redes neuronales de clasificación, eliminando los parámetros cuya contribución fuese inferior al 1% de la varianza total. Sin embargo, algunas pruebas realizadas con estos datos reducidos mostraron resultados inferiores a los obtenidos con el conjunto completo de parámetros. Esto es coherente, por cuanto incluso si la contribución de cada variable a la varianza total fuese igual, se tendría un aporte individual de 1,25%, valor muy cercano al umbral seleccionado. En consecuencia, se realizó otra prueba con una matriz de 150 entradas totales con un umbral de 0,1% y los resultados determinaron que existía una alta ortogonalidad de los parámetros analizados, de manera que los datos de entrada para el entrenamiento y validación de la red neuronal fueron inalterados.

Si bien estos resultados implican que se requiere de una red neuronal relativamente compleja para un adecuado entrenamiento, también mostraron que los criterios de selección de parámetros en las imágenes citológicas fueron apropiados, pues, aunque no necesariamente se garantiza que sean descriptores

completamente apropiados para la caracterización de malignidad celular, si cumplen el criterio importante de ortogonalidad²¹.

3.3.2. Entrenamiento de la red neuronal de clasificación

Inicialmente se hizo una prueba preliminar usando una red neuronal más reducida que la propuesta para el sistema completo, usando un número pequeño de muestras para el entrenamiento y la validación. Esta red inicial servía como indicador de la viabilidad de la clasificación usando los parámetros descriptores obtenidos en las etapas previas del trabajo. Debido a los positivos resultados, se desarrolló la red neuronal final.

Teniendo en cuenta el elevado número de parámetros de entrada para la red neuronal de clasificación, se empleó, usando criterios tanto empíricos como recomendados por la literatura, una red neuronal backpropagation con 7 neuronas en la primera capa, 5 neuronas en la segunda capa y una neurona de salida. Las funciones de excitación fueron *purelin* para la primera capa y sigmoideas en las capas restantes, debido a que los resultados en el vector objetivo de la red son limitados a únicamente dos posibilidades: 1 para una posible anomalía y 0 para una muestra normal. La función de transferencia *purelin* es adecuada con el fin de obtener un adecuado rango dinámico en la ponderación de las variables de

²¹ Es importante señalar que la alta ortogonalidad de datos de entrada en un sistema de clasificación no es factor decisivo para señalar la importancia de cada variable, por cuanto un dato cuya covarianza sea elevada no necesariamente es un parámetro requerido para la segmentación. Es por esto que además se hace necesario ponderar adecuadamente los datos de la red neuronal con el fin de estimar correctamente la contribución de cada variable en el proceso de clasificación.

entrada y la función sigmoidea sirve para ajustar los datos en el rango de salida requerido (0 y 1)²².

Los vectores correspondientes a los parámetros descriptores de las imágenes citológicas fueron normalizados, pues corresponden a dimensiones de diferente naturaleza o son completamente adimensionales.

Para el entrenamiento de las redes neuronales se usaron 100 imágenes anormales de un total de 30 láminas citológicas y 120 imágenes normales de un total de 40 láminas citológicas. Las imágenes fueron seleccionadas aleatoriamente entre las imágenes capturadas de las láminas citológicas usadas en el desarrollo del proyecto. El vector objetivo de salida es un número de doble precisión, 0 para muestras normales y 1 para muestras anormales.

Los resultados del entrenamiento de las redes usadas están descritos ampliamente en la sección 4.

²² Debido a esta característica, las funciones sigmoideas también se conocen como *squeezers* (compresoras).

3.3.3. Validación de la red neuronal

La red neuronal obtenida en la etapa anterior fue validada con un conjunto de 80 imágenes anormales de un total de 28 láminas citológicas y 80 imágenes normales de un total de 37 láminas citológicas. En este conjunto de imágenes, por supuesto, no se encontraban imágenes usadas en la etapa de entrenamiento de la red neuronal de clasificación.

Adicionalmente, se usó un pequeño grupo de 30 imágenes totales para hacer un test de validación del entrenamiento, con el fin de hacer un análisis comparativo del proceso completo y así, en caso necesario, repetir el entrenamiento inicial.

Los resultados del entrenamiento y la validación son reseñados en el capítulo 4 del libro.

3.3.4. Red neuronal de clasificación de estadíos

Como parte de trabajo adicional de desarrollo del proyecto, se entrenó una red neuronal con cuatro neuronas de salida, con el fin de intentar discriminar los diferentes estadíos de avance del proceso maligno celular. La discriminación de los estadíos no era un objetivo implícito inicialmente en el proyecto de maestría, puesto que la principal intención del sistema de clasificación es su utilidad como mecanismo de tamizaje en la detección temprana de cáncer de cuello uterino, y no un medio de segmentación y clasificación de cada estadío patológico. Sin embargo, teniendo en cuenta que las láminas citológicas utilizadas en el desarrollo

del trabajo estaban discriminadas apropiadamente en los diversos estadios patológicos (ASCUS, LSIL, HSIL, carcinoma invasor), se usaron las imágenes digitales correspondientes a estas láminas con el fin de abordar el problema de la clasificación directa. Es necesario señalar que el principal inconveniente de la clasificación de los estadios patológicos está en el hecho de que en una lámina citológica anormal no todas las células presentes tienen características anómalas. Es decir, la presencia de un solo campo de visión con células LSIL es suficiente para determinar la patología, sin importar que en los otros campos de visión en la lámina las muestras sean normales. Esto implica que la selección de las imágenes usadas en el entrenamiento de la red neuronal fue muy riguroso y sujeto principalmente al error de que durante el proceso de captura no se contaba con un especialista en el tema y fue necesaria la ponderación del autor del proyecto (debido a que la captura de imágenes se realizó en el Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales de la UIS).

Los resultados obtenidos se reseñan en el capítulo 4 del libro.

3.4. INTERFAZ GRÁFICA DE USUARIO

La interfaz gráfica de usuario fue desarrollada en el entorno de desarrollo GUIDE de *Matlab 7.0*. En realidad, el sistema final tiene tres interfaces correspondientes a procesos diferentes de análisis, entrenamiento y adquisición de imágenes.

3.4.1. Interfaz de visualización y análisis

La interfaz principal contiene los elementos básicos de selección y visualización de imágenes válidas para la evaluación automática, selección del directorio en el cual se realizará el análisis, análisis completo (todos los conjuntos de imágenes en el directorio seleccionado), análisis sencillo (únicamente los 6 planos cromáticos correspondientes a la imagen seleccionada) y generación de reportes. El análisis se realiza usando la red neuronal predeterminada.

Selección y visualización de imágenes: El usuario selecciona una imagen para su visualización en pantalla. Adicionalmente, esta imagen es utilizada en el caso de realizarse análisis sencillo de datos.

Selección de directorio: El usuario selecciona el directorio en el cual están almacenadas las imágenes a analizar o visualizar.

Análisis completo: El sistema realiza el procedimiento completo (segmentación, obtención de parámetros, simulación de la red neuronal y obtención de resultados) en todo el conjunto de imágenes en el directorio seleccionado.

Análisis simple: Procedimiento completo de análisis únicamente en los datos correspondientes a la imagen seleccionada (visualizada en pantalla).

3.4.2. Interfaz de entrenamiento

La interfaz de entrenamiento fue desarrollada con el fin de facilitar el entrenamiento de la red neuronal de clasificación. En principio, este procedimiento no debe ser realizado por cualquier usuario, pues la red neuronal usada en el sistema configurado ya está diseñada y entrenada apropiadamente para el análisis de datos. En la interfaz de entrenamiento el usuario selecciona secuencialmente los directorios correspondientes a imágenes normales y anormales, con el fin de que el sistema tenga información apropiada para el entrenamiento de la red. Internamente, el sistema desarrolla la rutina completa, generando un vector objetivo de acuerdo con la selección inicial del usuario. La red neuronal entrenada reemplaza la red original, de manera que el uso de esta interfaz debe estar restringido únicamente a usuarios experimentados.

3.5. APORTES ADICIONALES AL TRABAJO

Teniendo en cuenta que el campo de investigación y desarrollo en el campo de evaluación asistida por software es muy amplio, se realizó un trabajo conjunto con estudiantes de pregrado de la Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones de la Universidad Industrial de Santander, conjuntamente con el Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales y la Facultad de Salud de la universidad. El objetivo principal de la realización de estos trabajos es contribuir con el área de análisis automático de imágenes microscópicas mediante el desarrollo de trabajos de grado consistentes con esta área. En este sentido, se

realizó la dirección y asesoría de los siguientes trabajos de grado en el período 2004-2006:

- *Diagnóstico de leucemia de leucocitos mediante procesamiento digital de imágenes*²³: Este trabajo es realizado actualmente por la estudiante Sandra Medrano y su ejecución se encuentra en aproximadamente el 50%. Consiste en usar técnicas similares de segmentación, determinación de patrones y clasificación de muestras sanguíneas con el fin de diagnosticar adecuadamente leucemia de leucocitos.
- *Diseño y construcción de un sistema de adquisición automática de imágenes microscópicas*²⁴: Este trabajo es realizado por los estudiantes Saíd David Pertuz y Héctor Reneé Ibáñez y su ejecución se encuentra en aproximadamente el 85%. Una de las limitaciones más grandes en el desarrollo de sistemas de evaluación asistida por software es el hecho de que generalmente es requerido un usuario para realizar la rutina de adquisición y captura de las imágenes microscópicas. Teniendo en cuenta esta limitación este proyecto consiste en el desarrollo de un sistema que realice automáticamente el procedimiento de desplazamiento de la platina (ejes x e y) y el enfoque de la imagen (mediante algoritmos de autoenfoco y métodos numéricos de optimización), así como la captura y almacenamiento de las imágenes en un sistema de cómputo.

²³ Dirigida por Edwin Alberto Silva Cruz, codirigido por Jorge Humberto Echeverri M.D. esp. patología

²⁴ Dirigido por Edwin Alberto Silva Cruz, codirigido por César Duarte Gualdrón Ing. Msc

- *Diseño y construcción de un dispositivo de procesamiento automático de tejidos biológicos*²⁵: Trabajo ejecutado en 100%, actualmente en pruebas de validación según estándares internacionales. A pesar de que algunas pruebas como las citológicas o hematológicas no requieren de la manipulación y procesamiento biológico de tejido blando, un gran inconveniente en la evaluación microscópica de muestras está dada en el procedimiento previo de fijación, deshidratación, y aclaración. De acuerdo con estas consideraciones, se realizó un dispositivo de procesamiento automático de tejidos biológicos que garantiza que las muestras finales tengan propiedades adecuadas para su inspección microscópica (morfología) e histoquímica.

Adicionalmente, con el fin de fortalecer el área de bioingeniería en la Universidad Industrial de Santander, se realizó la dirección de otras tesis de grado cuya temática no era directamente relacionada con el área de desarrollo de este trabajo, pero que contribuyen con el crecimiento de la bioingeniería en el nivel local (Reconstrucción 3D de un corazón humano a partir de secciones delgadas 2D (*slices*) y Control automático de dispositivos de medios diagnósticos del HUS).

²⁵ Dirigido por Edwin Alberto Silva Cruz, codirigido por Jorge Humberto Echeverri M.D. esp. patología

4. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de correlación entre los valores arrojados por el sistema de detección temprana de malignidad celular y los estudios histopatológicos realizados entre febrero y junio de 2005 en el departamento de patología de la Universidad Industrial de Santander. Las láminas usadas fueron proporcionadas por PROFAMILIA y por la Liga Contra el Cáncer, debido a que en la Facultad de Salud de la universidad no se realizan análisis citológicos de cuello uterino.

El conjunto total de láminas citológicas está reseñado a continuación:

PROFAMILIA

24 láminas citológicas de muestras normales

25 láminas citológicas de muestras anormales

Liga Contra el Cáncer

5 láminas citológicas de muestras normales

4 láminas citológicas de muestras de significancia indeterminada

20 láminas citológicas de muestras anormales

4.1. ENTRENAMIENTO Y ANÁLISIS INICIAL

Para el análisis inicial se seleccionaron muestras aleatorias de los diversos grupos, pero el único criterio de clasificación era basado en la presencia o ausencia de patología. Es decir, todas las muestras anormales, sin importar su estadio de clasificación, simplemente fueron seleccionadas como anormales para su clasificación por la red neuronal.

En primera instancia se usó un conjunto pequeño de datos así:

60 imágenes citológicas

30 imágenes con anomalías celulares

30 imágenes con células normales

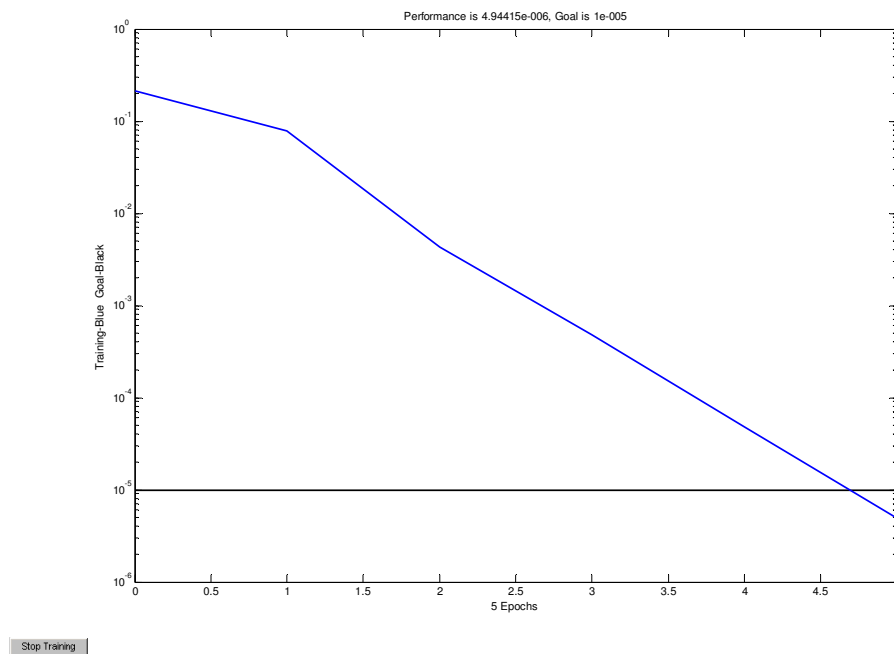
La arquitectura de la red neuronal es de 5 neuronas en la primera capa, 5 neuronas en la segunda capa y una neurona de salida. La función de transferencia de la primera capa es *purelin*, y las de la capas restante es sigmoidea.

La red neuronal entrenada usó un conjunto de 20 imágenes, 10 normales y 10 anormales, con un vector objetivo (*target*) de 0 para las imágenes normales y 1 para las imágenes anormales. Los resultados fueron los siguientes:

	Tiempo total	Tiempo/imagen
Segmentación:	23 minutos, 35 segundos	28 segundos
Extracción parámetros estadísticos	56 segundos	1,12 segundos
Extracción parámetros morfológicos	4 minutos, 47 segundos	5,75 segundos

Entrenamiento de la red: Convergencia: 5 épocas
Error: 4.94415e-6
Tiempo de procesamiento: 0.516 segundos

Figura 39. Entrenamiento de la red neuronal



Para la validación de resultados se usaron las 40 imágenes restantes. El vector de salida para las imágenes anormales es el siguiente:

[0.9959 0.0009 0.9958 0.9960 0.9960 0.0381 0.9960 0.9960
 0.9958 0.9960 0.9960 0.9950 0.9960 0.9960 0.9960 0.9960 0.9960
 0.9960 0.0008 0.9956]

El vector de salida para las imágenes normales es el siguiente:

[0.0008 0.0008 0.0008 0.0010 0.0035 0.9922 0.0008 0.9942
 0.0008 0.9939 0.0029 0.2003 0.0447 0.9949 0.9921 0.0008 0.0009
 0.3470 0.9841 0.0303]

Los resultados anteriores permiten determinar la matriz de confusión:

17	3
6	14

Es decir, 17 imágenes anormales fueron correctamente seleccionadas como anormales y 3 seleccionadas equivocadamente; mientras que 14 imágenes normales fueron seleccionadas correctamente como normales y 6 seleccionadas equivocadamente.

Los resultados, entonces, son los siguientes:

- Sensibilidad: 85%

- Especificidad: 70%
- VPP: 73%
- VPN²⁶: 82%

Figura 40. Figura Imágenes erróneamente clasificadas como anormales

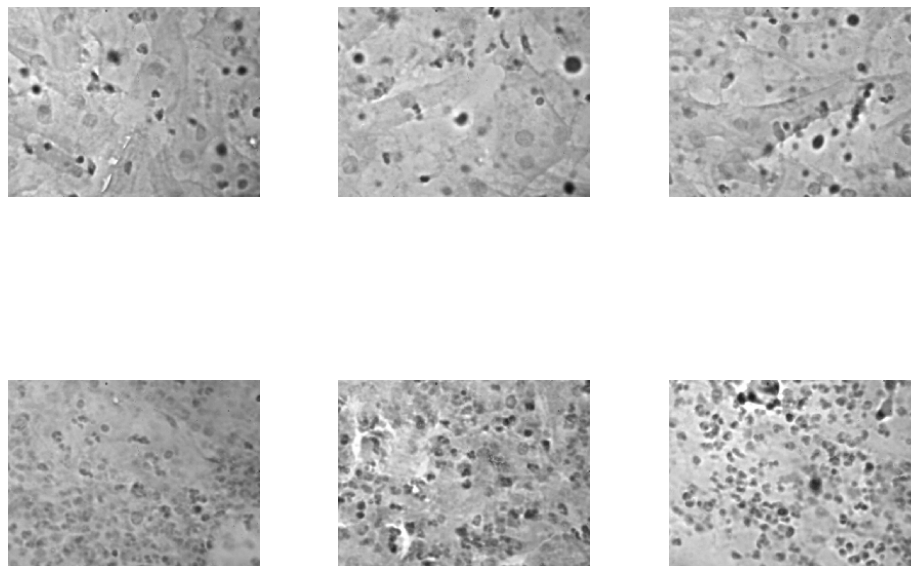
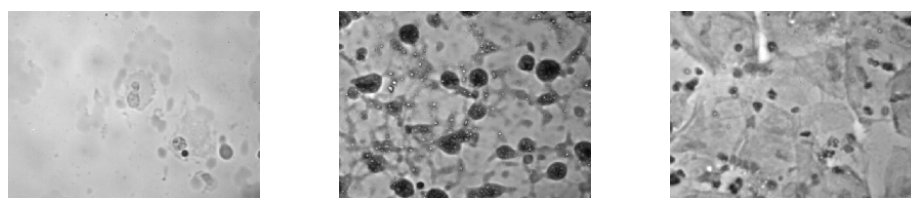


Figura 41. Figura Imágenes erróneamente clasificadas como normales



En las figuras anteriores se muestran las 9 imágenes incorrectamente clasificadas en el conjunto de datos de validación. En primera instancia, se observa que al

²⁶ VPP y VPN son Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo, respectivamente. Corresponden a la posibilidad de que una valoración diagnóstica sea verdadera. Es decir, en este caso, un 73% de las muestras evaluadas como positivas, son efectivamente anómalas; mientras que un 82% de las muestras evaluadas como negativas son normales. Como se muestra más adelante, los valores predictivos dependen enormemente de la prevalencia de una patología, de modo que acá están mostrados únicamente como valor aproximado al real (es decir, si se toma un conjunto de muestras cuya distribución anómalas-normales sea similar a la prevalencia).

menos 4 de las imágenes erróneamente clasificadas como anormales por el sistema automático son fácilmente clasificadas por la inspección visual humana. Esto añade robustez al sistema de clasificación, pues muestra que el análisis conjunto hombre-máquina es un buen complemento para realizar una segmentación adecuada.²⁷

Por otra parte, la figura 41 muestra las imágenes clasificadas erróneamente como normales. Si bien las dos primeras imágenes tienen indicios de anomalías, en la primera de ellas la información no es muy clara debido a la presencia únicamente de dos o tres núcleos con coloración muy tenue. La tercera imagen, aunque inicialmente determinada anormal en el conjunto de datos, luego de una inspección rigurosa se puede observar que no presenta indicios claros de anomalía celular o tisular.

Teniendo en cuenta que de cada lámina citológica se deben tomar al menos 10 imágenes para su análisis, se espera, extrapolando los resultados obtenidos, que en una citología anormal por lo menos el sistema determine que 8 imágenes tienen características anómalas y en una citología normal sólo en promedio 3 imágenes.

²⁷ Un sistema de evaluación asistida por software tiene como principal característica que haga un buen complemento con el usuario humano del sistema; es decir, que el error producido por el software sea fácilmente subsanado por el observador humano y viceversa, con el fin de aumentar adecuadamente la sensibilidad y especificidad total. En otras palabras, un sistema automático no es muy útil si produce los mismos errores que el observador humano.

Con el fin de corroborar esta suposición, se usó la misma red entrenada para determinar el comportamiento de la salida de otras imágenes correspondientes a las láminas citológicas en las cuales el sistema arrojó resultados erróneos. Los resultados de esta simulación son los siguientes:

- Falsos negativos: Haciendo simulación de la red neuronal en 5 imágenes de la misma lámina citológica que cada una de las imágenes con resultados de falsos negativos, se encontró que en promedio 4 de las 5 imágenes analizadas fueron clasificadas correctamente como anómalas.
- Falsos positivos: Se hizo simulación de la red neuronal en 5 imágenes de la misma lámina citológica que cada imagen con resultado falso positivo. Los resultados siguieron la misma tendencia que en el análisis inicial (70% de aciertos).

Estos resultados indican claramente que el sistema está en capacidad de determinar con cierto grado de precisión una anomalía celular en una muestra citológica. Adicionalmente, un sistema de tamizaje debe garantizar una alta sensibilidad en el diagnóstico y las pruebas realizadas mostraron que, en conjunto, ninguna lámina citológica anómala fue clasificada como normal (al menos el 80% de las imágenes en una lámina citológica anormal fueron clasificadas anormales). Por otra parte, el primer entrenamiento fue limitado a únicamente 20 imágenes, de modo que se esperaban resultados mucho mejores con un entrenamiento final

usando alrededor de 160 imágenes (80 normales, 40 LSIL, 20 HSIL y 20 carcinoma).

Adicionalmente, es importante señalar que aunque el conjunto de datos fue seleccionado de manera aleatoria, las imágenes de entrenamiento fueron revisadas con rigurosidad, debido a al hecho de que un conjunto de imágenes fuese tomado de una citología anormal no garantizaba totalmente que todas las imágenes en ese conjunto mostrasen indicios de anomalías. La selección de las imágenes y su clasificación para el primer entrenamiento fueron realizadas por el autor del trabajo, mientras que se esperaba contar con la asesoría de un especialista para el entrenamiento y validación finales.

4.2. DISEÑO DE LA RED NEURONAL, ENTRENAMIENTO Y PRUEBAS FINALES

Los resultados obtenidos en la etapa anterior fueron indicativos de la viabilidad del sistema de detección de anomalías en muestra citológicas. Posteriormente se realizaron las pruebas finales, para lo cual se usaron casi todas las imágenes citológicas capturadas para el estudio, incluyendo muestras con imperfecciones como presencia de artefactos, rayones en el vidrio o coloración inadecuada. No se usó todo el conjunto completo debido a que el tiempo total de procesamiento para todas las muestras excede 120 horas de procesamiento continuo, que está sujeto además a posibles bloqueos del equipo de cómputo y fallas en el suministro de energía eléctrica.

El conjunto de láminas usadas fue el siguiente:

74 láminas citológicas

45 láminas con anomalías celulares (LSIL, HSIL y Carcinoma invasor)

29 láminas con células normales

De este conjunto de láminas se usaron imágenes así:

300 imágenes totales

150 imágenes de anomalías

150 imágenes normales

4.2.1. Arquitectura de la red neuronal

Teniendo en cuenta que se requiere de un sistema que realice adecuadamente la segmentación y clasificación de patrones teniendo en cuenta vectores de entrada determinados, se seleccionó una red neuronal backpropagation como elemento discriminador. La literatura muestra que las redes neuronales backpropagation son, en general, las más adecuadas para realizar tareas de segmentación y clasificación.

Posteriormente, se requirió determinar específicamente las características estructurales de la red neuronal. Lamentablemente, no existe literatura muy amplia y definida en torno al proceso de determinación de la arquitectura de una red

neuronal. Inicialmente se realizó una prueba inicial, reseñada en el capítulo anterior, y luego se diseñó una red neuronal más compleja, de 7 neuronas en la primera capa, 5 neuronas en la segunda capa y una neurona en la salida. Esta arquitectura probó ser la más adecuada entre muchas otras que se probaron, variando el número de neuronas en las capas y añadiendo una capa adicional.²⁸

Las funciones de transferencia usadas fueron *purelin* en la primera capa y sigmoideas en las capas restantes. Se seleccionaron de esta manera teniendo en cuenta que la función de transferencia *purelin* permite una excursión amplia de los datos de entrada en la primera capa, mientras que las funciones sigmoideas son apropiadas en las siguientes capas para obtener ponderaciones limitadas, que estén acordes con la función objetivo binaria. Adicionalmente, las funciones sigmoideas son muy apropiadas en una red neuronal backpropagation debido a su propiedad de diferenciación total en toda la excursión de datos, lo que hace que el proceso de entrenamiento de la red neuronal sea óptimo.

El entrenamiento de la red neuronal se realizó con 50 imágenes anormales (20 LSIL, 15 HSIL, 15 carcinoma) y 40 imágenes normales, para un total de 90 imágenes totales. La validación se realizó con las imágenes restantes, 100 anómalas y 110 normales.

²⁸ Acorde con lo encontrado en la teoría de redes neuronales, una red neuronal con más capas y neuronas tuvo mejor aproximación en el entrenamiento, pero su sensibilidad es muy alta, lo cual la hacía inestable, de modo que pequeñas variaciones en las entradas conducían a grandes divergencias en las salidas. Esta característica es muy negativa en un sistema de clasificación, ya que se espera que entradas similares produzcan salidas similares en la red.

4.2.2. Entrenamiento de la red neuronal

Para el entrenamiento de la red neuronal se usó una fracción aleatoria de las muestras obtenidas en el proceso de captura y almacenamiento de imágenes citológicas así:

90 imágenes totales

40 imágenes normales

20 imágenes de LSIL

15 imágenes de HSIL

15 imágenes de carcinoma invasor²⁹

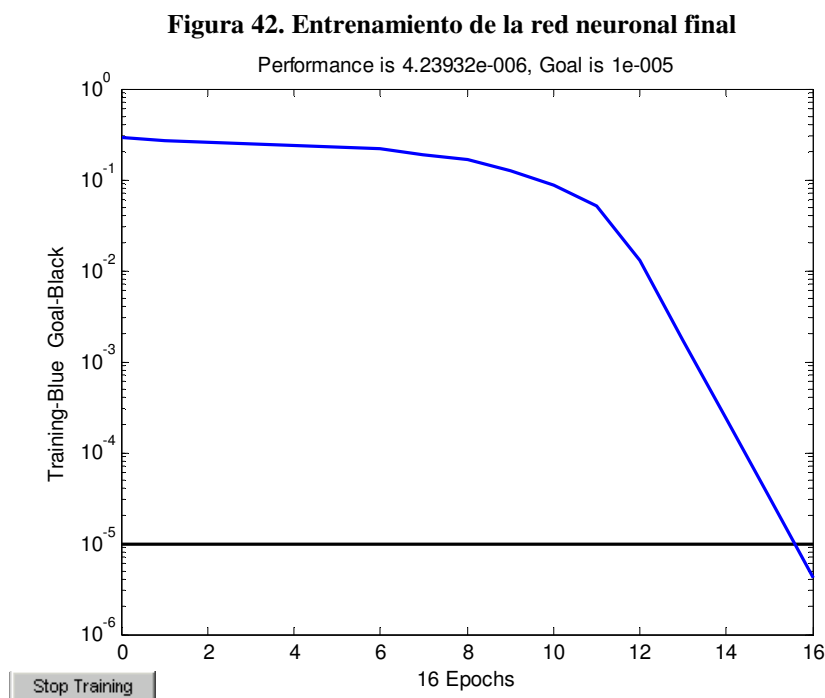
Estas imágenes fueron seleccionadas de la totalidad de láminas citológicas usadas en el estudio, con el fin de garantizar que el sistema fuese entrenado tanto en citologías de PROFAMILIA como en citologías de la Liga Contra el Cáncer, puesto que sus características ópticas difieren considerablemente debido al uso de distintos reactivos para la fijación de la muestra. Lamentablemente, una parte considerable (alrededor del 40%) de las imágenes capturadas de citologías de la Liga Contra el Cáncer tuvo que ser descartada posteriormente, por cuanto el uso de una técnica de fijación diferente, con un reactivo llamado Citosol, añadió un efecto óptico que hizo que las imágenes capturadas por la cámara fuesen

²⁹ Esta clasificación fue determinada de acuerdo con el diagnóstico proporcionado por PROFAMILIA y la Liga Contra el Cáncer.

altamente borrosas. Inicialmente se trabajó con el conjunto completo de imágenes, pero se observó, por análisis de los parámetros obtenidos, que con las imágenes que se descartaron los parámetros obtenidos eran muy similares, insuficientes para una adecuada discriminación.

A continuación se muestran los parámetros obtenidos en un entrenamiento exitoso usando pocas imágenes para el entrenamiento:

Entrenamiento de la red:	Convergencia:	16 épocas
	Error:	4.2393e-6
	Tiempo de procesamiento:	17,18 segundos



Cuando se usó un conjunto muy grande de imágenes para el entrenamiento, difícilmente se alcanzaba el error determinado. Esto ocurre principalmente porque es altamente probable que una imagen catalogada como anormal para el entrenamiento, realmente corresponda a un campo de visión en el cual no se presente tal anomalía o esté en grado mínimo, generando parámetros similares a los de una imagen normal y, en consecuencia, dificulte la convergencia del entrenamiento.

Entrenamientos sucesivos de la red neuronal variando el conjunto de datos de entrenamiento mostraron que la convergencia era considerablemente buena, pues menos de uno de cada ocho entrenamientos condujo a fallas en la convergencia. Esto fue coincidente con la teoría de los algoritmos de Levenberg usados en el entrenamiento de las redes neuronales.

4.2.2. Validación de la red neuronal

Se realizó la validación de la red neuronal entrenada con las imágenes restantes del conjunto total utilizado en el estudio, excluyendo las usadas en el entrenamiento, así:

180 imágenes totales

80 imágenes normales

40 imágenes de LSIL

40 imágenes de HSIL

20 imágenes de carcinoma invasor

La matriz de confusión obtenida es la siguiente:

	Normales (evaluación)	Anormales (evaluación)
Normales (real)	68	12
Anormales (real)	9	91

A continuación se muestran los
vectores de salida obtenidos después
de la simulación³⁰.

Normales	Anormales
0.0009	1,0000
0.0011	1,0000
0.0012	1,0000
1,0000	1,0000
0.0013	1,0000
0.0009	1,0000
0.0009	0.9951
0.0009	1,0000
0.0016	1,0000
0.0009	1,0000
0.0009	1,0000
0.0010	0.9974
0.0009	0.9970
0.1447	0.9969
0.0008	0.9973
0.0014	0.9972

0.0004	1,0000
0.0089	0.9974
0.0009	1,0000
0.0011	0.9973
0.0007	1,0000
0.2784	0.9973
0.0010	1,0000
0.1904	1,0000
0.0013	0.9973
0.0026	1,0000
0.0012	0.9994
0.0424	0.9971
0.0007	1,0000
0.0004	1,0000
0.0008	0.9973
0.0013	1,0000
0.0009	1,0000
0.0012	0.9966
0.0009	0.9966
0.0007	1,0000
0.0010	1,0000
0.0010	0.9880
0.0006	0.9979
0.8322	1,0000
0.0009	0.9986
0.0003	0.9901
0.1386	0.9965
0.9972	1.0000
0.9952	1,0000
0.1279	1,0000
1,0000	0.9970
0.0878	1,0000
0.0197	0.9951
0.9904	1,0000
0.0010	0.9986
0.0009	0.9997

³⁰ Se debe señalar que estos resultados corresponden a una de las simulaciones realizadas. Los resultados pueden variar ligeramente en otras simulaciones debido a que el proceso de segmentación no siempre arroja los mismos resultados. Adicionalmente, depende en gran medida de la adecuada selección de regiones de interés por parte del usuario. Sin embargo, en todas las simulaciones se encontraron niveles de sensibilidad superiores al 88% y niveles de especificidad superiores al 70%

0.0019	0.9974	0.0009	1,0000
1.0000	0.9955	1.0000	0.9403
0.0006	0.9972	1.0000	0.9970
0.0006	1,0000	0.0007	0.9988
0.0013	0.9989		0.9922
0.0012	0.0009		0.0053
0.0007	0.9953		1,0000
0.0009	0.9951		1,0000
0.0008	0.9778		1,0000
0.0008	0.0009		1,0000
0.9960	0.0003		1,0000
0.0009	0.1794		0.9968
0.0010	0.9958		1,0000
0.0009	1,0000		1,0000
0.0007	0.0009		1,0000
0.0009	0.9947		1,0000
0.0008	0.0009		1,0000
1.0000	0.0009		1,0000
1.0000	0.6936		1,0000
0.0007	0.9844		1,0000
1.0000	0.0011		1,0000
0.0005	0.0009		1,0000
0.0006	0.6520		1,0000
0.0012	1,0000		1,0000

Estos resultados muestran que si bien un considerable número de las muestras normales fue clasificado como anormal (15%), únicamente un 9% de las muestras anormales fue clasificado como normal. Esto implica un alto valor de especificidad, muy superior incluso a los encontrados en estudios realizados en la UIS [45]. Esto es que, a diferencia de la evaluación tradicional de citologías, los valores de especificidad son más adecuados para ser aceptado como prueba de tamizaje. Por otra parte, el VPP tiene resultados de 88,34%, superiores también a los encontrados en estándares internacionales. El VPN fue de 88,31%, ligeramente inferior al promedio obtenido por el método tradicional (95%). Este resultado de VPN, sin embargo, no es crítico, pues en una prueba de tamizaje lo más importante es conseguir sensibilidad alta, dejando que otra prueba de validación (en este caso la colposcopia) cumpla con los criterios de especificidad. Además, la prevalencia puede afectar enormemente el VPN, haciendo que una patología con prevalencia muy baja pueda tener métodos diagnósticos inadecuados pese a tener un VPN cercano al 100%³¹. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que no se seleccionaron manualmente las imágenes para el proceso de validación, de manera que se incluyeron muestras cuya calidad dificultó enormemente la clasificación. En general, la mayor parte de las muestras normales catalogadas como anormales correspondía a imágenes con muy pocas células presentes, mientras que las

³¹ Supóngase una patología con prevalencia 10/100000, sensibilidad 10% y especificidad 100%. En un conjunto aleatorio de 100000 muestras se espera encontrar 10 anormales y 99990 normales. Con los valores de especificidad y sensibilidad, los diagnósticos son así: 1 anormal, 99999 normales; lo cual conduce a un VPN de 99,99%, pese a que la sensibilidad del sistema es muy baja. Si la prevalencia fuese mayor (exagerando, 50000/100000), el VPN, con los mismos valores de especificidad y sensibilidad, sería de apenas 52,63%.

muestras anormales clasificadas como normales tenían algunos imperfectos como artefactos, citoplasmas muy extendidos o alta presencia de tintura en la muestra.

4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

4.3.1. Consideraciones preliminares

La citología cérvico uterina convencional es usada como el método tradicional para el tamizaje en la detección de cáncer de cuello uterino. El principal inconveniente de esta prueba es que los valores promedio de sensibilidad no son muy altos, lo cual hace muy discutible su uso como método aceptable de tamizaje. Para la evaluación de los resultados se hará un estudio comparativo entre los obtenidos por medio del software desarrollado y los reseñados por García [45] en su trabajo de validación de la citología cérvico uterina como medio diagnóstico en la identificación de cáncer, realizado en la Universidad Industrial de Santander.

Con el fin de aclarar algunos conceptos usados en el análisis de los resultados, a continuación se mostrará una breve reseña.

Existen varios parámetros usados para medir la validez de una prueba diagnóstica. La prueba diagnóstica más elemental, del mismo tipo que la utilizada en este trabajo, es la dicotómica, en la cual el resultado final de la

prueba es una valoración positiva o negativa, correspondiente a la presencia o ausencia de una patología. En general, se debe contar con una valoración real de las muestras usadas para el estudio o, en su defecto, algo conocido como “gold standard”. El “gold standard” es un método alternativo de diagnóstico, cuyos resultados probados de sensibilidad y especificidad son elevados, de manera que constituya un adecuado patrón de referencia en ausencia de una valoración real. Los datos obtenidos mediante el método de diagnóstico a analizar son cotejados individualmente con los resultados dados por el patrón de referencia y agrupados en una tabla así:

	Diagnóstico positivo	Diagnóstico negativo
Valoración real positiva	VP	FN
Valoración real negativa	FP	VN

VP: Verdadero positivo

VN: Verdadero negativo

FP: Falso positivo

FN: Falso negativo

Con los resultados de esta tabla se pueden hacer los cálculos de algunos parámetros normalmente aceptados para determinar la validez de la prueba diagnóstica.

Sensibilidad y especificidad

- Sensibilidad: Es la probabilidad de que una muestra correspondiente a un individuo enfermo sea valorada positiva por el medio diagnóstico. También se conoce como FVP, o fracción de verdaderos positivos. Se calcula según la siguiente fórmula:

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

- Especificidad: Es la probabilidad de que una muestra correspondiente a un individuo sano obtenga valoración negativa por el método diagnóstico. También llamada FVN, o fracción de verdaderos negativos. Se calcula así:

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

Valores predictivos

- Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de que un individuo que haya obtenido una valoración positiva por el método diagnóstico, efectivamente esté enfermo. Se calcula según la fórmula siguiente:

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

- Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de que un individuo con valoración negativa por el método diagnóstico, verdaderamente esté sano. Se calcula así:

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

La sensibilidad y la especificidad son los parámetros establecidos para indicar la validez de una prueba como medio diagnóstico. Los valores predictivos carecen de importancia directa en la valoración de un medio diagnóstico, por cuanto dependen de factores externos como el índice de prevalencia (porcentaje de población afectada). En los anexos se muestra esto en mejor detalle.

Razones de probabilidad

- Razón de verosimilitudes positiva: Se obtiene mediante el cociente entre la probabilidad de un resultado positivo entre los pacientes enfermos y la probabilidad de un resultado positivo entre los pacientes sanos así:

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

- Razón de verosimilitudes negativa: Es la razón entre la probabilidad de obtener un resultado negativo en presencia de la enfermedad y la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la enfermedad.

$$RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

4.3.2. Obtención de parámetros

La matriz de confusión obtenida en este trabajo es la siguiente:

	Diagnóstico positivo	Diagnóstico negativo
Valoración real positiva	91	9
Valoración real negativa	12	68

El patrón de comparación fue dado por la valoración cruzada entre PROFAMILIA y el Dr. Jorge Humberto Echeverri, de la Facultad de Salud de la UIS. Si bien se debe considerar que este patrón de referencia está sujeto a las fallas inherentes a la citología cérvico uterina convencional, hay una mayor confiabilidad teniendo en cuenta que PROFAMILIA realiza una segunda valoración en el caso de las láminas valoradas como positivas o de significancia indeterminada (ASCUS). El mayor error está establecido por el hecho de que incluso en una lámina citológica correspondiente a una patología, sólo algunos de los centenares de campos de visión posibles hacen evidente la anomalía, de manera que en el proceso de captura es posible que algunas de las imágenes usadas para la validación de resultados haya sido catalogada erróneamente. Este posible error fue atenuado por la posterior evaluación de las imágenes digitales realizada por el Dr. Jorge Echeverri.

Los resultados obtenidos permitieron obtener los siguientes parámetros:

- Sensibilidad: 91%
- Especificidad: 85%
- VPP: 88,35%
- VPN: 88,31%
- RV+: 6,06
- RV-: 0,11

4.3.3. Parámetros obtenidos en un estudio local de citología vaginal

El Grupo de Investigación en Patología Estructural, Funcional y Clínica, de la Universidad Industrial de Santander, realizó un estudio de validación de la citología cérvico uterina convencional como medio diagnóstico [45]. Este estudio fue tomado como referencia para la comparación de resultados. A continuación se muestra la tabla porcentual de contingencia obtenida en este estudio:

	Diagnóstico positivo	Diagnóstico negativo
Valoración real positiva	0,00252	0,01759
Valoración real negativa	$5,347 \times 10^{-5}$	0,97937

Con estos resultados se calcularon los parámetros así:

- Sensibilidad: 12%
- Especificidad: 99%

- VPP: 83,3%
- VPN: 98,2%
- RV+: 12
- RV-: 0,88

4.3.4. Comparación de los resultados

En la siguiente tabla se muestra la comparación entre los parámetros obtenidos por la evaluación por software y los reseñados previamente en el estudio realizado por el Grupo de Investigación en Patología Estructural, Funcional y Clínica, de la Universidad Industrial de Santander.

	Citología cérvico uterina convencional	Evaluación por software
Sensibilidad	12%	91%
Especificidad	99%	85%
VPP	83,3%	88,35%
VPN	98,2%	88,31%
RV+	12	6,06
RV-	0,88	0,11

La primera diferencia importante está observada en el parámetro de sensibilidad. Debido a algunos factores mencionados por los autores, el resultado del 12% obtenido en el estudio de citología cérvico uterina convencional (CCUC) está considerablemente por debajo del promedio

internacional, del rango entre 20 y 35% [48], [51]. Sin embargo, incluso la comparación del resultado obtenido por la evaluación con software con este parámetro internacional muestra una gran diferencia. En cambio, el parámetro de especificidad fue mayor en la CCUC que en la evaluación por software, aunque debe considerarse que el parámetro más importante en la validación de una prueba como mecanismo adecuado de tamizaje es la sensibilidad.

En la tabla también se muestran los resultados obtenidos para los valores predictivos VPP y VPN. Estos parámetros no deben ser comparados directamente, puesto que, como ya se reseñó, dependen directamente de la prevalencia de la patología. En el estudio realizado por el Grupo de Investigación en Patología Estructural, Funcional y Clínica el conjunto de muestra fue obtenido de un total poblacional normal, de modo que se asume una prevalencia patológica de 2%, muy similar a la real. En cambio, para la validación por software se usó un conjunto de 180 muestras, de las cuales 100 correspondían a muestras patológicas, provocando una alteración intencionada de la prevalencia a un 55,55%³². Si bien entonces no se debe hacer una comparación directa, es de reseñar que la CCUC continúa teniendo gran validez debido a su elevado VPN, ya que menos del 2% de las mujeres con diagnóstico negativo en realidad tienen la patología. Esta aparente contradicción, teniendo en cuenta la baja sensibilidad, está explicada por el índice de prevalencia.

En cuanto a las razones de verosimilitud obtenidas, la CCUC muestra una mayor razón de verosimilitud positiva. Según estos resultados, una valoración

³² Si se hubiese usado un modelo de prevalencia de 2%, para el mismo conjunto de 150 imágenes correspondientes a anomalías (50 entrenamiento y 100 validación), se hubiese requerido de un total de 7500 imágenes anormales (45000, si se tiene en cuenta que cada imagen en realidad se compone de 6 planos espectrales), lo cual no hubiese sido viable teniendo en cuenta el tiempo de captura y procesamiento requerido para ello.

positiva es 12 veces más probable en una paciente enferma que en una normal. En el caso de la evaluación por software, este índice se reduce a 6. Por otra parte, sin embargo, los resultados de razones de verosimilitud negativa muestran que por evaluación por software una valoración negativa es 9 veces más probable que una positiva en una paciente sana, mientras que por CCUC este índice es muy pequeño, de apenas 1,14. Aunque, nuevamente por las razones de prevalencia en el grupo muestral, estos resultados no deben ser comparados directamente, son un indicador de que la evaluación por software, gracias a la pequeña razón de verosimilitud negativa (se debe tener en cuenta que, al contrario de lo sucedido con la razón de verosimilitud positiva, entre más pequeña sea la VP-, mejor), permite brindar una gran seguridad a la paciente en el sentido de que es muy poco probable que, en presencia de una anomalía, su valoración sea negativa.

Se debe destacar el alto nivel de sensibilidad de la prueba, con resultados considerablemente superiores a los esperados, especialmente teniendo en cuenta que el promedio internacional de detección de positivos de cáncer (es decir, excluyendo anomalías displásicas no consideradas como carcinoma invasor) es de apenas un 35%.

La conclusión más importante es que el alto índice de la especificidad en la CCUC y el alto índice de sensibilidad en la evaluación por software es un buen indicador de la complementariedad de estos dos métodos diagnósticos en la detección de cáncer de cuello uterino.

4.3. AJUSTES FINALES AL SISTEMA

Después de realizadas las pruebas de validación de resultados se contó con la colaboración del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander para su verificación. Para esto se contó principalmente con la asesoría del Dr. Jorge Humberto Echeverri Perico, con quien se realizaron varias jornadas de caracterización de las imágenes digitales usadas en el proceso de validación de resultados. Este trabajo se hizo con el fin de atenuar el posible error producto de la subjetividad inherente al diagnóstico realizado por PROFAMILIA y la Liga Contra el Cáncer, debido a que numerosos estudios muestran una alta variabilidad en este proceso.

La revisión de las imágenes, incluyendo las distintas etapas del proceso, fue aprobada por el Dr. Echeverri, de modo que no fue necesario hacer modificaciones sustanciales al software, salvo algunos ajustes en la interfaz gráfica y en la ejecución de rutinas adicionales. Estos ajustes permitieron mejorar las prestaciones del software, haciéndolo más amigable para el usuario.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El sistema desarrollado permite la detección de anomalías celulares correspondientes a procesos displásicos con un grado alto de sensibilidad, lo cual indica que es posible su uso como herramienta de tamizaje en el diagnóstico de cáncer de cuello uterino.
- El tiempo computacional requerido para algunos algoritmos es muy elevado, lo que reduce su viabilidad de aplicación en un sistema de detección precoz de cáncer de cuello uterino. Sin embargo, esta limitación es cada vez menor debido al avance tecnológico en procesamiento y memoria en los equipos de cómputo.
- Se determinó que la técnica de procesamiento multiespectral tiene aplicabilidad de mayor eficacia que el procesamiento de imágenes de tres capas cromáticas (RGB) debido a que hay mayor información disponible para el análisis de las imágenes.
- Se comprobó que un sistema de reconocimiento de patrones para la segmentación en imágenes digitales tiene altas prestaciones como mecanismo de identificación de características, lo cual es acorde con la teoría de visión de máquina comparada con la visión animal.
- La experimentación con la respuesta de los tejidos biológicos en distintos rangos espectrales fue coincidente con lo encontrado en la

bibliografía, según la cual es posible realizar algoritmos de clasificación basados en conjuntos de imágenes multiespectrales.

- El análisis estadístico de componentes principales en los parámetros de clasificación mostró que fueron adecuados como discriminadores de posibles patologías en una muestra citológica.

RECOMENDACIONES

- Es recomendable el uso de una cámara con alta sensibilidad debido a las limitaciones de iluminación presentes en un sistema de microscopía. Así mismo, un aumento en la resolución de la cámara representa unas imágenes más adecuadas para el procesamiento, especialmente en la detección de bordes y la segmentación.
- Como complemento del sistema de detección automática de cáncer de cuello uterino es importante contar con un mecanismo de adquisición y captura automática de imágenes microscópicas, especialmente considerando que en una lámina citológica, correspondiente a una muestra anormal, es posible que haya apenas unos cuantos campos de visión en los cuales se manifieste la anomalía. Por este motivo, en la actualidad se está desarrollando este sistema como tesis de pregrado de ingeniería electrónica.
- Es importante considerar que el costo computacional en términos de procesamiento y de memoria es elevado teniendo en cuenta que los algoritmos requieren de conjuntos de datos elevados para las operaciones de preprocesamiento, segmentación y extracción de patrones, de modo que se sugiere el uso de sistemas computacionales con las prestaciones mínimas reseñadas. Adicionalmente, el uso de equipos de cómputo con mejores especificaciones permitirá desarrollar algoritmos más eficientes, especialmente de acuerdo con mayores velocidades de cómputo, transferencia de datos entre la tarjeta el

procesador y capacidad de memoria RAM del equipo. Algunas pruebas desarrolladas mostraron que el uso de un equipo de 2,8 GHz, 2 GB de memoria RAM, procesador dual core, permite disminuir el tiempo medio de procesamiento de una muestra de 36 segundos a 25 segundos. Se calculó, de acuerdo con el número de campos presentes en una lámina citológica, que un tiempo medio de 10 segundos es adecuado para el diseño de un dispositivo de tamizaje aplicable.

- La línea de desarrollo de sistemas de evaluación asistida por software en imágenes digitales es una prioridad en la investigación en el ámbito internacional. Es así que se sugiere continuar con esta área de trabajo en la Universidad Industrial de Santander, teniendo en cuenta su pertinencia en diversos campos adicionales a la biongeniería.

REFERENCIAS

REFERENCIAS PROCESAMIENTO DE IMÁGENES, SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES MÉDICAS

- [1] Adali, T; Yue, Wang; *"Applications of neural networks to image processing"* 2002
- [2] Aus, H.M.; Harms, H.; ter Meulen, V. y Gunzer, U. *"Statistical Evaluation of Computer Extracted Blood Cell Features for Screening Populations to Detect Leukemias"*, *Pattern Recognition Theory and Applications*, Heidelberg 1987
- [3] Azriel, R. *"Image Analysis, Problems, Progress and Prospects"*, *Pattern Recognition*, vol. 17, 1984
- [4] Bamford, P; *Automating Cell Segmentation Evaluation with Annotated examples*, 2002
- [5] Bamford, P; Lovell, B; *Cell nucleus segmentation*, 1998
- [6] Ballard, D.H.; Brown, C.M.; *Computer Vision*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1982
- [7] Bengtsson, E; *The measure of cell features*, 1987
- [8] Brejl, M; Sonka, M; *Object localization and border detection criteria design in edge-based image segmentation: automated learning from examples*, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 19, no. 10, 2000
- [9] Chieco, P.; Jonker, A; Melchiorri, C.; Vanni, G.; van Noorden, C.J.F.; A user's guide for avoiding errors in absorbance, image cytometry. *Histochem. J.* 26:1-19., 1994
- [10] Comer, M. y Delp, E. J. *"Morphological operations for color image processing"*, *Electronic Imaging*, Julio de 1999
- [11] Demuth, H. y Beale, M. *"Neural Network Toolbox for use with Matlab"* 1993
- [12] Duff, M. J. B.; Jones, B. M. y Townsend, L. J.; *"Parallel processing pattern recognition system UCPR1"* *Nucl. Instrum. Meth.* vol. 52, 1967
- [13] Feund, J; Miller, M; *Estadística matemática con aplicaciones*, sexta edición. México: Pearson, 2000
- [14] Fontoura, L; Marcondes, R; *Shape analysis and classification*. 2000
- [15] Gómez, E; *"Estudio e implementación de métodos para la obtención de contornos de imágenes celulares"* UIS. 1994
- [16] González, R.C.; Wintz, P; *Digital Image Processing*, segunda edición, Addison Wesley, Reading, MA. 1987
- [17] Gualdrón, O; Ibañez, L; *"Reconocimiento y caracterización de imágenes microscópicas de muestras de areniscas"*. UIS. 1989
- [18] Harms, H. y Aus, H. M., *"Tissue Image Segmentation with Multicolor, Multifocal Algorithms"*, *Pattern Recognition Theory and Applications* Heidelberg 1987
- [19] Jain, A. K. *"Advances in Statistical Pattern Recognition"*, *Pattern Recognition Theory and Applications*, Heidelberg 1987
- [20] Korb, K; Nicholson, A; *Bayesian Artificial Intelligence*, Pattern analysis and applications, vol. 9, número 2, 2004
- [21] Kupinski, M. A.; Edwards, D. C.; Giger, M. L. y Metz, C. E. *"Ideal observer approximation using Bayesian classification neural networks"*, *IEEE Transactions and Medical Imaging*, 1998
- [22] Langley, P. y Sage, S. *"Induction of Selective Bayesian Classifiers"*, *Memorias de la Décima Conferencia de Incertidumbre en Inteligencia Artificial*, Seattle, 1994
- [23] Lo, S. C.; Chang, H. P; et al *Artificial convolution neural networks for medical image pattern recognition* en *"Neural networks"* vol 8, 1995
- [24] MacAulay, C; *Development, implementation and evaluation of segmentation algorithms for the automatic classification of cervical cells*, Tesis PhD, University of British, 1989

- [25] McKenna, S; *Automatic analysis of papanicolau smears*, Tesis PhD University of British, 1994
- [26] Michie, D.; Spiegelhalter, D.J. y Taylor, C.C. "*Machine Learning, Neural and Statistical Classification*", Inglaterra, 1994
- [27] Noguchi, Y; Tenjin, Y; *A scene-segmentation method for multispectral cell images*, Analytical and quantitative cytology, vol 6, número 3, 1984
- [28] Nordin, B; *The development of an automatic prescreener for the early detection of cervical cancer*, Tesis PhD Universidad Uppsala
- [29] Pratt, W.K.; *Digital Image Processing*, segunda edición, Wiley, New Cork. 1991
- [30] Rey, A; "*Caracterización y procesamiento digital de imágenes celulares*" UIS. 1990
- [31] Russ, J., *The image processing handbook*, tercera edición. 1998
- [32] Thompson, C.M.; Shure, L.; "*Image Processing Toolbox for use with Matlab*" 1993
- [33] Unger, S. H.; *Pattern recognition and detection*, Proc. IRE. vol. 47, 1959
- [34] Vannier, M.W., Pilgram, T.K., Speidel, C.M., Neumann, L.R., *Validation of magnetic resonance imaging multispectral tissue classification*, Comput. Med. Imaging Graph., vol 15, 1991.
- [35] Yu, H; Jenq-Neng, H; "*Handbook of neural network image processing*", 2002
- [36] Zhang, Y; *A survey on evaluation methods for image segmentation*, Pattern-Recognition, vol. 29, no. 8, 1996.

REFERENCIAS PATOLOGÍA DEL CÁNCER

- [37] Anton-Culver H, Bloss JD, Bringman D, et al. Comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a population-based epidemiologic study *Am J Obstet Gynecol* 166:1507-1514. 1992
- [38] Arrosi, S; Sankaranarayanan, R; Maxwell, D; *Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America*; Salud Pública de México, vol 45, suplemento 3, 2003
- [39] Arends MJ, Buckley CH, y Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 51:96-103. 1998
- [40] Berg JW. Morphologic classification of human cancer. En: *Cancer Epidemiology and Prevention*, Schottenfeld D, Fraumeni JF, Jr, eds. New York: Oxford University Press, p. 28-44. 1996
- [41] Bose S, Kannan V, y Kline TS. 1994. Abnormal endocervical cells. Really abnormal? Really endocervical? *Am J Clin Pathol* 101:708-713.
- [42] Castro, M; Cobos, F; Corzo, E; Forero, P; Insuasty, J; Registro y Análisis del Comportamiento del Cáncer en la Unidad de Oncología del Hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga durante los años de 1990 a 1995. Medicas UIS: Bucaramanga, Colombia. vol 14, 2000
- [43] Cuello C. *Curso de Patología del Tracto Genital Inferior. Informe citológico y patológico de lesiones intraepiteliales cérvico-uterinos. Clasificación actual*. Curso de Patología del Tracto Genital Inferior. H.U.V : 16-17. (1996).
- [44] Eifel PJ, Berek JS, and Thigpen JT. Cancer of the cervix, vagina, and vulva. In: *Cancer: principles and practice of oncology*, DeVita VT, Jr, Hellman S, and Rosenberg SA, eds. Philadelphia: 1997
- [45] García, E; Díaz, J et al. *Validación de la citología cérvico-uterina convencional con prueba de referencia histopatológica en la identificación de cáncer escamocelular invasor* 2003
- [46] Hopkins MP y Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 77:912-917. 1991
- [47] Kjaer SK y Brinton LA.. Adenocarcinomas of the uterine cervix: the epidemiology of an increasing problem. *Epidemiol Rev* 15:486-498. 1993
- [47] Kurman, R; Solomon, D; *The Bethesda system for reporting cervical /vaginal cytologic diagnoses* New York: Springer, 1994
- [48] Lee, KR; Mister, LJ; Granter, SR; *Papanicolaou smear sensitivity for adenocarcinoma in situ of the cervix. A study of 34 cases*. *Am J Clin Pathol* 107:30-35. 1997

- [50] Luzzatto, R; Boon, ME; *Contribution of the endocervical Cytobrush sample to the diagnosis of cervical lesions. Acta Cytol* 40:1143-1147. 1996
- [51] Nieminen, P; Kallio, M; Hakama, M: *The effect of mass screening on incidence and mortality of squamous and adenocarcinoma of cervix uteri. Obstet Gynecol* 85:1017-1021. 1995
- [52] Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, et al., eds. *Cancer Incidence in Five Continents. Vol VII*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. (IARC Scientific Publication No. 143). 1997
- [53] Percy C, Van Holten V, y Muir C, *International Classification of Diseases for Oncology*, Segunda edición. Génova: Organización Mundial de la Salud 1990
- [54] Platz CE y Benda JA. Female genital tract cancer. *Cancer* 75:270-294. 1995
- [55] Pontén, J., Adami, H. O., Bergström, R., et al *Strategies for global control of cervical cancer. Int. J. Cancer.* 1995
- [56] Schiffman MH y Brinton L.A. *The epidemiology of cervical carcinogenesis. Cancer* 76:1888-1901. 1995
- [57] Takahashi, M; *Citología del cancer*, segunda edición, 1982
- [58] Torres, J.. *Lesiones Escamosas Intraepiteliales Cervicales (LEIC)*. Universidad del Valle
- [59] World Health Organization. *Manual of the International Classification of Diseases for Oncology*, Primera edición. Génova: Organización Mundial de la Salud 1976