

**ANÁLISIS DE BIOPSIAS DE SENO PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE
LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA POR MEDIO DE
TRATAMIENTO DE IMÁGENES**

**CINDY LORENA BAUTISTA BOHÓRQUEZ
BELKYS ZULAY ORTIZ VILLAMIZAR**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO MECANICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2012

**ANÁLISIS DE BIOPSIAS DE SENO PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE
LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA POR MEDIO DE
TRATAMIENTO DE IMÁGENES**

**CINDY LORENA BAUTISTA BOHÓRQUEZ
BELKYS ZULAY ORTIZ VILLAMIZAR**

**Trabajo de Grado para Optar al Título de
Ingeniera de Sistemas**

Director:

**Víctor Eduardo Martínez Abaunza
Mg. Informática y Ciencias de la computación.**

Codirector(a):

**Olga Mercedes Álvarez Ojeda
MD. Especialista en patología**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO MECANICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2012

A mi hacedor de milagros, porque en realidad tienes cosas grandes y maravillosas para mí, y para ti mi hermosa Camilita, que fuiste la musa de mi inspiración.

Cindy Lorena Bautista Bohórquez

A Dios por darme las herramientas necesarias para salir adelante en cada una de mis metas en especial en ésta. A mis padres Sergio Ortiz y Gladys Villamizar, quienes de niña tomaron mis manos para apoyar mis primeros pasos, hoy cosechamos juntos los frutos de un gran esfuerzo, un gran logro. A mis hermanos por estar presentes apoyándome incondicionalmente. A amigos y familiares por su motivación constante. A mi compañera y amiga Cindy Bautista ¡Lo logramos!.

Belkys Zulay Ortiz Villamizar

AGRADECIMIENTOS

Queremos en primer lugar dar gracias a Dios por darnos la sabiduría necesaria para sacar este proyecto adelante, por llenarnos de esperanza en los momentos en que no se veían soluciones claras.

Damos gracias a nuestras familias, nuestro motor, quienes nos animaban a seguir luchando por cumplir esta meta, nuestros amigos que nos animaban con sus locuras a buscar soluciones cada vez que algo no salía bien.

Agradecemos al profesor Víctor Martínez porque sus aportes fueron de gran ayuda para la culminación exitosa de este proceso, a nuestra codirectora Olga Mercedes Álvarez quien muy amablemente nos acompañó e instruyó durante este proceso.

Queremos dar las gracias a la profesora Lola Xiomara Bautista por siempre estar dispuesta a orientarnos y proporcionarnos los medios para sacar una solución efectiva.

Al Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB) por brindarnos las herramientas básicas para emprender este proceso de investigación.

Y no puede faltar un agradecimiento especial para la Nona por hacer más amenas nuestras reuniones con sus ricas onces y por estar pendiente de nuestro bienestar.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. PRESENTACION DEL PROYECTO	22
1.1. OBJETIVOS	22
1.1.1. <i>Objetivo General</i>	22
1.1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	22
1.2. JUSTIFICACIÓN	23
1.2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	23
1.2.2. <i>Impacto esperado</i>	25
1.2.3. <i>Viabilidad</i>	26
1.2.4. <i>Estado del Arte</i>	26
2. MARCO TEÓRICO	27
2.1. FUNDAMENTOS DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES	27
2.2. ETAPAS DEL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	28
2.2.1. <i>Adquisición de la imagen</i>	29
2.2.2. <i>Técnicas de preprocesamiento</i>	29
2.2.3. <i>Segmentación de la imagen</i>	35
2.2.4. <i>Descripción de la imagen</i>	44
2.2.5. <i>Reconocimiento e interpretación</i>	45
2.3. MORFOLOGÍA MATEMÁTICA	45
2.3.1. <i>Operadores básicos</i>	46
2.4. CANCER DE MAMA	47
2.4.1. <i>Factores de riesgo</i>	50
2.4.2. <i>Diagnostico</i>	50
2.4.3. <i>Factores pronóstico</i>	51
2.4.4 <i>Tratamiento</i>	51
2.5. RECEPTORES HORMONALES	52
2.5.1. <i>Tipos de receptores hormonales</i>	53
2.5.2. <i>Características generales de los receptores</i>	53
2.6. ESTRÓGENOS	54

2.6.1. <i>Receptores de estrógenos</i>	54
2.7. PROGESTERONA.....	56
2.7.1. <i>Receptores de progesterona</i>	57
2.8 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA.....	58
2.9. INMUNOHISTOQUIMICA	59
2.9.1. <i>Descripción de la metodología inmunohistoquímica</i>	60
3. CONSTRUCCION DEL MODELO COMPUTACIONAL	62
3.1. METODOLOGIA DE DESARROLLO	62
4. ADQUISICION	64
5. PREPROCESAMIENTO	66
6. SEGMENTACION.....	68
6.1. UMBRALIZACION.....	68
6.1.1. <i>Iterativo</i>	68
6.1.2. <i>Pun Kapur</i>	70
6.1.3. <i>Matlab</i>	71
6.2. MORFOLOGIA MATEMATICA.....	72
6.3. <i>EXTRACCION DE BORDES</i>	73
6.3.1 <i>Canny</i>	73
6.3.2. <i>Sobel</i>	74
6.3.3. <i>Prewitt</i>	75
7. DESCRIPCIÓN	77
8. BASE DE DATOS	81
9. MODELO COMPUTACIONAL	83
10. RESULTADOS	92
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	94
BIBLIOGRAFIA	95
ANEXO 1. FUNCIONAMIENTO DE LA HERRAMIENTA SOFTWARE.....	98

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de los Casos de uso del sistema.....	84
Tabla 2. Análisis de resultados.	92
Tabla 3. Resultados de la clasificación	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Etapas fundamentales del procesamiento digital de imágenes	28
Figura 2. Ejemplo de ecualización del Histograma desarrollado en Matlab.....	31
Figura 3. Esquema de imagen de color RGB con los correspondientes pixeles de cada componente.....	33
Figura 4. Cubo modelo RGB.....	34
Figura 5. Modelo HSI.....	35
Figura 6. Concepto de primera y segunda derivada para la extracción de bordes.	36
Figura 7. Gradiente de $f(x, y)$ a lo largo de la dirección de r	37
Figura 8. Ejemplos de detección de bordes; en cada caso a la izquierda está el gradiente de las imágenes y a la derecha mapa de bordes.	38
Figura 9. Histogramas de intensidad; izq. Umbral único; der. Umbrales múltiples.	40
Figura 10. Ejemplos imágenes segmentadas según diferentes métodos.	42
Figura 11. Ejemplo de crecimiento de regiones.	43
Figura 12. Anatomía de la mama femenina.	48
Figura 13. Tumor en la mama femenina.	49
Figura 14. Visualización en el microscopio de los receptores de estrógenos y progesterona.	54
Figura 15. Positividad inmunohistoquímica nuclear (a) leve (b) moderada (c) intensa para receptores de estrógenos.	55
Figura 16. Positividad inmunohistoquímica nuclear (a) leve (b) moderada (c) intensa para receptores de progesterona.....	57
Figura 17. Imagen de Receptores de Progesterona obtenida en la primera etapa de adquisición.	65
Figura 18. Imagen de Receptores de Estrógenos Positiva, obtenida en la segunda etapa de adquisición.	65
Figura 19. Función de transformación de intensidad imadjust. (a) Imagen original (b) Función imadjust.....	67
Figura 20. Resultado de la segmentación utilizando el método iterativo.	69
Figura 21. Resultado de la segmentación utilizando el método de Pun Kapur.	71
Figura 22. Resultado de la segmentación utilizando el método ofrecido por Matlab.	72
Figura 23. Resultado de la obtención de bordes.....	75
Figura 24. Histograma capa de Tono.....	78

Figura 25. Histograma con la normalización de dos imágenes positivas.....	78
Figura 26. Histograma con la normalización de una imagen positiva comparada con una negativa.	79
Figura 27. Histograma de distribución de intensidades de la capa S.....	80
Figura 28. Base de datos.....	81
Figura 29. Diagrama de casos de uso.	83
Figura 30. Ventana principal de la Herramienta Software.....	98
Figura 31. Menú Paciente.....	99
Figura 32. Registrar Paciente.....	100
Figura 33. Buscar Paciente.....	100
Figura 34. Ventana Imagen.....	101
Figura 35. Ventana Datos Imagen.....	102
Figura 36. Opción Cargar Imagen.....	102
Figura 37. Resultado de la opción Cargar Imagen.....	103
Figura 38. Ventana Preprocesamiento.....	104
Figura 39. Visualización de la imagen balanceada en la Ventana Imagen.....	105
Figura 40. Opción segmentación.....	106
Figura 41. Visualización de la Imagen Segmentada.....	107
Figura 42. Ventana Análisis.....	108
Figura 43. Ventana Resultados.....	109

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Funcionamiento de la Herramienta Software	98

GLOSARIO

ADQUISICIÓN: Obtención de la imagen digital a través de la utilización de un equipo electrónico especializado.

ANTÍGENO: Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.

APOPTOSIS: Es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente.

BIOMARCADORES: Indicador de la presencia o extensión de un proceso biológico que está directamente vinculado con la manifestación clínica y la evolución de una patología determinada.

CARCINOMA DUCTAL: Neoplasia cuyas células están confinadas en el interior de un conducto.

CARCINOMA LOBULILLAR: Se refiere a cambios neoplásicos no cancerosos en las células que revisten los lóbulos o lobulillos de la mama en los extremos distales de los conductos mamarios.

CONTRASTE: Se define como la diferencia relativa en intensidad entre un punto de una imagen y sus alrededores.

ECUALIZACIÓN DEL HISTOGRAMA: Es una transformación que pretende obtener para una imagen un histograma con una distribución uniforme.

FACTOR PRONÓSTICO: Se conoce como cualquier parámetro, conocido en el diagnóstico o después de la cirugía, que se asocia con una determinada supervivencia, global o libre de enfermedad.

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

GALACTÓFOROS: Son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón.

GRANULARIDAD: En fotografía se entiende por granularidad o grano al tamaño de las partículas que forman la capa fotosensible que recubre la película fotográfica o el papel fotográfico.

HISTOGRAMA: Representa la frecuencia relativa de los niveles de gris de la imagen.

INMUNOHISTOQUÍMICA: Es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina.

NEOPLASIA: Es el proceso de proliferación anormal (multiplicación abundantemente) de células en un tejido u órgano que desemboca en la formación de un neoplasma.

HORMONAS PEPTÍDICAS: Son una clase de péptidos que son secretados en el torrente circulatorio y tienen una función endocrina en el animal vivo.

PROLIFERACIÓN CELULAR: Es el incremento del número de células por división celular.

RECEPTORES HORMONALES: Entidad celular de naturaleza proteica que une específicamente determinada hormona o fármaco y que, como consecuencia de tal unión, inicia una serie de procesos a nivel celular que, en última instancia, determinan la respuesta fisiológica.

REFLECTIVIDAD: Es la fracción de radiación incidente reflejada por una superficie.

SATURACIÓN: Es la intensidad de un matiz específico.

SEGMENTACIÓN: Divide una imagen en sus partes constituyentes u objetos, para extraer cierta información subyacente para su posterior análisis.

TRANSFORMADA DE FOURIER: Es básicamente el espectro de frecuencias de una función.

UMBRALIZACIÓN: Es una de las técnicas más comunes en el proceso de segmentación de la imagen.

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS DE BIOPSIAS DE SENO PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA POR MEDIO DE TRATAMIENTO DE IMÁGENES.*

AUTORAS: BAUTISTA BOHÓRQUEZ, Cindy Lorena**
ORTIZ VILLAMIZAR, Belkys Zulay**

PALABRAS CLAVE: Tratamiento Digital de Imágenes, Segmentación de color, segmentación, cáncer de Seno, receptores hormonales, inmunohistoquímica, biopsias, inmunoreactividad.

CONTENIDO:

El cáncer de seno es el cáncer con más frecuencia a nivel mundial entre las mujeres, teniendo el mayor porcentaje de Mortalidad (12.5); seguido por el cáncer de Cuello Uterino; Colombia no está exenta y éste también es el de mayor incidencia y mortalidad en el país¹.

La determinación de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona, se realiza sobre tejido canceroso, a través de la utilización de muestras de biopsias; las cuales son tratadas con métodos de inmunotinción (inmunohistoquímicos), el resultado de este proceso permite una visualización directa de los receptores en los núcleos, permitiendo el calculo de la expresión nuclear que en última instancia contribuirá en la formulación del tratamiento más adecuado; en la actualidad este proceso se realiza de forma manual, siendo propenso al error humano, dificultando la clasificación dentro de las diferentes intensidades, debido a que no existe una técnica estándar para la realización del proceso, lo que puede ocasionar que varíe de un observador a otro.

El presente proyecto se deriva de una de las línea trabajadas por el Grupo de Investigación en Ingeniería biomédica (GIIB), como es el tratamiento de imágenes médicas, orientándose a la construcción de herramientas software que faciliten la labor de los médicos patólogos; en este caso en lo relacionado con la formulación de un tratamiento adecuado según la determinación de la expresión de receptores de estrógenos y progesterona del cáncer de mama.

En su desarrollo se emplearon diversas técnicas de tratamiento digital de imágenes, bases de datos, y una metodología de Prototipado Evolutivo.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas.

Director: Víctor Eduardo Martínez Abaunza. Codirector(a): Dra. Olga Mercedes Álvarez Ojeda.

ABSTRACT

TITLE: BREAST BIOPSY ANALYSIS TO DETERMINE RECEPTORS EXPRESSION OF ESTROGEN AND PROGESTERONE THROUGH IMAGE TREATMENT.*

AUTHORS: BAUTISTA BOHÓRQUEZ, Cindy Lorena **
ORTIZ VILLAMIZAR, Belkys Zulay **

KEY WORDS: Digital Image Treatments, Color segmentation, Breast cancer, Hormonal receptors, Immunohistochemistry, Biopsy, Immunoreactivity.

CONTENT:

Breast cancer is the most common cancer worldwide among women, considering it has the highest mortality rate (12.5%), followed by cervical cancer. Colombia is not exempted and breast cancer is also the most incident, with the highest mortality rate all over the country.

The determination of the receptor's expression of estrogen and progesterone is done on cancerous tissue through biopsy samples, which are treated with immunostaining methods (immunohistochemistry). The result of this process enables a direct visualization of the receptors in the nucleus, allowing the nuclear expression's calculation that eventually will contribute in the formulation of the most appropriate treatment. At present days, this process is done manually, being susceptible to human mistaken, making difficult the classification within the different intensities, because of the lack of a standard technique for the realization of the process; which may cause result variation among the different observers.

This Project derives from one of the lines worked by the Research Group for Biomedical Engineering (GIIB), the Medical Image treatment, oriented to the construction of software tools that ease pathologist's labor; related to the formulation of an adequate treatment according to the determination of the receptors expression of estrogen and progesterone of breast cancer.

Several techniques of digital image treatment and database were used in the development of this Project, in addition of an evolutionary prototyping methodology.

* Minor Degree Project

** Faculty of Physic and Mechanic Engineering. School of System Engineering. Director: Víctor Eduardo Martínez Abaunza. Codirector: Dr. Olga Mercedes Álvarez Ojeda.

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto contiene una herramienta software que permite realizar una medición a la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona presentes en muestras de biopsias de seno, marcadas utilizando métodos de inmunotinción; este cálculo contribuye a la formulación del tratamiento de un paciente específico.

El cáncer de seno es el tipo de cáncer más frecuente en la población femenina global con una incidencia del 22.9 % y una mortalidad del 12.4 % según la base de datos de la Organización Mundial de la Salud (Globocan 2008); en Colombia ocupa también el primer lugar de frecuencia, según esta base de datos con una incidencia de 21.5% y una mortalidad de 12.3 %. En Santander según el Registro Poblacional de Cáncer del Área Metropolitana de Bucaramanga el cáncer de seno es también el más frecuente.

Estudios realizados han comprobado que el cáncer de mama es hormonodependiente, por lo que su comportamiento biológico es regulado en gran medida por la acción de las hormonas ováricas, estrógenos y progestágenos.² Además también se ha demostrado la utilidad de la determinación de la expresión de éstos últimos, ya que permiten elegir un tratamiento adecuado para los pacientes que presentan cáncer de mama, a demás facilita medir la respuesta al tratamiento hormonal, convirtiendo así la expresión de receptores de Estrógenos y Progesterona en una variable pronostica de gran valor.

En la actualidad su determinación se realiza a través de estudios inmunohistoquímicos sobre secciones tisulares usando anticuerpos específicos;

² Receptores estrogénicos alfa y Beta en cáncer de mama. Acta Medica Grupo Ángeles Vol.1 No. 3. Septiembre 2003
Patricia Sánchez Suárez.

esto ofrece la ventaja de la visualización directa de los receptores en los núcleos de las células neoplásicas, permitiendo evaluar la heterogeneidad tumoral y evitar los falsos positivos obtenidos por métodos bioquímicos.

Obtenidas las muestras, la estimación del estado de receptores de estrógenos y progesterona se basa en un conteo subjetivo de la expresión nuclear de cada muestra; determinando los porcentajes de ésta, junto con la intensidad presente en la misma. Estos conteos pueden variar según el observador, ya que no hay una técnica estándar para realizar dicho conteo; por lo que es un proceso dispendioso y propenso al error humano.

El presente proyecto describe una herramienta software que permite determinar la expresión e intensidad de los receptores de estrógenos y progesteronas en imágenes de biopsias de cáncer de mama. La metodología utilizada para la construcción del modelo computacional fue el prototipado evolutivo.

1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Desarrollar un algoritmo para determinar el porcentaje e intensidad de la expresión de receptores hormonales en células tumorales malignas como factor pronóstico del cáncer de mama basado en el procesamiento de imágenes.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Obtener imágenes microscópicas de biopsias de seno que serán analizadas durante el desarrollo del proyecto.
- Aplicar técnicas de procesamiento digital sobre las imágenes para determinar las áreas de interés (citoplasma y núcleo).
- Construir un algoritmo para caracterizar y calcular el porcentaje e intensidad de la expresión de receptores de estrógenos y progesterona en las imágenes, que sirva como factor pronóstico del cáncer de mama.
- Crear una interfaz de usuario apropiada para la implementación del algoritmo desarrollado.

1.2. JUSTIFICACIÓN

1.2.1. Definición del problema

Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) son proteínas especializadas que se encuentran en ciertas células del organismo. Estos receptores se unen a los estrógenos y a la progesterona, que son hormonas femeninas que circulan por la sangre, y promueven el crecimiento y división de nuevas células (principalmente en el endometrio, mama y ovarios), además del desarrollo de caracteres sexuales secundarios en la mujer

Debido a que algunos cánceres de mama son dependientes de hormonas, sus células tumorales presentan receptores de estrógenos y de progesterona en su núcleo; a dichos tumores se les conoce como hormono-dependientes y los estrógenos y la progesterona circulantes en la sangre de la persona quien lo padece fomentan su crecimiento.

Para conocer la presencia o ausencia de receptores de estrógeno y progesterona es necesario realizar pruebas sobre el tejido canceroso, en este caso a través de la utilización de muestras de biopsias, donde con ayuda de un grupo de técnicas de inmunotinción (inmunohistoquímicas) es posible visualizar los receptores en los núcleos de las células, si estos existen, así como no visualizarse cambios en la tinción de los núcleos en caso de su ausencia.

Para analizar y determinar el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción, se realiza un proceso manual, en el que se considera una determinada población de células cancerosas; sin embargo la naturaleza del proceso lo hace susceptible a error humano al depender en gran medida de las habilidades del patólogo.

Una vez determinado el diagnóstico de cáncer de mama, los factores pronóstico ayudan a enfocar el manejo y tratamiento de la enfermedad. Se conoce como factores pronósticos al conjunto de parámetros percibidos en el diagnóstico y asociados a una supervivencia global o libre de enfermedad o a una probabilidad de recuperación, en ausencia de un tratamiento.

Es de allí donde surge la necesidad de contar con una herramienta adecuada para la determinación de los porcentajes de receptores de estrógenos y progesterona en las muestras, dada su gran importancia para la formulación del tratamiento más adecuado en el cáncer de mama.

En las últimas décadas ha tenido un gran interés el desarrollo de herramientas para apoyar el análisis de tejidos y en particular el análisis de muestras de tinción inmunohistoquímicas; estos sistemas buscan reducir las variaciones en la detección inmunohistoquímica, mediante la mejora de las mediciones cuantitativas³; inicialmente estos sistemas utilizaban métodos basados en la valoración de áreas de interés, usando umbrales globales para distinguir el tejido teñido del fondo, sin considerar la identificación de núcleos individuales; además los resultados obtenidos suministraban información un poco confusa para los patólogos.

Las últimas investigaciones se han enfocado inicialmente en la eliminación de los problemas de pre-procesamiento frecuentes asociados a la luz, la transparencia y las imágenes borrosas; además se utiliza segmentación buscando separar regiones de acuerdo a características específicas (brillo absoluto, gradiente de brillo, color, forma, área, textura) u operaciones morfológicas.

³ Computer-aided classification of breast cancer nuclei. F. Schnorrenberg ¹, C.S. Pattichis ¹, K. Kyriacou ², M. Vassiliou ³, C.N. Schizas. Accepted for publication in the journal *Technology & Health Care*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, 1996.

En la mayoría de las investigaciones los resultados obtenidos fueron contrastados con los valores suministrados por médicos expertos, en éstos se encontró mayor sensibilidad en los procesos asistidos por computadora (80-85 %), así como un porcentaje de exactitud global entre el 80-90%. Por esta razón, se busca desarrollar una herramienta que se adecue a las necesidades existentes, a través de la obtención, procesamiento y reconocimiento de características específicas en las imágenes de biopsias de mama que presentan los receptores de estrógenos y progesterona, igualando y/o superando los porcentajes de efectividad obtenidos durante otras investigaciones.

1.2.2. Impacto esperado

Esta investigación traerá un avance significativo al Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander, debido a que no se cuenta con una herramienta software que permita la determinación de los porcentajes de estrógenos y progesterona.

Además traerá resultados positivos para el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB) ya que es una oportunidad de afianzar los conocimientos existentes sobre tratamiento digital de imágenes.

La Facultad de Salud (UIS) también se verá beneficiada, debido a que la culminación exitosa de este proyecto brindara mayor desarrollo e innovación tecnológica en los procesos de análisis e interpretación de muestras inmunohistoquímicas, al facilitar la realización de una tarea que en la actualidad se hace de forma manual.

1.2.3. Viabilidad

Para desarrollar este proyecto se cuenta con el apoyo del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB).

También se cuenta con el respaldo de especialistas en medicina y en tratamiento digital de imágenes, quienes por medio de conferencias nos ilustran acerca del tema, al mismo tiempo que nos presenta material bibliográfico para abordar eficazmente la problemática.

En cuanto a la infraestructura el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica nos garantizan los equipos para respaldar el desarrollo del proyecto, como lo son Cámaras, microscopios, casos de biopsias, bases de datos y las licencias para trabajar con el software específico.

1.2.4. Estado del Arte

Se han desarrollado herramientas software orientadas al apoyo de procesos médicos en diferentes áreas, con ayuda del tratamiento digital de imágenes. Muestra de esto son algunas de las herramientas desarrolladas por el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica; sin embargo el Grupo de Investigación hasta ahora está abordando temas relacionados con el cáncer de mama; a nivel Nacional no se encontró evidencia respecto a herramientas desarrolladas con el mismo fin; a nivel internacional en trabajos europeos diferentes autores citan en sus investigaciones la utilización de herramientas como BASS(Biosy Analysis Support System), CAS/200(Cell Analysis System); sin embargo estos productos tienen un alto costo comercial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTOS DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

En las últimas décadas se ha despertado un gran interés en el tratamiento digital de imágenes, impulsado por el flujo de nuevas aplicaciones y su creciente uso en campos comerciales, industriales, aplicaciones médicas e investigaciones científicas; en términos generales hace refiere a la manipulación de imágenes a través de un computador⁴; aplicando un conjunto de métodos sobre una imagen de entrada para producir una imagen modificada de salida o la extracción de un conjunto de rasgos distintivos de la imagen inicial. Estos procesos ofrecen mejora en la calidad de la información gráfica disponible para la interpretación humana y el procesamiento de los datos de la escena para la percepción autónoma por una máquina.⁵⁶

Una imagen contiene información descriptiva de la intensidad de luz del objeto que representa, proporcionada de tal manera que una persona puede visualizarla en un campo específico². Una imagen digital es definida como una función bidimensional $f(x,y)$, donde x y y representan coordenadas espaciales y el valor de f representa el nivel de intensidad en dichas coordenadas.⁷

Siendo todos valores infinitos discretos. Si se considera imágenes monocromáticas la intensidad se referirá al nivel de gris presente; mientras para imágenes de color la intensidad se referirá a la combinación individual de las diferentes intensidades del modelo utilizado. Con lo anterior una imagen digital

4 CASTLEMAN, Kenneth R. Digital Image Processing. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 1996

5 Shih, Frank Y. Image Processing and Mathematical morphology fundamentals and applications. Taylor & Francis Group. USA 2009.

6 González, Rafael C y Woods, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison-Wesley Iberoamericana S.A. USA. 1996.

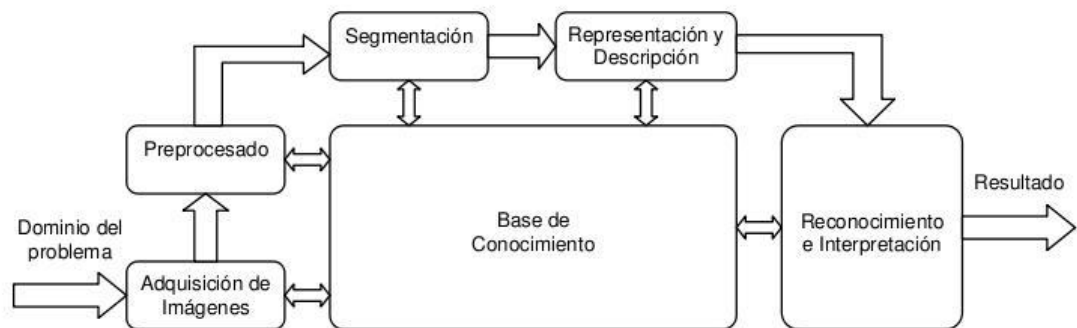
7 González, Rafael C y Woods, Richard. Digital Image Processing Using Matlab.

puede ser representada como un sistema de coordenadas de una matriz, en el que cada elemento de ésta recibe el nombre de *pixel* o *pels*.

2.2. ETAPAS DEL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Considerando una imagen como una representación numérica de un objeto que usa variables discretas (píxeles) y una escala de grises cuantificables, se pueden realizar cálculos sobre dicha representación a través de métodos numéricos para obtener un resultado esperado. Con lo anterior y considerando los estudios realizados a través de la historia, se puede agrupar el procesamiento de imágenes en las etapas de la Figura 1.

Figura 1. Etapas fundamentales del procesamiento digital de imágenes



Fuente: González, Rafael C. y Woods, Richard E.⁸

- **Adquisición de la imagen:** obtención de la imagen digital a través de la utilización de equipo electrónico especializado.
- **Preprocesamiento:** se busca mejorar la imagen, esto se refiere a acentuar y realzar algunas características de la misma, como bordes o superficies a

⁸ GONZÁLEZ, Rafael C y Woods, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison-Wesley Iberoamericana S.A. USA. 1996

través de la manipulación de contraste, nivel de gris, filtrado, reducción del ruido, entre otros.

- **Segmentación:** consiste en la fragmentación de la imagen en sus componentes más representativos o partes constituyentes.
- **Descripción:** representación y descripción a través de ecuaciones o modelos matemáticas con el propósito de encontrar las propiedades que las identifica⁹; se basa en una selección de rasgos.
- **Reconocimiento:** Asignación de una etiqueta según la información obtenida; asignando significado a los objetos recocidos.

2.2.1. Adquisición de la imagen

Para la adquisición digital de imágenes se necesitan dos elementos. El primero es un dispositivo físico sensible a una determinada banda del espectro de energía electromagnética (como las bandas de rayos X, ultravioleta, visible o infrarrojo) y que produzca una señal eléctrica de salida proporcional al nivel de energía detectado. El segundo, denominado digitalizador, es un dispositivo para convertir la señal de salida del sistema sensible a la forma digital.

2.2.2. Técnicas de preprocesamiento

La base principal del desarrollo de proyecto está concentrada en las etapas de preprocesamiento y segmentación; en la primera se busca mejorar la imagen, esto se refiere a acentuar y realzar algunas características de la misma, como bordes o superficies a través de la manipulación de contraste, nivel de gris,

⁹ modelo computacional para caracterización de células endocervicales - Víctor Eduardo Martínez Abaunza 2007

filtrado, reducción del ruido, entre otros, buscando mayor efectividad en el posterior análisis para una aplicación específica. El proceso de mejora de la imagen no incrementa el contenido de la información de ésta; éste facilita la detección del rango dinámico de características elegibles

La mayor dificultad en la mejora de imágenes es la cuantificación del criterio de mejora; debido a esto la mayoría de estas técnicas son empíricas y para obtener un resultado satisfactorio requieren procedimientos iterativos¹⁰.

Esta etapa del procesamiento de imágenes se puede subdividir en dos categorías: *métodos en el dominio espacial* y *métodos en el dominio frecuencia*; en la primera se manipulan los píxeles de la imagen; mientras que en la segunda la manipulación de la imagen se realiza a través de la modificación de la Transformada de Fourier. Cada uno de esta categoría posee sus propias técnicas; se expondrá las generalidades de algunas y solo se citarán otras.

Métodos en el dominio espacial

- **Procesamiento por punto.**

Son técnicas que trabajan a partir de la transformación del nivel de gris; considerando que la mejora de un punto depende del nivel de gris del mismo; y por consiguiente operan cambiando el nivel de grises en cada pixel de forma independiente Considerando una transformación de intensidad en el nivel de gris simple se distinguen varios métodos: *aumento de contraste*, *negativo*, *comprensión de rango dinámico*, *fraccionamiento del nivel de gris* y *fraccionamiento de los planos de bits*.

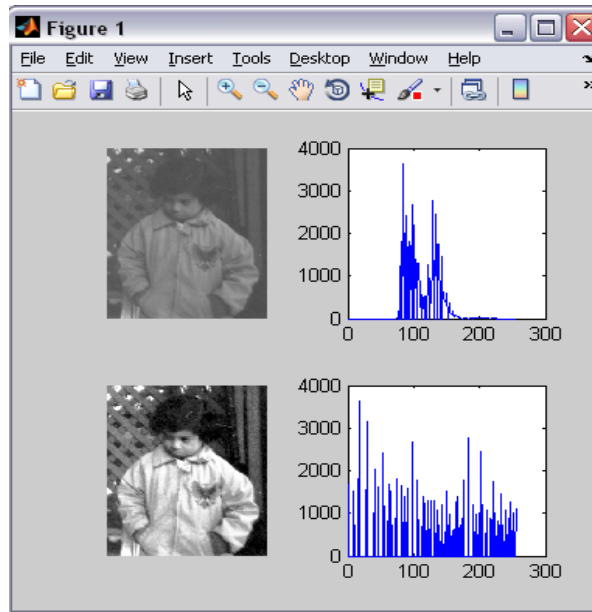
10 CASTLEMAN, Kenneth R. Digital Image Processing. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 1996

- **Ecuación del histograma**

Un Histograma es una función discreta $p(r_k) = n_k/n$ donde r_k es el k -ésimo nivel de gris; n_k es el número de píxeles de la imagen con ese nivel de gris y n es el número total de píxeles de la imagen con k comprendida en un rango de $[0; L-1]$.

Considerando los píxeles como variables continuas normalizadas donde los niveles de gris varían aleatoriamente en el intervalo $[0, 1]$, la ecualización del histograma es una transformación no lineal, caracterizada a través de la función de densidad de probabilidad de los diferentes niveles de gris. Si se emplea una función de distribución acumulada respecto a un valor r , se producirá una imagen con niveles de gris distribuidos uniformemente.

Figura 2. Ejemplo de ecualización del Histograma desarrollado en Matlab.



Fuente: Autoras.

En la parte superior se encuentra la imagen original con su respectivo histograma, en la parte inferior la imagen luego de aplicar la ecualización de la imagen junto con su histograma.

- **Filtrado espacial**

En él se emplea mascarar o filtros espaciales para mejorar la imagen; estos filtros pueden ser: paso bajo, paso alto o paso banda; los primeros hacen la imagen más borrosa y reducen el ruido, los segundos realzan contraste y detectan bordes y los últimos eliminan regiones elegidas y son empleadas particularmente en la restauración de imágenes.

Fundamentos del color

El análisis de imágenes a color es un potente descriptor que simplifica la identificación y extracción de objetos de una escena; además el ojo humano puede distinguir una amplia gama de colores comparado con los niveles de gris¹¹

- **Modelos de color**

Un modelo de color permite la especificación de un sistemas de coordenadas tridimensional en el que cada color asume el valor de un punto determinado, en la actualidad los modelos de color ha sido orientados hacia el hardware o hacia aplicaciones donde se pretende manipular el color.

RGB →monitores a color y cámaras

CMY →Impresoras a color

YIQ →Televisión a color estándar NTSC

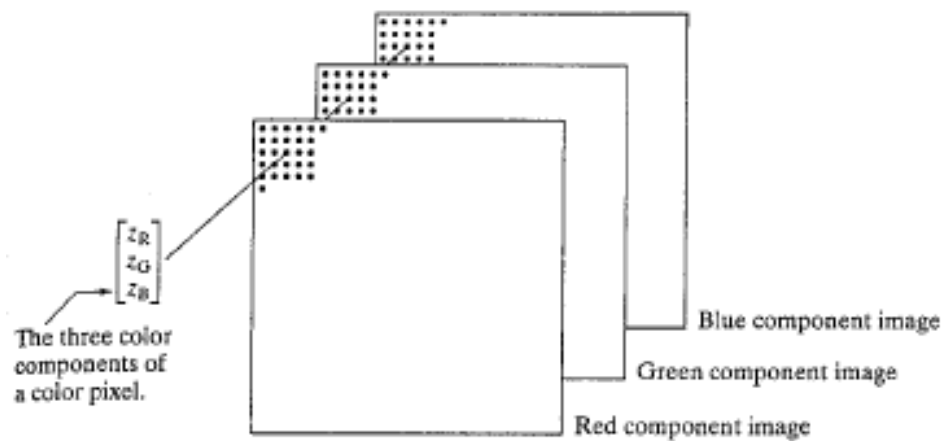
HSI y HSV →Manipulación de Imágenes a color¹²

11 PAJAREZ, M. Gonzalo; CRUZ, G. Jesús. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. AlfaOmega. México. 2008

12 Procesamiento de imágenes digitales - R. De la Rosa Flores - Facultad de ciencias de la computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México 2007.

Los modelos más utilizados para el procesamiento de imágenes son los RGB, YIQ y HSI. El modelo de color RGB, representa una imagen como una matriz $M \times N \times 3$ de píxeles de color que corresponden a los componentes, Rojo, Verde y Azul de dicha imagen en una localización específica.

Figura 3. Esquema de imagen de color RGB con los correspondientes píxeles de cada componente

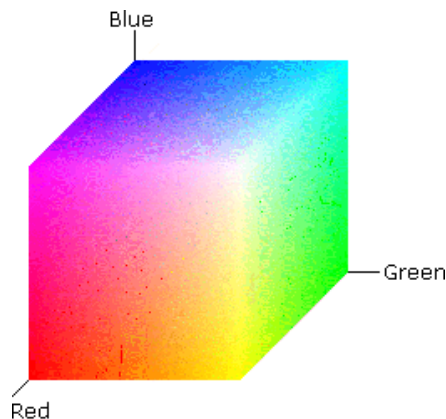


Fuente: González, Rafael C y Woods, Richard¹³

El espacio de puntos que abarca el modelo RGB está determinado por un cubo 3D en el que cada coordenada representa uno de los componentes del modelo, para obtener un color se extiende un vector desde el origen a un punto cualquiera del dicho cubo; la diferencia de un color a otro radica en la distancia vectorial entre ellos. En este modelo se utiliza una notación de intensidad que abarca una escala desde 0 a 255; donde el primero simboliza la ausencia de intensidad y el segundo es el máximo valor para ésta.

¹³ González, Rafael C y Woods, Richard. Digital Image Processing Using Matlab.

Figura 4. Cubo modelo RGB.



En cada uno de los vértices que se encuentran sobre los ejes x , y y z se encuentran los colores primarios, en los demás vértices se encuentran colores secundarios, en el origen se encuentra el color Negro a través de la diagonal se encuentra la escala de grises hasta terminar en el blanco.¹⁴

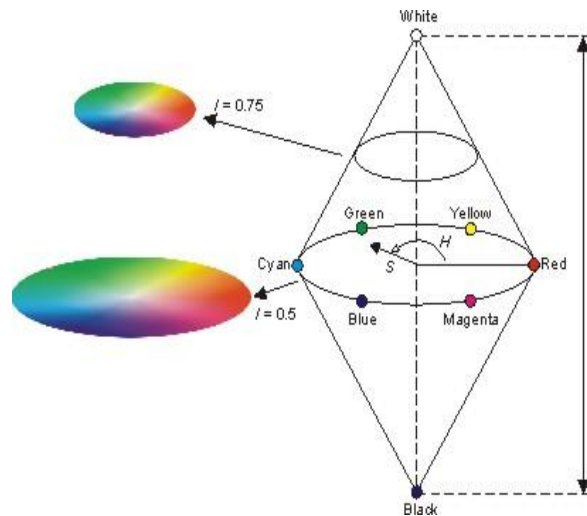
El modelo de color YIQ se utiliza principalmente en las emisiones comerciales de televisión; se considera una recodificación del modelo RGB, muy eficiente en la transmisión y compatibilidad de los estándares de televisión en blanco y negro. Aprovecha la sensibilidad del ojo humano a los cambios de saturación, empleando más ancho de banda para representar Y (luminancia) y menor para representar I y Q (información del color); en el tratamiento de imágenes su ventaja principal es el desacoplamiento de sus elementos que permite procesar la luminancia de una imagen sin afectar su contenido cromático.

El modelo HSI maneja tres componentes: Intensidad, Tono y Saturación; la primera es una componente desacoplada del contenido cromático de la imagen, mientras que las otras dos se relacionan con la manera como se percibe en color en el ojo humano. El espacio de colores HSI se representa por el eje vertical de

¹⁴ Imagen tomada de <http://msdn.microsoft.com/en-us/library/dd372185%28v=vs.85%29.aspx>

intensidad y la posición de los puntos de color que cae en planos perpendiculares a este eje.

Figura 5. Modelo HSI.



Fuente: Imagen tomada de <http://www.blackice.com/colorspaceHSI.htm>.

El eje vertical representa el valor de luminancia que equivale a la escala de grises; la saturación del color se mide como la magnitud del vector.

2.2.3. Segmentación de la imagen

La segmentación divide una imagen en sus partes constituyentes u objetos¹⁵, para extraer cierta información subyacente para su posterior análisis¹⁶. Los algoritmos de segmentación se pueden basarse en la discontinuidad o similitud de los niveles de gris presentes en la imagen; para el primer caso se detectan puntos aislados y bordes o fronteras de la imagen; mientras que en los segundos

15 González, Rafael C y Woods, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison-Wesley Iberoamericana S.A. USA. 1996

16 PAJAREZ, M. Gonzalo; CRUZ, G. Jesús. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. AlfaOmega. México. 2008

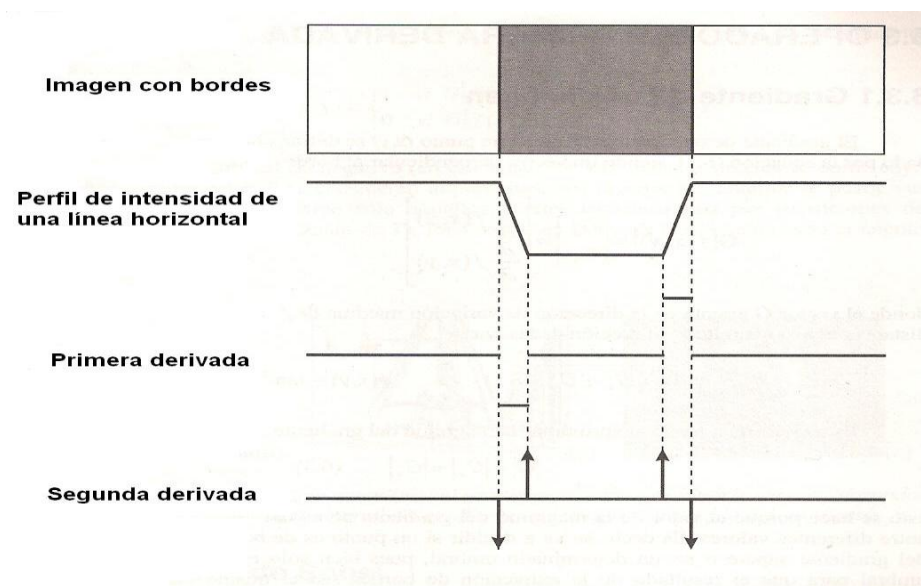
se enfocan en la determinación de regiones o secciones a través de umbralización u otros métodos.

- **Bordes**

Un borde es una línea que separa dos regiones; en el procesamiento de imágenes los puntos de bordes son pixeles alrededor de los cuales la imagen presenta una brusca variación de los niveles de gris.

En la extracción de bordes, se consideran conceptos relacionados a la primera o segunda derivada; en una imagen con presencia de borde, la primera derivada es cero en las regiones con intensidad constantes y presenta un valor constante en la transición de intensidad. La segunda derivada, es cero en todos los puntos excepto en al comienzo o final de una transacción de intensidad. En otras palabras un cambio de intensidad, se representa como un cambio brusco de la primera derivada, y se produce un cambio de signo en su valor, en la segunda derivada; este cambio es conocido como “zero-crossing”.

Figura 6. Concepto de primera y segunda derivada para la extracción de bordes.

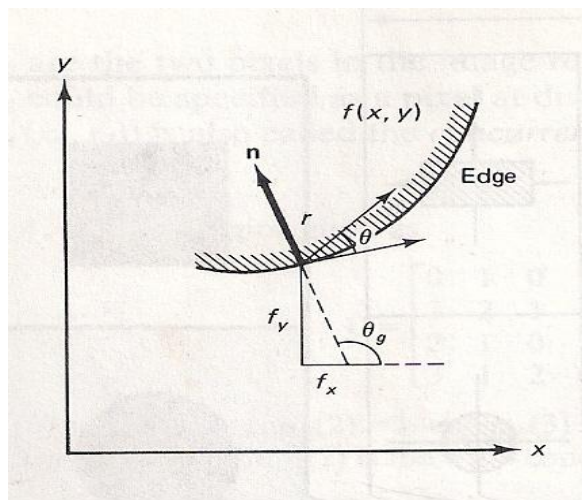


Dentro de los operadores basados en la primera derivada se encuentran los operadores gradiente, estos han originado diversos métodos para la extracción de bordes como son: los operadores de Sobel, Prewitt, Robert; Kirsch; Robinson, Frei-Chen.

El gradiente de una imagen $f(x, y)$ en un punto (x, y) se define como un vector bidimensional, perpendicular al borde, determinado por la ecuación:

$$G[f(x, y)] = \begin{bmatrix} G_x \\ G_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} f(x, y) \\ \frac{\partial}{\partial y} f(x, y) \end{bmatrix} \quad (1.1)$$

Figura 7. Gradiente de $f(x, y)$ a lo largo de la dirección de r .

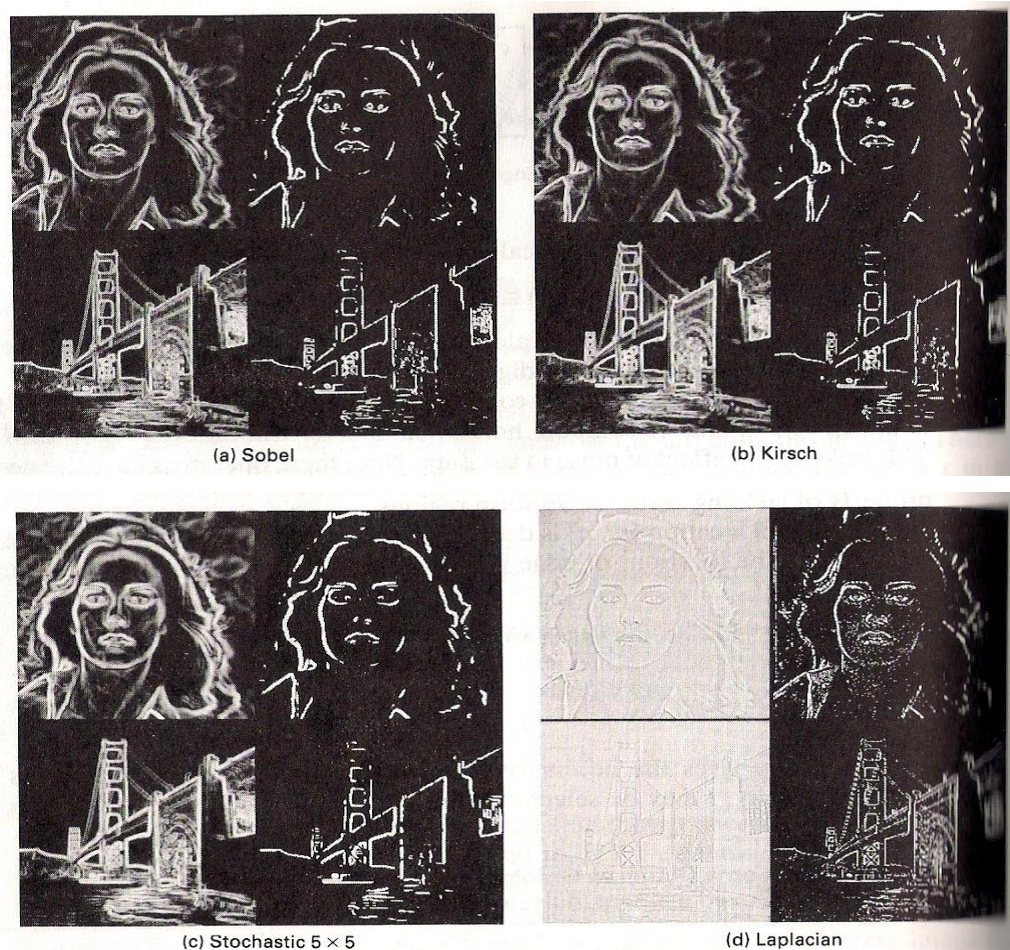


Fuente: CASTLEMAN, Kenneth R. ¹⁷

¹⁷ CASTLEMAN, Kenneth R. Digital Image Processing. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 1996.

Dentro de los operadores basados en la segunda derivada se encuentran los operadores de Laplaciano y Laplaciano de la Gaussiana.

Figura 8. Ejemplos de detección de bordes; en cada caso a la izquierda está el gradiente de las imágenes y a la derecha mapa de bordes.



Fuente: JAIN, Anil K.¹⁸

¹⁸ JAIN, Anil K. Fundamentals of Digital Image Processing. Prentice Hall. 1989.

- **Umbralización**

Es una de las técnicas más comunes en el proceso de segmentación de la imagen. Se basa en la idea; que la imagen posee regiones con niveles de luminosidad semejantes, quienes al ser representados en un histograma muestran unas modas dominantes separadas por un nivel al que se llama *umbral*.¹⁹

La determinación del valor umbral U está dada por la función:

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

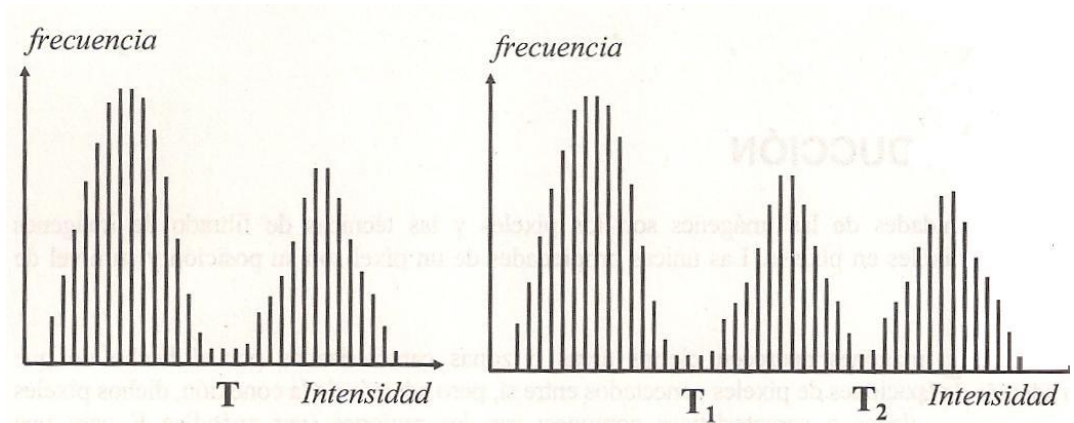
Donde $f(x, y)$ es el nivel de gris del punto (x, y) y $p(x, y)$ representa una propiedad local en dicho punto³, con lo anterior una imagen umbralizada $g(x, y)$ se define como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 \dots \text{si} \dots f(x, y) > T \\ 0 \dots \text{si} \dots f(x, y) \leq T \end{cases} \quad (1.3)$$

Así lo los pixeles marcados con 1 corresponderán a objetos, mientras que los pixeles marcados con 0 corresponderán al fondo.

19 Modelo computacional para caracterización de células endocervicales - Víctor Eduardo Martínez Abaunza 2007

Figura 9. Histogramas de intensidad; izq. Umbral único; der. Umbrales múltiples.



Fuente: PAJAREZ, M. Gonzalo; CRUZ, G. Jesús.²⁰

Tipos de Umbrales

- **Umbrales globales**

Se usan en imágenes con una clara distinción entre los objetos y el fondo sobre el que se sitúan; además en aquellas cuya iluminación es relativamente uniforme.

El umbral T depende solo de la función $f(x, y) \rightarrow T=T[f(x, y)]$ (1.4)

- **Umbral local**

Se usa en imágenes que debido a la arbitrariedad de la iluminación presentan sombras o reflejos y cuyo análisis se realiza de forma local para compensar este hecho. El umbral T depende de $f(x,y)$ y alguna propiedad local de dicho punto. \rightarrow

$$T=T[f(x, y); p(x, y)] \quad (1.5)$$

²⁰ AJAREZ, M. Gonzalo; CRUZ, G. Jesús. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. AlfaOmega. México. 2008.

- **Umbral dinámico**

Se usan en imágenes cuando el fondo no es constante y el contraste de los objetos dentro de la imagen varia; el umbral se define como una función de posición de la imagen que varia lentamente.

$$T=T[x, y; f(x, y), p(x, y)] \quad (1.6)$$

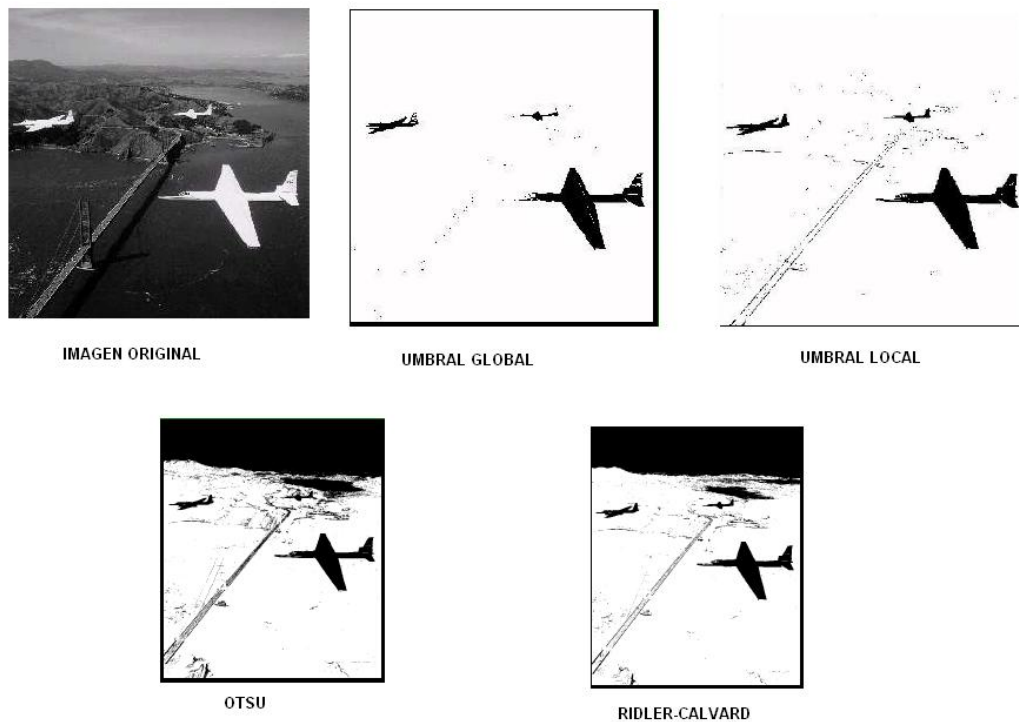
Determinación del umbral optimo.

El valor del umbral puede afectar el tamaño del objeto extraído, por esta razón se necesita un óptimo y consistente método para establecer el valor del umbral. Un umbral óptimo se caracteriza por presentar en su histograma picos de intensidad altos, estrechos y simétricos, separados por profundos valles.

- **Selección por características de frontera:** En esta solo se consideran aquellos pixeles que están cercano a dentro de la frontera entre los objetos y su entrono, aumentado la simetría en los picos del histograma; además si se usan píxeles que cumplen medidas basadas en operadores gradiente y Laplaciano se obtendrán valles más profundos entre los picos del histograma. El gradiente permite determinar si un píxel es un borde o no y el Laplaciano indica si está en el lado claro u oscuro de la frontera. Con esto se crea una imagen binaria segmentada en la que los objetos de interés se representan con **0** (negro) y el fondo en valores de **255**(Blanco).
- **Selección por varias variables:** Además de la intensidad también se puede considerar otras variables; por ejemplo en las imágenes de color cada píxel está caracterizado por 3 valores (RGB), permitiendo la construcción de un histograma tridimensional. En este caso la umbralización se centra en encontrar agrupaciones de puntos en este espacio tridimensional.

- **Método de Otsu:** Al suponer que el histograma está formado por la suma de dos densidades de probabilidad gaussianas, y que a medida que estas se asemejan al histograma real, las desviaciones estándar deben disminuir y como consecuencia se debe elegir aquel umbral que minimice las sumas de las varianzas de las dos divisiones del histograma.
- **Método de Ridler-Calvard:** Obtiene el umbral mediante un proceso iterativo en el cual se calcula inicialmente el valor medio de la imagen, determinando dos clases cuya intensidad es la menor o mayor. Luego se determina los valores medios de estas clases y se repite este proceso de forma iterativa considerando un factor de parada ϵ .

Figura 10. Ejemplos imágenes segmentadas según diferentes métodos.



Fuente: MARTINEZ, José Ramiro. ²¹

²¹ MARTINEZ, José Ramiro. Visión por computador: técnicas de Segmentación I. documento en línea Universidad de Sevilla. Fecha consulta Mayo 2011. URL: http://www.esi2.us.es/~jdedios/asignaturas/Master_1.pdf.

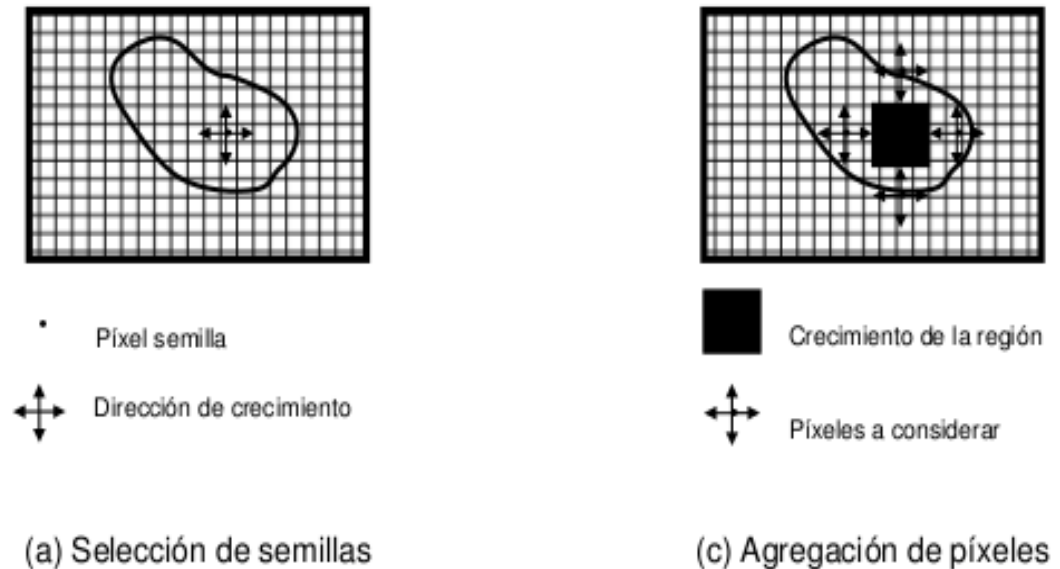
- **Segmentación orientada a las regiones**

A diferencia de la Umbralización estas técnicas están basadas en encontrar directamente las regiones.

Crecimiento de regiones

Se encarga de agrupar píxeles o subregiones dentro de regiones más grandes; inicia con un conjunto de puntos generadores a partir de los cuales se va extendiendo la región al agregar los puntos próximos de características similares. Hay que considerar que el crecimiento de regiones presenta algunos problemas²²: entre ellos la selección de los generadores iniciales, la adecuada selección de propiedades para la inclusión de puntos y la formulación de la regla de parada.

Figura 11. Ejemplo de crecimiento de regiones.



Fuente: Víctor Eduardo Martínez Abaunza²³

²² González, Rafael C y Woods, Richard E. Tratamiento Digital de Imágenes. Addison-Wesley Iberoamericana S.A. USA. 1996.

División y fusión de regiones

Consiste en subdividir la imagen inicialmente en un conjunto de regiones arbitrarias y después fusionar o dividir dichas regiones.

2.2.4. Descripción de la imagen

El conjunto resultante de píxeles segmentados requieren una representación y descripción para su procesamiento en el computador. Para representarlo se pueden considerar características externas (Contorno, se elige cuando el objetivo se centra en las características de forma) o internas (Píxeles de la región, se elige cuando el principal interés se centra en las propiedades de reflectividad).

Los datos producidos durante la segmentación, raramente se utilizan para obtener descriptores, normalmente se utilizan esquemas que compacten los datos en representaciones más útiles en el cálculo de descriptores. Entre los diferentes métodos de representación se encuentran: *códigos de cadena*, *aproximaciones poligonales*, *firmas*, *lados del contorno*, entre otros.

Estas representaciones permiten formular descriptores tanto para el contorno como para las regiones; en el desarrollo de este proyecto el interés principal son las regiones, así que se abordara un poco más el tema.

- **Descriptores simples**

Área de una región: Número de píxeles contenido en su contorno. Perímetro de una región: longitud de su contorno.

Ejes principales de una región: vectores propios de la matriz de covarianza obtenida al utilizar los píxeles interiores de la región como variables aleatorias.

²³ MODELO COMPUTACIONAL PARA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ENDOCERVICALES - VÍCTOR EDUARDO MARTÍNEZ ABAUNZA 2007 Fuente Imagen: González Penedo, Manuel. Óp. Cit.

- **Descriptores topológicos**

Son propiedades de una figura a las que no afecta ninguna deformación, en tanto no haya división horizontal o uniones en la figura (Ej. Número de huecos, Número de componentes conexas).

Textura

Proporciona intuitivamente medidas de propiedades como: suavizado, rugosidad y regularidad. Se utilizan diferentes métodos para describir la textura entre ellos destacan; los estadísticos (proporciona características de suavidad, rugosidad, granularidad, etc.), los estructurales (descripción de textura basada en líneas paralelas regularmente espaciadas) y los espectrales (basadas en las propiedades del espectro de Fourier).

2.2.5. Reconocimiento e interpretación

Esta última etapa está relacionada principalmente con las aplicaciones que requieren de un análisis automatizado de imágenes.

El análisis de imágenes es un proceso que consiste en descubrir, identificar y comprender los patrones que son relevantes en el rendimiento de un trabajo basado en imágenes. Uno de los principales objetivos del análisis de imágenes por computadora consiste en dotar a una máquina, en algún sentido, de la capacidad de aproximación, similar a la de los seres humanos.

2.3. MORFOLOGÍA MATEMÁTICA

Es importante abarcar este tema debido a que la morfología matemática es utilizada como una herramienta para extraer componentes de una imagen que sean útiles en la representación y descripción de la forma de una región, tales como contornos, esqueletos y cerco convexo. También son técnicas útiles para el

preprocesamiento o postprocesamiento de la imagen, tales como el filtrado morfológico, la reducción y el recortado.

El lenguaje de la morfología matemática es la teoría de conjuntos.

Elemento estructurante

La idea básica en la morfología matemática es probar una imagen con una forma predefinida simple sacando conclusiones sobre cómo esta forma encaja o no las formas en la imagen. Éstos son algunos ejemplos de elementos estructurantes ampliamente utilizados (denotados por B):

Sea $E = \mathbb{R}^2$; B es un disco abierto de radio r , centrado en el origen.

Sea $E = \mathbb{Z}^2$; B es un cuadrado 3x3.

Sea $E = \mathbb{Z}^2$; B es la "cruz".

2.3.1. Operadores básicos

Las operaciones básicas son operadores de cambio-invariante estrechamente relacionados con la suma de Minkowski.

Sea E un espacio euclidiano o una cuadrícula entera y A una imagen binaria en E .

- **Erosión**

La erosión de la imagen binaria A por el elemento estructurante B está definida por:

$$A \ominus B = \{z \in E \mid B_z \subseteq A\} \quad (1.7)$$

Donde B_z es la traslación de B por el vector z , esto es,

$$B_z = \{b + z \mid b \in B\}, \forall z \in E. \quad (1.8)$$

- **Dilatación**

La dilatación de A por el elemento estructurante B se define por:

$$A \oplus B = \bigcup_{b \in B} A_b \quad (1.9)$$

Si B tiene un centro en el origen, entonces la dilatación de A por B se puede entender como el lugar geométrico de los puntos cubiertos por B cuando el centro de B se mueve dentro de A .

- **Apertura**

La apertura de A por B se obtiene por la erosión de A por B , seguida por la dilatación de la imagen resultante por B :

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (1.10)$$

- **Cierre**

El cierre de A por B se obtiene por la dilatación de A por B , seguida por la erosión de la estructura resultante por B :

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (1.11)$$

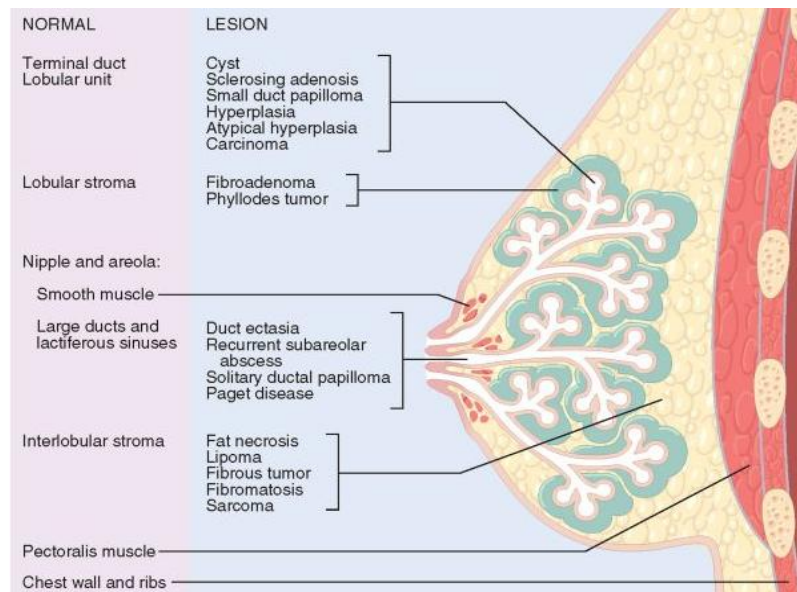
2.4. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el crecimiento desenfrenado de células malignas en el tejido mamario, debido a la acción de las hormonas, estas juegan un papel muy importante aquí, por ser sustancias que el organismo produce naturalmente, y que

estimulan el crecimiento de los tejidos sensibles a las mismas, tales como las glándulas mamarias.

Cuando el cáncer surge en los tejidos de las mamas, es posible que las hormonas lo ayuden a crecer y a propagarse por otros órganos. Por esta razón, es probable que con la ayuda de fármacos que bloqueen la producción de hormonas o que modifiquen la forma en que éstas operan en el organismo se logre luchar contra el cáncer.

Figura 12. Anatomía de la mama femenina.



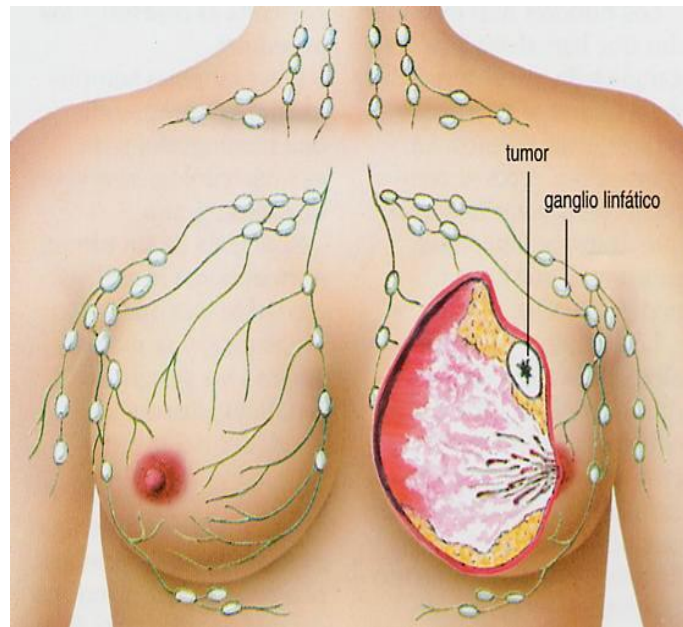
Existen dos tipos principales de cáncer de mama:

- El carcinoma ductal: es el más frecuente, y se presenta en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón.
- El carcinoma lobulillar: se presenta en unas partes de las mamas, llamadas lobulillos, que producen la leche materna.

El cáncer de mama puede ser invasivo o no. Invasivo significa que se ha propagado desde el conducto galactóforo o lobulillo a otros tejidos en la mama). No invasivo significa que aún no ha invadido otro tejido mamario. El cáncer de mama no invasivo se denomina *in situ*.

- El carcinoma ductal *in situ* (CDIS), o carcinoma intraductal, es un cáncer de mama en el revestimiento de los conductos galactóforos que todavía no ha invadido tejidos cercanos. Sin tratamiento, puede progresar a cáncer invasivo.
- El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) es un marcador del aumento del riesgo de cáncer invasivo en la misma o ambas mamas.²⁴

Figura 13. Tumor en la mama femenina.



²⁴ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.htm>

2.4.1. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo asociados a el hecho de contraer cáncer de mama incluyen una edad avanzada, el género, la primera menstruación a temprana edad, edad avanzada en el momento del primer parto o nunca haber dado a luz, antecedentes familiares de cáncer de mama, el tomar hormonas tales como estrógeno y progesterona, la densidad de la mama, el consumir licor, el estilo de vida que se lleve y hecho de ser de raza blanca.

2.4.2. Diagnóstico

Los exámenes utilizados para diagnosticar y vigilar a los pacientes con cáncer de mama abarcan:

- Resonancia magnética de las mamas: para ayudar a identificar mejor la tumoración mamaria o evaluar un cambio anormal en una mamografía.
- Ecografía de las mamas: para mostrar si la tumoración es sólida o llena de líquido.
- Biopsia de mama: usa métodos como biopsia aspirativa, guiada por ecografía estereotáctica o abierta.
- Tomografía computarizada: para ver si el cáncer se ha diseminado.
- Mamografía: para detectar cáncer de mama o ayudar a identificar la tumoración o protuberancia mamaria.
- Tomografía por emisión de positrones (TEP)
- Biopsia de ganglio linfático: centinela para ver si el cáncer se ha diseminado.

Si el especialista diagnostica cáncer de mama, se realizaran exámenes adicionales para comprobar si el cáncer se ha diseminado por otros órganos del cuerpo. Esto se denomina estadificación, y es de gran ayuda para guiar el tratamiento y seguimiento futuro del mismo.

Los estadios o fases del cáncer de mama van de 0 a IV, Cuanto más alto sea el número del estadio, más avanzado estará el cáncer.

El diagnóstico de cáncer de mama sólo puede adoptar el carácter de definitivo por medio de una biopsia mamaria.

2.4.3. Factores pronóstico

Una vez establecido el diagnóstico de cáncer de mama invasivo, los factores pronósticos y predictivos ayudarán en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Se reconoce como factor pronóstico a cualquier parámetro, conocido en el diagnóstico o después de la cirugía, que se asocie con una determinada supervivencia, global o libre de enfermedad, en ausencia de tratamiento adyuvante.²⁵

Existe acuerdo en considerar como validos los siguientes factores pronósticos: en la categoría de características de la enfermedad, el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico; entre las características del paciente independientes de la enfermedad, la edad; y como biomarcadores, medibles en tejidos, células y fluidos, el estado de los receptores esteroideos (RE-RP).

2.4.4 Tratamiento

El tratamiento se basa en muchos factores, incluyendo:

- a. El tipo y estadio del cáncer.
- b. Si el cáncer es sensible o no a ciertas hormonas.

²⁵ Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? Breast Cancer Res Treat 1994; 30: 117-126.

- c. Si el cáncer sobre-expresa una proteína llamada Her 2 neu que proviene de la amplificación de un gen.

En general, los tratamientos para el cáncer pueden abarcar:

- Fármacos quimioterapéuticos para destruir las células cancerosas.
- Radioterapia para destruir el tejido canceroso.
- Cirugía para extirpar el tejido canceroso.
- La hormonoterapia, la cual se prescribe a las mujeres con cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno con el fin de bloquear ciertas hormonas que estimulan el crecimiento del cáncer.
- La terapia dirigida, también llamada terapia biológica, es un tipo más nuevo de tratamiento para el cáncer. Esta terapia utiliza fármacos antineoplásicos especiales que focalizan ciertos cambios en una célula que pueden llevar al cáncer, como es el caso de las pacientes que sobre-expresan la proteína Her 2 neu.

2.5. RECEPTORES HORMONALES

Se ha denominado receptor a la entidad celular de naturaleza proteica que une específicamente determinada hormona o fármaco y que, como consecuencia de tal unión, inicia una serie de procesos a nivel celular que, en última instancia, determinan la respuesta fisiológica.

Los receptores hormonales se encuentran situados en la superficie de las células o en el interior de las mismas. Todos o casi todos los receptores hormonales son proteínas, además, cada receptor suele ser específico para una única hormona; ello determina qué hormona actuará sobre un tejido particular.

La determinación de receptores hormonales, puede realizarse mediante diferentes sistemas analíticos, como enzimoimmunoanálisis (EIA), carbón dextrano,

inmunohistoquímica (IHQ), polietilenglicol, entre otros. Cada uno de los cuales aporta sus ventajas y sus inconvenientes.

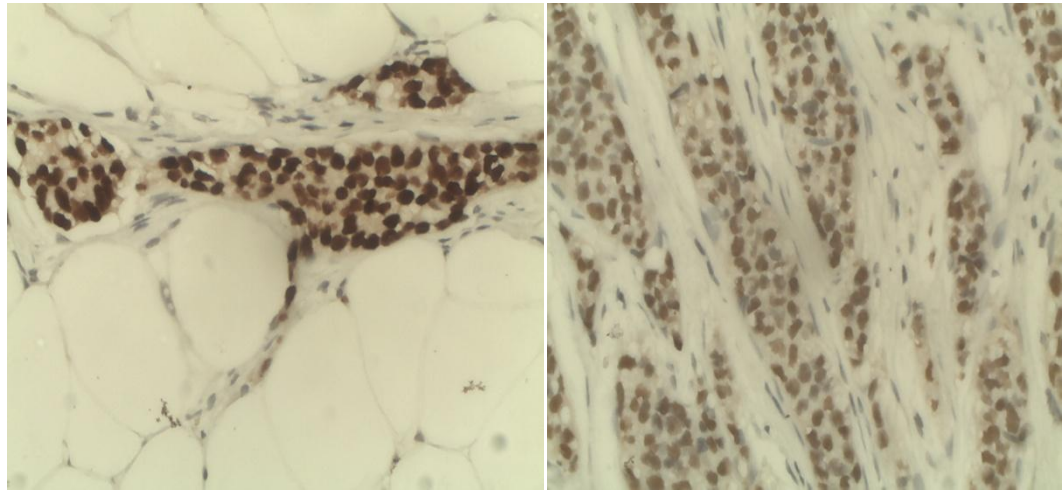
2.5.1. Tipos de receptores hormonales

- Receptores nucleares: esteroides (estrógeno, progesterona, testosterona), tiroxina (T3, T4), ácido retinoico. Todas estas sustancias son lipofílicas.
- Receptores hormonales de superficie celular
 - a) Liposolubles: hormonas peptídicas (FSH, LH, LHRH, insulina, glucagón), derivados de aminoácidos (epinefrina, histamina) y péptidos de crecimiento (EGF, IGF1).
 - b) Lipofílicos: prostaglandinas.

2.5.2. Características generales de los receptores

- Especificidad: capacidad para unirse a un solo tipo de hormona.
- Afinidad: fuerza con que la hormona se une al receptor.
- Actividad específica: promover cambios tróficos y funcionales de la célula blanco.

Figura 14. Visualización en el microscopio de los receptores de estrógenos y progesterona.



Fuente: Autoras.

2.6. ESTRÓGENOS

Son hormonas sexuales esteroideas de tipo femenino principalmente, producidas por los ovarios y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales.

En su función endocrina, los estrógenos atraviesan la membrana celular para llegar al núcleo, en el que se encargan de activar o desactivar determinados genes, regulando la síntesis de proteínas. Como función primordial los estrógenos inducen los fenómenos de proliferación celular sobre los órganos, principalmente en el endometrio, mama y el mismo ovario.

2.6.1. Receptores de estrógenos

Los receptores de estrógeno hacen referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17β -estradiol o estrógeno. Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores nucleares.

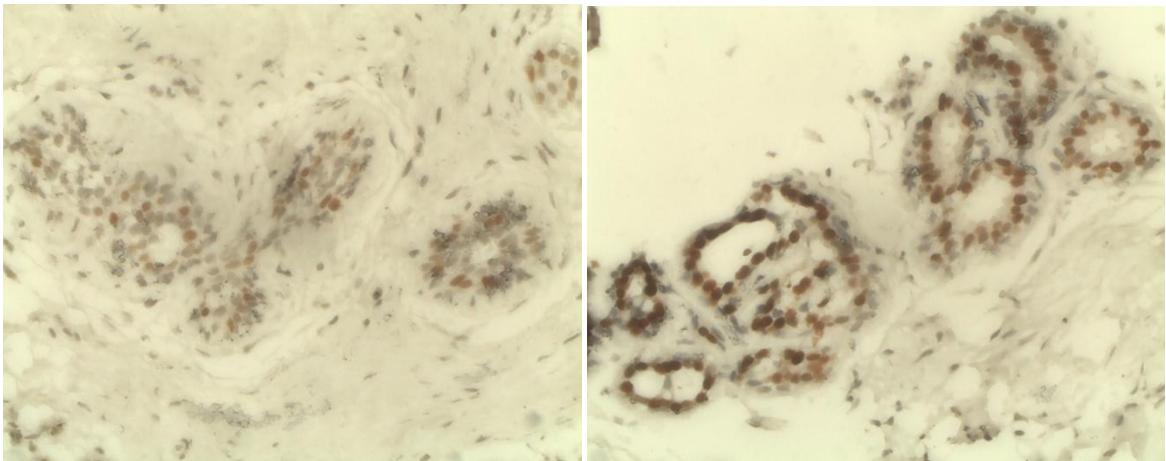
Los receptores de estrógeno son sobre-expresados en alrededor del 70% de los casos de cáncer de mama, referidos como "Receptores de estrógenos positivos". Se ha propuesto dos hipótesis para explicar por qué esto causa tumorigénesis, y las evidencias que apoyan cada una de dichas hipótesis son las siguientes:

- En primer lugar, la unión de estrógeno al receptor estimula la proliferación de las células de las glándulas mamarias, con el resultado de un incremento en la división celular y así, de la replicación del ADN, con el consiguiente riesgo de sufrir mutaciones.
- En segundo lugar, el metabolismo del estrógeno produce residuos genotóxicos.

El resultado de ambos procesos es la interrupción del ciclo celular, la apoptosis (muerte celular) y la reparación del ADN, con la consecuente posibilidad de la formación de un tumor.

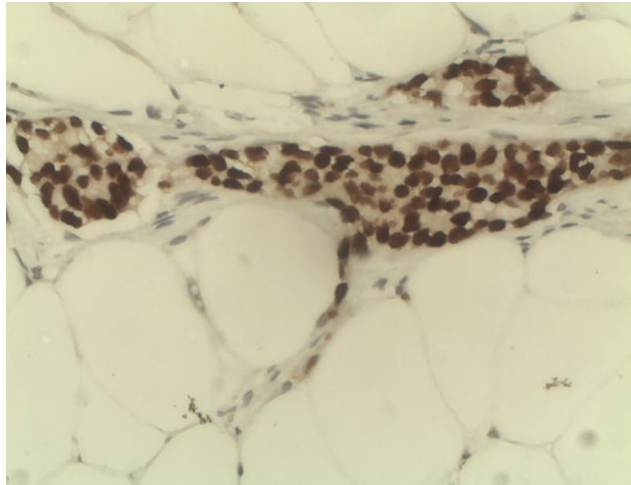
Una de las funciones específicas del receptor de estrógeno es promover el crecimiento temprano de los conductos lácteos que invaden la almohadilla grasa del pezón en la mama.

Figura 15. Positividad inmunohistoquímica nuclear (a) leve (b) moderada (c) intensa para receptores de estrógenos.



(a)

(b)



(c)

Fuente: Autoras.

2.7. PROGESTERONA

La progesterona es una de las hormonas sexuales que se desarrollan en la pubertad y en la adolescencia en el sexo femenino, producidas en el ovario (cuerpos lúteos) y la placenta, también pueden sintetizarse en las glándulas adrenales y el hígado.

Actúa principalmente durante la segunda parte del ciclo menstrual, parando los cambios endometriales que inducen los estrógenos y estimulando los cambios madurativos, preparando así al endometrio para la implantación del embrión.

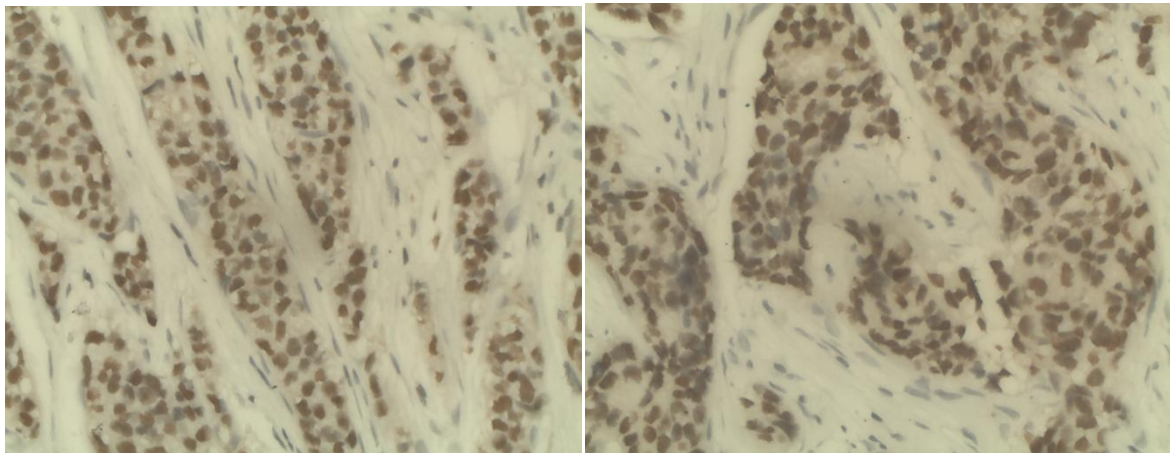
Es la hormona responsable del desarrollo de caracteres sexuales secundarios en una mujer, y su función es esencial para el sano desarrollo mamario durante la pubertad junto con la preparación para la lactancia y la alimentación del seno materno.

2.7.1. Receptores de progesterona

Es difícil separar los efectos que causa el receptor de progesterona de los causados por los receptores de estrógenos, debido a que la síntesis de RP es estrógeno dependiente.²⁶

La actuación conjunta de los receptores de estrógenos y progesterona es lo que permite el desarrollo de las terminales mamarias o ácinos localizados en los extremos de los conductos que se convertirán en las estructuras productoras de leche en la glándula mamaria.

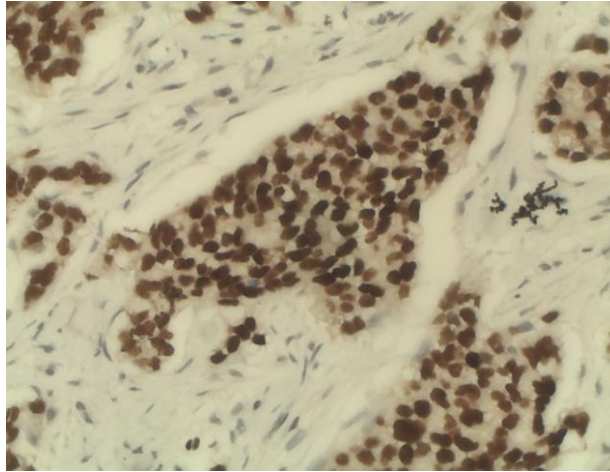
Figura 16. Positividad inmunohistoquímica nuclear (a) leve (b) moderada (c) intensa para receptores de progesterona.



(a)

(b)

²⁶ Receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama, Asociación con variables clinicopatológicas; Molina, María L.; Aldo; nobrega, Doris; Molina, Yajaira (1).



(c)

Fuente: Autoras.

2.8 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA

Se ha observado un gran incremento en el estudio y uso, como factores pronósticos del cáncer de mama, de numerosos antecedentes relacionados con el comportamiento biológico del tumor y que corresponden a la presencia o ausencia de receptores para hormonas esteroidales, como receptores para estrógenos y progesterona.

El grado de expresión de estos marcadores en el tejido tumoral se analiza a través de procedimientos inmunohistoquímicos que persiguen predecir el comportamiento biológico del tumor, pues los cánceres que no muestran expresión de receptores hormonales de estrógenos y progesterona, tienen peor comportamiento biológico.

La gran utilidad de la determinación de los receptores de estrógenos y progesterona en la elección del tratamiento del cáncer de mama está bien

establecida, ya que son indicadores pronóstico y sirven como guías para la realización de la terapia hormonal.²⁷

Los tumores RE(+) son a menudo bien diferenciados, diploides con bajos índices proliferativos, tienen una baja propensión para la recurrencias viscerales y frecuentemente responden a la terapia endocrina, los pacientes tienen un curso natural más indolente con supervivencia libre de enfermedad y global más prolongada. En cambio los tumores RE (-) son por lo general pobremente diferenciados, aneuploides, con altos índices proliferativos, tienen mayor recurrencia visceral y usualmente no responden a la manipulación hormonal.

2.9. INMUNOHISTOQUIMICA

La inmunohistoquímica (IHQ) en las últimas décadas está siendo utilizada de manera progresivamente creciente, consolidándose como un tecnología esencial en el diagnóstico y como indicador del pronóstico en patología celular común. Además gracias a la IHQ pueden demostrarse las hormonas y los receptores de las hormonas.

Un campo cada vez más importante para el uso de la IHQ se sitúa en la valoración del pronóstico, que puede ayudar al especialista a prescribir con mayor precisión al tratamiento más conveniente para una enfermedad maligna en particular.

Este grupo de técnicas de inmunotinción permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados, basándose en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

²⁷ Marcadores de utilidad en cáncer mamario, María Teresa Poblete S.

Uno de los problemas actuales con estas técnicas no es la técnica en sí, manual o automatizada, o la posibilidad de acceder a los numerosos anticuerpos existentes, sino la interpretación de los resultados. Los errores de interpretación disminuyen a nivel aceptable cuando el médico patólogo y sus colaboradores tiene experiencia en estas técnicas y los resultados se analizan a la luz de los demás hallazgos clínico-patológico.

2.9.1. Descripción de la metodología inmunohistoquímica

El proceso comienza cuando se recibe la pieza quirúrgica o biopsia, como en todos los especímenes quirúrgicos, se coloca la pieza en una solución para que sea posible trabajar sobre el tejido. Pasado un día en fijación, se procede a tomar pequeñas muestras del tejido; una vez hecho esto, se sigue con el proceso de deshidratación y parafinación convencionales, donde están los cortes mencionados.

Más adelante comienza la parte sustancial de la prueba: se hacen cortes y se colocan en portaobjetos, acto seguido, por un proceso casi ortodoxo donde, con hornos de microondas y vaporeras, se busca “desenmascarar” los antígenos buscados, para luego, colocar microgotas del anticuerpo selectivo para ese antígeno en particular; (los anticuerpos son hechos de forma industrial, y se venden como sets; de hecho, hay varias marcas, tipos y hasta modelos: cada año se mejoran, se hacen más selectivos y económicos).

Se espera un pequeño lapso de tiempo y al observar al microscopio de campo claro, si la reacción es positiva, veremos las células malignas coloreadas de un tinte café; lógico es pensar que el antígeno está presente, pues hubo una reacción inmunológica in vitro: Por así decirlo “estamos viendo los antígenos teñidos de

color".²⁸²⁹ La reacción se clasificó como negativa cuando no hubo reacción, o si un número menor o igual al 10 % de las células tumorales están coloreadas.

²⁸ Elias JM: Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis. ASCP Press, Chicago. 1990.
Taylor CR, Cote RJ: Immunomicroscopy: A diagnosis Tool for the Surgical Pathologist, 2nd ed. WB Saunders Co., Philadelphia, 1994.

²⁹ Honkoop AH, van Diest PJ, de Song JS et al: Prognostic role of clinical, pathological and biological Characteristics in patients with locally advanced breast cancer. Br J Cancer 1998; 77(4): 621.

3. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO COMPUTACIONAL

3.1. METODOLOGÍA DE DESARROLLO

La metodología utilizada para el desarrollo del proyecto fue el *prototipado evolutivo*, ya que es la que mejor se adapta, por ser un modelo donde el sistema se desarrolla en incrementos, de forma que puede modificarse de manera inmediata en respuesta a la realimentación proporcionada por el especialista en este caso.

Para un correcto desarrollo de la metodología es de gran importancia definir los requerimiento del sistema en este caso se buscaba la construcción de una herramienta que permitiera el análisis de las biopsias de seno, para lograr una correcta determinación de la expresión de los receptores hormonales, lo que traería una optimización en el proceso realizado por los patólogos en el laboratorio.

El proceso de desarrollo de software se caracteriza por tener una serie de actividades necesarias para transformar los requerimientos del usuario en un sistema software con ayuda del prototipado evolutivo.

Las fases que se llevaron a cabo para el desarrollo del sistema se presentan a continuación:

- **Análisis preliminar y especificación de requerimientos:** En esta etapa se realizaron actividades de vital importancia para el desarrollo del sistema, como lo es la captura de requerimientos con el especialista, se identificaron las principales necesidades mediante reuniones, y se plantearon las posibles soluciones.

Posteriormente se seleccionaron las soluciones más viables de acuerdo a la implementación, las cuales fueron refinadas con el especialista.

- **Diseño del prototipo:** Con la información adquirida en la fase anterior se procedió a realizar una representación coherente de los aspectos del software que cumplan con los requerimientos.

Se realizó el diseño de los casos de uso según los requerimientos obtenidos, junto con su respectiva especificación. También se efectuó la descripción de la base de datos y de las diferentes interfaces a construir.

- **Implementación y pruebas:** En esta etapa se efectuó la traducción del diseño a un lenguaje de programación, haciendo uso del entorno de desarrollo Matlab, se implementaron los diferentes métodos para realizar el procesamiento de la imagen, y también se realizaron las respectivas pruebas a la aplicación.

- **Evaluación y refinamiento iterativo del prototipo:** en esta fase se presentó el prototipo al especialista, quien evaluó su utilidad y detectó posibles mejoras, las cuales llevan a la modificación del prototipo. Y una posterior evaluación, hasta cumplir con los requerimientos del sistema.

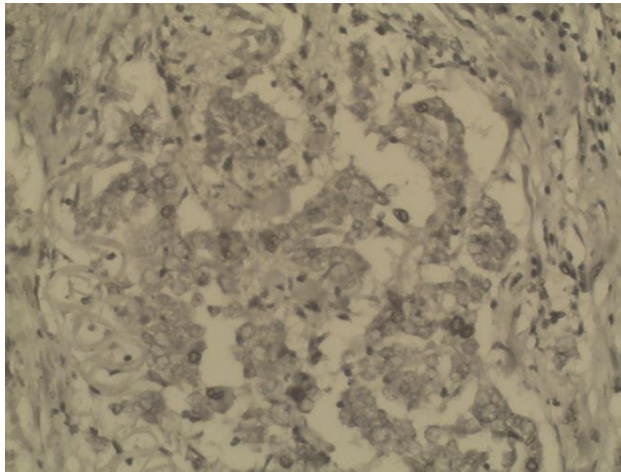
4. ADQUISICIÓN

Para garantizar una mayor eficiencia del proceso es necesario hacer énfasis en la etapa inicial, es decir la captura de las imágenes; si éstas son obtenidas en óptimas condiciones (iluminación, resolución, aumento) permitirán un mejor desempeño en el desarrollo del proyecto al facilitar el manejo de las características que se desean estudiar.

El modelo de adquisición empleado fue elaborado en el Departamento de Patología, en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Para realizar el montaje se empleo un microscopio Olympus CX31, al que se conectó una cámara de video digital CCD Motic 2300 de alta resolución de 3.0 Mp con adaptadores ópticos para estereomicroscopio, posteriormente se estableció una conexión USB a un computador portátil MAC, utilizando el software Motic Imagen Plus.

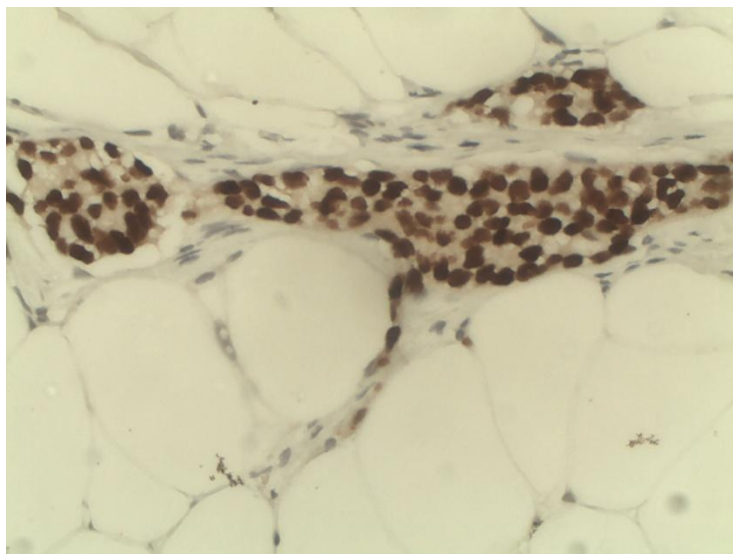
En la primera etapa de adquisición, las imágenes no contaban con características óptimas para su estudio, ya que la falta de iluminación generaba confusión en el análisis, dificultando la distinción de los elementos a estudiar.

Figura 17. Imagen de Receptores de Progesterona obtenida en la primera etapa de adquisición.



La segunda etapa de adquisición se mejoro notablemente la calidad de la imagen, ya que se modificaron las condiciones de iluminación y de aumento. Se obtuvieron Imágenes con las diferentes características que se pretenden estudiar, se clasificaron en tres grupos: Receptores hormonales positivos, negativos y mixtos, estas fueron almacenadas en formato PNG, con una resolución de 1024 X 768 píxeles y un aumento de 40x.

Figura 18. Imagen de Receptores de Estrógenos Positiva, obtenida en la segunda etapa de adquisición.



5. PREPROCESAMIENTO

Después de culminar el proceso de adquisición de la imagen se procede a trabajar en la mejora de la imagen, para así obtener un resultado efectivo en la segmentación que es la etapa posterior.

La mejora de la imagen tiene como objetivo resalta o corregir determinados aspectos de la misma, dependiendo de las características que se deseen buscar dentro de cada imagen, ya que no existen procedimientos estándares que se apliquen a todas las clases de imágenes adquiridas.

En este caso el procedimiento utilizado para mejorar las imágenes adquiridas se baso en una técnica aplicada sobre el dominio espacial, es decir se trabajo directamente sobre los pixeles que componen la imagen.

Los métodos del dominio espacial se denotan mediante la expresión:

$$g(x,y)=T[f(x,y)] \quad (1.12)$$

Donde $f(x,y)$ es la imagen de entrada, $g(x,y)$ es la imagen de salida(procesada) y T es un operador sobre f , definido sobre una vecindad específica sobre un punto (x,y) .

La aproximación principal para definir vecindades espaciales sobre un punto (x,y) es usar una región cuadrada o rectangular centrada en (x,y) , el centro de la región se mueve pixel en pixel y a medida que se mueve, engloba diferentes vecindades. El operador T se aplica sobre cada localización (x,y) para obtener la salida, g , en dicha localización. Solo los pixeles en la vecindad se usan para calcular el valor de g en (x,y) .

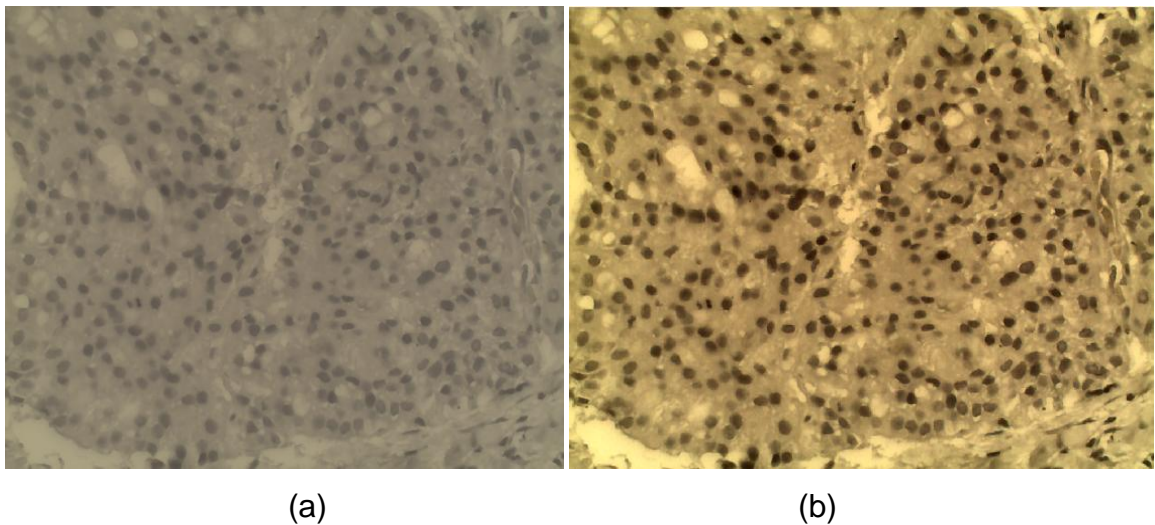
La forma más simple de la transformación T es cuando la vecindad es de tamaño 1×1 (un único píxel). En este caso, el valor de g en (x,y) depende solamente de la intensidad de f en dicho punto, y T se convierte en una *función de transformación de intensidades o niveles de gris*.

Se recurrió a la función ***imadjust*** porque es una herramienta básica para realizar transformaciones de intensidad ya sea de valor en imágenes de niveles de gris o de mapa de color en imágenes a color. Su sintaxis es:

$$g = \text{imadjust}(f, [\text{low_in high_in}], [\text{low_out high_out}]) \quad (1.13)$$

Esta función transforma los valores de intensidad de la imagen f a nuevos valores en g . A continuación se presentan los resultados obtenidos con la aplicación de la función de transformación de intensidad.

Figura 19. Función de transformación de intensidad ***imadjust***. (a) Imagen original
(b) Función ***imadjust***



6. SEGMENTACIÓN

Debido al trabajo realizado en la etapa anterior con la función de transformación de intensidad sobre las imágenes, se procede a trabajar con métodos de segmentación basados en la umbralización.

6.1. UMBRALIZACION

Se implementaron varios métodos que permitieron los cálculos de diferentes umbrales, de forma que fuera posible la detección de los núcleos de las células con respecto al citoplasma, al final se obtuvieron imágenes binarizadas.

6.1.1. Iterativo

En este proceso se logra la ubicación del umbral mediante comparaciones sucesivas entre dos umbrales hasta encontrar el adecuado, los pasos que se siguen este algoritmo se describen a continuación:

- a) Se determinan los dos umbrales iniciales: el primero (U_0) se localiza en cero y el segundo (U_1) en la mediana de los niveles del histograma diferentes de cero.

$$U_0=0 \quad (1.14)$$

$U_1=$ mediana de los niveles diferentes a cero.

- b) Se calcula la diferencia entre U_1 y U_0 .

$$\text{Diferencia}=U_1-U_0 \quad (1.15)$$

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

$$U_0 = U_1 \quad (1.16)$$
$$U_1 = \frac{\text{Promedio Mayores a } U_0 + \text{promedio(Menores a } U_0)}{2}$$

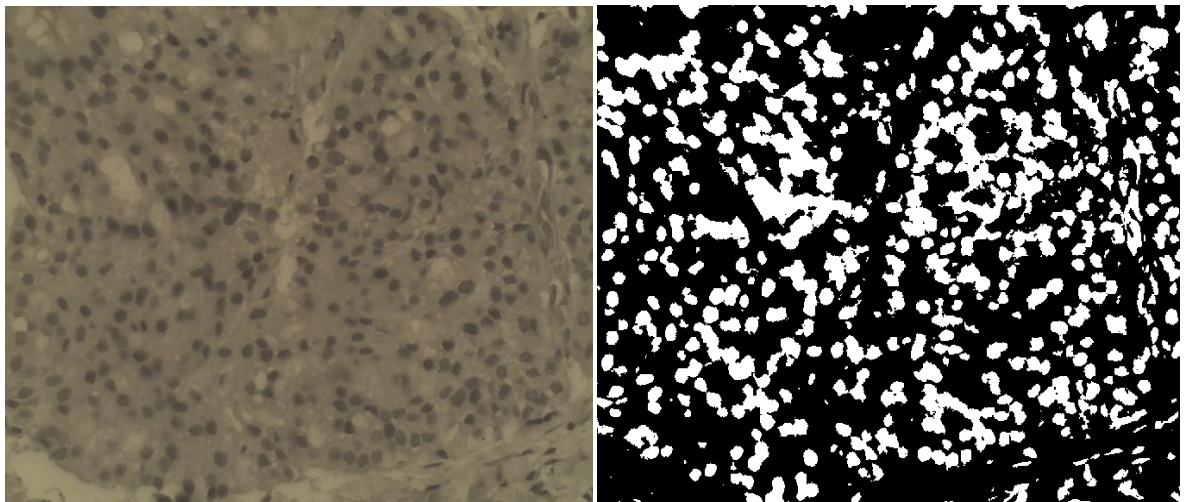
- d) Se realiza la comparación de la diferencia hasta que sea menor o igual que uno y se obtiene el umbral adecuado.

$$\text{Umbral} = U_1 \quad (1.17)$$

Los resultados de la aplicación del algoritmo iterativo se muestran a continuación:

Figura 20. Resultado de la segmentación utilizando el método iterativo.

(a) Imagen Original (b) Núcleos segmentados



(a)

(b)

6.1.2. Pun Kapur

Este método obtiene su nivel de umbralización por medio de la aplicación de estadísticas de la teoría de la información.

La entropía del histograma es utilizada para el cálculo del umbral ya que se definen dos entropías a posteriori, una para el objeto y otra para el fondo, seguidamente se hace una extensión de estas involucrando distribuciones de probabilidad.

$$H_b t = - \sum_{i=0}^t \frac{p_i}{P_t} \ln\left(\frac{p_i}{P_t}\right) \quad (1.19)$$

$$H_w t = - \sum_{i=t+1}^{l-1} \frac{p_i}{1-P_t} \ln\left(\frac{p_i}{1-P_t}\right) \quad (1.20)$$

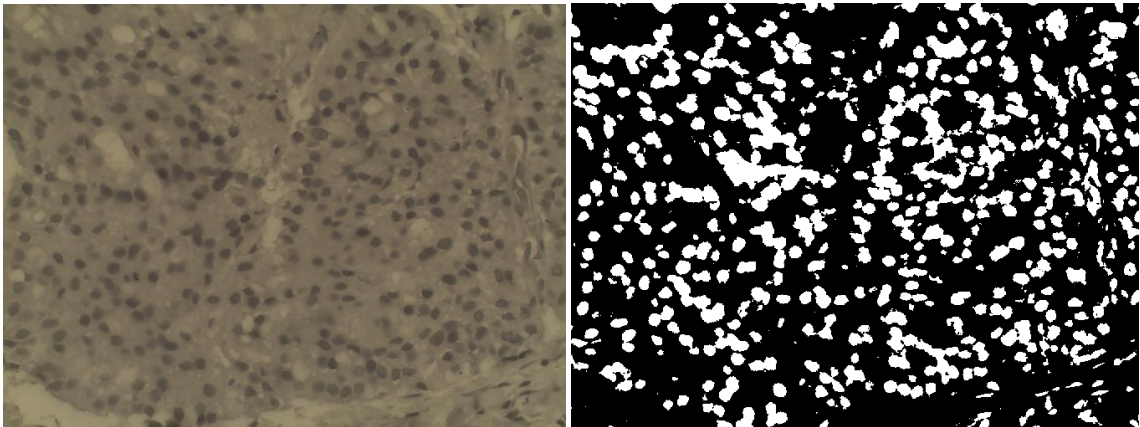
$$H = H_b + H_w \quad (1.21)$$

Donde H_w es la entropía del objeto, H_b es la entropía del fondo, P_i es la probabilidad de un nivel de gris, P_t es la distribución de probabilidad del histograma, y el umbral t es localizado cuando H es máximo. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la aplicación del método de umbralización con Pun Kapur:

Figura 21. Resultado de la segmentación utilizando el método de Pun Kapur.

(a) Imagen Original

(b) Núcleos segmentados



6.1.3. Matlab

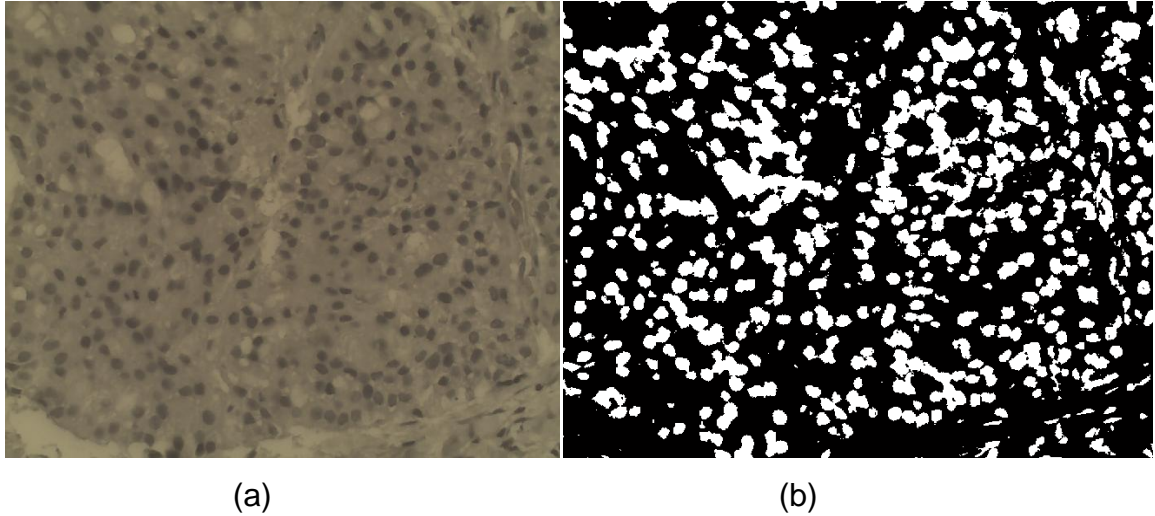
Matlab tiene una función automática que nos busca un umbral en el histograma. El cálculo está basado en tratar de optimizar la media de intensidad a ambos lados del umbral. La función tiene la siguiente sintaxis:

$$T = \text{graythresh}(f) \quad (1.22)$$

Donde f es la imagen original y T es el umbral. Los resultados obtenidos con este método de umbralización son los siguientes:

Figura 22. Resultado de la segmentación utilizando el método ofrecido por Matlab.

(a) Imagen Original (b) Núcleos segmentados



6.2. MORFOLOGÍA MATEMÁTICA

Después de aplicar diferentes operaciones morfológicas sobre las imágenes segmentadas, se llegó a la conclusión de la operación que se ajusta mejor a las condiciones de las imágenes trabajadas es un *cierre*, ya que esta operación tiende a suavizarla. El cierre del conjunto A por el elemento de estructura B se define de la siguiente manera:

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (1.23)$$

Que nos indica que el cierre de A por B es simplemente la dilatación de A por B, seguida por la erosión del resultado por B. En el cierre se usó un elemento estructurante en forma de disco para aproximarlos a la forma que poseen los núcleos de las células, y su tamaño fue escogido haciendo pruebas con diferentes valores y evaluando el que mejor se ajustara al caso de estudio.

6.3. EXTRACCIÓN DE BORDES

Para la detección de bordes se utilizaron diferentes métodos, con el fin de buscar los que mejor se ajustaran, los métodos que arrojaron mejores resultados son descritos a continuación.

6.3.1 Canny

Estas son las etapas que sigue el algoritmo de Canny:

a) Reducción de ruido

Canny utiliza un filtro basado en la primera derivada de una gaussiana. Ya que es susceptible al ruido presente en datos de imagen sin procesar, la imagen original es transformada con un filtro gaussiano. El resultado es una imagen un poco borrosa respecto a la versión original. Esta nueva imagen no se ve afectada por un píxel único de ruido en un grado significativo.

b) Encontrar la intensidad del gradiente de la imagen

El borde de una imagen puede apuntar en diferentes direcciones, por lo que el algoritmo de Canny utiliza cuatro filtros para detectar horizontal, vertical y diagonal en los bordes de la imagen borrosa. El operador de detección de bordes devuelve un valor para la primera derivada en la dirección horizontal (G_y) y la dirección vertical (G_x). A partir de éste, se pueden determinar el gradiente de borde y la dirección:

$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (1.24)$$

$$\Theta = \arctan\left(\frac{G_y}{G_x}\right) \quad (1.25)$$

6.3.2. Sobel

Los valores de G_x y G_y pueden implementarse por convolución de la imagen con las mascarar 3x3 dadas en (1.26), conocidas como operadores de Sobel.

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{bmatrix} z_1 & z_2 & z_3 \\ z_4 & z_5 & z_6 \\ z_7 & z_8 & z_9 \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \\
 \text{(a)} & \text{(b)} & \text{(c)}
 \end{array} \quad (1.26)$$

Donde (a) Región de la imagen de dimensión 3x3, (b) Mascara usada para obtener G_x en el punto central de la región 3x3, (c) Mascara usada para obtener G_y en el mismo punto. Las derivadas basadas en los operadores de Sobel son:

$$\begin{aligned}
 G_x &= z_3 + 2z_6 + z_9 - (z_1 + 2z_4 + z_7) \\
 G_y &= z_7 + 2z_8 + z_9 - (z_1 + 2z_2 + z_3)
 \end{aligned} \quad (1.27)$$

Donde los distintos valores de z son los niveles de gris de todos los pixeles solapados por las mascarar en cualquier localización de la imagen.

Para obtener los valores de las componentes del vector gradiente en el punto definido por el pixel central de la región, se utilizan las expresiones anteriores con lo que la magnitud y el ángulo se pueden obtener a partir de las siguientes expresiones, es decir obtenemos un valor del gradiente en dicho punto.

$$|G| = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (1.27)$$

$$\phi(x, y) = \tan^{-1} \frac{G_y}{G_x} \quad (1.28)$$

$$|G| \approx |G_x| + |G_y| \quad (1.29)$$

Para obtener el siguiente valor, las mascarar se mueven a la siguiente posición del nuevo pixel y se repite el proceso, después de haber barrido todas las posibles posiciones, el resultado es una imagen gradiente.

6.3.3. Prewitt

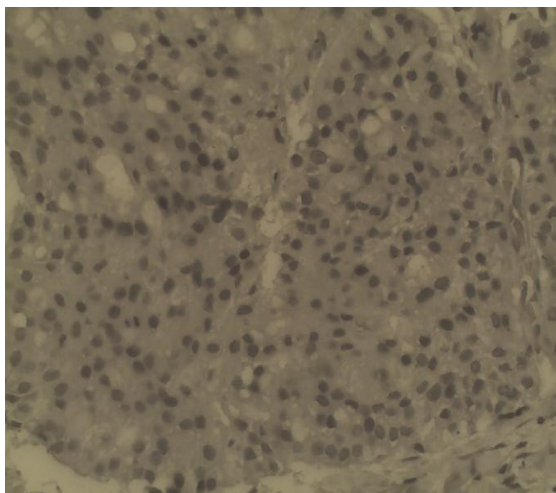
El operador de Prewitt es similar al de Sobel, solo diferenciándose en los coeficientes de las mascarar, las cuales a continuación:

$$\begin{matrix} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \\ \text{(a)} & \text{(b)} \end{matrix} \quad (1.30)$$

Operadores de Prewitt. (a) Mascara usada para obtener Gx en el punto central de la región 3x3, (b) Mascara usada para obtener Gy en el mismo punto. Los resultados obtenidos en la aplicación de estos métodos se muestran a continuación:

Figura 23. Resultado de la obtención de bordes.

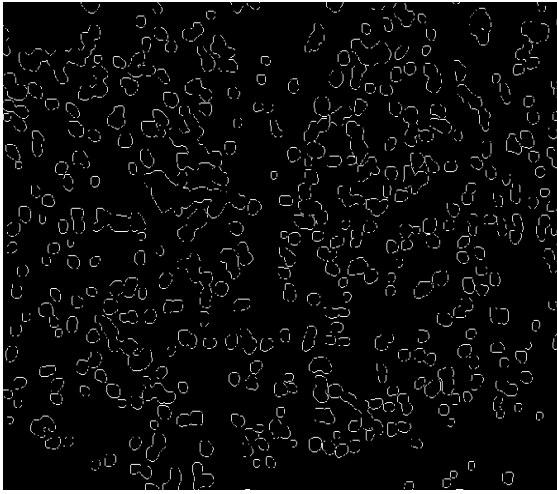
(a) Imagen Original (b) Método de Canny (c) Método de Prewitt (d) Método de Log
(e) Método de Sobel



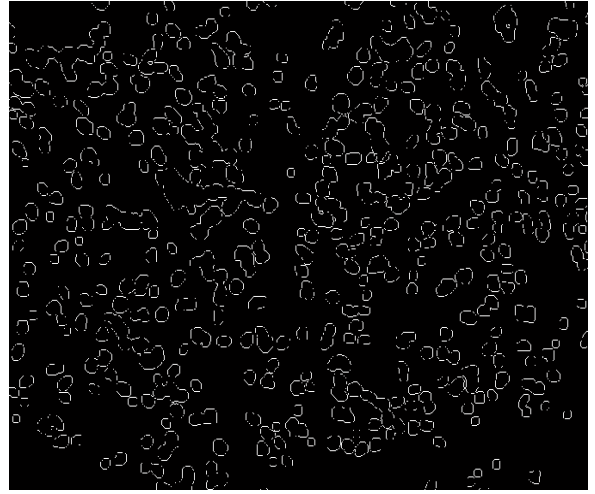
(a)



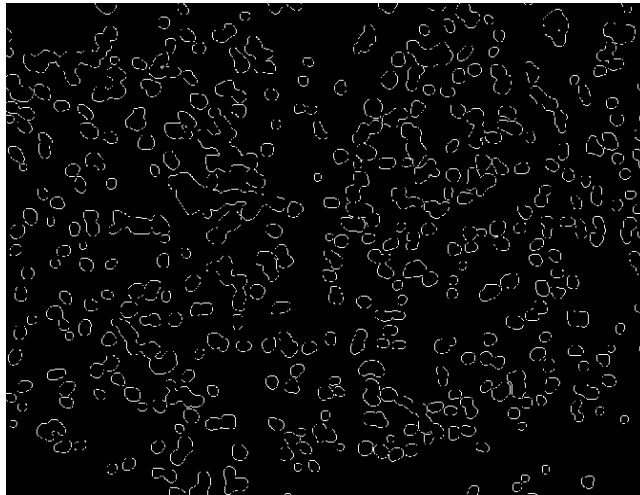
(b)



(c)



(d)



(e)

7. DESCRIPCIÓN

El resultado de la segmentación es un conjunto de imágenes binarias. En las que se resaltan los núcleos presentes en la imagen de forma independiente, como regiones aisladas y a las cuales se pueden extraer diversas características para su análisis futuro.

Las características utilizadas fueron:

- **Área:** su valor es obtenido como el número de píxeles contenidos en una región; recordando que la región está constituida por píxeles en blanco en la imagen binaria.
- **Perímetro:** su valor es obtenido como el número de píxeles que forman el borde de la región.

Una vez obtenida la imagen segmentada, se realizó una conversión de la imagen original del modelo RGB al modelo HSL, para trabajar con las capas H (tono) y S (saturación) de ésta.

Se realizó una operación lógica matemática tipo AND entre la imagen segmentada según una región específica y la capa H de la imagen, se determinó la distribución normal de los elementos de dicha región, obteniendo los valores de media y varianza para ésta; se estudiaron estos valores, observando que todas las imágenes presentaban valores de media similares, sin embargo los valores de varianza entre los tonos marrón y azul diferían considerablemente, con lo anterior se buscó un patrón de clasificación que permitiría determinar si la región contenía núcleos positivos o negativos.

Figura 24. Histograma capa de Tono

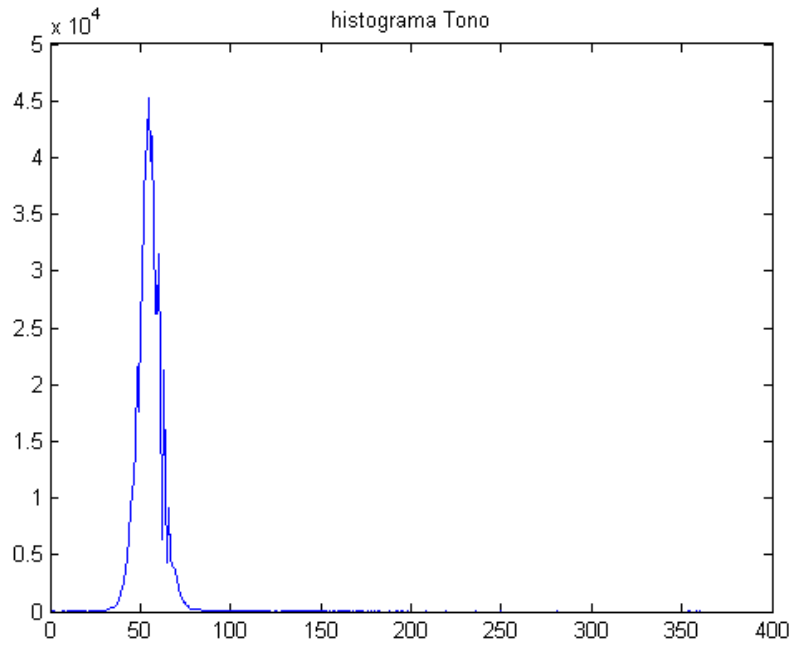


Figura 25. Histograma con la normalización de dos imágenes positivas

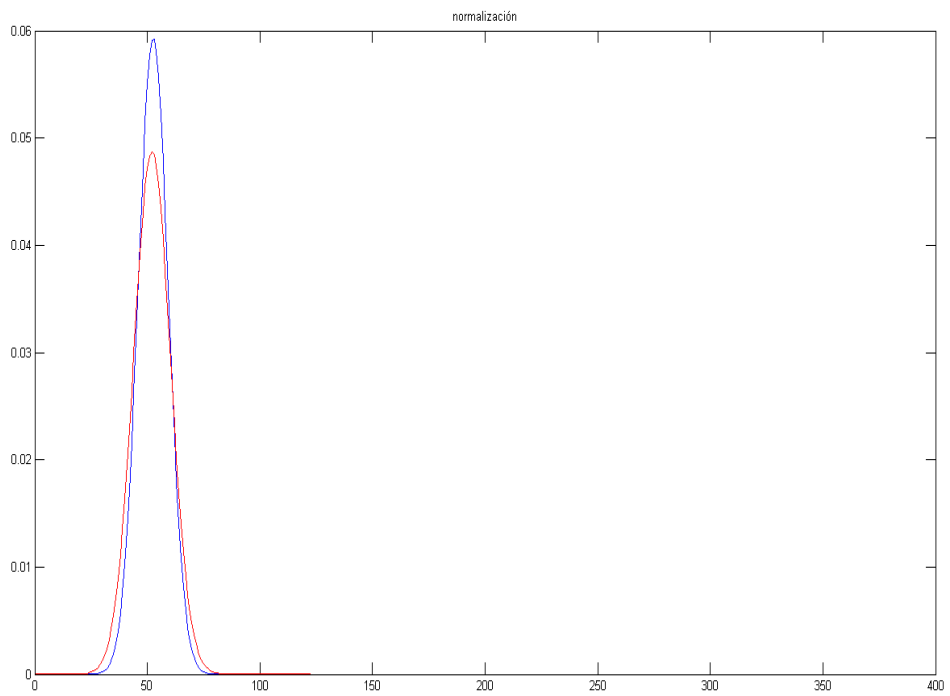
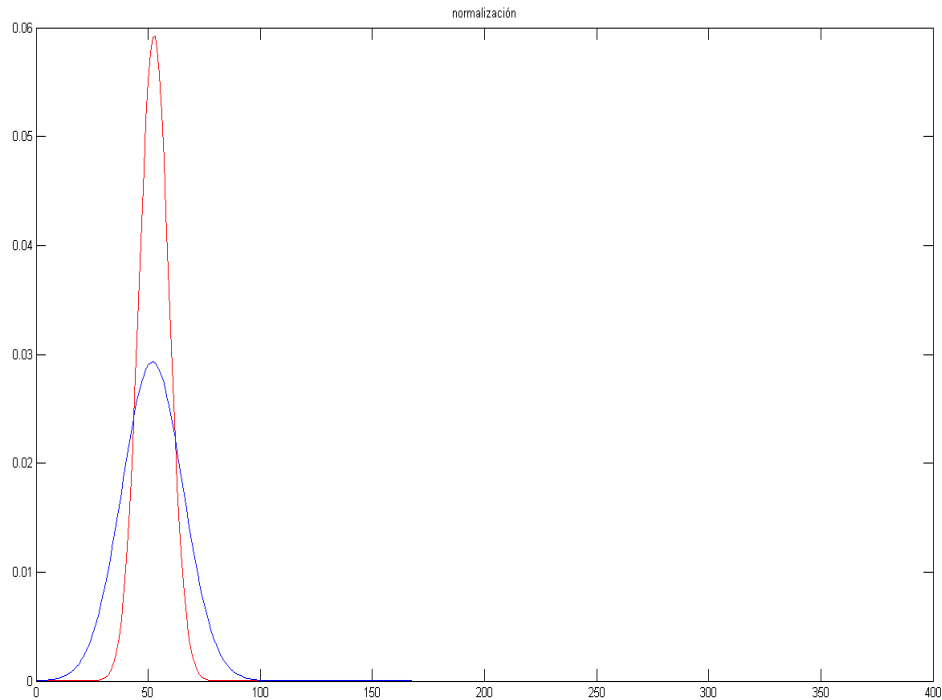
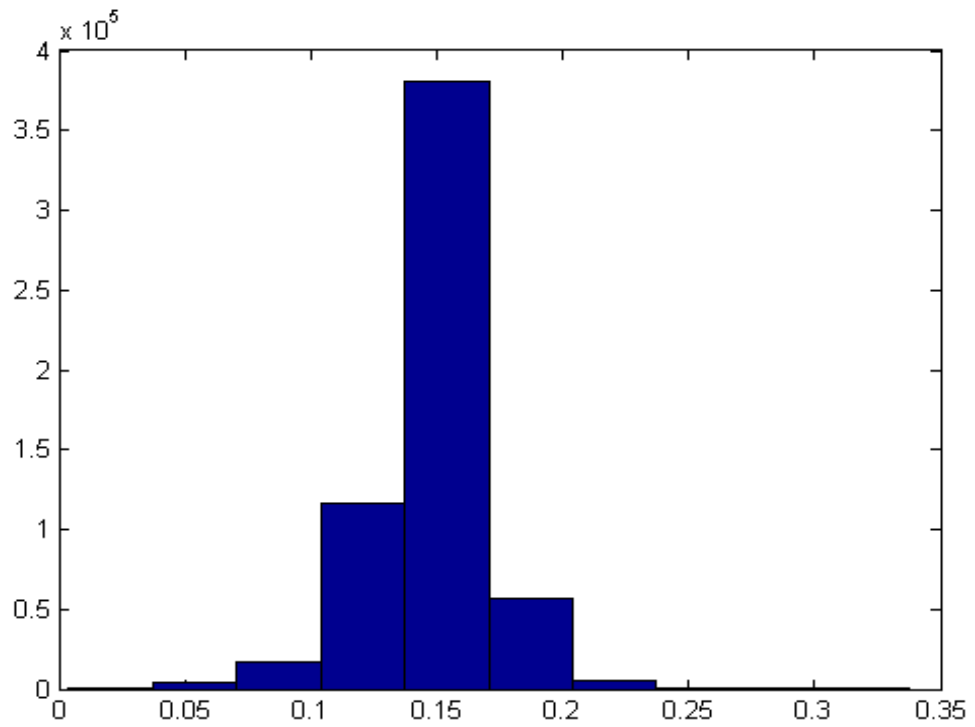


Figura 26. Histograma con la normalización de una imagen positiva comparada con una negativa.



Una vez determinada la positividad o negatividad de la región, se estableció el nivel de intensidad, considerando la capa S de la imagen de cada región. Se promediaron los valores de cada región, el valor obtenido se clasificó en según unos criterios en leve, moderado o intenso, estos criterios están definidos por intervalos de valores de la capa S.

Figura 27. Histograma de distribución de intensidades de la capa S

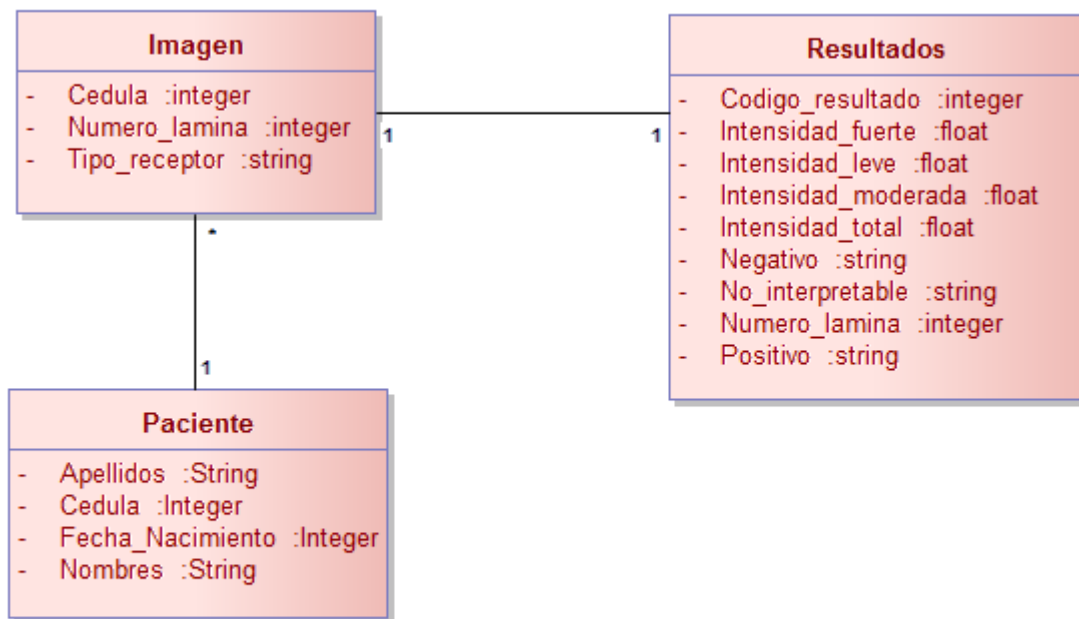


8. BASE DE DATOS

Toda la información obtenida después del análisis de las imágenes y que sea de interés para el especialista es almacenada en una base de datos, junto con la información personal del paciente y las características de las imágenes que se trabajan en el sistema.

El diseño de la base de datos es relacional, a continuación se presenta una descripción de las entidades con sus respectivos atributos.

Figura 28. Base de datos.



- **Pacientes:** Esta entidad almacena la información personal del paciente (Apellidos, Cedula, Fecha_Nacimiento, Nombres) al cual se le van a

analizar las imágenes, por medio de la cedula se puede relacionar Pacientes con la entidad Imagen.

- **Imagen:** Esta tabla me permite almacenar el código de la lámina a la cual pertenece la imagen que se está analizando, junto con el tipo de receptor. La imagen es asociada a un paciente específico gracias al número de cedula.
- **Resultados:** En esta tabla se almacenan los resultados de interés para el especialista, después del análisis de las imágenes, los resultados se asocian a una imagen por medio del código de la lámina.

9. MODELO COMPUTACIONAL

El sistema desarrollado se baso en una metodología de prototipado evolutivo, incorporando conocimientos en tratamiento digital de imágenes. A continuación se detallan los casos de uso diseñados para el desarrollo del sistema con su respectiva documentación.

Figura 29. Diagrama de casos de uso.

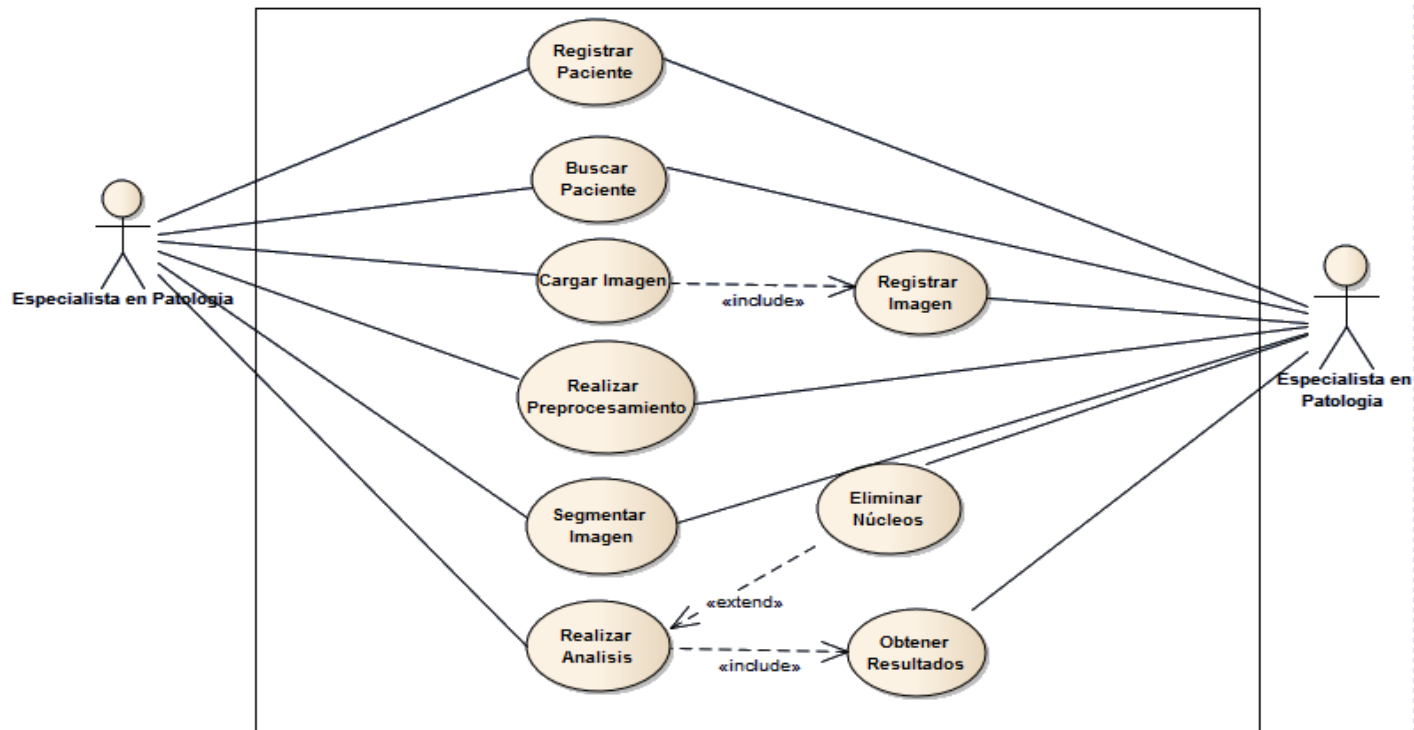


Tabla 1. Descripción de los Casos de uso del sistema

DOCUMENTACION DE LOS CASOS DE USO		
Caso de Uso	Registrar paciente	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite al especialista registrar la información personal del paciente para posteriormente ser almacenada en la base de datos.	
Descripción	El usuario ingresa al sistema y en primera instancia debe registrar la información del paciente, para que esta sea asociada a la imagen que se analizará, posteriormente la información suministrada es almacenada en la base de datos.	
Precondición(es)	La condición previa es ingresar al sistema.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El caso de uso inicia cuando el especialista desea ingresar la información del paciente que se desea analizar.</p> <p>3. El usuario introduce la información del paciente, y le da la opción guardar.</p>	<p>2. El sistema presenta al especialista la interfaz correspondiente al registro.</p> <p>4. El sistema almacena la información en la base de datos y habilita las diferentes opciones para trabajar en el análisis de la imagen.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	El usuario ha almacenado la información personal del paciente en la base de datos.	

Caso de Uso	Buscar Paciente	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite buscar un paciente en la base de datos, para que esta información sea relacionada con la imagen que se desea trabajar.	
Descripción	El especialista accede al sistema y desea buscar un paciente que ya ha sido almacenado con anterioridad en la base de datos, para relacionarlo con la imagen que pretende analizar.	
Precondición(es)	El paciente ya debe estar almacenado en la base de datos.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El especialista ingresa al sistema y desea buscar la información de un paciente que ya ha sido almacenado en la base de datos.</p> <p>3. El usuario digita la cedula del paciente y le da la opción de guardar.</p>	<p>2. El sistema le presenta al usuario una interfaz donde le pide que digite el numero de cedula del paciente.</p> <p>4. Si la información coincide con la información almacenada en la base de datos, el usuario tendrá acceso al sistema para realizar el trabajo sobre las imágenes, de lo contrario no tendrá acceso al sistema hasta no ingresar la información del paciente.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	El especialista puede acceder al sistema para realizar el análisis de las imágenes relacionadas con ese paciente.	
Caso de Uso	Cargar imágenes	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite cargar las imágenes al sistema para su posterior análisis.	

Descripción	Brinda al especialista la posibilidad de cargar las imágenes del paciente que se va a estudiar, junto con una descripción de la imagen de acuerdo al código de lámina a la que pertenece y al tipo de receptor hormonal.	
Precondición(es)	El usuario debe haber ingresado la información del paciente al que se le desea realizar el estudio.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El usuario oprime la opción cargar imagen en la interfaz de análisis de la imagen.</p> <p>3. El especialista registra esta información y oprime la opción guardar.</p> <p>5. El usuario selecciona la imagen que se desea cargar y le da aceptar.</p>	<p>2. El sistema abrirá una interfaz para realizar la descripción de la imagen, esta se hace con información como el número de lámina a la que pertenece la imagen que se va a cargar, como el tipo de receptor a estudiar.</p> <p>4. Se presenta la forma de cargar la imagen al especialista.</p> <p>6. El sistema carga la imagen seleccionada.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	La imagen ha sido cargada al sistema.	
Caso de Uso	Realizar preprocesamiento	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite realizar al especialista la mejora de la imagen, que es la primera etapa en el procesamiento.	

Descripción	El usuario desea realizar el proceso de procesamiento sobre la imagen cargada en la etapa anterior, se presenta una interfaz de preprocesamiento, donde es posible la visualización de la imagen junto con su histograma, se realizan las modificaciones necesarias sobre la imagen para posteriormente realizar el proceso de segmentación.	
Precondición(es)	La imagen ya debe estar cargada en el sistema.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. Se selecciona la opción de preprocesamiento en el sistema.</p> <p>3. El especialista realiza los cambios sobre la imagen y los guarda.</p>	<p>2. el sistema le presenta al usuario una interfaz donde se realiza este proceso.</p> <p>4. el sistema guarda las modificaciones realizadas sobre la imagen y permite visualizar al usuario de la imagen mejorada.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	El especialista realizo la mejora de la imagen para posteriormente realizar el proceso de segmentación.	
Caso de Uso	Segmentar imagen	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Le permite al especialista realizar la segmentación de los núcleos, después de haber realizado el preprocesamiento.	
Descripción	Una vez culminado el preprocesamiento de la imagen, el usuario procede a la extracción de los núcleos de las células por medio de la segmentación, el sistema le ofrece la opción de trabajar diferentes métodos para realizar este proceso.	
Precondición(es)	El usuario debe haber realizado la etapa de preprocesamiento de la imagen con anterioridad.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema

	<p>1. El usuario oprime la opción segmentar.</p> <p>3. El especialista selecciona las opciones que se ajusten de mejor forma a la imagen de estudio.</p>	<p>2. El sistema le proporciona una serie de opciones para realizar el proceso, lo cual le traerá resultados diferentes al especialista.</p> <p>4. El sistema almacena la imagen segmentada, y muestra los resultados al usuario.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	La imagen fue segmentada con éxito y se almaceno en el sistema.	
Caso de Uso	Realizar análisis	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite realizar procesos de mejora sobre los resultados obtenidos en la etapa de segmentación.	
Descripción	El sistema le permite al usuario realizar mejoras sobre el proceso de segmentación, por medio de la eliminación de núcleos, y además permite evidenciar los resultados obtenidos.	
Precondición(es)	Debe haber concluido el proceso de segmentación de la imagen.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	1. En la interfaz principal se oprime la opción realizar análisis.	2. El sistema abrirá una interfaz donde se puede visualizar la imagen segmentada con una numeración específica de cada núcleo, además permite la eliminación de los núcleos que no corresponden a los

		núcleos reales de las células y también se puede evidenciar los resultados del proceso de análisis.
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	La interfaz que permite realizar el proceso de eliminación y donde se puede acceder a los resultados del proceso está habilitada.	
Caso de Uso	Registrar imagen	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite realizar una descripción de las imágenes que se desean estudiar.	
Descripción	Permite al especialista relacionar la imagen a estudiar con el numero de la lamina a la que esta pertenece, junto con el tipo de de receptor que se puede visualizar en la imagen.	
Precondición(es)	El paciente debe haber sido registrado en el sistema.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El usuario oprime la opción cargar imagen en la interfaz de análisis de la imagen.</p> <p>3. El especialista registra esta información y oprime la opción guardar.</p>	<p>2. El sistema abrirá una interfaz para realizar la descripción de la imagen, esta se hace con información como el número de lámina a la que pertenece la imagen que se va a cargar, como el tipo de receptor a estudiar.</p> <p>4. El sistema almacena en la base de datos la información que describe la imagen.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	La descripción de la imagen ha sido almacenada en la base de datos.	

Caso de Uso	Eliminar núcleos	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite la eliminación de los núcleos que han sido mal segmentados durante el proceso.	
Descripción	Le permite al especialista eliminar aquellas zonas que no pertenecen realmente a los núcleos de las células.	
Precondición(es)	El proceso de segmentación debió realizarse con anterioridad.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El usuario oprime la opción eliminar núcleos dentro de la interfaz de análisis.</p> <p>3. El especialista registra esta información y oprime la opción eliminar.</p>	<p>2. El sistema le muestra al usuario una casilla para digitar el valor del núcleo que desea eliminar.</p> <p>4. El núcleo es eliminado, y el sistema permite visualizar al usuario la modificación de la imagen, sin los núcleos eliminados.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	Las áreas que no pertenecen realmente a un núcleo dentro de la imagen, se eliminan de acuerdo a las elecciones del especialista.	
Caso de Uso	Obtener resultados	
Actor(es)	Especialista en patología	
Propósito	Permite visualizar al especialista los resultados del análisis.	
Descripción	El usuario puede visualizar en una interfaz los resultados de interés de los estudios realizados, junto con la imagen que se está analizando y la información del paciente.	

Precondición(es)	Realizar las etapas anteriores del procesamiento de la imagen.	
Flujo Principal	Acciones de Actor(es)	Respuestas del Sistema
	<p>1. El usuario oprime la opción resultados en la interfaz de análisis de la imagen.</p> <p>3. El especialista visualiza esta información y podrá guardarla si así lo desea.</p>	<p>2. El sistema abrirá una interfaz donde se indican los resultados del análisis realizado sobre la imagen, junto con la información personal del paciente.</p> <p>4. El sistema almacena los resultados en la base de datos.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición(es)	Se permitió la visualización de los resultados del análisis al especialista.	

10. RESULTADOS

Para cada imagen, se calculo el número total de núcleos, posteriormente fue necesario hacer una distinción entre las positivas y negativas, si resultaban ser positivas era necesario determinar las diferentes intensidades; para este caso se realizo una clasificación, los tonos requeridos fueron los azules (Células no teñidas), marrones oscuros (células tenidas intensamente), marrones medios (Células teñidas moderadamente) y por ultimo marrones claros (Células teñidas levemente).

Tabla 2. Análisis de resultados.

Número total de Núcleos segmentados	Positividad	Porcentaje de Intensidad Leve	Porcentaje de Intensidad Moderada	Porcentaje de Intensidad Fuerte	Porcentaje Total de Positividad
45	Positiva	20	22,222	35,556	77,778
65	Positiva	13,85	38,46	9,23	61,53
156	Positiva	6,410	64,744	17,949	89,103
81	Positiva	12,346	67,901	2,4691	82,716
212	Negativa				
167	Negativa				

En la tabla anterior, se indican los resultados obtenidos en el análisis de 5 de las imágenes adquiridas, donde se muestra el total de núcleos segmentados, la positividad adquirida, junto con los porcentajes que definen la intensidad.

En el caso de resultar ser una imagen positiva con presencia de núcleos no teñidos (tonos azules), fue necesario excluirlos del conteo.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos_Positivos}}{\text{Verdaderos_Positivos} + \text{Falsos_Negativos}} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos_Negativos}}{\text{Verdaderos_Negativos} + \text{Falsos_Positivos}} * 100$$

$$\text{Valor_predictivo_positivo} = \frac{\text{Verdaderos_Positivos}}{\text{Verdaderos_Positivos} + \text{Falsos_Positivos}} * 100$$

Tabla 3. Resultados de la clasificación

Clasificación	Tonos Marrones	Tono Azules	Total
Manual	124	30	154
Aplicación	126	28	154

$$\text{Sensibilidad} = \frac{113}{113+12} * 100 = 90.4\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{16}{16+13} * 100 = 55.17\%$$

$$\text{Valor_predictivo_positivo} = \frac{113}{113+13} * 100 = 89.6\%$$

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se construyó una herramienta software que permite la determinación de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona, calculando los porcentajes particulares para ciertas tonalidades de acuerdo a su nivel de intensidad.

Fueron establecidas las condiciones idóneas para la adquisición de las imágenes, teniendo en cuenta parámetros de iluminación y aumento.

Se establecieron ciertos criterios correspondientes a cada uno de los parámetros a evaluar, para la diferenciación de las tonalidades presentes en la imagen.

Con las técnicas de tratamiento de imágenes utilizadas, se logró realizar una diferenciación de las tonalidades en las células teñidas positivamente, permitiendo clasificarlas en Leves, moderadas o intensas.

Se sugiere poblar la base de datos con la información de los pacientes estudiados en años anteriores, para establecer una relación clara con las láminas que se estudian actualmente en las pruebas de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

ANDREU, Gabriela. Visión por Computador. Segmentación de imágenes. Universidad Politécnica de Valencia. En URL: http://miron.disca.upv.es/vxc/Documentos/Microsoft%20PowerPoint%20-%20vxc-5_2a.pdf

BERMUDEZ V, Cecilia, RARADA D., David. Estudio inmunohistoquímico del carcinoma de glándula mamaria en el Hospital Vargas de Caracas. En: Revista Venezolana de Oncología. Junio, 2008. Vol. 20. Págs. 78-90. ISSN 0798-0582.

CASTLEMAN, Kenneth R. Digital Image Processing. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 1996.

CLARK, Gary M. Do we really need prognostic factors for breast cancer?. En: Breast Cancer Research and Treatment. Enero, 1994. Vol. 30 pags. 117-126.

DOMINGUEZ, M A; MARCOS, M; MEIRIÑO, R; VILLAFRANCA, E; DUEÑAS, M. T; ARIAS, F., MARTINEZ, E. Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano. En: Anales del Sistema sanitario de Navarra. 2001 Vol. 24. Págs 99-110. ISSN 1137-6627.

FLOREZ, Rafael de La Rosa. Procesamiento de imagenes Digitales. En: Memorias semana Informatica. Universidad Autonoma de Puebla, Mexico, Octubre, 2007.

GONZÁLEZ, Rafael C, WOODS, Richard E, EDDINS, Steven L. Digital Image Processing using Matlab. 1^{ra} Ed. Upper Saddle River, NJ Prentice Hall. 2004

GONZÁLEZ, Rafael C, WOODS, Richard E, Tratamiento Digital de Imágenes. USA. Addison Wesley Iberoamericana S.A./Ediciones Diaz de Santos SA. 1996

HONKOOP AH, VAN DIEST PJ, de Song JS et al: Prognostic role of clinical, pathological and biological Characteristics in patients with locally advanced breast cancer. Br J Cancer 1998; 77(4): 621.

Image Processing Toolbox. User's Guide. The Mathworks Inc. 2011

JAIN, Anil K. Fundamentals of Digital Image Processing. Prentice Hall. 1989

JM, Elias; Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis. ASCP Press, Chicago. 1990.

MARTINEZ ABAUNZA, Victor Eduardo. Modelo Computacional para caracterización de células endocervicales. Tesis de Pregrado. Bucaramanga. 2007

MARTÍNEZ, José Ramiro. Visión por computador: técnicas de Segmentación I. Documento en línea de la Universidad de Sevilla. En: http://www.esi2.us.es/~jdedios/asignaturas/Master_1.pdf.

MOLINA, Maria L; BOBREGA, Doris; MOLINA, Yajaira. Receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama, Asociación con variables clinicopatológicas. En: Revista Salus de la Facultad de Salud de la Universidad de Carabobo, Venezuela. Diciembre 2001. Vol. 5 . ISSN 1316- 7183.

PAJAREZ, M. Gonzalo; CRUZ, G. Jesús. 2^{da} Ed. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. AlfaOmega. México. 2008

Shih, Frank. Y. Image Processing and Mathematical Morphology Fundamentals and applications. USA: Taylor & Francis Group. 2009

SUÁREZ, Patricia, BENITEZ, Luis. Receptores Estrógenos Alfa y Beta en cáncer de mama. En Acta Medica Grupo Angel Septiembre, 2003. Vol. 1 No. 3 .Mexico.

POBLETE, María Teresa. Marcadores de utilidad en cáncer mamario. En: Cuaderno de Cirugía (Valdivia). Diciembre, 2001. Vol. 15 No. 1. ISSN 0718-2864

SCHNORRENBURG, F.; PATTICHIS, C.S.; KYRIACOU, K.C.; SCHIZAS, C.N. Computer-aided detection of breast cancer nuclei. En: IEEE Transactions On Information Technology In Biomedicine. Junio,1997. Vol. 1 No 2 págs.128-140 ISSN 1089-7771

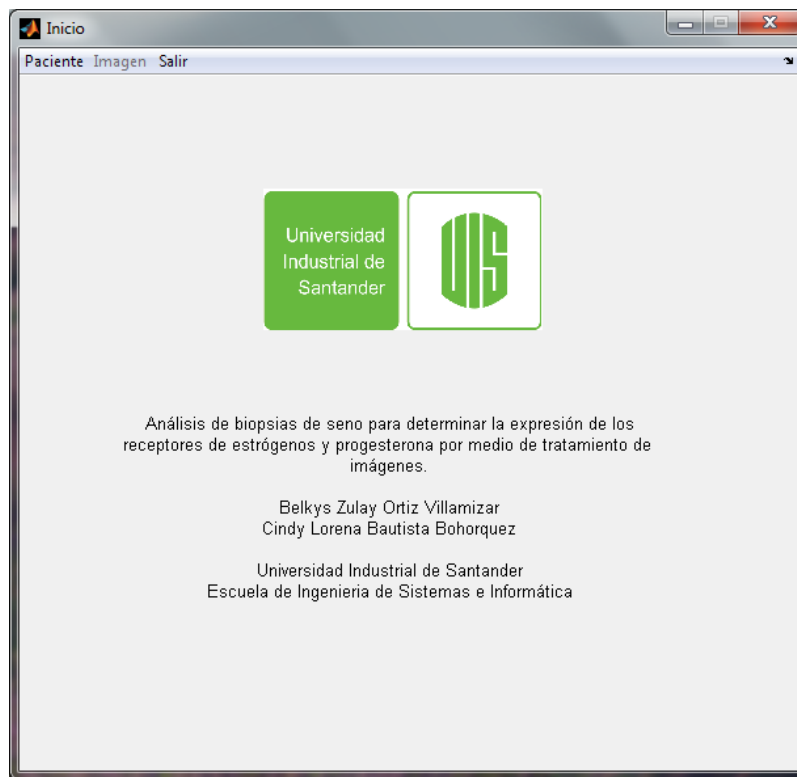
SCHNORRENBURG, F.; PATTICHIS, C.S.; KYRIACOU, K.C.; SCHIZAS, C.N., Computer-aided classification of breast cancer nuclei. En: Technology & Health Care. Diciembre, 1996 Vol. 4 págs.147-161 ISSN 0928-7329.

TAYLOR, CR, Cote RJ: Immunomicroscopy: A diagnosis Tool for the Surgical Pathologist, 2nd ed. WB Saunders Co., Philadelphia, 1994.

ANEXO 1. FUNCIONAMIENTO DE LA HERRAMIENTA SOFTWARE

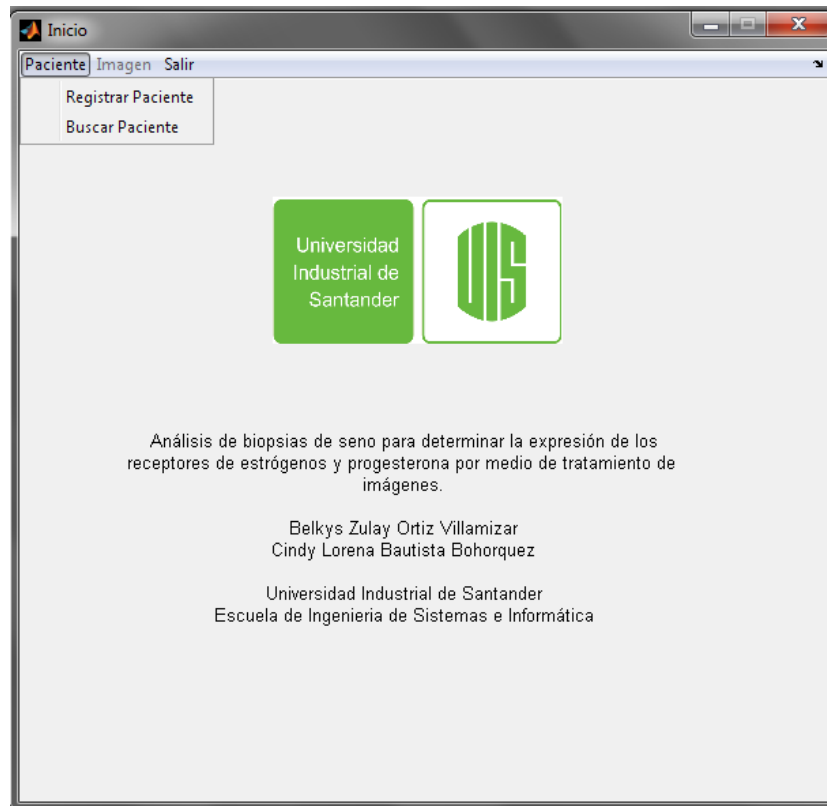
La herramienta computacional fue desarrollada en su totalidad en el entorno de desarrollo Matlab R2009a, con un motor de base de datos postgresQL 9.1.

Figura 30. Ventana principal de la Herramienta Software.



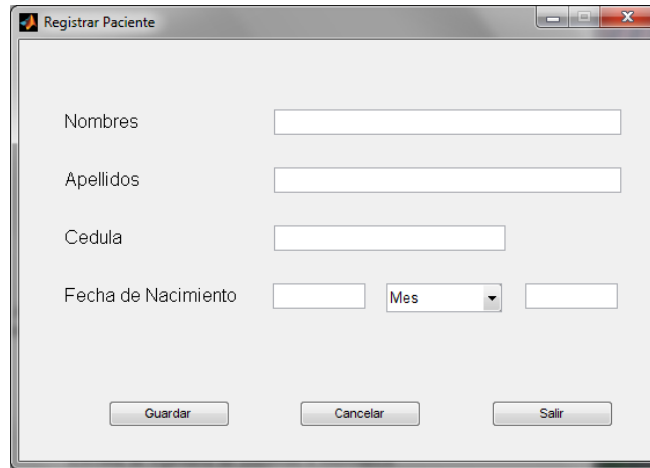
En la primera ventana con la que interactúa el usuario, se presentan las opciones pacientes, Imagen y salir. En primera instancia la opción Imagen aparece deshabilitada debido a que no se ha ingresado la información del paciente que se desea analizar.

Figura 31. Menú Paciente



El menú Paciente contiene la opción Registrar Paciente, lo que indica que el sistema va a analizar las imágenes de este paciente por primera vez, también contiene la opción Buscar Paciente, para relacionar las imágenes, con pacientes que ya están dentro de la base de datos.

Figura 32. Registrar Paciente

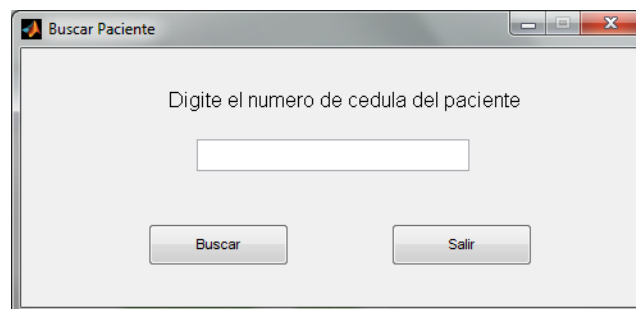


The screenshot shows a window titled "Registrar Paciente" with a standard Windows-style title bar. The window contains four input fields: "Nombres", "Apellidos", "Cedula", and "Fecha de Nacimiento". The "Fecha de Nacimiento" field is split into three parts: a text box for the day, a dropdown menu currently showing "Mes", and another text box for the year. At the bottom of the window, there are three buttons: "Guardar", "Cancelar", and "Salir".

Al hacer clic en la opción Registrar Paciente el sistema muestra una interfaz donde se almacena la información personal de paciente (Nombres, Apellidos, Cedula, Fecha de Nacimiento), junto con las opciones Guardar, Cancelar y Salir.

Si es seleccionada la opción Guardar, la información del paciente es almacenada en la base de datos, y posteriormente se habilita la opción Imagen en la Ventana Principal. La opción Cancelar me borra los elementos digitados hasta ese momento en la interfaz, y Salir lleva de nuevo al usuario a la Ventana Principal.

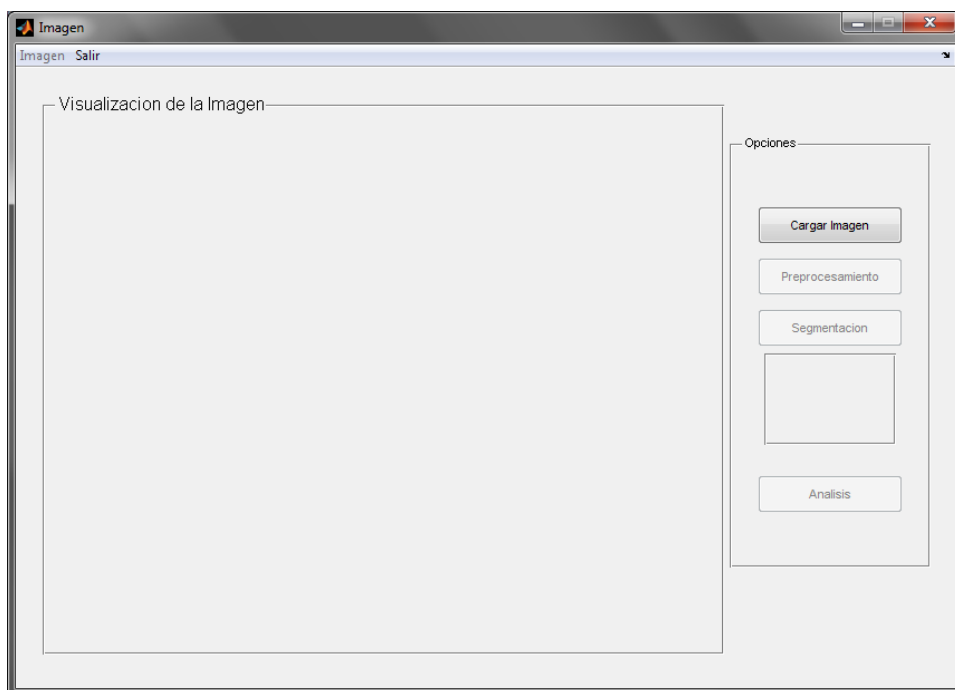
Figura 33. Buscar Paciente



The screenshot shows a window titled "Buscar Paciente" with a standard Windows-style title bar. The window contains a text prompt "Digite el numero de cedula del paciente" above a single text input field. At the bottom of the window, there are two buttons: "Buscar" and "Salir".

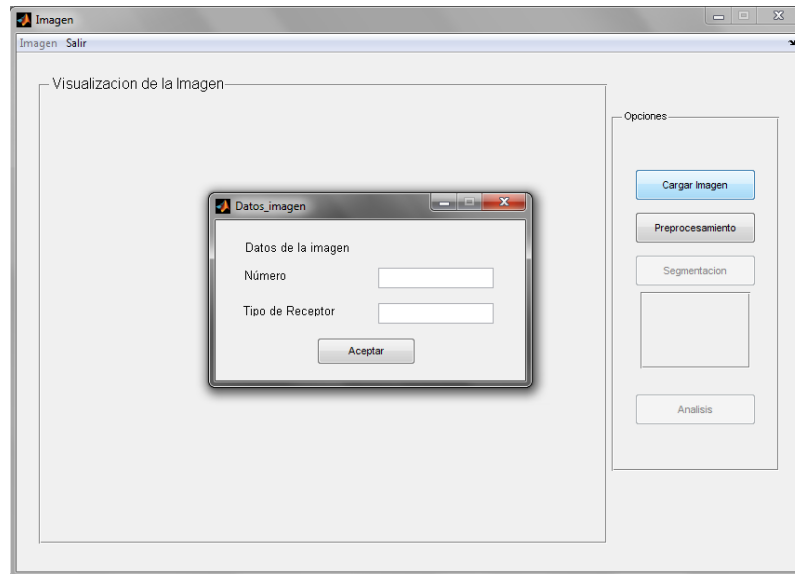
Si el paciente ingresa a la opción Buscar Paciente, se muestra la ventana anterior, donde existe una casilla para digitar la cedula del paciente al que pertenecen las imágenes que se desea analizar, junto con la opción Buscar, y la opción salir. Después de digitar la cedula del paciente y dar clic en buscar, se habilitara la ventana Imagen.

Figura 34. Ventana Imagen



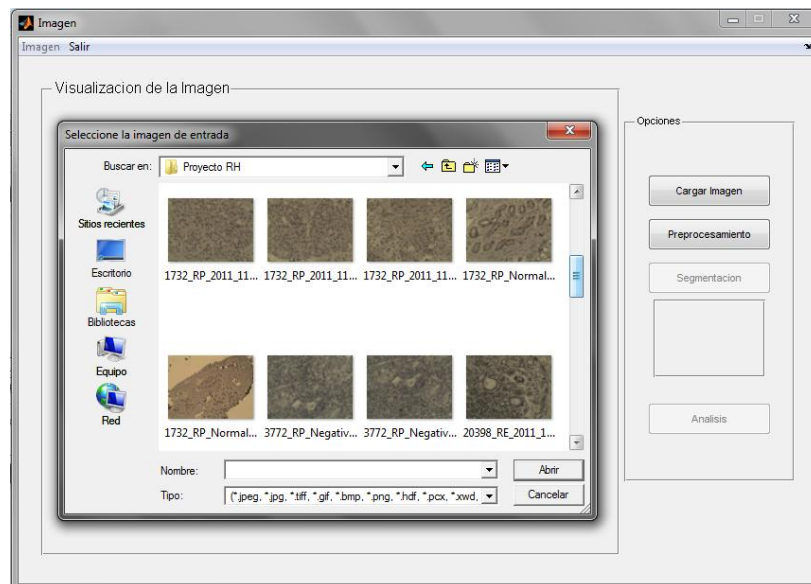
En la Ventana Imagen se presentan las principales opciones para realizar el procesamiento de la imagen, se tienen las opciones: Cargar Imagen, Preprocesamiento, Segmentación y Análisis. En el primer momento solo aparece habilitada la opción Cargar Imagen.

Figura 35. Ventana Datos Imagen



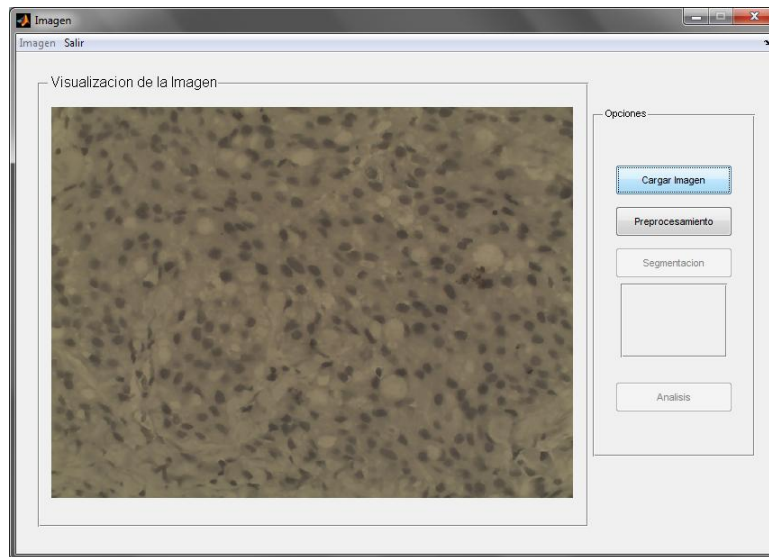
Al seleccionar la opción Cargar Imagen se abrirá una Ventana Datos Imagen donde se registra la descripción de la imagen que se va a estudiar, La información que debe ser suministrada por el especialista es el numero de la lamina al que pertenece la imagen, junto con el Tipo de Receptor.

Figura 36. Opción Cargar Imagen



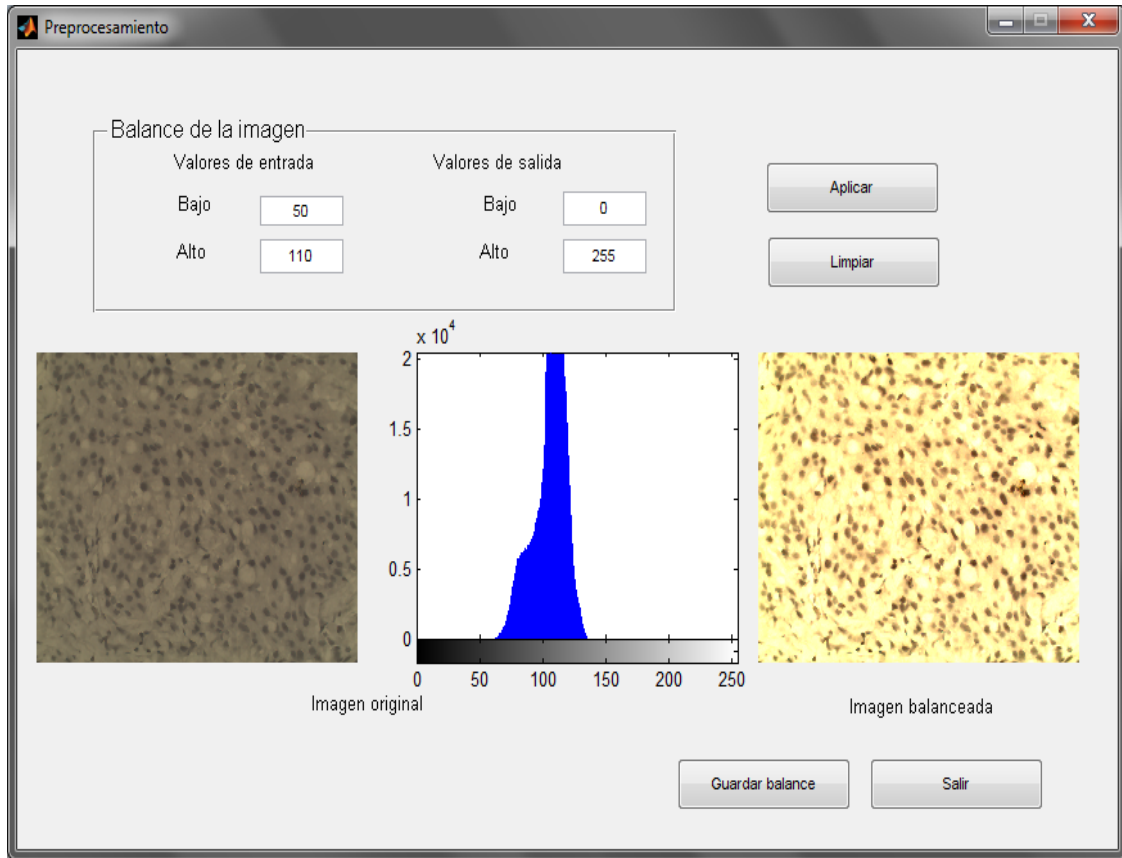
Después de almacenar la información de la imagen, se procede a buscar la imagen que se desea analizar.

Figura 37. Resultado de la opción Cargar Imagen



Cuando se ha seleccionado la imagen, esta se muestra en la ventana principal, donde es posible continuar con el proceso de tratamiento de la imagen.

Figura 38. Ventana Preprocesamiento



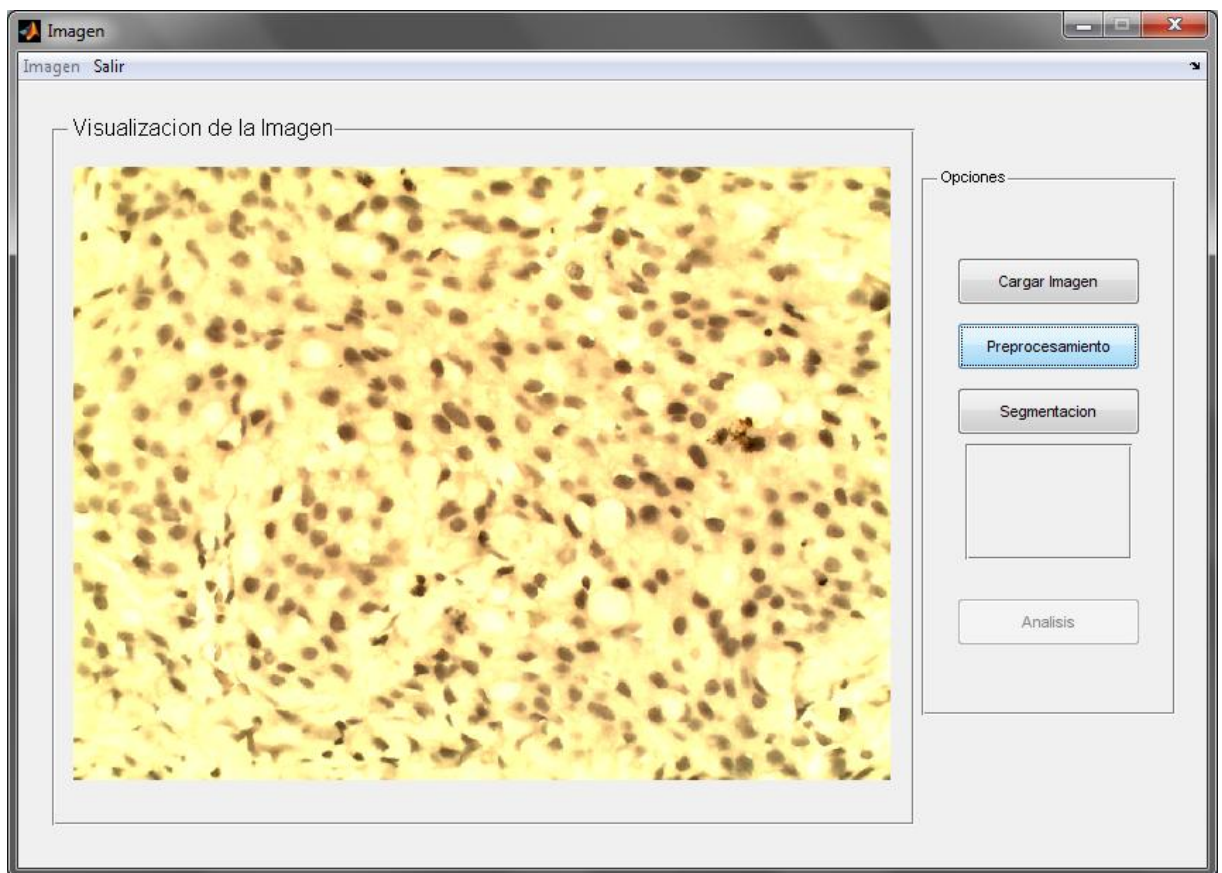
Si se selecciona el botón Preprocesamiento, se mostrará una Ventana Preprocesamiento donde es posible realizar el balance de la imagen, Se muestra la imagen que se está analizando, junto con su Histograma que representa la distribución de las intensidades de la imagen.

Las casillas que se presentan en la parte superior, permiten realizar el balance de la imagen tomando como valores de entrada los valores que se desean resaltar dentro de la imagen, y los valores de salida representan la forma como se pretenden distribuir los valores de entrada.

Al seleccionar el botón Aplicar se realiza el balance sobre la imagen, y se muestra en la parte inferior derecha, si se da clic sobre limpiar, los valores de las casillas se limpian, junto con la imagen balanceada y es posible realizar el proceso nuevamente hasta obtener los mejores resultados, de acuerdo a las características que se deseen resaltar.

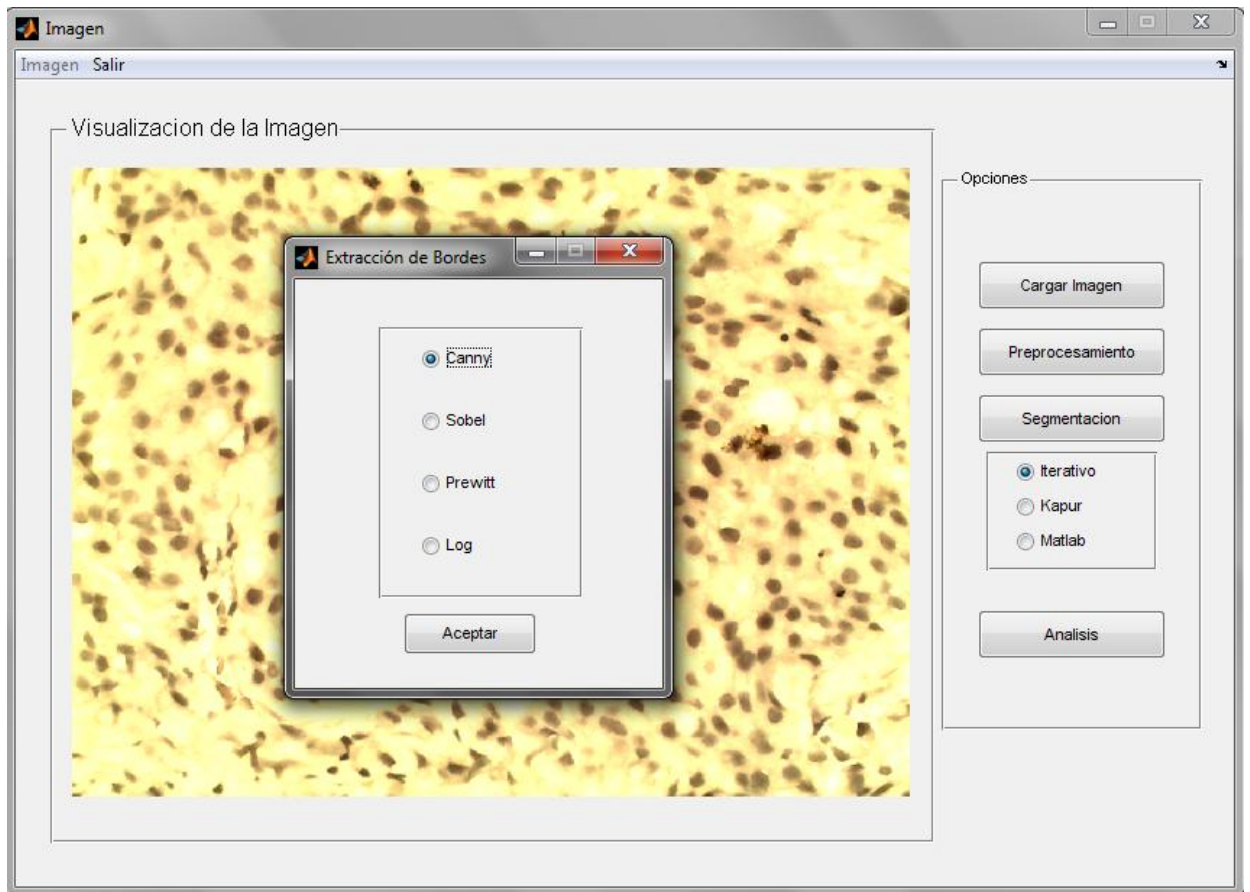
La opción Guardar Balance permite guardar la imagen balanceada y me permite visualizar, y me lleva nuevamente a la Ventana Imagen donde es posible visualizar ahora la imagen balanceada.

Figura 39. Visualización de la imagen balanceada en la Ventana Imagen



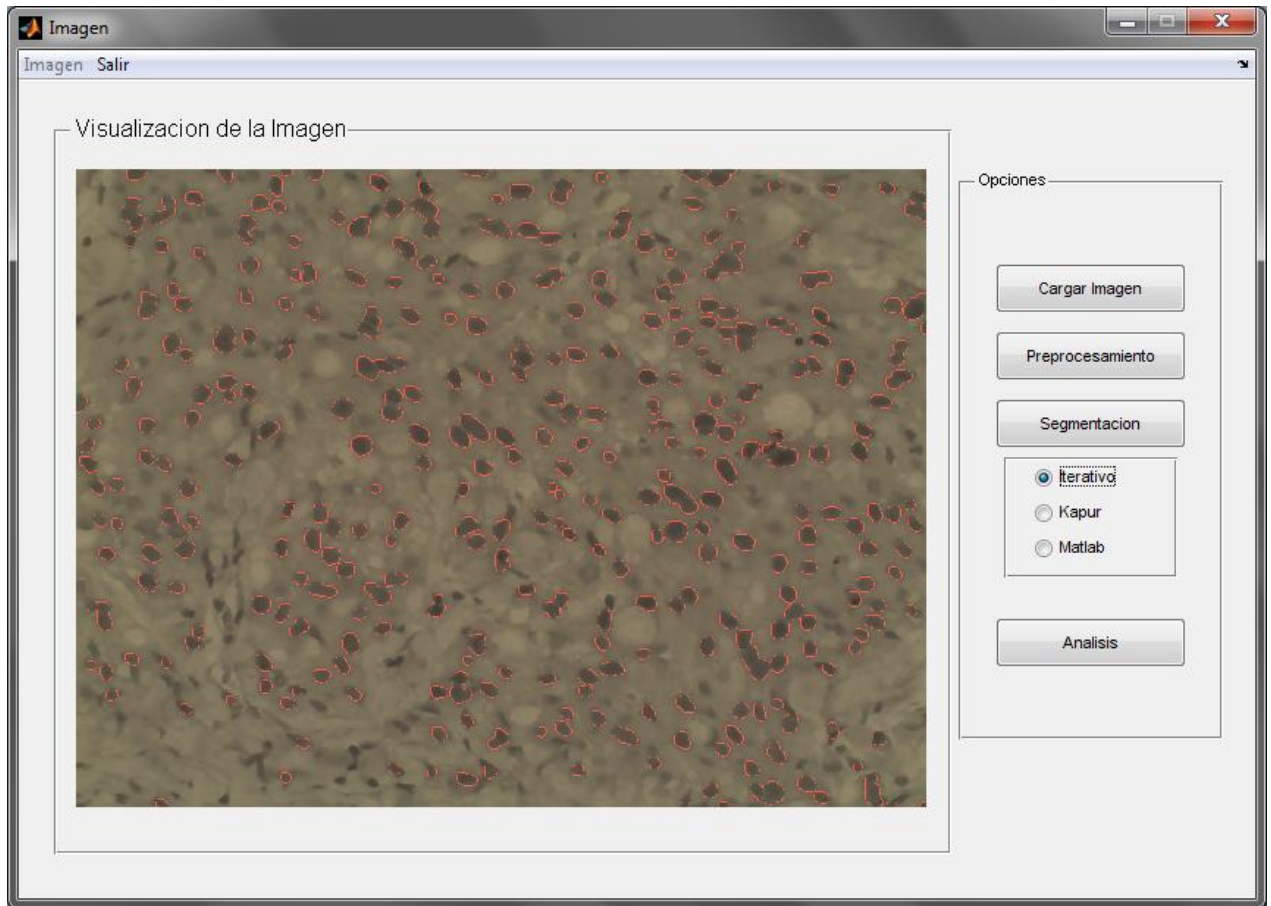
La opción Segmentación es habilitada después de realizar el balance de la imagen.

Figura 40. Opción segmentación



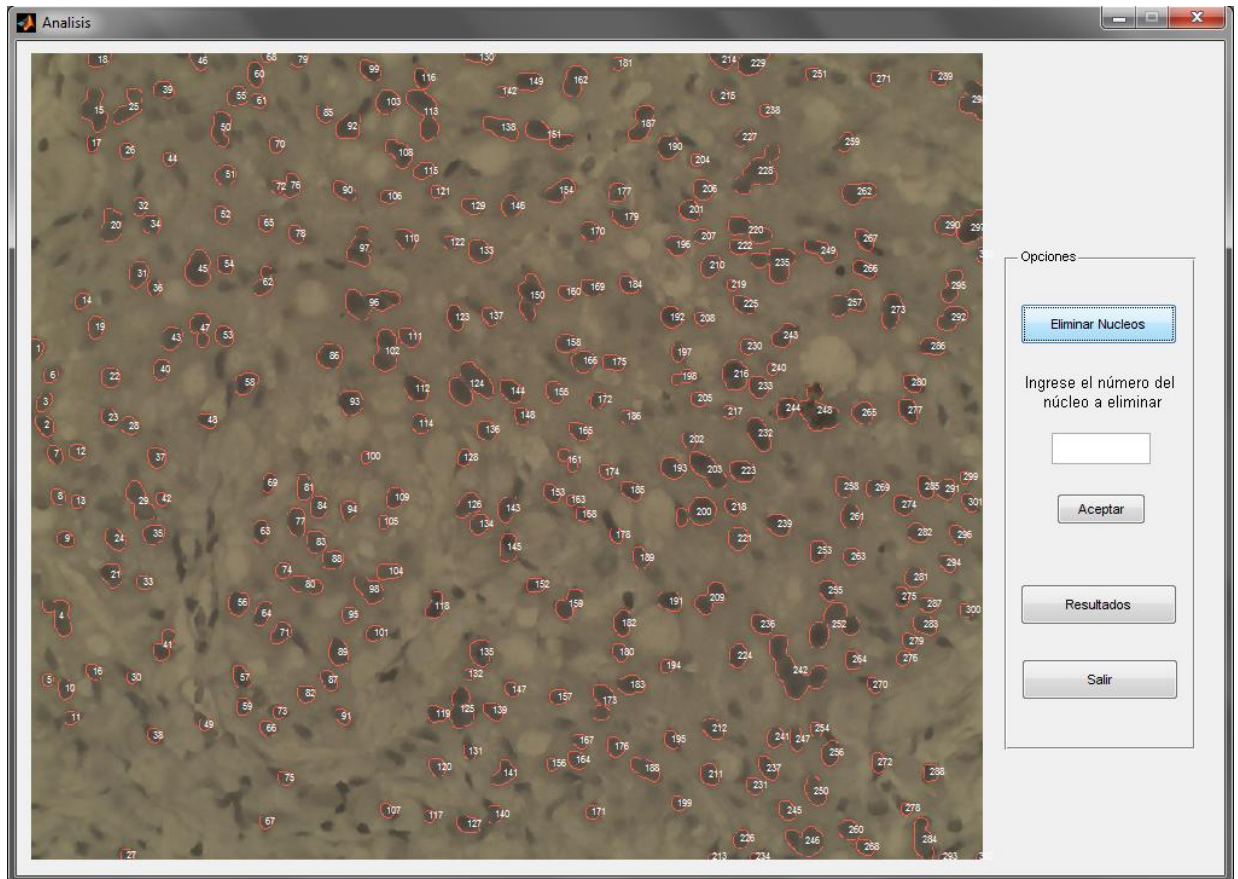
Al oprimir el botón Segmentación, se muestran las opciones de los diferentes métodos implementados para realizar este proceso, el usuario puede variar los diferentes métodos hasta encontrar el que mejor resalte los núcleos de las células. Al dar clic en la opción Aceptar se muestra la imagen segmentada en la Ventana Imagen.

Figura 41. Visualización de la Imagen Segmentada.



La imagen segmentada es mostrada en la Ventana Principal, donde es posible modificar el proceso de segmentación hasta encontrar el más óptimo. El botón Análisis se habilita después de este proceso.

Figura 42. Ventana Análisis



La Ventana Análisis me permite visualizar la segmentación hecha sobre la imagen al igual que una etiqueta sobre cada núcleo segmentado, además me presenta el botón Eliminar Núcleos, Resultados y Salir.

Como los resultados de la segmentación me pueden mostrar regiones que no pertenecen a núcleos reales, Si se hace clic sobre el botón Eliminar Núcleos, se muestra una casilla donde es posible eliminar el estas regiones digitando el numero de la etiqueta que posee en la imagen. El botón Resultados me muestra los resultados del proceso.

Figura 43. Ventana Resultados

The screenshot shows a window titled "Resultados" with the following content:

Información del Paciente

Nombres:	Daniela Fernanda
Apellidos:	Camargo Rojas
Cedula:	1098663856
Edad:	23
Número de Lamina	8812

VALORACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Tipo de Receptor		Estrógenos	
Analisis		Intensidad de Inmunoreactividad	
Positivo	Si	Leve	13.85
Negativo	No	Moderado	38.46
No interpretable	No	Intenso	9.23
		Total	61.53

Buttons: Guardar, Salir

En esta interfaz se pueden evidenciar los resultados del proceso de determinación de positividad de los núcleos, junto con la clasificación de intensidades. En la parte superior izquierda se muestra la información del paciente al que pertenece la imagen que se está analizando, en la parte superior derecha se encuentra la imagen inicial adquirida de la Lámina del paciente.

En la parte inferior se puede evidenciar los resultados de la valoración inmunohistoquímica, donde se muestra el tipo de receptor que se está analizando en ese instante, la positividad que se adquiere del estudio de los núcleos y los

niveles de intensidad de estos mismos, clasificados en leves, moderados e intensos.