

**IMPLEMENTACIÓN DE UN ALGORITMO QUE PERMITA LA DETECCIÓN DE
GLÓBULOS BLANCOS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS MEDIANTE TÉCNICAS
DE TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS**

**ANGIE MILENA MARTÍNEZ MEJÍA
CAMILO ANDRÉS SAAVEDRA SANTAMARIA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2012

**IMPLEMENTACIÓN DE UN ALGORITMO QUE PERMITA LA DETECCIÓN DE
GLÓBULOS BLANCOS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS MEDIANTE TÉCNICAS
DE TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS**

**ANGIE MILENA MARTÍNEZ MEJÍA
CAMILO ANDRÉS SAAVEDRA SANTAMARIA**

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero de Sistemas

**Directora
Ph.D(c) Lola Xiomara Bautista Rozo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

A mis padres, Miguel Eduardo Martínez Quintero y María Julieta Mejía Tette, por su apoyo incondicional, enseñanza continúa y paciencia para culminar con éxito esta etapa.

Angie Milena Martínez Mejía

A mis padres, Roberto Saavedra Núñez y Esperanza Santamaria Villamil, por su apoyo y guía para enfrentar los retos que se presentaron en el trayecto para terminar con esta etapa.

A mis abuelos, Benjamin Santamaria y Sara Villamil, por su cariño.

Camilo Andrés Saavedra Santamaría

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la oportunidad de alcanzar esta meta y la determinación de continuar a pesar de las dificultades presentadas en el trayecto.

A nuestras familias por brindarnos su apoyo y buenos deseos.

A nuestros amigos por ayudarnos, apoyarnos y por esos momentos de felicidad que compartimos.

A la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER y a la Escuela de Ingeniería de Sistemas, por la formación profesional brindada.

Al Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica GIIB y a quienes lo integran, especialmente al M.Sc(c) Emir Galvis, por dedicar parte de su tiempo a darnos la asesoría en los momentos en los que la necesitamos.

Al D.E.A. Alfonso Mendoza Castellanos y la PH.d.(c) Lola Xiomara Bautista Roza, profesores de la Escuela de Ingeniería de Sistemas y al MD Ernesto Rueda Arenas, Oncólogo Pediatra del Hospital Universitario de Santander por compartir su amplio conocimiento, en sus respectivas áreas, con nosotros.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO	18
1.1. Título	18
1.2. Objetivos	18
1.2.1 Objetivo General	18
1.2.2 Objetivos Específicos	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
2.1 Planteamiento del problema	19
2.2 Impacto	21
2.3 Viabilidad	22
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1 Hematología	24
3.1.1 La sangre	24
3.1.2 Glóbulos blancos	24
3.1.3 Clasificación CD de glóbulos blancos	25
3.1.3.1 Granulocitos	25
3.1.3.1.1 Granulocitos neutrófilos	26
3.1.3.1.2 Granulocitos eosinófilos	27
3.1.3.1.3 Granulocitos basófilos	27
3.1.3.2 Monocitos	27
3.1.3.3 Linfocitos	28
3.2 Técnicas de detección	30
3.2.1 Técnica manual	30
3.2.2 Técnica de impedancia	31
3.2.3 Técnica de citometría de flujo	32
3.2.4 Técnica de tratamiento digital de imágenes	34

3.3 Tratamiento Digital de Imágenes	36
3.3.1 Representación digital de imágenes	36
3.3.2 Conversión a escala de grises	37
3.3.3 Modelos de color	38
3.3.4 Mejora de una imagen	39
3.3.4.1 Mejoras por operaciones por punto	40
3.3.4.1.1 Ecuador de histogramas	40
3.3.4.2 Mejoras por operaciones espaciales	41
3.3.5 Segmentación	43
3.3.5.1 Umbralización	43
3.3.5.2 Segmentación orientada a las regiones	44
3.3.5.2.1 Crecimiento de regiones	44
3.3.5.2.1.1 División y fusión de regiones	44
4. MODELO COMPUTACIONAL.....	45
4.1 Descripción de los casos de uso	45
4.2 Propuesta de trabajo futuro	46
4.2.1 Descripción de los casos de uso	47
5. DESARROLLO COMPUTACIONAL.....	51
5.1 Adquisición	52
5.2 Pre-procesamiento	55
5.3 Segmentación.....	56
5.3.1 Umbralización	56
5.3.2 Detección de bordes	57
5.3.2.1 Algoritmo de Laplace	57
5.3.2.2 Algoritmo de Sobel	58
5.3.2.3 Gradiente Morfológico	59
5.3.2.4 Algoritmo de Canny	60
6. RESULTADOS.....	63
6.1 Resultados en imágenes.....	63

6.2 Especificidad y sensibilidad	65
7. CONCLUSIONES	66
8. RECOMENDACIONES.....	67
GLOSARIO.....	68
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	72
Anexo 1: Funcionamiento del algoritmo	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Extensión de sangre periférica normal	20
Figura 2. Distribución de eventos notificador, por sexo, INC, 2008.....	22
Figura 3. La sangre	24
Figura 4. Clasificación de los glóbulos blancos en grupos y subgrupos	25
Figura 5. Granulocitos normales	26
Figura 6. Neutrófilos normales	26
Figura 7. Eosinófilo y basófilo normales	27
Figura 8. Monocito	28
Figura 9. Linfocito.....	29
Figura 10. Conteo celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer	31
Figura 11. Esquema del recuento celular con método de Impedancia	32
Figura 12. Esquema de un citofluorómetro	34
Figura 13. Representación matricial de una imagen.....	37
Figura 14. Escalas cromáticas y acromáticas	37
Figura 15. Imagen que se ha transformado en escala de grises	38
Figura 16. Imagen modelo RGB (Rojo – Verde – Azul).....	39
Figura 17. Modelo HSL (Matriz - Saturación – Luminosidad).....	39
Figura 18. Mejora de imágenes	40
Figura 19. Histogramas.....	41
Figura 20. Método de la mediana.....	42
Figura 21. Imagen suavizada con el método de la Mediana	42
Figura 22. Imagen con filtros, paso bajo y paso alto matriz diagonal.....	43
Figura 23. Diagrama de casos de uso modelo actual.....	46
Figura 24. Diagrama de casos de uso modelo futuro	50
Figura 25. Diagrama de las etapas de detección.....	51
Figura 26. Lámina de extendido	52
Figura 27. Microscopio y cámara.....	53
Figura 28. Montaje	53
Figura 29. Imágenes observadas bajo el microscopio	54
Figura 30. Diagrama de flujo del funcionamiento del algoritmo	55

Figura 31. Clases de Umbralización ofrecidas por EmguCV	57
Figura 32. Tipos de filtros morfológicos	60
Figura 33. Tipos de detección de bordes	61
Figura 34. Muestra de imágenes con su resultado final	63
Figura 35. Interfaz inicial presentada al usuario	72
Figura 36. Cuadro de diálogo para abrir una imagen	73
Figura 37. Imagen cargada en el espacio de trabajo.....	73
Figura 38. Imagen en la cual se ha detectado los glóbulos blancos	74
Figura 39. Cuadro de diálogo para guardar una imagen cargada	75
Figura 40. Imagen ampliada	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caso de Uso: Cargar Imagen.....	45
Tabla 2. Caso de Uso: Analizar Imagen	46
Tabla 3. Caso de Uso: Seleccionar paciente	47
Tabla 4. Caso de Uso: Detectar glóbulos blancos	47
Tabla 5. Caso de Uso: Caracterizar glóbulos blancos	48
Tabla 6. Caso de Uso: Realizar conteo de glóbulos blancos	49
Tabla 7. Caso de Uso: Generar diagnóstico	49
Tabla 8. VP, VN, FP, FN.....	65

RESUMEN

Título: IMPLEMENTACIÓN DE UN ALGORITMO QUE PERMITA LA DETECCIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS MEDIANTE TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS. ¹

Autores: Angie Milena Martínez Mejía – Camilo Andrés Saavedra Santamaría.²

Palabras clave: Tratamiento Digital de Imágenes, técnicas de detección de glóbulos blancos, glóbulos blancos, sangre, enfermedades hematológicas.

Descripción: El descubrimiento de nuevas enfermedades hematológicas y el estudio de las mismas, han llevado al ser humano a buscar maneras más sencillas y rápidas para la detección y posterior tratamiento de ellas, ya que estas enfermedades en su gran mayoría pueden afectar elementos celulares (eritrocitos, plaquetas y leucocitos), plasmáticos, órganos hematopoyéticos (médula ósea) y órganos linfoides. Debido a las diversas funciones que los componentes sanguíneos cumplen, sus trastornos darán lugar a una serie de manifestaciones que pueden ser denominados como síndromes en sus diferentes tipos.

De ahí surgió la idea de ofrecer una alternativa a los métodos existentes de detección y conteo de células sanguíneas, utilizando Tratamiento Digital de Imágenes. Este trabajo de grado consiste en la detección de glóbulos blancos en imágenes de muestras de sangre periféricas, siendo la primera etapa de una herramienta computacional que servirá de apoyo para el diagnóstico de enfermedades hematológicas.

Para la realización de este trabajo de grado fue necesaria la investigación de diversos algoritmos de tratamiento digital de imágenes ya implementados que sirvieron como guía en las diferentes etapas de desarrollo, seleccionando los que mejor se adaptaron a las necesidades presentadas en el transcurso del mismo. A su vez, se hizo necesario el estudio de la morfología y función de los glóbulos blancos en la sangre. Para el desarrollo de lo anterior se trabajó bajo el método evolutivo, específicamente se utilizó la metodología bajo el desarrollo basado en prototipos, usando el compilador Visual Studio Express 2010, utilizando el wrapper para lenguaje C# de la librería OpenCV, llamado EmguCV.

¹ Trabajo de grado

² Facultad de Ingeniería Fisicomecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informáticas.
Directora: Lola X Bautista Roza.

SUMMARY

TITLE: IMPLEMENTATION OF AN ALGORITHM THAT ALLOWS THE DETECTION OF WHITE BLOOD CELLS IN BLOOD SAMPLES THROUGH DIGITAL MICROSCOPIC IMAGE PROCESSING TECHNIQUES. ³

Authors: Angie Milena Martínez Mejía – Camilo Andrés Saavedra Santamaría. ⁴

Keywords: Image digital processing, White blood cells detection techniques, White blood cells, blood, hematological diseases.

Description: The discovery of new hematological diseases and their study, have led the man to search easier and faster ways for the detection and subsequent treatment of them, since these diseases mostly affects cellular elements (erythrocytes, platelets and leukocytes), plasma-forming organs (bone marrow) and lymphoid organs. Due to the various functions that blood components met, their problems will lead to a series of events that can be referred as syndromes in different types.

This led to the idea of offering an alternative to the existing white blood cells detection and counting methods using digital image processing. This work consists on the white blood cells detection in peripheral blood samples images, being the first step of a computational tool that will support the diagnosis of hematological diseases.

For the realization of this work it was necessary the research of diverse implemented digital image processing algorithms that served as a guide in the different steps of the development, selecting those that better adapted to the presented necessities during the development. In turn it is necessary to study the morphology and function of white blood cells.

The development was done under the evolutionary method, specifically the methodology used was the prototype based development, using Visual Studio Express 2010 and the C# wrapper of the OpenCV library named EmguCV.

³ Work Degree

⁴ Faculty of Fisicalmechanics Engineering. School of System Engineering. Directress: Lola X Bautista Rozo.

INTRODUCCIÓN

Siempre ha sido de gran interés para el ser humano adquirir un mayor conocimiento sobre la hematología y sus principales características. Este interés lo impulsó a tratar de comprender mejor las diferentes patologías, que estaban presentes desde la antigüedad [1]. Debido a esto, surgió la necesidad de hacer más sencilla la adquisición de los resultados hematológicos y así aparecieron las diferentes técnicas de detección celular, entre las que se encuentran, la manual, la de citometría de flujo, la de impedancia eléctrica y una fundamentada en tratamiento digital de imágenes microscópicas que es la base principal de este proyecto.

En la actualidad se presentan distintos tipos de enfermedades que le competen al área de la Hematología [2], pero en esta oportunidad, se quiere plantear una base, para posteriormente tener una herramienta de apoyo al especialista para el diagnóstico de enfermedades de la sangre que sean causadas por el comportamiento anormal de estas células. En Colombia la leucemia linfocítica aguda y la leucemia mieloide son las más comunes en niños y constituyen el 35% de los eventos notificados por el Instituto Nacional de Cancerología (Ver Figura 2 – 31 p.)

La primera etapa para obtener esta herramienta es la construcción de un algoritmo que detecte la presencia de glóbulos blancos en la sangre utilizando Tratamiento Digital de Imágenes microscópicas, que es la que se plantea en el desarrollo de este proyecto. Las etapas posteriores incluirán: El conteo, la clasificación y la caracterización de los glóbulos blancos, para finalmente brindar apoyo al diagnóstico de enfermedades hematológicas. Estas etapas se podrán realizar con éxito gracias al resultado de este proyecto.

La culminación satisfactoria de este trabajo, trajo como resultado el cumplimiento de los objetivos fijados al iniciar el mismo y cimentará las bases para el desarrollo de la herramienta de apoyo al diagnóstico anteriormente mencionada. Una vez comprendido el impacto que puede producir un proyecto de esta índole, es importante que el lector realice un análisis detallado de este documento.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1.1 TÍTULO

Implementación de un algoritmo que permita la detección de glóbulos blancos de muestras sanguíneas mediante técnicas de tratamiento digital de imágenes microscópicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar un algoritmo que permita la detección de glóbulos blancos por medio de tratamiento digital de imágenes microscópicas de muestras sanguíneas periféricas.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Hacer una revisión bibliográfica de algoritmos ya diseñados y probados, que permitan la diferenciación de elementos en una imagen microscópica digital y elegir el que mejor se adapte a las características específicas de los glóbulos blancos.
- Estudiar las características morfológicas de los glóbulos blancos.
- Implementar el algoritmo más adecuado, para la detección de los glóbulos blancos de acuerdo a su morfología.
- Calcular indicadores de especificidad y sensibilidad en la detección que realiza el algoritmo.

2. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto es la primera etapa dentro del proceso de una investigación mayor que permitirá identificar con mayor facilidad y especificidad enfermedades que estén directamente relacionadas con la deficiencia, mutación y/o aumento de glóbulos blancos. Entre estas enfermedades se encuentran [3]:

- Enfermedades infecciosas
- Leucemias
- Enfermedades de hígado y riñón
- Exposición a radiaciones
- Presencia de sustancia cito tóxicas
- Fallas de la médula ósea

En el contexto de esta primera etapa, se llevará a cabo un método que permita la detección de glóbulos blancos en imágenes microscópicas, lo que permitirá en etapas posteriores, el conteo, la clasificación y el diagnóstico de diversas patologías hematológicas. Además, proporcionará una visualización de las células, cuando sea necesario.

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de diversas infecciones en la sangre o de diferentes tipos de leucemias es causada por una sobreproducción de glóbulos blancos en la médula ósea. [4] Los niveles de glóbulos blancos en la sangre, bien sea normales o anormales, son detectados por un examen de sangre llamado hemograma o cuadro hemático, el cual se realiza por medio de las técnicas mencionadas en el numeral 3.2. [5]

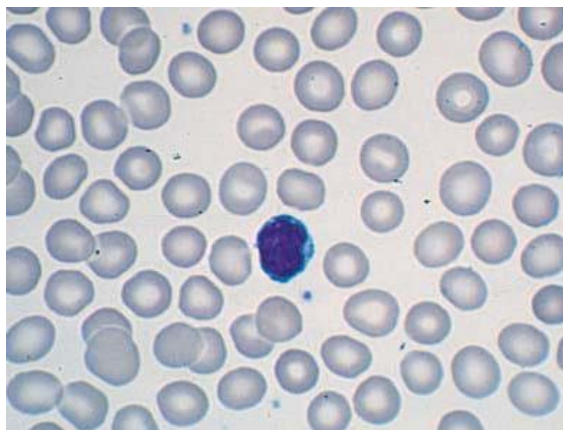
Exceptuando la técnica manual, estas técnicas representan una inversión de dinero grande para los laboratorios clínicos, ya que es necesario el uso de equipos costosos y la compra de reactivos químicos necesarios para el funcionamiento de los mismos. La técnica manual, en cambio, no representa mayor inversión de dinero

pero si requiere una gran dedicación de tiempo por parte del profesional, ya que en ésta técnica se deben contar manualmente las células sanguíneas observadas en el microscopio, lo que conlleva errores en el resultado del hemograma, debido al esfuerzo que esto requiere.

Cuando los resultados de utilizar la técnica de impedancia y citometría de flujo arrojan niveles de glóbulos blancos en la sangre por fuera de los parámetros normales, es necesaria la realización del llamado extendido de sangre periférica (Ver Figura 1). Con un extendido de sangre periférica se puede evaluar la morfología, la cantidad y la proporción de las diferentes clases de glóbulos blancos. [6] Esta evaluación es posible, ya que el extendido es un análisis realizado por los bacteriólogos utilizando microscopios, lo que permite ver el estado de los glóbulos blancos en la sangre.

Es allí donde surge la necesidad de una herramienta que permita, no sólo analizar las cantidades de glóbulos blancos presentes en la sangre, sino que también permita al profesional observar una imagen con la morfología y clasificación de los mismos.

Figura 1: Extensión de sangre periférica normal



Fuente: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: HARRISON Principios de Medicina interna, 17ª edición: <http://www.harrisonmedicina.com>

2.2 IMPACTO

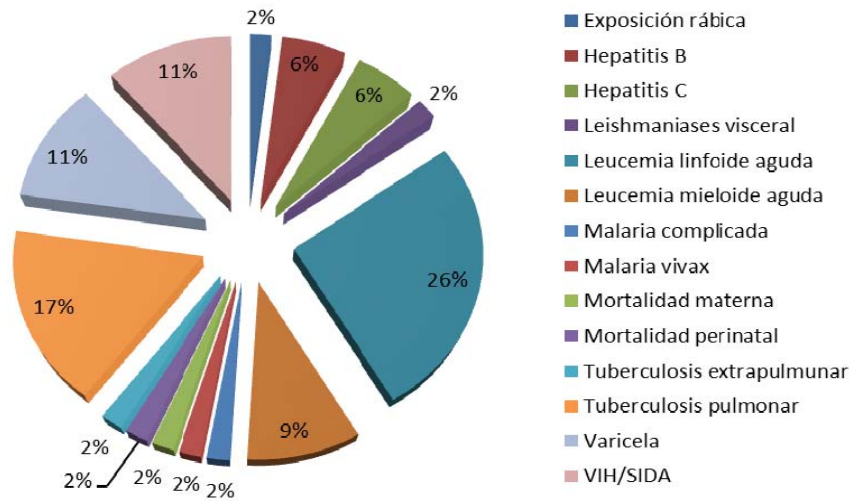
Al terminar este proyecto, se tendrá la base para desarrollar una herramienta software que apoye al especialista en el diagnóstico de enfermedades como la **Leucemia Linfoide (o Linfoblástica) Aguda infantil (LLA)**, que es una enfermedad en la que glóbulos blancos que combaten las infecciones se encuentran inmaduros en grandes cantidades en la sangre y médula ósea. [7]

La LLA es la forma más común de leucemia infantil y el tipo más común de cáncer infantil y suele afectar más a los varones. La tasa anual de incidencia en niños y niñas colombianos es de 5,6 y 6 por 100.000 respectivamente, tasas superiores a las de países como Haití, Cuba y Estados Unidos. [8] Además esta enfermedad constituye aproximadamente el 25% de todos los cánceres en niños menores de 15 años. [9]

Una vez esta enfermedad sea detectada en su etapa inicial, será fácilmente tratable y disminuirá la tasa de mortalidad en niños (y adultos) causada por este y otros tipos de leucemia; es por ello que todo el proceso de investigación, del cual este proyecto es la etapa inicial, quiere minimizar el tiempo que llevaría detectar esta enfermedad y muchas otras patologías hematológicas que estén directamente relacionadas con las mutaciones, el crecimiento descontrolado y/o la falta de producción de glóbulos blancos en la sangre.

Para ilustrar mejor esta problemática se muestran cifras dadas por el Instituto Nacional de Cancerología. (Ver Figura 2) De los 53 eventos notificados el 35% corresponden a pacientes con diagnóstico oncológico de leucemia de tipo linfoide o mieloides.

Figura 2: Distribución de eventos notificador, por sexo, INC, 2008.



Fuente: Instituto Nacional de Cancerología. Disponible en:
<http://www.cancer.gov.co/documentos/Boletinepidemiologico/N.2-2009.pdf>

2.3 VIABILIDAD

Para el desarrollo de este proyecto se cuenta con la base de datos de recursos electrónicos y la biblioteca de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander que cuenta con una serie de libros relacionados con hematología, con el fin de obtener conocimiento sobre el tema, tal como la morfología, función y clasificación de glóbulos blancos y las patologías que están asociadas a su comportamiento. Estas herramientas son de gran ayuda ya que no se cuenta con un conocimiento previo a ello para el desarrollo del proyecto.

Asimismo se cuenta con el respaldo del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB) adscrito a la escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática de la Universidad Industrial de Santander, que brindan su colaboración en el área del Tratamiento Digital de Imágenes ya que cuenta con una serie de estudiantes que han investigado sobre el tema como:

- HERRAMIENTA BASADA EN MAQUINAS DE SOPORTE VECTORIAL PARA LA CLASIFICACION DE CELULAS ESCAMOSAS DE CITOLOGIAS

CERVICO UTERINAS. Laura Yadira Valbuena Rodríguez, Milton Antonio Caviedes Sanabria; Director Víctor Eduardo Martínez.

- MODELO COMPUTACIONAL PARA CARACTERIZACION DE CELULAS ENDOCERVICALES Víctor Eduardo Martínez Abaunza; directores Alfonso Mendoza Castellanos, Olga Mercedes Álvarez Ojeda, Ernesto García Ayala.
- DISEÑO E IMPLEMENTACION DE UN SISTEMA BASADO EN REDES NEURONALES ARTIFICIALES PARA LA CARACTERIZACION DE CELULAS MALIGNAS EN FLUIDO PLEURAL Juan Francisco Remolina Caviedes, Adrián Fernando Rodríguez Vega ; Directores Olga Mercedes Álvarez Ojeda y Víctor Eduardo Martínez Abaunza

Además el GIB cuenta con equipo necesario para el desarrollo de software y con alianzas con centros diagnósticos que nos facilitarán las imágenes microscópicas que serán usadas en el momento del desarrollo.

También se cuenta con herramientas que son claves en el momento de la implementación del algoritmo como lo son: MATLAB (**M**atrix **L**aboratory) y OpenCV (**O**pen **S**ource **C**omputer **V**ision) que son herramientas especializadas en el tratamiento de imágenes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 HEMATOLOGÍA

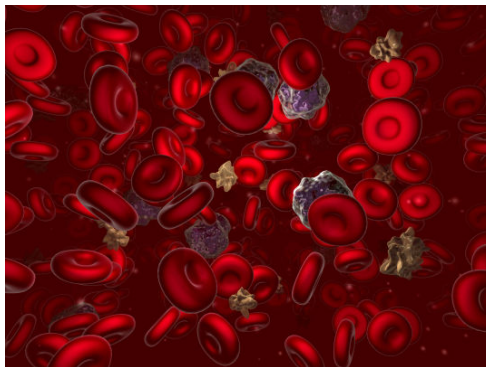
La hematología es el estudio de la sangre, de los tejidos formadores de sangre, los órganos hematopoyéticos⁵ y los desórdenes asociados a ellos. [10]

3.1.1 LA SANGRE

La sangre es un tejido líquido que circula permanentemente por el sistema vascular formado por vasos sanguíneos de diverso calibre y en íntimo contacto con todas las células del organismo. La sangre se compone esencialmente de plasma, un componente líquido en el que se hallan suspendidas las células, que son de tres tipos [11]:

- Glóbulos rojos: Células anucleadas con función respiratoria.
- Glóbulos blancos: Células nucleadas con función defensiva.
- Plaquetas: Fragmentos de citoplasma con función hemostática.

Figura 3: La sangre



Fuente: Start Imagebase: Scientific & Medical ART

3.1.2 GLÓBULOS BLANCOS

Los glóbulos blancos son las células sanguíneas nucleadas la cantidad normal de estas células por milímetro cúbico es de 4.500 a 11.000 y constituyen al 1% del

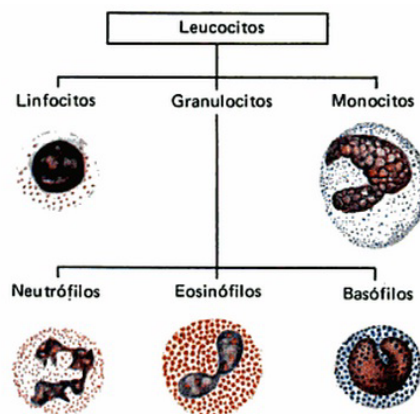
⁵ Los órganos hematopoyéticos son: La médula ósea, los órganos linfoides, los ganglios linfáticos, el timo y el bazo.

volumen sanguíneo. Los glóbulos blancos se subdividen en granulocitos, linfocitos y monocitos. Al igual que todas las células de la sangre, los glóbulos blancos derivan de células madre y células progenitoras de la médula ósea. Desempeñan un papel fundamental en la defensa contra los agentes patógenos. [12]

3.1.3 CLASIFICACIÓN CD DE GLÓBULOS BLANCOS

Una clasificación moderna de los glóbulos blancos tiene su fundamento en diversas moléculas de la superficie de estas células y de células emparentadas y recibe el nombre de clasificación CD. CD significa cúmulo de diferenciación. [13]

Figura 4: Clasificación de los glóbulos blancos en grupos y subgrupos



Fuente: THEWS, Gerhard. MUTSCHLER, Ernst. VAUPEL, Peter. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: Manual para farmacéuticos y biólogos. Edición en español. Barcelona: Editorial Reverté, 1983. 149 p.

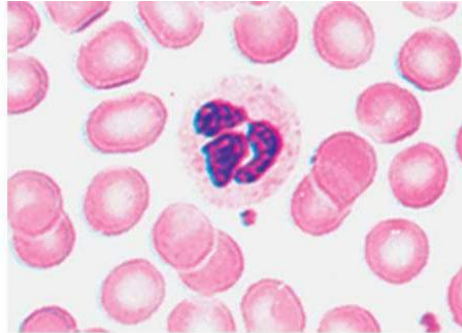
3.1.3.1 GRANULOCITOS

La mayoría de granulocitos poseen un núcleo polilobulado, complejo, por lo que también se denominan glóbulos blancos polimorfonucleados. El citoplasma contiene gránulos característicos, que permiten establecer una clasificación de los granulocitos de acuerdo a su presencia. El núcleo celular está muy lobulado, mostrando con frecuencia varios segmentos interconectados por delgados filamentos de cromatina.

Los granulocitos se forman en la médula ósea a partir de células madre y se desarrollan al principio mediante varias divisiones celulares y, más tarde, pasan por

un período de maduración celular. Los granulocitos se dividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. [13]

Figura 5: Granulocitos normales

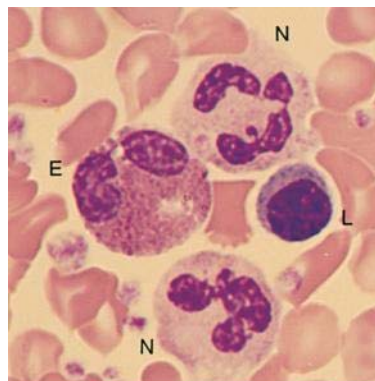


Fuente: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: HARRISON Principios de Medicina interna, 17ª edición: <http://www.harrisonmedicina.com>

3.1.3.1.1 GRANULOCITOS NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son células de 9-12 micrómetros de diámetro, con finos gránulos citoplasmáticos. Estos gránulos son, en su mayoría, lisosomas. Pueden abandonar los vasos sanguíneos desplazándose por el tejido conectivo. Son importantes agentes funcionales para la defensa inespecífica, pueden fagocitar materiales extraños y gérmenes patógenos. El periodo de maduración en la médula ósea es de unos 4-10 días. Después de 7 horas de estar en el torrente sanguíneo, estas células migran a los tejidos del sistema respiratorio o los tractos digestivo o urogenital. Después de abandonar la médula ósea, su supervivencia es de pocos días. [13]

Figura 6: Neutrófilos normales



Fuente: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: HARRISON Principios de Medicina interna, 17ª edición: <http://www.harrisonmedicina.com>

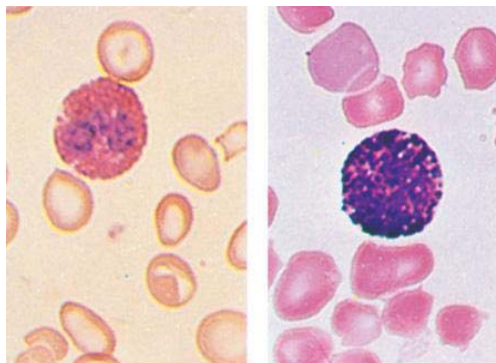
3.1.3.1.2 GRANULOCITOS EOSINÓFILOS

Son algo más grandes que los neutrófilos, miden 11-14 micrómetros de diámetro. En su citoplasma contienen gránulos relativamente gruesos. Pueden fagocitar complejos antígeno-anticuerpo, así como proteínas extrañas. El número de eosinófilos varía de acuerdo con un marcado ritmo diario: a primeras horas de la mañana este número es más pequeño y a media noche más alto. Cuando se presentan reacciones alérgicas y afecciones parasitarias y en el periodo de curación de algunas enfermedades infecciosas, se observa un aumento en el número de eosinófilos (Eosinofilia hemática). [13]

3.1.3.1.3 GRANULOCITOS BASÓFILOS

Los basófilos son los granulocitos de menor tamaño, de 8-11 micrómetros de diámetro. Sus gránulos son gruesos. No poseen enzimas, ni tampoco tienen actividad fagocitaria. Se conoce muy poco acerca de su función. Cuando se presentan casos de reacciones de hipersensibilidad, se observa un incremento del número de basófilos (Basofilia). [13]

Figura 7: Eosinófilo y basófilo normales



Fuente: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: HARRISON Principios de Medicina interna, 17ª edición: <http://www.harrisonmedicina.com>

3.1.3.2 MONOCITOS

Los monocitos son las células hemáticas de mayor tamaño, de 12-20 micrómetros de diámetro. Su citoplasma contiene gránulos finísimos. El núcleo celular es grande, frecuentemente arriñonado, a veces lobulado, y por lo general, situado algo excéntricamente.

Los monocitos se forman en la médula ósea. Tras su liberación y paso al torrente circulatorio, permanecen en sangre sólo unas pocas horas. Los monocitos tienen gran movilidad ameboide y son capaces de acumular y fagocitar partículas grandes., tales como glóbulos rojos lesionados o muertos. [13]

Figura 8: Monocito

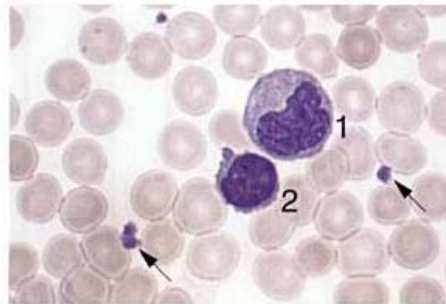


Fig. 4-22 Monocito (1) con núcleo arrifionado y un linfocito (2), un poco más pequeño y con núcleo redondeado, en un extendido sanguíneo (humano). En las inmediaciones de los leucocitos aparecen pequeños trombocitos (→) individuales bien visibles. Técnica de Pappenheim; 1.250 ×.

Fuente: THEWS, Gerhard. MUTSCHLER, Ernst. VAUPEL, Peter. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: Manual para farmacéuticos y biólogos. Edición en español. Barcelona: Editorial Reverté, 1983. 222 p.

3.1.3.3 LINFOCITOS

Los linfocitos son las células específicas del sistema inmune. Su tamaño varía entre 7-10 (Pequeños) y 11-16 (Grandes) micrómetros de diámetro. Su citoplasma encierra un núcleo redondo u ovalado circundado por un delgado ribete de citoplasma. Alrededor del 22.44% de los glóbulos blancos son linfocitos, eso equivale a unos 2.200-4.400 por milímetro cúbico. Su nombre se debe a que es el único leucocito en la linfa. Las infecciones por virus activan especialmente a los linfocitos. Existen dos tipos de linfocitos, los linfocitos B y los linfocitos T.

Los linfocitos B son los efectores de la inmunidad humoral (Parte de los mecanismos inmunitarios que cumplen sus funciones con ayuda de anticuerpos) y se originan en la médula ósea. Los linfocitos T median la inmunidad celular (Parte de los mecanismos inmunitarios que cumplen sus funciones con ayuda de los linfocitos), también se originan en la médula ósea, pero migran rápidamente hacia el timo, donde maduran. Ambos tipos de linfocitos provienen de una célula madre común en la médula ósea. [13]

Figura 9: Linfocito

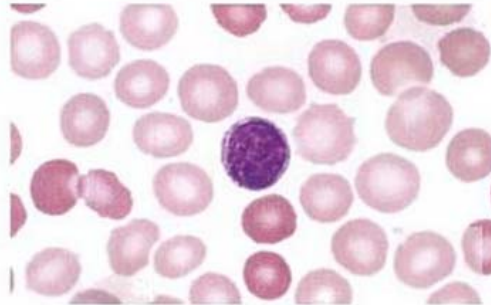


Fig. 4-17 Linfocito en un extendido sanguíneo (humano).
El núcleo es redondeado y oscuro y a su alrededor se ve un reborde estrecho de citoplasma. Técnica de Pappenheim; 1.250 x.

Fuente: THEWS, Gerhard. MUTSCHLER, Ernst. VAUPEL, Peter. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: Manual para farmacéuticos y biólogos. Edición en español. Barcelona: Editorial Reverté, 1983. 217 p.

3.2 TÉCNICAS DE DETECCIÓN

3.2.1 TÉCNICA MANUAL

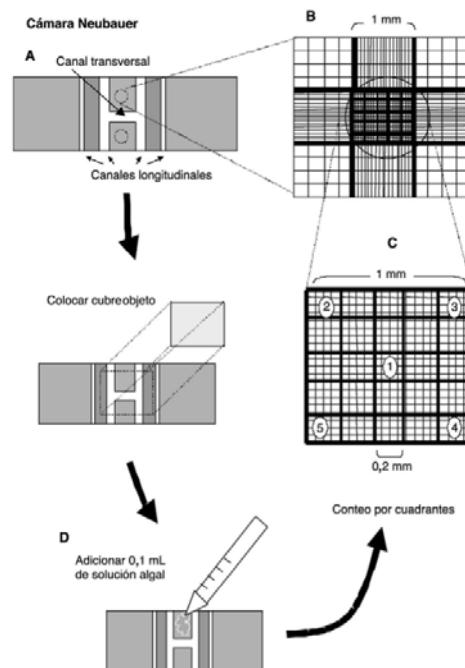
La técnica manual consiste en contar el número de glóbulos blancos por medio de la observación a través de un microscopio, utilizando un teclado conocido como contador hematológico para registrar el número de células contadas, y una placa rectangular de cristal conocida como cámara de Neubauer (Ver Figura 10), donde se esparce la sangre en dos pequeñas depresiones ubicadas en el sector de la mitad de la placa de cristal, que luego es cubierta con un cubrecámara; que se adhiere por tensión superficial a la cámara de Neubauer. [14]

Esta cámara tiene líneas rectas rayadas con punta de diamante sobre la placa en los lugares donde se esparce la sangre, definidas con un espacio entre ellas determinado con longitud conocida y con un número determinado de cuadrantes definidos por estas líneas, son dos las zonas donde se esparce la sangre, todo este dispositivo se conoce de forma común como hemocitómetro; este diseño se especifica con el fin de establecer una área con un tamaño conocido utilizada para determinar la concentración de células contadas por unidad de volumen en la muestra.

Luego de haber contado cuantas células se observan en los cuadrantes; por medio de cálculos matemáticos se define la concentración de estas células en la sangre, y se procede a efectuar el diagnóstico correspondiente. [14]

La técnica manual, requiere de un tiempo considerable debido a la preparación del equipo, la muestra, y el proceso de conteo realizado por el profesional, además de cierto nivel de esfuerzo físico. Estas condiciones impulsaron la búsqueda de otra forma de realizar el conteo de células sanguíneas y su posible automatización.

Figura 10: Conteo celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer



Fuente: Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum*.

Disponible en: http://www.idrc.ca/fr/ev-84467-201-1-DO_TOPIC.html

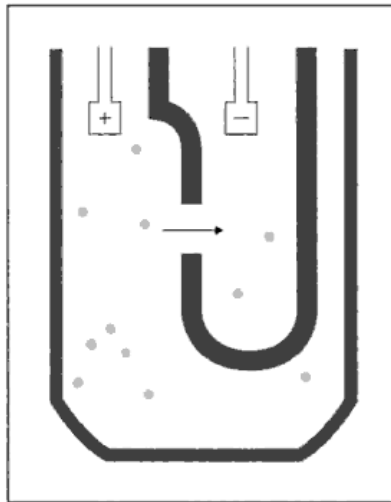
3.2.2 TÉCNICA DE IMPEDANCIA

La técnica de impedancia eléctrica se basa en la detección de los cambios de la resistencia eléctrica producidos por una partícula suspendida en un diluyente conductor a su paso por una abertura de dimensiones conocidas. (Ver Figura 11) Para crear la corriente eléctrica se sumergen dos electrodos en el líquido, uno a cada lado de la abertura. [15]

A medida que cada partícula pasa por la abertura, se produce un cambio en la resistencia entre los electrodos. Este cambio genera un impulso eléctrico mensurable. El número de impulsos se corresponde con el número de partículas que atraviesan la abertura. La amplitud de cada impulso resulta, en esencia, proporcional al volumen de la partícula. Cada impulso es amplificado y comparado con los canales de voltaje internos de referencia.

Los discriminadores de tamaño calibrados, que rodean a estos, sólo dejan pasar los impulsos con una determinada amplitud. Por tanto, los impulsos se distribuyen hacia los distintos canales según su amplitud, de esta manera es posible caracterizar las células en sus diferentes tipos y contarlas. [15]

Figura 11: Esquema del recuento celular en los equipos basados en el método de la resistencia eléctrica (Impedancia).



Fuente: VIVES CORRONS, Joan Lluís. AGUILAR BASCOMPTE, Josep Lluín. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3era ed. Barcelona: Masson, 2006. 99 p.

3.2.3 TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La técnica por citometría consiste en un proceso de recuento y medición de las propiedades de las células o partículas que se transportan por medio de un flujo a través de una zona de detección. Este flujo enfocado alinea las células, u otras partículas biológicas, en una única fila para atravesar el centro de la zona de detección. Las características físicas o químicas de las células o partículas se miden en la zona de detección. Cuando el proceso de medición es totalmente automático, los componentes básicos que hacen posible la citometría de flujo incluyen:

- Un sistema automático de muestreo y preparación.
- Una zona de detección.
- Componentes para la recogida, procesamiento y almacenamiento de los datos.

- Componentes para el análisis y visualización de los datos.

Las dos técnicas de citometría de flujo que existen para medir los parámetros hematológicos son:

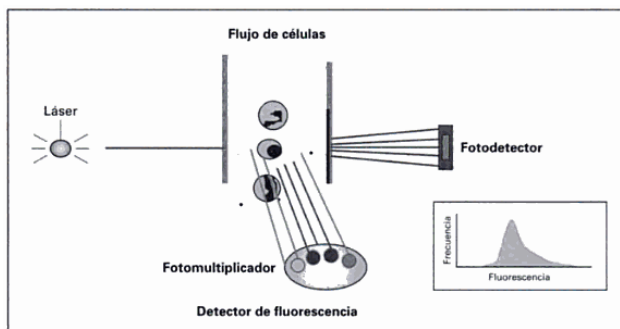
- La técnica de medición por dispersión o fluorescencia óptica se utiliza para analizar WBC (Conteo de células blancas), NRBC (Conteo de células rojas nucleadas), RETC (Conteo de reticulitos o células rojas inmaduras) y plaquetas en las muestras.
- La Tecnología de la impedancia eléctrica se utiliza para realizar un recuento y tipificar por tamaño los eritrocitos y las plaquetas (también se puede utilizar durante el recuento de plaquetas como control de calidad del recuento de plaquetas óptico).

Las mediciones por dispersión óptica/fluorescencia tienen lugar en el conjunto óptico, que consiste en los tres subsistemas principales siguientes:

- Sistema de iluminación
- Sistema de la celda de flujo óptica
- Sistema de recogida/detección

Resumiendo este proceso, las células son diluidas en unas proporciones determinadas [15], cada una de estas diluciones se inyecta mediante un flujo a un canal que es impactado por un láser progresivamente, la dispersión de la luz del láser es medida en una celda. Ésta ocurre a medida que diferentes cuerpos en la solución van avanzando, en este caso, cada tipo de célula. De esta manera existe una celda, que se encarga de medir y filtrar esta dispersión para cuantificarla y dependiendo del grado de dispersión que se registre, se puede identificar qué tipo de célula es; por medio del sistema de detección, que luego envía sus análisis al usuario en forma de un informe organizado [16].

Figura 12: Esquema de un citofluorómetro



Fuente: VIVES CORRONS, Joan Lluís. AGUILAR BASCOMPTE, Josep Lluín. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3era ed. Barcelona: Masson, 2006. 103 p.

3.2.4 TÉCNICA DE TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Esta técnica se basa en el reconocimiento de células como glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas por medio del análisis computarizado de las imágenes que proporciona el microscopio, este análisis es realizado a partir de extensiones sanguíneas que se colocan al microscopio el cual se mueve de forma controlada por un computador. El análisis de la extensión se realiza con un sistema automático de rastreo similar al empleado de forma manual pero más rápida, de esta manera la muestra se desplaza de forma automática y es así como se recorre toda la superficie de la extensión hasta que se analice un número determinado de células previamente fijadas por el operador. Cuando se localiza una célula entonces se detiene el microscopio y la imagen óptica es captada por una cámara para digitalizarla en el computador en donde se comparan las características morfológicas de dicha célula con las que han sido previamente programadas para distintos tipos de células, de esta manera se analiza el tamaño celular, el contorno nuclear, la coloración y cuando las características morfológicas de la célula observada se ajustan a alguna de las programadas, entonces el sistema la identificará, en caso contrario el sistema la clasificará como desconocida. [17]

En el momento de realizar el tratamiento de imágenes sobre una muestra sanguínea se debe considerar un factor muy importante como lo es la adquisición de la imagen.

En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas de adquisición para imágenes microscópicas, dando origen a un campo de la fotografía considerado como microfotografía digital. Así como se han desarrollado microscopios electrónicos que permiten digitalizar la imagen directamente al computador por una interfaz USB; diversas cámaras y soportes se han desarrollado para esta tarea, permitiendo construir una nueva área del estudio de factores microscópicos considerado como microscopía virtual.

Hoy en día se busca optimizar el proceso de análisis de imágenes microscópicas partiendo desde su adquisición, buscando brindar la mayor cantidad de información en la imagen buscando la captación de todas las señales posibles referentes a las muestras, para que el procesamiento de las imágenes sea más efectivo. [18]

3.3 TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Desde sus inicios el procesamiento digital de imágenes ha sido utilizado en gran cantidad de disciplinas científicas, con diferente grado de éxito, y gracias a la disminución en el costo de los dispositivos para adquirir información gráfica y al aumento en la capacidad de los equipos de cómputo se puede afirmar que su crecimiento será mayor [19]

En el caso de la medicina que es el campo de estudio específico del proyecto se observa que los proyectos informatizados realizan el contraste o codifican los niveles de intensidad en colores para facilitar la interpretación de las imágenes de los rayos X y de otras imágenes biomédicas. [20]

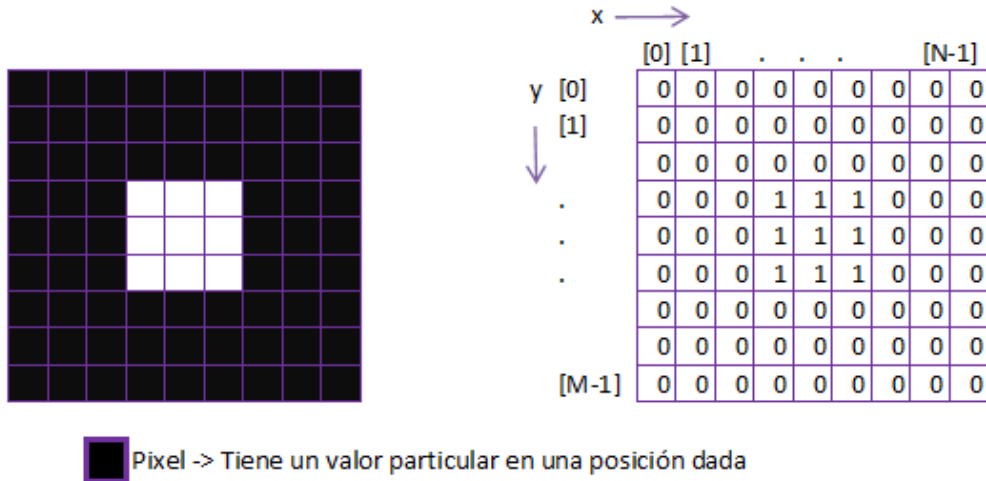
En la búsqueda que la terminología y las técnicas que se van a usar, queden de una forma bien estructurada se presenta paso a paso cada una de ellas, comenzando algunas definiciones de suma importancia para la buena interpretación del proyecto.

3.3.1 REPRESENTACION DIGITAL DE IMAGENES

El término imagen se refiere a una función bidimensional de intensidad de luz $f(x,y)$, donde x e y representan las coordenadas espaciales y el valor de f en un punto cualquiera (x,y) es proporcional al brillo (o nivel de gris) de una imagen en ese punto.

En cuanto a la imagen digital es una imagen $f(x,y)$ que se ha discretizado tanto en coordenadas espaciales como en el brillo. Una imagen digital puede considerarse como una matriz cuyos índices de fila y columna identifican un punto de la imagen y el valor correspondiente elemento de la matriz indica el nivel de gris en ese punto. Los elementos de una distribución digital de este tipo se denominan elementos de la imagen, o más comúnmente píxeles o pels. [20]

Figura 13: Representación matricial de una imagen, donde los pixeles negros son representados por ceros y los blancos por uno.

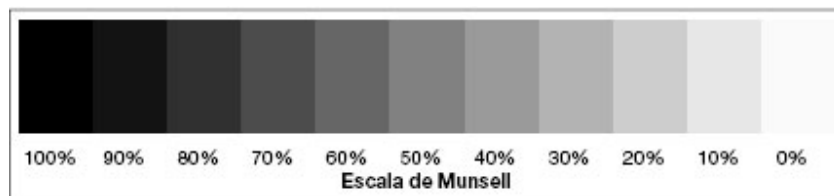


3.3.2 CONVERSIÓN A ESCALA DE GRISES

El blanco, el negro y el gris son colores acromáticos, es decir, colores sin color. Psicológicamente son colores dado que originan en el observador determinadas sensaciones y reacciones. Desde el punto de vista físico, la luz blanca no es un color, sino la suma de todos los colores, respecto al pigmento el blanco sería considerado un color primario, ya que no puede obtenerse a partir de ninguna mezcla.

El color negro, por el contrario, es la ausencia absoluta de la luz. Y en cuanto color sería considerado un secundario, ya que es posible obtenerlo a partir de la mezcla de otros. Las escalas pueden ser cromáticas o acromáticas

Figura 14: Escalas cromáticas y acromáticas

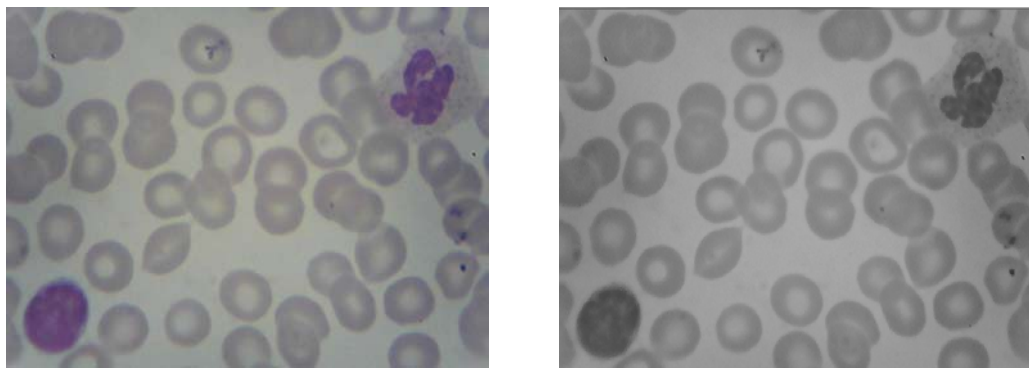


Fuente: <http://www.fotonostra.com/grafico/escalascolores.htm>

Cromática: Los valores del tono se obtienen mezclando los colores puros con el blanco o el negro, por lo que pueden perder fuerza cromática o luminosidad.

Acromática: Será siempre una escala de grises, una modulación continua del blanco al negro. La escala de grises se utiliza para establecer comparativamente tanto el valor de la luminosidad de los colores puros como el grado de claridad de las correspondientes gradaciones de este color puro. Por la comparación con la escala de grises (escala test), se pone de relieve las diferentes posiciones que alcanzan los diferentes colores puros en materia de luminosidad.

Figura 15: Imagen que se ha transformado en escala de grises



(a) Imagen original

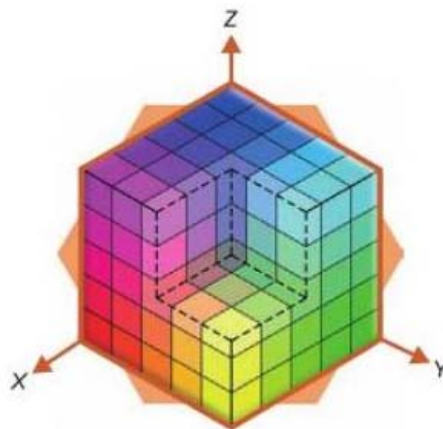
(b) Imagen en escala de grises

3.3.3 MODELOS DE COLOR

Los modelos de color facilitan la especificación de los colores de una forma normalizada. En esencia, un modelo de color es la especificación de un sistema de coordenadas tridimensional y de un sub espacio de un sistema en el que cada color puede ser representado por un único punto. [20]

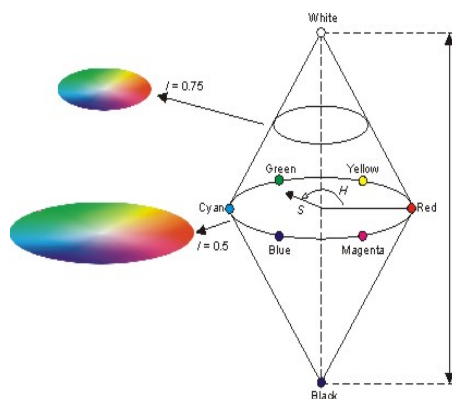
Los modelos orientados hacia el hardware utilizados habitualmente en la práctica son RGB (Dado por sus iniciales rojo, verde y azul – Ver Figura 15) para monitores en color y cámaras de video, el CMY (cían, magenta y amarillo) para impresoras en color y el YIQ, que es el estándar de las emisiones de televisión a color, donde la Y corresponde a la luminancia, la I y la Q son dos componentes cromáticas denominadas fase y cuadratura.[21] Los modelos HSL (Ver Figura 16) y HSV Manipulación de Imágenes a color [22]

Figura 16: Imagen modelo RGB (Rojo – Verde – Azul)



Fuente: MORO VALLINA, Miguel. Tratamiento informático de la información: Metodología dual para software libre y software propietario. 1era ed. Madrid: Ediciones Paraninfo, 2010. 297 p.

Figura 17: Modelo HSL (Matriz - Saturación – Luminosidad)

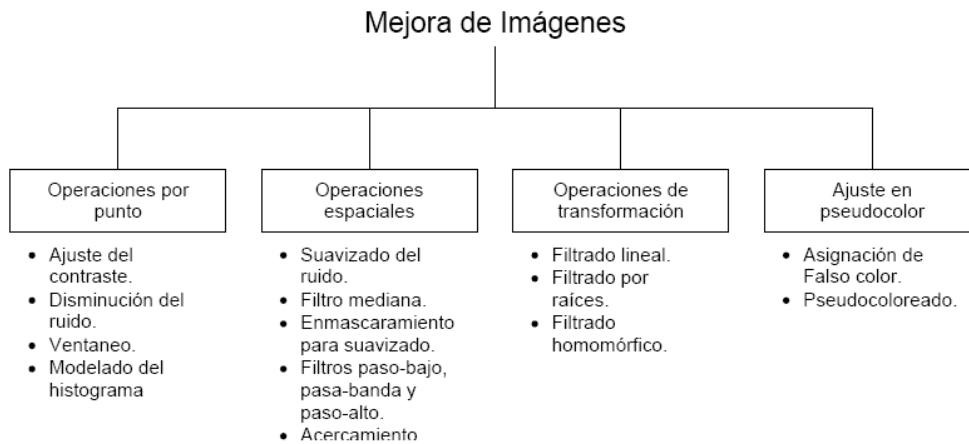


Fuente: Black ice – HSI Color Space. Disponible en: <http://www.blackice.com/colorspaceHSI.htm>

3.3.4 MEJORA DE UNA IMAGEN

Para realizar una mejora a la imagen se presentan una serie de métodos que están basadas en técnicas, bien sea en el dominio espacial o en el dominio de la frecuencia. El propósito de esta sección es desarrollar sus ideas básicas y relacionarlas con ambas aproximaciones. [23]

Figura 18: Mejora de imágenes



Fuente: JAIN, Anil K. Fundamentals of Image Processing. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1989. Pag 233

3.3.4.1 MEJORAS POR OPERACIONES POR PUNTO

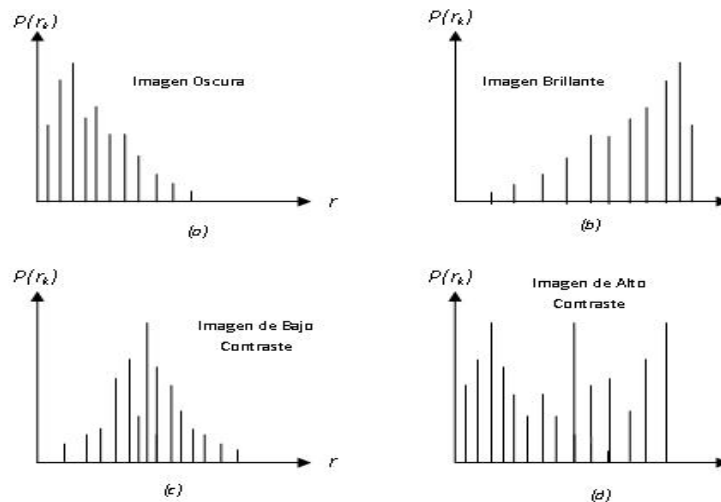
Estos tipos de filtro son dados por un nivel de gris que poseen las imágenes, que se definen por algunos intervalos que cambian de nivel de gris, de acuerdo a las transformaciones de gris.

Dentro de algunas de las transformaciones las más nombradas son *el fraccionamiento del nivel de gris* donde se destaca un rango específico del nivel de gris de una imagen. Entre las aplicaciones se encuentran la mejora de rangos como las masas de agua de las imágenes de satélite. Otra de las aplicaciones que se nombra es *el fraccionamiento de los planos de bits*.

3.3.4.1.1 ECUALIZADOR DE HISTOGRAMAS

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 $[0; L-1]$; la distribución del histograma permite la distinción entre los cuatro tipos básicos de imágenes según la región en el que se concentren los niveles de gris. [23]

Figura 19: Histogramas de 4 tipos de imágenes; según el sesgo presente en cada uno se hace su distinción; los valores en el origen corresponden al negro y los valores en 255 corresponden al blanco



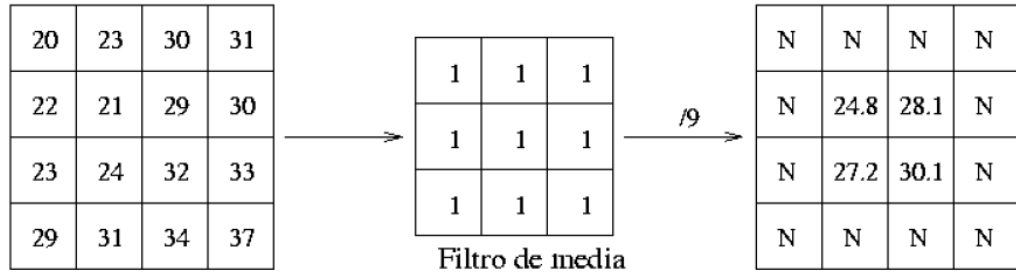
Fuente: GONZÁLEZ, Rafael c. WOODS, Richard E. Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996.

3.3.4.2 MEJORAS POR OPERACIONES ESPACIALES

Filtro suavizante: se emplea para reducir el ruido. Es útil la eliminación de los pequeños detalles de una imagen antes de la extracción de un objeto, el llenado de pequeños espacios de líneas o curvas. La reducción del ruido puede realizarse mediante el aumento de la “borrosidad” con un filtro lineal o también con un filtro no lineal [24].

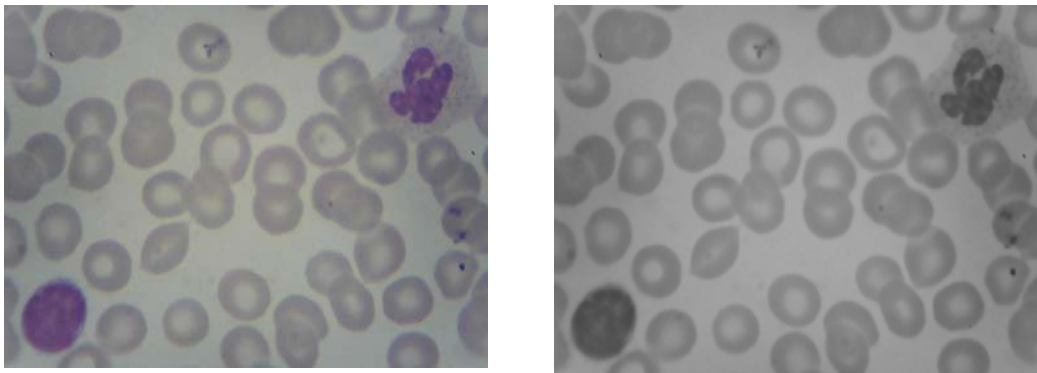
Método de la mediana: tiene la ventaja de que el valor final del pixel es un valor real presente en la imagen y no un promedio, de este modo se reduce el efecto borroso que tienen las imágenes que han sufrido un filtro de media. Además el filtro de la mediana es menos sensible a valores externos. El inconveniente es que resulta más complejo de calcular ya que hay que ordenar los diferentes valores que aparecen en los pixeles incluidos en la ventana y determinar cuál es el valor central.

Figura 20: Método de la mediana



Fuente: Técnicas de filtrado. Disponible en: <http://www.um.es/geograf/sigmur/teledet/tema06.pdf>

Figura 21: Imagen que ha sido suavizada utilizando el método de la Mediana



(a) Imagen original

(b) Imagen suavizada

Filtros paso alto y paso bajo: Son utilizados para atenuar o eliminar las componentes de altas frecuencias del dominio de Fourier, a la vez que dejan inalteradas las bajas frecuencias. Las componentes de alta frecuencia están directamente relacionadas con bordes y los detalles muy marcados de la imagen, por ello el resultado de estos filtros, denominados *paso bajo*, es hacer más borrosa la imagen. De otra forma, los filtros *pasa alto* atenúan o eliminan las componentes de baja frecuencia, responsables de las características menos variables en la imagen, de esta manera se agudizan los bordes y los detalles finos [25].

Figura 22: Imagen a la cual se le ha aplicado filtros, paso bajo y paso alto matriz diagonal.



Fuente: MATLAB R2009b versión 7.9.0.529

3.3.5 SEGMENTACION

La segmentación es uno de los primeros pasos para el análisis de las imágenes, además se caracteriza por que subdivide una imagen en sus partes constituyentes u objetos. El nivel al que se lleva a cabo esta subdivisión depende del problema a resolver. La segmentación deberá detenerse cuando los objetos de interés de una aplicación hayan sido aislados.

Los algoritmos de segmentación pueden basarse en la discontinuidad o en la similitud de los píxeles; en el primer caso, las principales áreas de interés son la detección de puntos aislados y la detección de bordes y líneas, en el segundo es usual utilizar los algoritmos como la umbralización o aquellos orientados a regiones (crecimiento o división y fusión), dado que agrupan los píxeles de acuerdo con propiedades semejantes. [26]

3.3.5.1 UMBRALIZACION

Es uno de los métodos más importantes de la segmentación de imágenes. Ya que tiene bajo consumo de computación. Se basa en la suposición que los objetos producen regiones con niveles de luminosidad semejantes y al ser representados en un histograma mostrarán las modas dominantes separadas por un nuevo nivel denominado umbral. La determinación del valor umbral U está dada por la función:

$$U=T [x, y, f(x, y), p(x, y)] \quad (3.1)$$

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:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 \dots \text{si} \dots f(x, y) > T \\ 0 \dots \text{si} \dots f(x, y) \leq T \end{cases} \quad (3.2)$$

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

3.3.5.2 SEGMENTACIÓN ORIENTADA A LAS REGIONES

A diferencia de la umbralización éstas técnicas están basadas en encontrar directamente las regiones.

3.3.5.2.1 CRECIMIENTO DE REGIONES

Se encarga de agrupar pixeles 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 problemas:

- La selección de los generadores iniciales
- La selección de las propiedades adecuadas para la inclusión de puntos
- Formulación de la regla de parada

3.3.5.2.1.1 DIVISIÓN Y FUSIÓN DE REGIONES

Consiste en subdividir la imagen inicialmente en un conjunto de regiones arbitrarias y después fusionar o dividir dichas regiones. [26]

4. MODELO COMPUTACIONAL

El desarrollo del algoritmo está fundamentado en el tratamiento digital de imágenes y la metodología de desarrollo evolutiva, por lo cual se presentan los siguientes casos de uso, ya que es allí, donde se explica la interacción del usuario con el algoritmo.

4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS DE USO

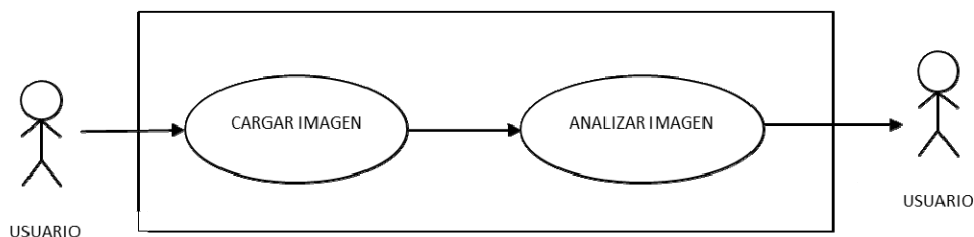
Tabla 1. Caso de Uso: Cargar Imagen

Caso de Uso	Cargar imagen	
Actor	Usuario	
Propósito	Permite al usuario posibilidad de elegir la imagen que desea analizar.	
Descripción	Al dar clic en el botón “Abrir imagen”, el usuario podrá elegir de un banco de imágenes, la que desee analizar, ya que de no ser así el sistema arrojará un mensaje de alerta, indicando que no se cargó ninguna imagen o que la imagen ya ha sido analizada.	
Precondiciones	El usuario debe ejecutar el algoritmo.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	<ol style="list-style-type: none"> 1. El caso de uso inicia cuando el usuario desea seleccionar una imagen y se dirige al botón “Abrir Imagen”. 3. El usuario selecciona una de las imágenes presentadas por el sistema y oprime la opción “Aceptar”. 	<ol style="list-style-type: none"> 2. El sistema le presenta el directorio donde se encuentra el banco de imágenes. 4. El sistema carga la imagen en el espacio respectivo y habilita el botón “Analizar”.
Sub-flujos	Línea 4: No se cargó ninguna imagen. Indica alerta. Retorno al paso 3.	
Poscondición	El usuario ha cargado la imagen seleccionada.	

Tabla 2. Caso de Uso: Analizar Imagen

Caso de Uso	Analizar imagen	
Actor	Usuario	
Propósito	Indica donde están localizados los glóbulos blancos dentro de la imagen original.	
Descripción	Después de cargar la imagen, el usuario oprime el botón "Analizar" y el sistema procederá a dibujar el núcleo de los glóbulos blancos y a superponerla con la imagen original, que es la imagen final presentada al usuario.	
Precondición	Haber seleccionado y cargado una imagen.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	1. Este caso de uso empieza cuando el usuario oprime el botón "Analizar".	2. El sistema presenta una imagen con el núcleo delimitado que significa la existencia de glóbulos blancos en ella.
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición	La imagen seleccionada cuenta ahora con los glóbulos blancos existentes resaltados.	

Figura 23: Diagrama de casos de uso modelo actual



4.2 PROPUESTA DE TRABAJO FUTURO

Como ya se ha mencionado anteriormente, el resultado de este proyecto es la primera etapa de un software que servirá de apoyo para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, pero el modelo computacional que a continuación se presenta, es un diseño preliminar de dicho software y no implica la implementación del modelo completo, ya que el objetivo de este proyecto es únicamente desarrollar la fase de la detección de glóbulos blancos. El propósito de modelar el software final es el de dar una base a las demás etapas del desarrollo del mismo.

4.2.1 Descripción de los casos de uso

Tabla 3. Caso de Uso: Seleccionar paciente

Caso de Uso	Seleccionar paciente	
Actor	Especialista	
Propósito	Permite al usuario cargar las imágenes del paciente que desea estudiar.	
Descripción	El usuario escoge un paciente previamente registrado en el sistema con su respectivo banco de imágenes y carga el mismo al sistema.	
Precondiciones	El usuario debe ingresar previamente al sistema. El paciente que se desea estudiar debe estar registrado en el sistema con sus respectivas imágenes.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	<ol style="list-style-type: none"> 1. El caso de uso inicia cuando el usuario desea seleccionar un paciente para su posterior análisis. 2. El usuario ingresa al sistema con su identificación y busca la lista de pacientes registrados en el mismo. 4. El usuario procede a seleccionar el paciente a estudiar y carga el banco de imágenes. 6. El usuario confirma si es correcta o no la información recibida por el sistema. 	<ol style="list-style-type: none"> 3. El sistema presenta al usuario una lista de pacientes para su respectiva selección. 5. El sistema envía un mensaje de confirmación. 7. si es correcta la acción el sistema carga el banco de imágenes de ese paciente de lo contrario se repite la selección.
Sub-flujos	Línea 3: Identificación del usuario inválida. Indica error. Retorno al paso 2.	
Poscondición	El usuario ha cargado el banco de imágenes del paciente seleccionado.	

Tabla 4. Caso de Uso: Detectar glóbulos blancos

Caso de Uso	Detectar glóbulos blancos
Actor	Especialista
Propósito	Indica donde están localizados los glóbulos blancos dentro de las imágenes originales.
Descripción	Después de cargar el banco de imágenes, el usuario procede a utilizar la opción analizar donde están contenidas las etapas del análisis, entre ellas detectar glóbulos blancos, caracterización y conteo de los mismos. Si el usuario elige la opción detectar, el

	sistema procede a dibujar el núcleo de los glóbulos blancos y a superponerla con la imagen original, que es la imagen final presentada al usuario.	
Precondición	Haber seleccionado y cargado el banco de imágenes del paciente.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	<p>1. Este caso de uso empieza cuando el usuario elije la opción analizar</p> <p>3. El usuario selecciona la opción Detectar glóbulos blancos.</p>	<p>2. El sistema le presenta tres opciones contenidas en el analizar al usuario, las cuales son: Detectar glóbulos blancos, caracterizar glóbulos blancos y realizar conteo de glóbulos blancos.</p> <p>4. El sistema presenta una imagen con el núcleo delimitado que significa la existencia de glóbulos blancos en ella.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición	La imagen seleccionada cuenta ahora con los glóbulos blancos existentes resaltados.	

Tabla 5. Caso de Uso: Caracterizar glóbulos blancos.

Caso de Uso	Caracterizar glóbulos blancos.	
Actor	Especialista	
Propósito	Permite la clasificación de los glóbulos blancos y a su vez determina si estos se encuentra sanos o no.	
Descripción	Si el usuario elige la opción Caracterizar glóbulos blancos el sistema presenta nuevamente la imagen con los glóbulos blancos resaltados junto con una tabla donde se especifica la clasificación y el estado en el que estado en el que se encuentra el glóbulo (sano o enfermo).	
Precondición	Que se halla elegido anteriormente la opción Detectar glóbulos blancos.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	<p>1. Este caso de uso empieza cuando el usuario selecciona la opción Caracterizar glóbulos blancos.</p>	<p>2. El sistema muestra la imagen nuevamente y a su vez una tabla con los resultados de la clase a la que pertenecen, así como su estado actual.</p>
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición	El usuario visualiza una imagen con los núcleos resaltados junto con una tabla de clasificación y estado de los glóbulos.	

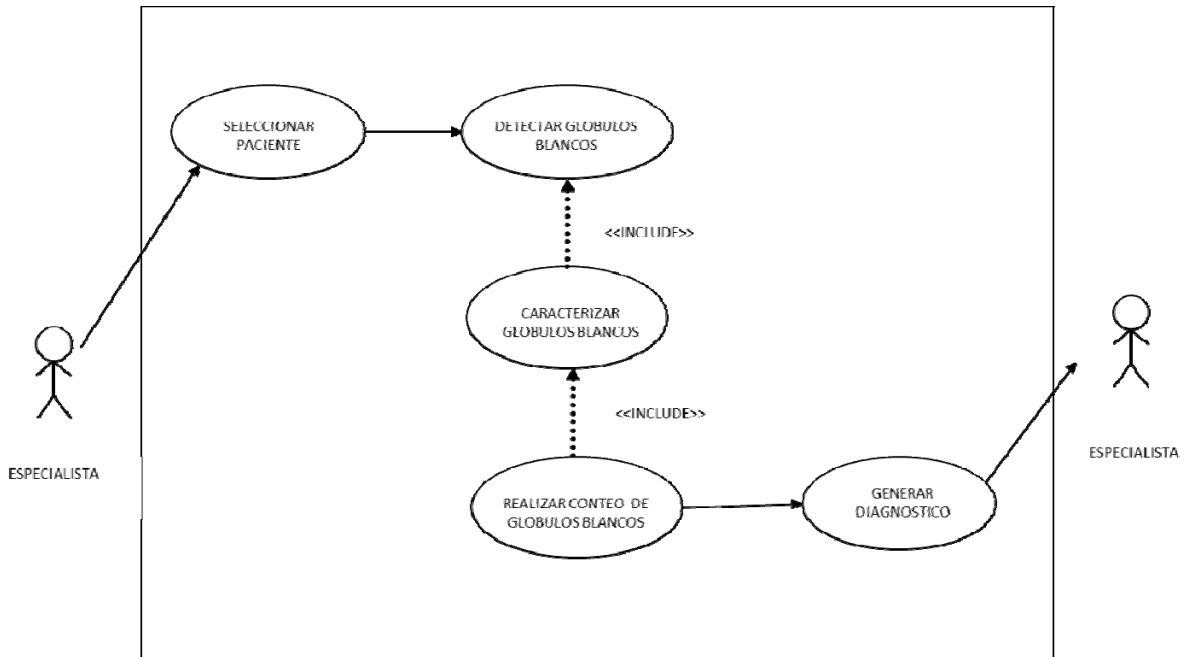
Tabla 6. Caso de Uso: Realizar conteo de glóbulos blancos.

Caso de Uso	Realizar conteo de glóbulos blancos	
Actor	Especialista	
Propósito	Establece el número de glóbulos que presenta la imagen	
Descripción	Si el usuario elige la opción Realizar conteo de glóbulos blancos el sistema presenta las etapas del análisis explicadas anteriormente adicionando el número de glóbulos blancos que posee la imagen con su respectiva etiqueta.	
Precondición	Haber realizado las labores de Detección y Caracterización de glóbulos blancos.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	1. Este caso de uso empieza cuando el usuario selecciona la opción Realizar conteo de glóbulos blancos.	2. El sistema adiciona en la tabla, el número de glóbulos blancos identificados en la imagen y los etiqueta.
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición	Se tiene una imagen con los glóbulos blancos detectados y etiquetados, adicionalmente una tabla con la caracterización y el número de glóbulos blancos.	

Tabla 7. Caso de Uso: Generar diagnóstico.

Caso de Uso	Generar diagnóstico.	
Actor	Especialista	
Propósito	Mostrar el balance obtenido del análisis de los glóbulos blancos del paciente y posteriormente un diagnóstico.	
Descripción	El usuario selecciona la opción Generar diagnóstico, el sistema le suministra un balance del banco de imágenes del paciente a manera de resultado con todos los datos obtenidos: número de glóbulos blancos, tipos y estados; adicionalmente arroja un diagnostico preliminar al usuario.	
Precondición	Haber realizado la fase completa de análisis con el banco de imágenes del paciente.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuestas del Sistema
	1. Este caso de uso empieza cuando el usuario selecciona generar diagnóstico. 3. Si el usuario desea Guardar el diagnóstico, seleccionará la opción guardar diagnostico o por el contrario la descartará.	2. El sistema le presenta el balance general del banco de imágenes y un diagnostico preliminar. Adicionalmente le presenta las opciones de guardar diagnóstico o descartar. 4. Si el usuario decide Guardar el diagnóstico, el sistema lo almacenará, o por el contrario la descartará.
Sub-flujos	Ninguno	
Poscondición	Se ha generado un diagnostico preliminar del paciente junto con un balance general de los glóbulos blancos del paciente.	

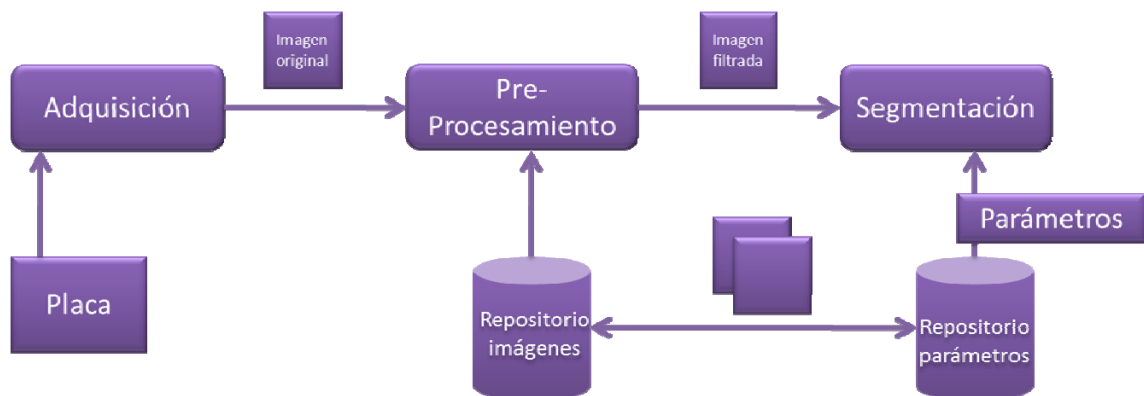
Figura 24: Diagrama de casos de uso modelo futuro



5. DESARROLLO COMPUTACIONAL

El desarrollo que aquí se muestra es el de la etapa de la detección de glóbulos blancos, modelado en el ítem 4. A continuación se ilustrarán y explicarán las diferentes etapas del algoritmo para detectar los glóbulos blancos. Este algoritmo fue desarrollado bajo el método evolutivo, usando el compilador Visual Studio Express 2010, utilizando el wrapper para lenguaje C# de la librería OpenCV, llamado EmguCV. El funcionamiento del algoritmo desarrollado se encuentra en la sección de Anexos. (Ir a pág 68)

Figura 25: Diagrama de las etapas de detección



- **Placa:** Se realiza un extendido de sangre periférico para ubicar bajo el microscopio y tomar las fotos respectivas que se cargarán al algoritmo para su análisis. Más detalles de este proceso se encuentran en el ítem 5.1 Adquisición.
- **Adquisición:** La adquisición consiste en la toma de imágenes estandarizadas para garantizar el funcionamiento correcto del algoritmo. Más detalles de las imágenes y del equipo utilizado para este proceso se encuentran en el ítem 5.1 Adquisición.
- **Pre-procesamiento:** El ingreso a este proceso es la imagen obtenida después de realizar la adquisición. A esta imagen (original), que se obtiene

de un repositorio, se le aplican ciertos filtros con el fin de eliminar ruidos e iniciar con el proceso de segmentación.

- **Segmentación:** El ingreso a este proceso es la imagen filtrada que después de aplicar ciertos parámetros, se detectan los glóbulos blancos.

5.1 ADQUISICIÓN

Inicialmente se obtuvieron unas imágenes de una página de imágenes médicas llamada www.imagenmed.com . Posteriormente se contó con la colaboración del MD. Ernesto Rueda Arenas, Oncólogo Pediatra, del Hospital Ramón González Valencia, con quien se realizó el extendido de sangre de una muestra, para estandarizar las imágenes con las que se trabajarían.

El extendido de sangre, es un procedimiento que consiste en los siguientes pasos:

1. Obtener una gota de sangre, que se extrae de una pinchadura en un dedo (Preferiblemente el “corazón”).
2. Se ubica la gota de sangre en el extremo de una placa de vidrio y se extiende la sangre hasta el otro extremo, utilizando otra placa.
3. Luego se procede a la tinción de la placa, para esto se debe utilizar el tinte requerido (En este caso, el tinte “Wright”) y se dejan pasar de 10 a 15 minutos para el correcto secado de la placa. Se obtiene el resultado mostrado a continuación:

Figura 26: Lámina de extendido



Después que ya se contara con el extendido de sangre, se procedió a la ubicación de la placa bajo el microscopio, en esta etapa se contó con el equipo adquirido por el Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB), que consiste en un microscopio UNICO G304 y una cámara para microscopios PREMIERE MA88.

Figura 27: Microscopio y cámara



(a) Microscopio



(b) Cámara

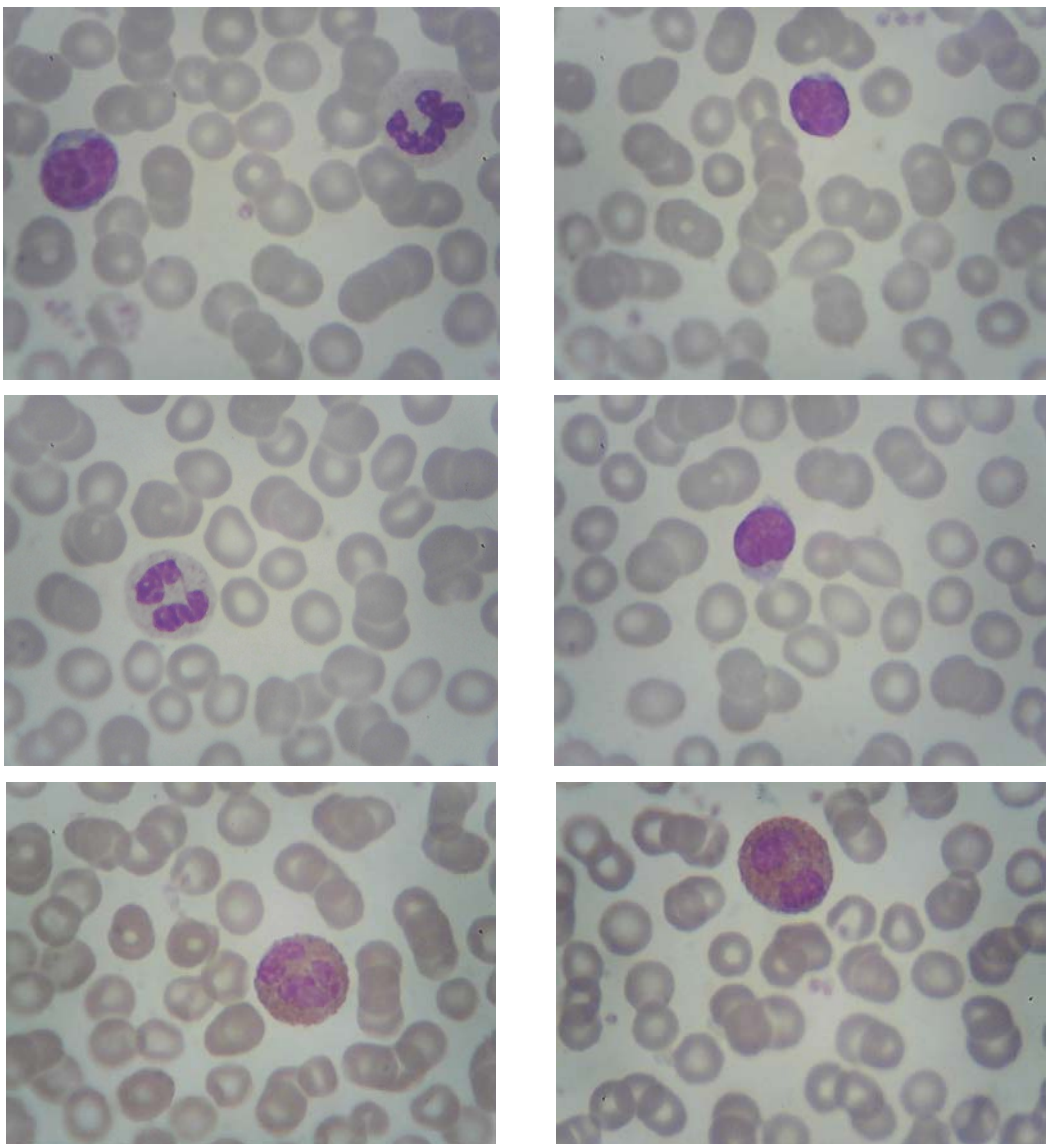
El montaje que se realizó consistió en ubicar la cámara en el espacio de uno de los oculares y finalmente ubicar la placa bajo uno de los lentes del microscopio así:

Figura 28: Montaje



Ya con este montaje, se procedió a la toma de fotos con la ayuda de un software que maneja la cámara. El recorrido de la placa se hizo de derecha a izquierda. Se tomaron 330 fotos, las cuales tienen una resolución de 640 x 480 pixeles, utilizando el lente del microscopio que brindaba un zoom de 100x. Dichas imágenes tienen un tamaño aproximado de 900 Kb c/u. A continuación se muestran algunas de las imágenes tomadas con las cuales se probó el algoritmo.

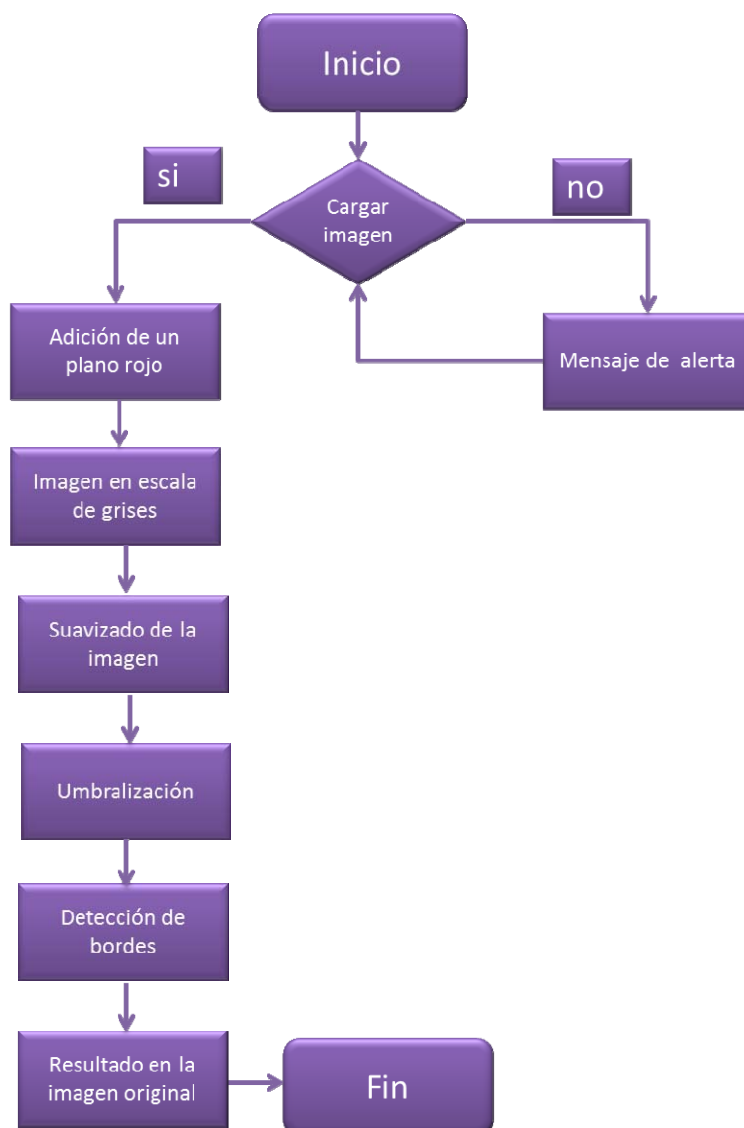
Figura 29: Imágenes observadas bajo el microscopio.



5.2 PRE-PROCESAMIENTO

En esta etapa del proyecto se realiza un mejoramiento a la imagen, eliminando ruidos con el fin de mejorar la precisión del algoritmo y evitar errores en la detección.

Figura 30: Diagrama de flujo del funcionamiento del algoritmo.



- **Cargar imagen:** Se selecciona la imagen que se va a analizar, de un banco de imágenes ubicadas en un directorio.

- **Adición de un plano rojo:** Se analizaron varios modelos de color y se concluyó que el que mejor se ajusta a las características de la imagen es el modelo RGB y más específicamente el plano rojo, que resalta los núcleos de los glóbulos blancos. Este resultado fue más favorable, que el arrojado por la ecualización del histograma.
- **Imagen en escala de grises:** Se convierte la imagen a escala de grises, con el fin de lograr una mejor precisión al ecualizar el histograma de la imagen y sus etapas posteriores.
- **Suavizar la imagen:** Se debe eliminar el ruido presente en la imagen para evitar que el algoritmo lo detecte como partes de los glóbulos blancos presentes en la imagen. Se seleccionó el filtro suavizante utilizando el método de la Mediana ya que arrojó los mejores resultados.

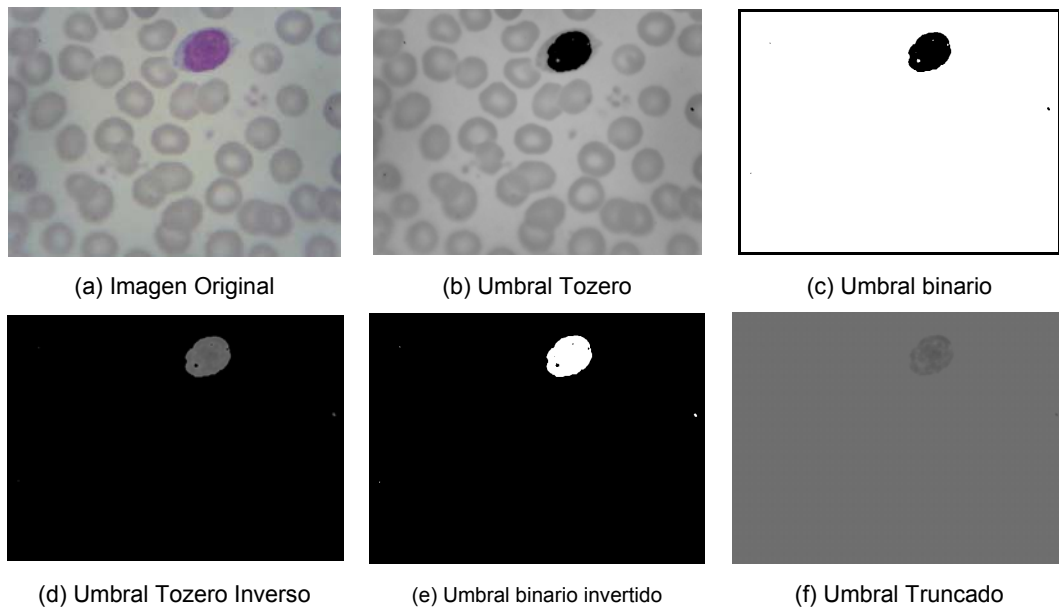
5.3 SEGMENTACIÓN

En esta etapa del proyecto se separan los componentes de la imagen. En este caso se segmenta el núcleo de los glóbulos blancos, ya que morfológicamente, estas células son las únicas que lo presentan y servirá para localizar las células. Para llegar a esta fase es necesario que se haya cumplido con los requerimientos mínimos de adquisición de imágenes y que se haya realizado correctamente el pre-procesamiento de las mismas.

5.3.1 UMBRALIZACIÓN

Existen diferentes técnicas para segmentar una imagen y éstas varían de acuerdo al propósito de la aplicación y el tipo de imágenes a procesar. En este caso se utilizó la segmentación basada en características, esto quiere decir que se asigna cada pixel a una región en función de características locales de la imagen en el pixel [27]. El mejor método de este tipo de segmentación es la Umbralización, que es el mejor método para separar el objeto del fondo, ya que convierte una imagen en escala de grises a una con dos niveles, del cual se eligió el método con Umbral Binario Invertido.

Figura 31: Clases de Umbralización ofrecidas por EmguCV



5.3.2 DETECCIÓN DE BORDES

Los filtros para detectar bordes buscan entre colores diferentes y así pueden detectar los contornos de los objetos. Para la realización de este proyecto se han probado distintos algoritmos para la detección de bordes, de los cuales cuatro se han tomado en cuenta para su posterior implementación y así elegir el más óptimo, teniendo en cuenta el tiempo de depuración y la calidad del resultado.

5.3.2.1 Algoritmo de Laplace

El filtro laplace se utiliza para mejorar la nitidez de la imagen por su capacidad de captar altas discontinuidades como resultado de aplicar la segunda derivada. Adicionalmente, detectar un borde es detectar el cruce por cero de la segunda derivada de la imagen.

Los filtros Laplacianos no son direccionales porque ellos resaltan rasgos lineales sin importar la dirección que tengan en la imagen. Estos filtros no consideran el gradiente mismo, sino los cambios del gradiente. En su forma más simple, pueden verse como el resultado de tomar la segunda derivada, ya que en una función 2D, $f(x,y)$ [28]:

$$\nabla^2 f(x,y) = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} \quad (6.1)$$

Lo que da como resultado:

$$\nabla^2 f(x, y) = f(x+1, y) + f(x-1, y) + f(x, y+1) + f(x, y-1) - 4f(x, y) \quad (6.2)$$

La máscara del filtro usada para la convolución es entonces:

$$L_1 = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (6.3)$$

Una ventaja de este detector de bordes es que los bordes detectados no dependen de la rotación de los mismos (a diferencia de otros como es el caso del detector de Sobel) y se usa una sola máscara para detectar todos los bordes. Las desventajas es que produce bordes dobles, es sensible al ruido (como cualquier derivada de segundo orden) y no es posible detectar la dirección del borde a partir de la imagen de resultado [28].

5.3.2.2 Algoritmo de Sobel

Se aplica sobre una imagen digital en escala de grises, calcula el gradiente de la intensidad de brillo de cada punto (píxel) dando la dirección del mayor incremento posible (de negro a blanco) además calcula el monto de cambio en esa dirección, es decir, devuelve un vector. El resultado muestra qué tan abruptamente o suavemente cambia una imagen en cada punto analizado, y a su vez que tanto un punto determinado representa un borde en la imagen y también la orientación a la que tiende ese borde. En la práctica, el cálculo de la magnitud, que da nociones de un borde, es más sencillo que la interpretación de la dirección [29].

Matemáticamente, el gradiente de una función de dos variables (para este caso la función de intensidad de la imagen) para cada punto es un vector bidimensional cuyos componentes están dados por las primeras derivadas de las direcciones verticales y horizontales. Para cada punto de la imagen, el gradiente del vector apunta en dirección del incremento máximo posible de intensidad, y la magnitud del gradiente del vector corresponde a la cantidad de cambio de intensidad en esa dirección. Lo anterior implica que el resultado de aplicar el operador sobel sobre la región de una imagen con intensidad de brillo constante es un vector cero, y el resultado de aplicarlo en un punto sobre un borde es un vector que apunta cruzando el borde (perpendicular) en sentido de los puntos más oscuros hacia los más claros.

El operador más común de detección de bordes en análisis de imágenes es el gradiente del nivel de gris [29]:

$$\nabla_g(x,y) = [Z_x, Z_y] = \left[\frac{\partial_g(x,y)}{\partial_x}, \frac{\partial_g(x,y)}{\partial_y} \right] \quad (6.5)$$

Para la definición de Z_x y Z_y , este algoritmo utiliza los coeficientes:

$$Z_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad Z_y = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \quad (6.6)$$

5.3.2.3 Gradiente Morfológico

El gradiente morfológico resulta del residuo de dos transformaciones α y β , esta diferencia se define como [30]:

$$\rho_{\alpha\beta}(X) = \alpha(X) - \beta(X) \quad (6.7)$$

Este gradiente es la diferencia entre una dilatación y una erosión de la imagen original. El gradiente por erosión es la diferencia entre el la imagen original y la erosión por un elemento estructurante Y , se define como [30]:

$$\rho_Y^-(f) = f - s_Y(f) \quad (6.8)$$

El gradiente por dilatación se define como la diferencia entre una dilatación por elemento estructurate Y y la imagen original:

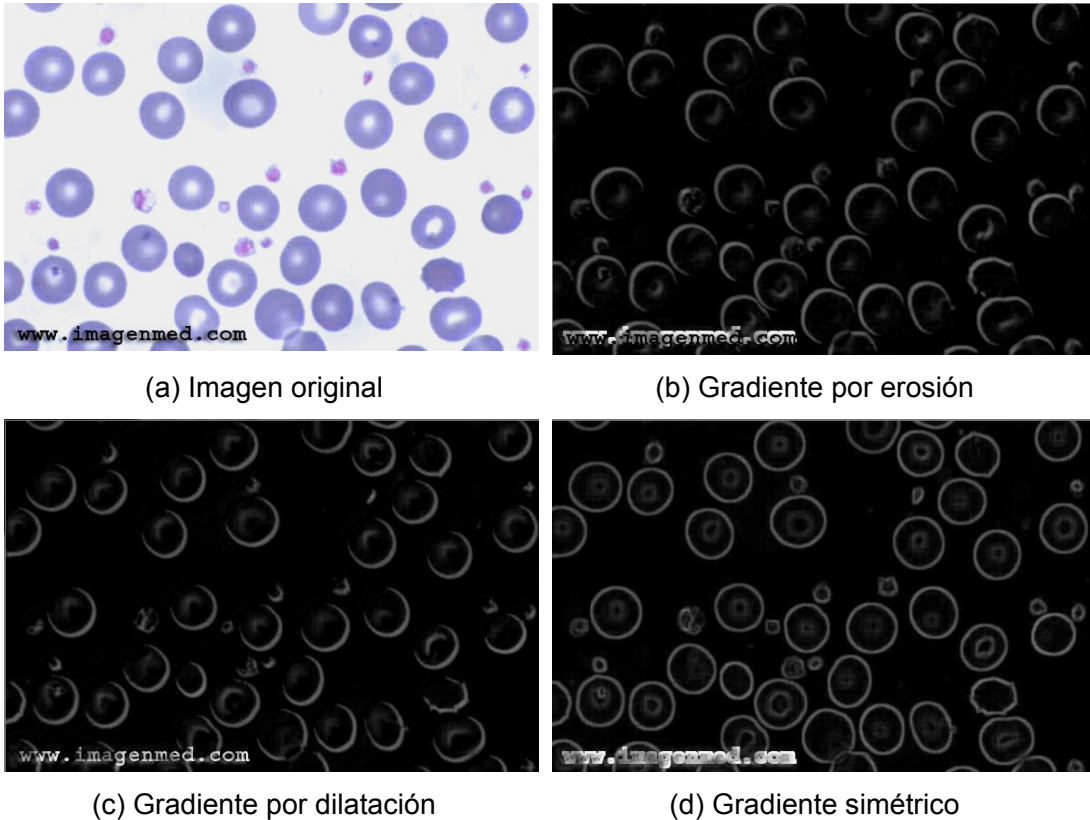
$$\rho_Y^+(X) = \delta_Y(f) - (f) \quad (6.9)$$

El gradiente simétrico se define como una diferencia entre la dilatación y la erosión de una imagen por un elemento estructurante Y :

$$\rho_Y(f) = \delta_Y(f) - s_Y(f) \quad (6.10)$$

El operador gradiente conforma y defina la imagen de partida del proceso de segmentación, de ahí la importancia de una elección correcta de elemento estructurante y de la variante de gradiente [30].

Figura 32: Tipos de filtros morfológicos



Fuente: <http://www.imagenmed.com/especiales/ie10/hem01.html#>

5.3.2.4 Algoritmo de Canny

Uno de los métodos relacionados con la detección de bordes es el uso de la primera derivada, la que es usada por que toma el valor de cero en todas las regiones donde no varía la intensidad y tiene un valor constante en toda la transición de intensidad. Por tanto un cambio de intensidad se manifiesta como un cambio brusco en la primera derivada, característica que es usada para detectar un borde, y en la que se basa el algoritmo de Canny [31].

El algoritmo de Canny consiste en tres grandes pasos:

- Obtención del gradiente: en este paso se calcula la magnitud y orientación del vector gradiente en cada píxel. Para cada píxel (i, j) en la imagen suavizada, se obtiene la magnitud y orientación del gradiente basándose en las siguientes expresiones:

El gradiente de una imagen $f(x,y)$ en un punto (x,y) se define como un vector

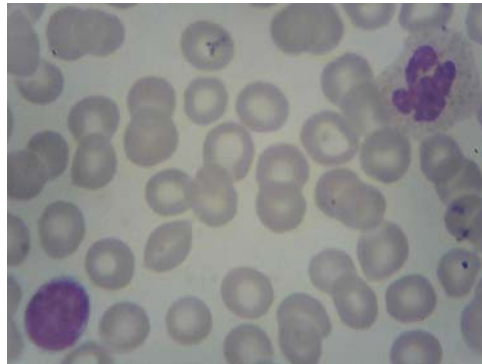
$$\mathbf{G}[f(x,y)] = \begin{bmatrix} G_x \\ G_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} f(x,y) \\ \frac{\partial}{\partial y} f(x,y) \end{bmatrix} \quad (6.11)$$

Siendo un vector perpendicular al borde, donde el vector G apunta en la dirección de variación máxima de f en el punto (x,y) por unidad de distancia, con la magnitud y dirección dadas por:

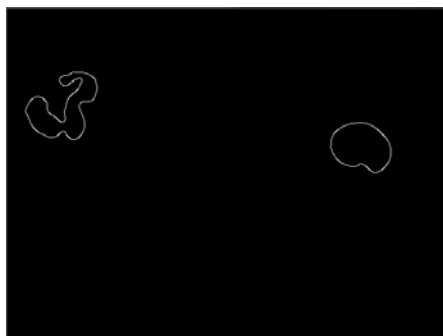
$$|G| = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} = |G_x| + |G_y|, \quad \theta(x,y) = \tan^{-1} \frac{G_y}{G_x} \quad (6.12)$$

- Supresión no máxima: en este paso se logra el adelgazamiento del ancho de los bordes, obtenidos con el gradiente, hasta lograr bordes de un píxel de ancho.
- Histéresis de umbral: en este paso se aplica una función de histéresis basada en dos umbrales; con este proceso se pretende reducir la posibilidad de aparición de contornos falsos [31].

Figura 33: Tipos de detección de bordes



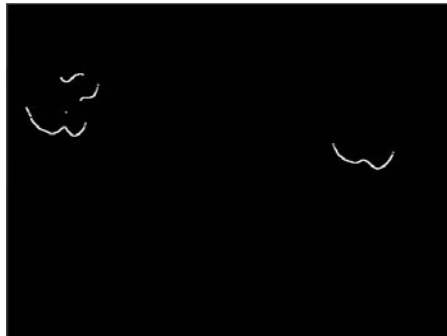
(a) Imagen original



(b) Canny



(c) Gradiente morfológico



(d) Sobel



(e) Laplace

Después de observar los resultados y el tiempo de depuración de cada algoritmo, se seleccionó el algoritmo de Canny, ya que fue el que mejor se ajustó a las necesidades y requerimientos del proyecto, así:

- **Canny:** Se ajustó perfectamente al algoritmo presentando un buen delineado del borde de los núcleos de los glóbulos blancos. Su tiempo en promedio fue de 9.6642 microsegundos.
- **Gradiente Morfológico:** En este caso el algoritmo presentó una buena detección del contornos de los núcleos, pero ya que utiliza los procesos de dilatación y erosión su tiempo de ejecución es mucho mayor: 15.9367 microsegundos.
- **Sobel:** El algoritmo presentó deficiencias continuas durante el proceso de detección aunque el tiempo de detección haya sido el menor: 6.20304 microsegundos.
- **Laplace:** Este algoritmo presentó una mayor sensibilidad al ruido la cual causa errores en la detección, su tiempo de ejecución fue de 9.01159 microsegundos.

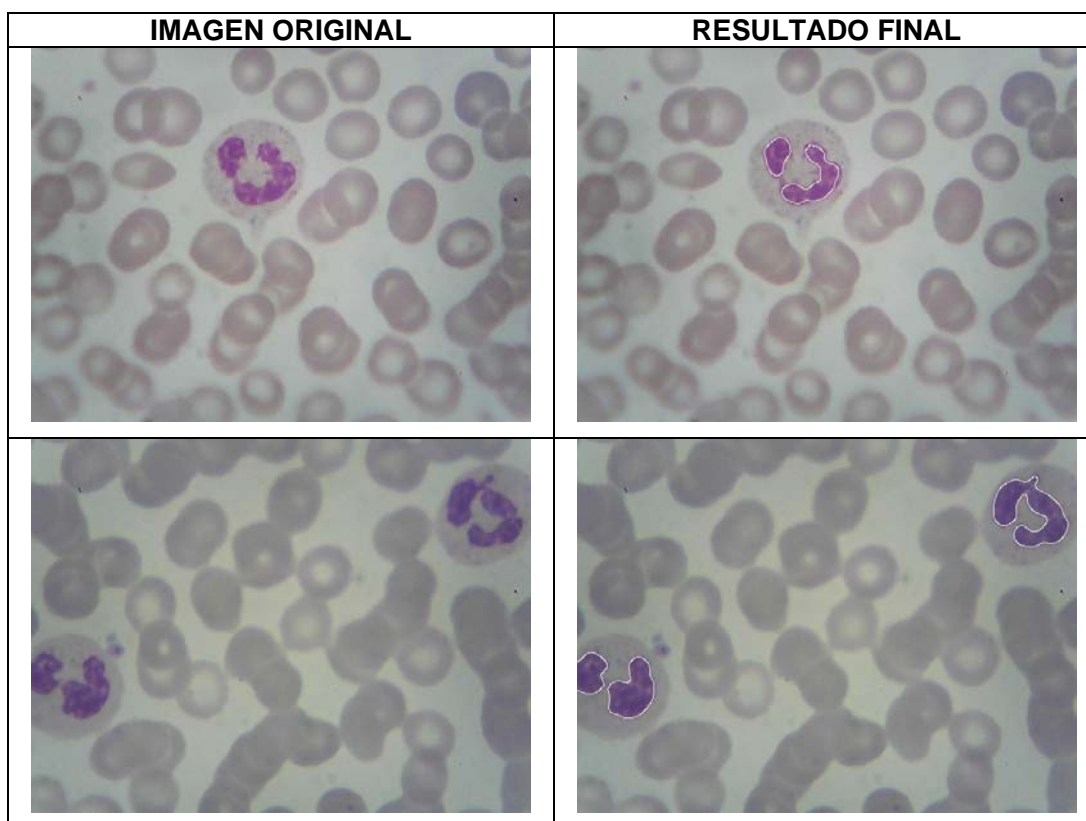
6. RESULTADOS

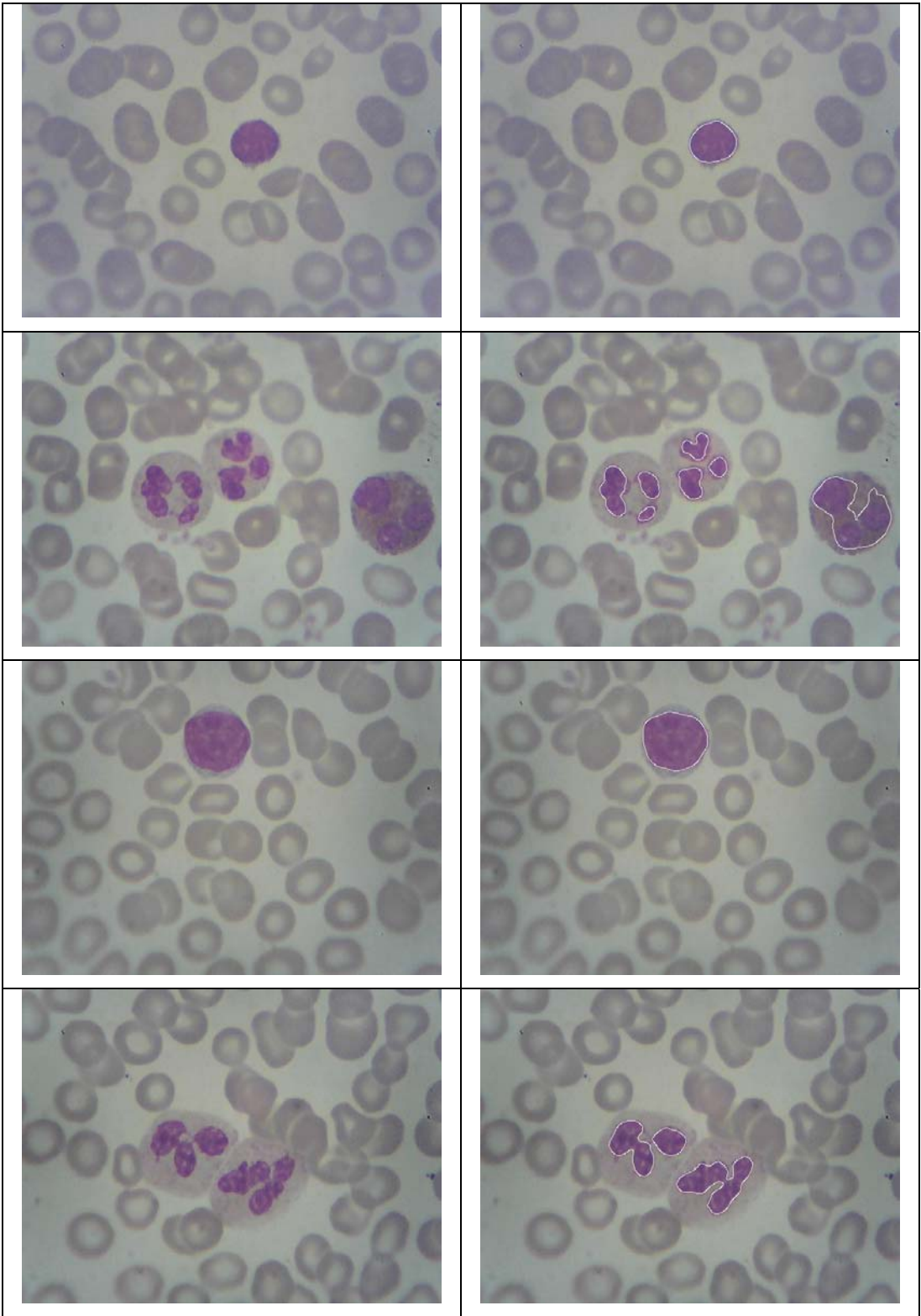
En esta parte se mostrará el resultado final de este proyecto. Primero se calculan los niveles de sensibilidad y especificidad. Luego se muestran algunas imágenes con sus resultados finales.

6.1 RESULTADOS EN IMÁGENES

A continuación se muestra algunas de las imágenes utilizadas para comprobar el funcionamiento del algoritmo, con su resultado final:

Figura 34: Muestra de imágenes con su resultado final





6.2 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

Los índices de especificidad y sensibilidad se calculan con el propósito de verificar la funcionalidad del algoritmo. En este caso, la sensibilidad es la probabilidad que tiene el algoritmo de no detectar partículas que pareciera ser glóbulos blancos, pero que no lo son. (Inexistencia de falsos positivos) y la especificidad es la probabilidad que tiene el algoritmo de detectar los glóbulos blancos. (Existencia de verdaderos positivos)

La sensibilidad se define como: $Sensibilidad = \frac{VP}{VP+FN}$ (7.1)

Donde VP son los verdaderos positivos y FN los falsos negativos.

La especificidad se define como: $Especificidad = \frac{VN}{VN+FP}$ (7.2)

Donde VN son los verdaderos negativos y FP los falsos positivos.

De 330 imágenes tomadas, se tiene la siguiente tabla de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos:

Tabla 8: VP, VN, FP, FN

	POSITIVOS	NEGATIVOS
VERDADEROS	181	119
FALSOS	26	4

Los índices para este algoritmo corresponden a los siguientes:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{181}{181+4} = 0,97837 \quad (7.3)$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{119}{119+26} = 0,82068 \quad (7.4)$$

7. CONCLUSIONES

- Se analizaron alrededor de quince (15) algoritmos, filtros y técnicas relacionados con las etapas de pre-procesamiento y segmentación, de los cuales se eligieron los cuatro (4) que mejor se adaptaron a: (a) Las características de las imágenes adquiridas, tales como el ruido, el contraste, el brillo, entre otras. (b) La morfología de los glóbulos blancos incluyendo el color y la clasificación.
- Se estudió la morfología de los glóbulos blancos, encontrando que la mayor característica es la presencia de un núcleo y concluyendo que detectando éste se facilita la segunda etapa de la herramienta propuesta, que incluye la caracterización de los glóbulos blancos, ya que éstos últimos se diferencian por su núcleo.
- Se implementó un algoritmo que detecta los núcleos de los glóbulos blancos, basándose en los filtros de la Mediana para la reducción de ruido, el filtro de Umbralización binario invertido, el detector de bordes de Canny y demás técnicas seleccionadas.
- Se calcularon los índices de sensibilidad y especificidad, obteniendo la cantidad de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. Estos índices fueron 0,97837 y 0,82068 respectivamente.
- Se dejó un banco de 330 imágenes adquiridas con los equipos pertenecientes al Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIIB) para trabajos de grado futuros.
- Este proyecto fue el primero en realizarse bajo un ambiente de programación diferente a Matlab, debido a que las librerías de OpenCV permiten extender el algoritmo a arquitecturas de alto rendimiento y así integrar esta herramienta con trabajos futuros.

8. RECOMENDACIONES

- Continuar con la segunda fase de la herramienta software, que incluye el conteo, caracterización y diferenciación de glóbulos blancos. Así como el posterior diagnóstico de las enfermedades relacionadas con cualquier tipo de alteración de los mismos.
- Automatizar el barrido que se debe hacer a la placa de la muestra sanguínea, para que el conteo que se debe realizar sea exacto.
- Integrar esta herramienta con proyectos afines a la Hematología, con el propósito de proporcionar una herramienta completa que de apoyo a los profesionales de ésta área.
- Realizar posteriores procesos de paralelización para una optimización de la herramienta ya que con la librería de OpenCV esto es posible.

GLOSARIO

- **Agentes patógenos:** Son las entidades biológicas capaces de producir enfermedades o daños a la biología de un huésped. (Humano, animal, vegetal).
- **Antígeno:** Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.
- **Convolución:** Es un operador matemático que transforma dos funciones f y g en una tercera función que representa la magnitud en la que se superpone f y una versión trasladada de g .
- **Cromatina:** Es el conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo de células eucariotas (con núcleo).
- **Cúmulo de diferenciación:** Son moléculas marcadoras en la superficie celular, que reconocen ciertos anticuerpos, usadas para la identificación del tipo de célula.
- **Elemento estructurante:** Es un conjunto de puntos formando una pequeña imagen que determinará la estructura de la imagen sobre la que se aplicará la operación morfológica.
- **Eritrocitos:** Son los también llamados glóbulos rojos.
- **Especificidad:** En este caso, es la probabilidad que tiene el algoritmo de detectar los glóbulos blancos. (Existencia de verdaderos positivos)
- **Fagocitocis:** Es un mecanismo por el cual algunas células rodean con su membrana citoplasmática a un antígeno y lo introducen al interior celular.
- **Función hemostática:** Las células que tienen esta función permiten que la sangre circule libremente por los vasos y cuando una de estas estructuras se ve dañada, permite la formación de coágulos para detener la hemorragia y reparar el daño.
- **Leucocitos:** Son los también llamados glóbulos blancos.
- **Linfa:** Es un líquido transparente que recorre los vasos linfáticos, que se encarga de defender el cuerpo contra organismos patógenos y absorber los nutrientes del aparato digestivo.

- **Movilidad ameboide:** Emisión de pseudópodos. Se emite un pseudópodo tras el que se desplaza el citoplasma que su vez se retrae por la cola. Cuando el citoplasma ocupa al pseudópodo, se forma un nudo y así se continúa avanzando.
- **Núcleo polilobulado:** Es un núcleo que tiene más de dos lóbulos.
- **Órganos Hematopoyéticos:** Los órganos hematopoyéticos son: La médula ósea, los órganos linfoides, los ganglios linfáticos, el timo y el bazo.
- **Patología:** Conjunto de síntomas de una enfermedad
- **Polimorfonucleado:** Es un tipo de glóbulo blanco.
- **Sensibilidad:** En este caso, es la probabilidad que tiene el algoritmo de no detectar partículas que pareciera ser glóbulos blancos, pero que no lo son. (Inexistencia de falsos positivos)
- **Sistema inmune:** Es el sistema de defensas del cuerpo contra los agentes invasores.
- **Sistema vascular:** Encargado de la distribución del riego sanguíneo por todo el organismo.
- **Tejido conectivo:** Es el principal constituyente del organismo. Se le considera como un tejido de sostén, ya que sostiene y cohesiona a otros tejidos y órganos, sirve de soporte a estructuras del organismo y protege y aísla a los órganos.
- **Timo:** Es el órgano responsable de la maduración de los linfocitos T y de secretar algunas hormonas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] DE LUNA OROSCO, María del Carmen. Hitos en la historia de la hematología. Archivos bolivianos de la historia de la medicina. Vol 6 N° 2. 2000. 127 p.
- [2] Instituto Nacional de Cancerología. Disponible en:
<http://www.cancer.gov.co/documentos/Boletinepidemiologico/N.2-2009.pdf>
- [3] STEVENS, Alan. LOWE, James. Anatomía Patológica. 2da ed. Madrid: Harcourt, 2001. 323 p.
- [4] Oxford University Press. Diccionario de Medicina. 2da reimpresión española. España: 2007. 474 p.
- [5] VIVES CORRONS, Joan Lluís. AGUILAR BASCOMPTE, Josep Lluín. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3a ed. Barcelona: Masson, 2006. 99 – 103 p
- [6] RODAK, Bernadette F. Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas. 2da ed. Buenos Aires: Panamericana, 2005. 174 p.
- [7] Subdirección de vigilancia y control en salud pública. Instituto nacional de salud. Informe epidemiológico nacional 2009. 318 p.
- [8] Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda en pediatría: incidencia, mortalidad y asociaciones causales Castro, Orozco, Rueda, Suárez, Centro de investigaciones epidemiológicas. Universidad Industrial de Santander 2007.
- [9] FONSECA DEL POZO, Javier. Técnico en emergencias sanitarias: Anatomofisiología y patologías básicas. 1a ed. Madrid: Arán Ediciones, 2009. 253 p.
- [10] Oxford University Press. Diccionario de Medicina. 2da reimpresión española. España: 2007. 388 p.
- [11] VIVES CORRONS, Joan Lluís. AGUILAR BASCOMPTE, Josep Lluín. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3era ed. Barcelona: Masson, 2006. 1 p.
- [12] WELSCH, Ulrich. SOBOTTA, Johannes. Histología. 2da ed. Madrid: Panamericana, 2006. 209 – 210 p.
- [13] THEWS, Gerhard. MUTSCHLER, Ernst. VAUPEL, Peter. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: Manual para farmacéuticos y biólogos. Edición en español. Barcelona: Editorial Reverté, 1983. 149-152 p.
- [14] VIVES CORRONS, Joan Lluís. AGUILAR BASCOMPTE, Josep Lluín. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3era ed. Barcelona: Masson, 2006. 89 p.
- [15] Manual de Operaciones CELL-DYN® 1700, 56-0369/R3, División de Diagnósticos, ABBOTT CIENTÍFICA S.A. Noviembre de 2004.

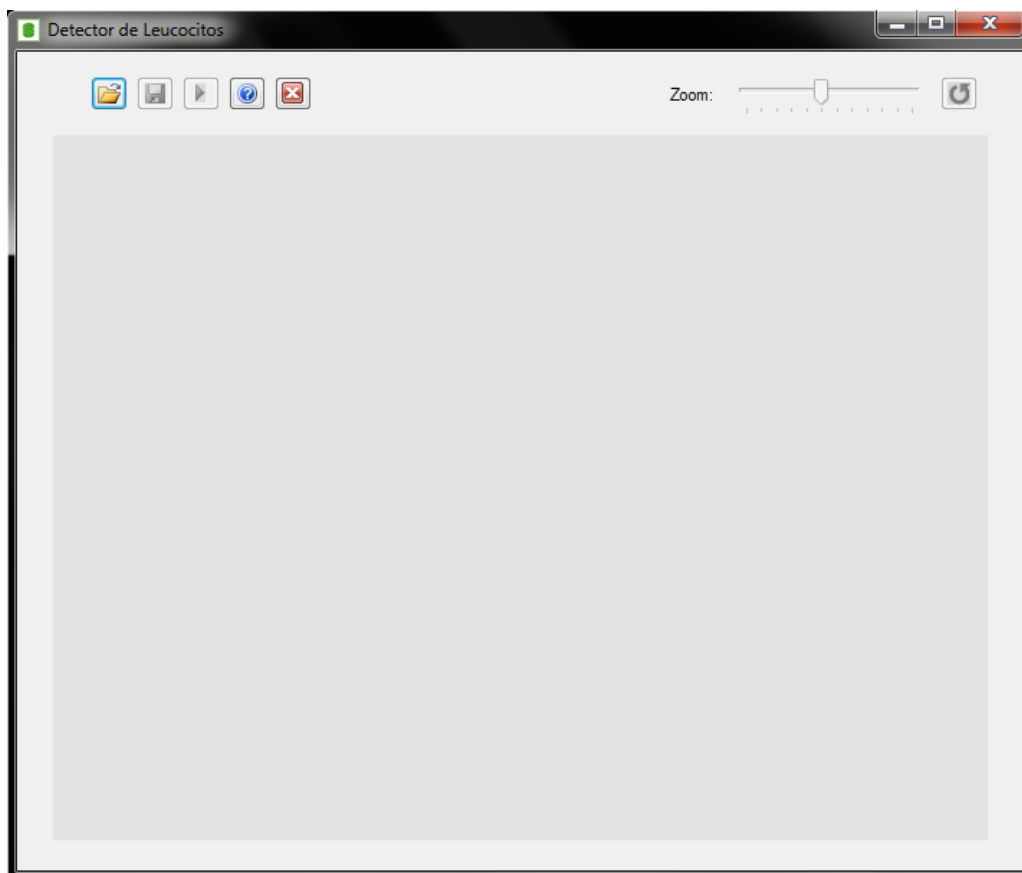
- [16] Manual de operaciones del sistema CELL-DYN Sapphire™, 56-0304/R1, Abbott Laboratories, Junio 2005.
- [17] GONZÁLEZ DE BUITRAGO, José M. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. 2da ed. Barcelona: Masson, 2004. 286 p.
- [18] Matyas, John Robert. Imaging and Evaluating Live Tissues at the Microscopic Level. 2009
- [19] MARTÍNEZ, Víctor E. Modelo computacional para caracterización de células endocervicales. Bucaramanga: 2007. 22 p
- [20] GONZÁLEZ, Rafael c. WOODS, Richard E. Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996. 3-7 p.
- [21] _____ Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996. 245 p.
- [22] DE LA ROSA, R. Procesamiento de imágenes digitales. Facultad de ciencias de la computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México 2007
- [23] GONZÁLEZ, Rafael c. WOODS, Richard E. Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996. 176-187 p.
- [24] CORRALES, Alberto. SANZ, Antonio. Sonificación de imágenes en 2-D. Universidad Rey Juan Carlos. 2003. 29 p.
- [25] GONZÁLEZ, Rafael c. WOODS, Richard E. Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996. 44 p.
- [26] _____ Tratamiento digital de imágenes. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1996. 447-495 p.
- [27] ALBA, José. CID, Jesús. MORA, Inmaculadora. Métodos de análisis de imágenes. Universidad de Vigo, Universidad Carlos III de Madrid, Universidad Rey Juan Carlos. España. 2006. 7 – 10 p.
- [28] RAMÍREZ, Alonso. Reporte de Búsqueda, detección y conteo de objetos. Centro de Investigación en Matemáticas. México. 13 p.
- [29] HERMOSILLA, T. BERMEJO, E. BALAGUER, A. RUIZ, LA. Detección de bordes con precisión subpíxel en imágenes digitales: Interpolación lineal frente a esquemas de tipo no lineal. Universidad Politécnica de Valencia. España. 2006. 12 p
- [30] Procesamiento Morfológico de Imágenes en color. Biblioteca Virtual Miguel De Cervantes. 14 p.
- [31] VALVERDE, Jorge. Detección de bordes mediante el algoritmo de Canny. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2,3 p.

ANEXOS

ANEXO 1. FUNCIONAMIENTO DEL ALGORITMO

Ejecución: Para iniciar el algoritmo basta con ubicarse en el directorio donde se encuentra la aplicación (Figura 35):

Figura 35: Interfaz inicial presentada al usuario.



Cargar una imagen: Para cargar una imagen, se debe dar clic al botón "Abrir" e inmediatamente se muestra un cuadro de diálogo, que se abre por defecto en el directorio que contiene el banco de imágenes tomadas. A continuación, se podrá elegir la imagen que se desea analizar. Si no se abre una imagen, los botones "Guardar" y "Detectar", no se podrán utilizar (Figura 36 - 37):

Figura 36: Cuadro de diálogo para abrir una imagen.

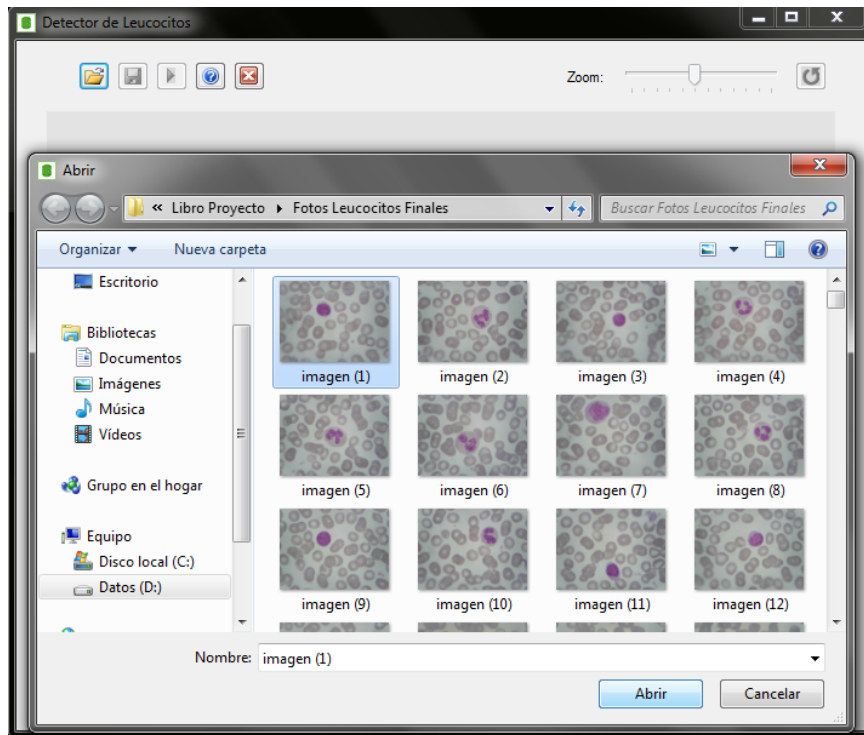
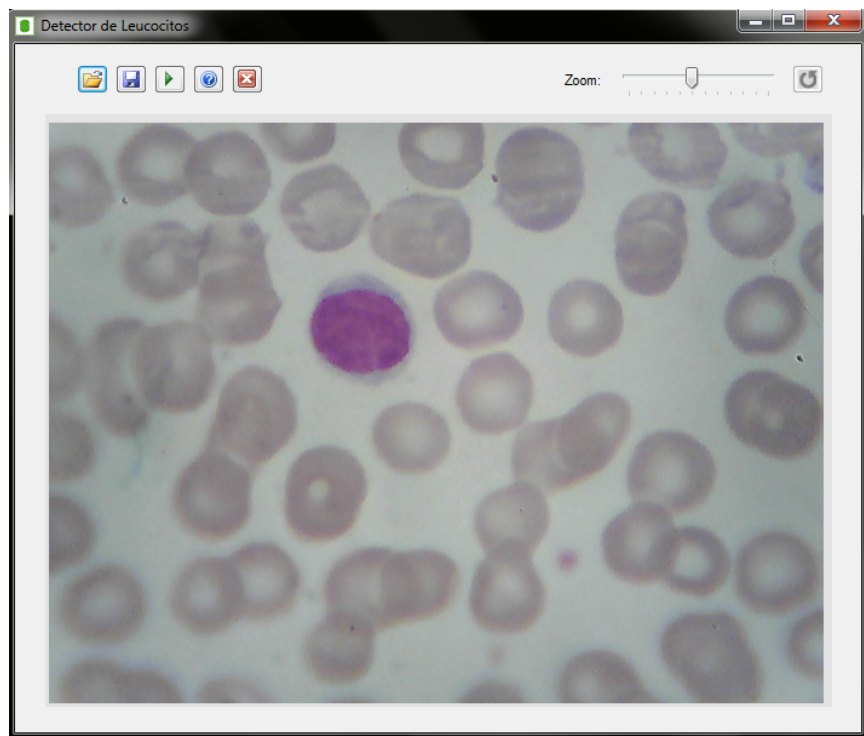
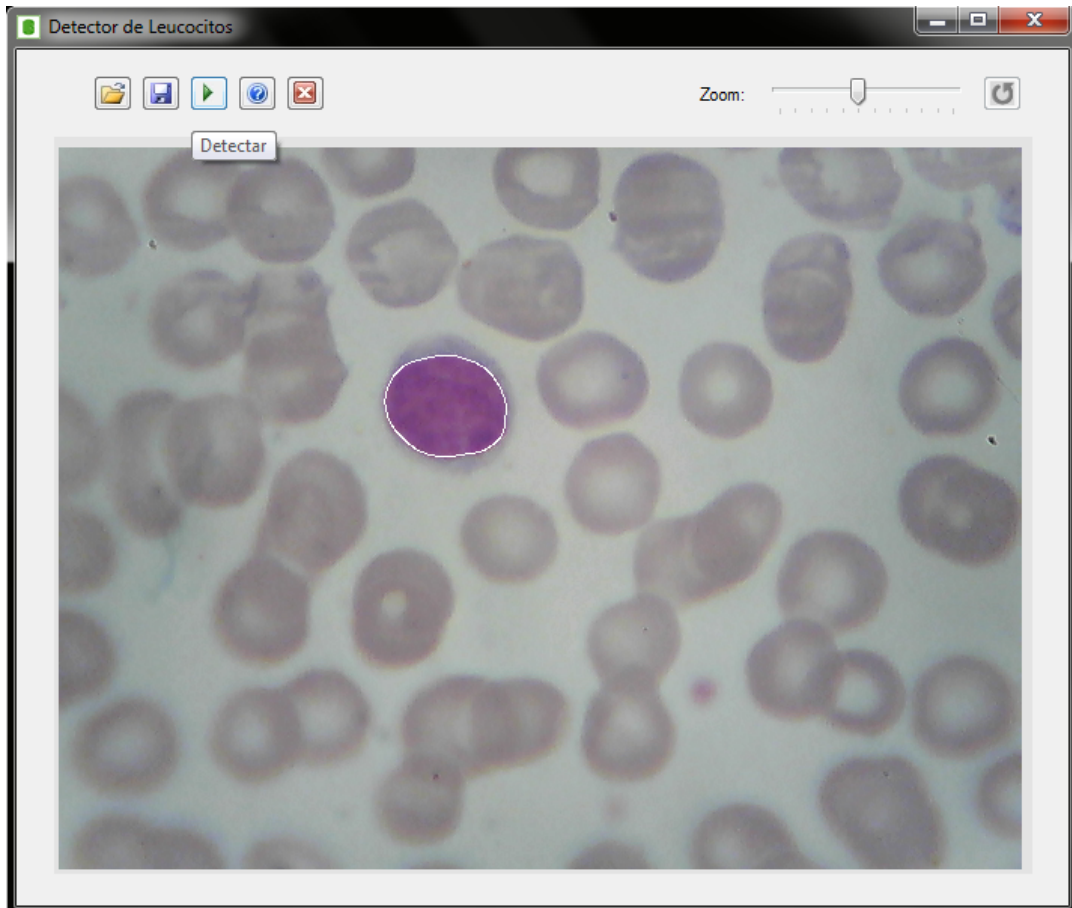


Figura 37: Imagen cargada en el espacio de trabajo.



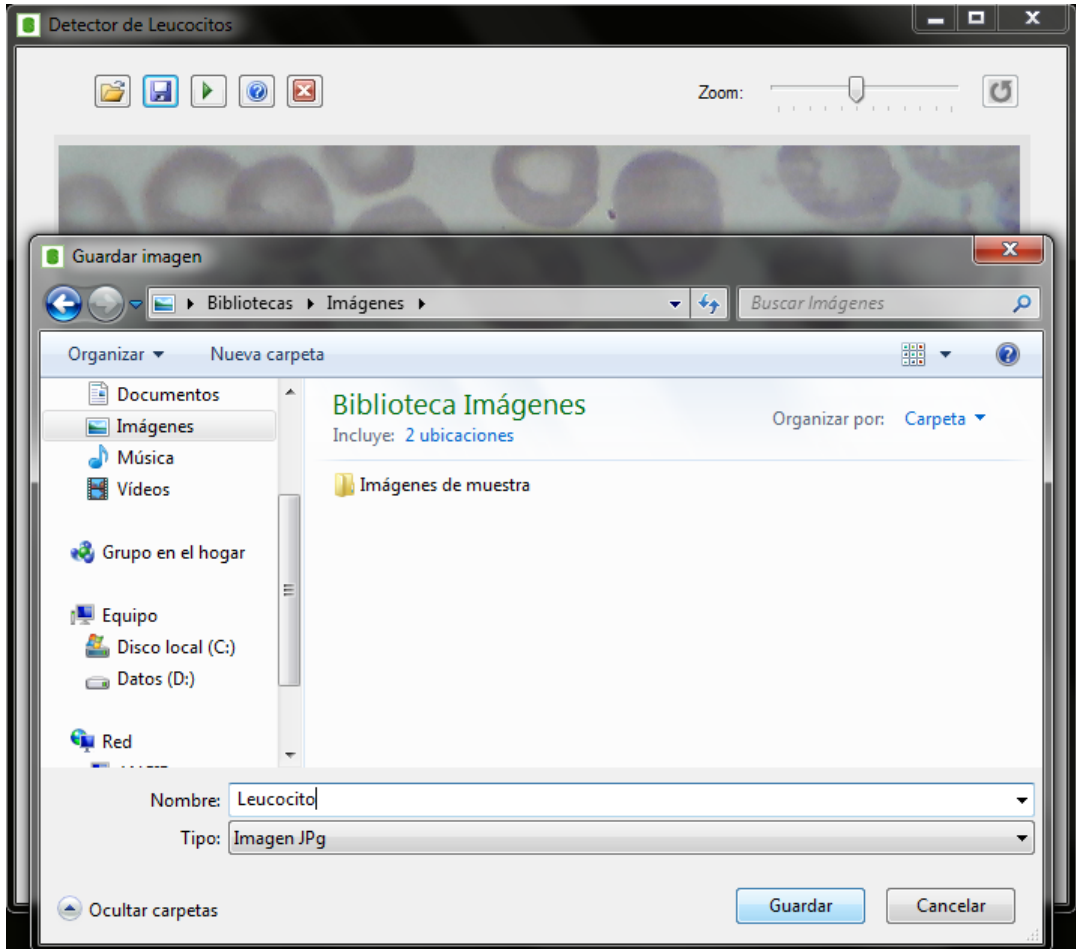
Detectar: después de haber cargado la imagen deseada del banco de imágenes se procede a detectar el núcleo de los glóbulos blancos (Figura 38):

Figura 38: Imagen en la cual se ha detectado los glóbulos blancos



Guardar una imagen: La opción de guardar imagen, se puede utilizar únicamente después de cargar la imagen. Se puede guardar una imagen después de detectar los glóbulos blancos o antes de hacerlo. Cuando se da clic en el botón "Guardar", saldrá un cuadro de diálogo que permitirá guardar la imagen contenida en el espacio de trabajo. Esta opción permitirá darle un nombre a la imagen y elegir el formato en el que se quiere guardar (.Jpg, .Bmp, .Gif), tal como se muestra a continuación (Figura 39):

Figura 39: Cuadro de diálogo para guardar una imagen cargada



Zoom: Es una de las opciones adicionales que ofrece el algoritmo para visualizar más de cerca la imagen ya sea antes de detectar los glóbulos o antes, solo basta con utilizar el TrackBar al lado superior derecho de la ventana principal. El botón ubicado al lado “Restaurar tamaño”, se usa para restaurar el tamaño de la imagen. (Figura 40):

Figura 40: Imagen ampliada

