

**DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA CLASIFICACIÓN
DE GLÓBULOS BLANCOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE
FROTIS SANGUÍNEO**

JOHNATAN NARANJO ACEVEDO

JUAN CARLOS PICO SARMIENTO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA

BUCARAMANGA

2013

**DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA CLASIFICACIÓN DE
GLÓBULOS BLANCOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE FROTIS
SANGUÍNEO**

**JOHNATAN NARANJO ACEVEDO
JUAN CARLOS PICO SARMIENTO**

**Trabajo de grado para optar por el título de
Ingeniero de Sistemas**

Directora:

MSc. Lola Xiomara Bautista Rozo

Codirectores:

MSc. Lina María Garcés Rodríguez

MSc. Andrés Eduardo Gómez Hernández

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

2013

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica por darnos la oportunidad de iniciarnos en el área de la investigación.

A nuestra directora de proyecto Lola Xiomara Bautista Rozo por su paciencia y ayuda incondicional.

A nuestros codirectores Andrés Eduardo Gómez y Lina María Garcés por su apoyo y consejos.

A Fabián Oswaldo Rojas Pedraza por brindarnos su conocimiento que fue de gran utilidad para la finalización de este proyecto.

A la Dra. Sandra Salazar y al Banco de Sangre Metropolitano por su colaboración y por brindarnos las muestras de sangre necesarias para el proyecto.

A Lizeth Andrea Castellanos Beltrán, Luis Eduardo Hasbón Reyes y Hugo Armando Gualdrón por su generosidad y ayuda.

Al profesor Arturo Plata Gómez y a Víctor Eduardo Martínez Abaunza por sus asesorías.

Al PhD.c. Darío José Delgado Quintero por sus consultorías que fueron de gran utilidad en la interpretación y realización de este proyecto.

A los compañeros del GIIB, con quienes es un placer trabajar y compartir.

Índice General

INTRODUCCIÓN	15
1. HEMATOLOGÍA.....	17
1.1 LA SANGRE.....	17
1.1.1 Composición de la Sangre.....	17
1.1.2 Funciones De La Sangre.....	18
1.2 GLÓBULOS ROJOS.....	18
1.3 PLAQUETAS.....	19
1.4 GLÓBULOS BLANCOS.....	20
1.4.1 Granulocitos.....	20
1.4.2 Agranulocitos.....	22
1.5 HEMOGRAMA.....	23
1.6 TÉCNICAS DE CONTEO CELULAR.....	24
1.6.1 Impedancia Eléctrica.....	24
1.6.2 Citometría De Flujo.....	25
1.6.3 Extendido De Sangre Periférica (ESP).....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	30
2.2 OBJETIVOS.....	31
2.2.1 Objetivo General.....	31
2.2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. SOLUCIÓN PROPUESTA.....	32
3.1 DOMINIO DEL PROBLEMA.....	33
3.1.1 Características Observadas Por Los Especialistas.....	33
3.2 ADQUISICIÓN.....	35
3.2.1 Parámetros del Microscopio.....	36
3.2.2 Parámetros de Captura.....	36
3.3 PRE-PROCESAMIENTO.....	37
3.3.1 Componente Fondo.....	39
3.3.2 Componente Núcleos.....	40
3.3.3 Componente WBC.....	41
3.3.4 Componente Textura.....	41
3.4 SEGMENTACIÓN.....	42
3.4.1 Pasos Previos para la Obtención de Núcleos y Citoplasmas.....	43
3.4.2 Segmentación de Núcleos.....	45
3.4.3 Segmentación de Citoplasmas.....	46
3.5 REPRESENTACIÓN Y DESCRIPCIÓN.....	46
3.5.1 Características de Región.....	47
3.5.2 Características de Textura.....	49
3.5.3 Reducción De Dimensionalidad.....	57

3.6 RECONOCIMIENTO E INTERPRETACIÓN	60
3.6.1 Arquitectura de la Red Neuronal.....	60
3.6.2 Entrenamiento.....	61
3.6.3 Algoritmo Clasificador.....	64
4. RESULTADOS.....	66
4.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	66
4.1.1 Sensibilidad.....	68
4.1.2 Especificidad.....	69
4.2 VALORES PREDICTIVOS.....	70
4.2.1 Valor Predictivo Positivo.....	70
4.2.2 Valor Predictivo Negativo.....	71
4.3 FUENTES PRINCIPALES DE ERROR	72
4.3.1 Errores Debidos a las Poblaciones de Leucocitos.....	72
4.3.2 Problemas Debidos a la Tinción del Frotis.....	73
4.3.3 Errores Debidos a la Técnica del Extendido.....	74
4.3.4 Errores Por Agregaciones Plaquetarias.....	76
4.3.5 Segmentación Pobre.....	76
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	77
5.1 Conclusiones.....	77
5.2 Recomendaciones	78
6. FUNCIONAMIENTO DE LA APLICACIÓN SOFTWARE (LEUKOSORTER).....	80
Glosario	87
Bibliografía	91

Índice de Figuras

Figura 1.1 Glóbulos Rojos Normales.	19
Figura 1.2 Plaquetas.	19
Figura 1.3 . Granulocitos: a) Cayado. b) Segmentado. c) Eosinófilo. d) Basófilo.	20
Figura 1.4 Agranulocitos: a) Linfocito. b) Monocito.	22
Figura 1.5 Contador de Coulter.	25
Figura 1.6 Citometría de Flujo.....	26
Figura 1.7 Frotis Sanguíneo Realizado Mediante El Método Porta-Objeto y Teñido Con Colorante De WRIGHT.	28
Figura 3.1 Etapas del Tratamiento Digital de Imágenes.....	32
Figura 3.2 Arreglo Diseñado para la Adquisición de Imágenes Digitales de Frotis Sanguíneos.	37
Figura 3.3 Pre-Procesamiento.	38
Figura 3.4 Componente Fondo. a) Imagen Original. b) Fondo.....	40
Figura 3.5 Componente Núcleos.	40
Figura 3.6 Componente WBC.	41
Figura 3.7 Componente Textura.	42
Figura 3.8 Obtención de la Componente WBC-Previos.	43
Figura 3.9 Obtención de la Componente WBC-Reales.	44
Figura 3.10 Segmentación de Núcleos.	45
Figura 3.11 Segmentación de Citoplasmas.	46
Figura 3.12 Firma o Signatura para un Círculo y un Cuadrado Respectivamente.....	47
Figura 3.13 Tipos de Texturas: a) Aleatoria. b) Determinista.	49
Figura 3.14 Características de Textura Utilizadas.	50
Figura 3.15 Imagen en Escala de Grises y su Histograma de Frecuencias.....	51
Figura 3.16 Características Extraídas para la Representación Matemática de Glóbulos Blancos.	56
Figura 3.17 PCA para un Conjunto de Datos.	58
Figura 3.18 PCA Aplicado a las Características de Glóbulos Blancos.....	58
Figura 3.19 Arquitectura de la Red Utilizada para la Clasificación. R es el vector de entradas, W son los pesos de la primera capa, lldistl es una función de distancia, b_1 es el umbral, LW son los pesos de la segunda capa, C es una función de transferencia compete.	61
Figura 3.20 Algoritmo de Entrenamiento.	62
Figura 3.21 Algoritmo de Entrenamiento en Ejecución.	63
Figura 3.22 Algoritmo de Entrenamiento Preguntando Si la Detección Fue Satisfactoria.	64
Figura 3.23 Algoritmo Clasificador.....	65
Figura 4.1 Glóbulos Blancos Mal Clasificados. En la Imagen de la Izquierda, Cerca de la Esquina Superior Izquierda, Un Granulocito Clasificado Como Linfocito. En la Imagen de la Derecha, Un Granulocito Clasificado Como Monocito. El algoritmo clasificador bordea los glóbulos blancos con un color para indicar su clasificación.	73
Figura 4.2 Imagen Resultado al Aplicar el Algoritmo Clasificador Sobre Dos Imágenes Con Poca Coloración.....	74
Figura 4.3 Imagen Resultado al Aplicar el Algoritmo Clasificador Sobre una Imagen Con Machas de Tinte. Las Manchas de Tinte Fueron Identificadas Por el Algoritmo Clasificador Como Glóbulos Blancos.....	74
Figura 4.4 Glóbulos Blancos Estallados.	75
Figura 4.5 Glóbulos Blancos Traslapados. En la imagen de la Izquierda, los Glóbulos Blancos se Tocan Debido a Un Frotis Grueso. En la Imagen de la Derecha, los Glóbulos Blancos Se Tocan Debido a la Probabilidad de que Suceda.	75
Figura 4.6 Agregaciones Plaquetarias Clasificadas Cómo Glóbulos Blancos.	76
Figura 6.1 Ventana de Inicio de Leukosorter.	80
Figura 6.2 Ventana de Exploración de Leukosorter.	81
Figura 6.3 Leukosorter Procesando una imagen.....	82
Figura 6.4 Clasificación de Glóbulos Blancos Realizada por Leukosorter.	83
Figura 6.5 Respuesta de Leukosorter al Deshabilitar el Checkbox Correspondiente a los Granulocitos.	84

Figura 6.6 Ventana de Exploración para la Futura Ubicación de la Imagen a Guardar.	85
Figura 6.7 Información Acerca de Leukosorter.....	86

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Valores de Referencia Cuadro Hemático Automatizado.	24
Tabla 3.1 Características Relevantes Tenidas en Cuenta por los Especialistas a la Hora de Realizar Conteo Diferencial.	35
Tabla 3.2 Formato para la Matriz de Características de los Núcleo.	56
Tabla 3.3 Formato para la Matriz de Características de los Citoplasmas.	57
Tabla 3.4 Formato para la Matriz de Características de la Célula en General.	57
Tabla 4.1 Descripción de Parámetros para el Cálculo de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos. La Variable x Indica Alguno de los Tres Grupos de Clasificación (Linfocito, Monocito, Granulocito).	67
Tabla 4.2 Parámetros para el Cálculo de Especificidad, Sensibilidad y Valores Predictivos.	68

RESUMEN

TÍTULO:

DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA CLASIFICACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE FROTIS SANGUÍNEO*

AUTORES:

JOHNATAN NARANJO ACEVEDO**

JUAN CARLOS PICO SARMIENTO**

PALABRAS CLAVES:

Clasificación, Extracción de Características, Frotis Sanguíneo, Glóbulos Blancos, Hematología, Tratamiento Digital de Imágenes.

DESCRIPCIÓN:

La diferenciación y evaluación de glóbulos blancos (o leucocitos), son unas de las herramientas de diagnóstico clínico más importantes y solicitadas por los especialistas en salud. Los leucocitos son la base del sistema inmunológico humano, por lo que su análisis es de gran utilidad en la medicina, debido a que brindan información considerable sobre la homeostasis del cuerpo humano. La identificación y clasificación de glóbulos blancos en ocasiones es realizada de manera manual, mediante una lectura visual realizada sobre un extendido de sangre periférica o frotis sanguíneo. El objetivo de esta lectura manual es corroborar los resultados obtenidos por los equipos hematológicos automatizados o hallar alteraciones que no pudieron ser detectadas; sin embargo, esta tarea se puede volver ardua. Además la correcta caracterización de los glóbulos blancos está directamente relacionada con la experiencia del especialista, lo que hace que este proceso sea susceptible a errores humanos. Teniendo en cuenta que la clasificación manual es de carácter visual y que los equipos automatizados no permiten análisis morfológico, se realizó una investigación de distintas técnicas de Tratamiento Digital de Imágenes (TDI) que permitieran la clasificación de glóbulos blancos presentes en imágenes de frotis sanguíneos. Esta investigación permitió concluir que el proceso de recuento diferencial de glóbulos blancos es automatizable mediante técnicas basadas en TDI, y de esta manera posibilitar que los especialistas de la salud tengan en cuenta alteraciones de carácter morfológico de manera mucho más eficiente y menos subjetiva.

*TRABAJO DE GRADO.

**FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS. ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA.
DIRECTOR: LOLA XIOMARA BAUTISTA. CODIRECTOR: ANDRÉS GÓMEZ. CODIRECTOR: LINA GARCÉS.

SUMMARY

TITLE:

DEVELOPING AN ALGORITHM FOR CLASSIFYING WHITE BLOOD CELLS IN BLOOD SMEAR MICROSCOPY IMAGES*

AUTHORS

JOHNATAN NARANJO ACEVEDO**

JUAN CARLOS PICO SARMIENTO**

KEY WORDS:

Blood Smear, Classification, Digital Image Processing, Feature Extraction, Hematology, White Blood Cells.

DESCRIPTION:

The white blood cell (leukocyte) distinction and evaluation are among the most important clinical diagnosis tools and are very highly demanded by health specialists. The leukocytes are the basis of the human immune system, and their analysis is very useful in medicine, due they give considerable information about the human body homeostasis. The identification and differentiation of white blood cells is sometimes done manually by visual reading on blood smears. The goal of that visual reading is to confirm the results gotten by automated hematology analyzers, or find non-detected disturbances; however, that labor may be hard. Also, an accurate white blood cell characterization is proportional to the specialist experience, making the process prone to human errors. Taking into account that the manual classification is a visual process and the automated hematology analyzers cannot analyze cell morphology, a research in diverse Digital Image Processing (DIP) techniques was made, to classify white blood cell in blood smear images. That research allowed concluding that the white blood cell differential count process is automatable by techniques based on DIP, and in this way let the health specialists consider more efficiently and less subjective morphological disturbances.

*WORK DEGREE.

**PHYSICOMECHANICAL ENGINEERINGS FACULTY. SYSTEM ENGINEERING SCHOOL. DIRECTOR: LOLA XIOMARA BAUTISTA. CODIRECTOR: ANDRÉS GÓMEZ. CODIRECTOR: LINA GARCÉS.

INTRODUCCIÓN

La correcta identificación y cuantificación de glóbulos blancos, son de los tópicos más importantes en áreas de la medicina como la hematología. Los glóbulos blancos son la base del sistema inmunitario humano, ya que se encargan de producir defensas y anticuerpos para neutralizar acciones patógenas (1), y su medición es de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades de diversa índole.

En la actualidad, por medio del hemograma se puede analizar diversos indicadores relacionados con la concentración y proporción de glóbulos blancos. El hemograma puede ser realizado por medio de equipos automatizados de recuento celular. Sin embargo, cuando estos equipos encuentran indicadores fuera de los parámetros de normalidad, advierten mediante alarmas posibles anomalías, por lo que se hace necesario realizar un extendido de sangre periférica o frotis sanguíneo para corroborar estas alarmas o descartarlas. La realización e informe de un extendido de sangre periférica depende de la práctica y experiencia de los especialistas que lo realizan (2).

Debido a que con un extendido de sangre periférica se evalúa la morfología de las células sanguíneas (3), se deduce que la información que brinda es de carácter visual, por lo que dicho proceso puede ser automatizado por medio de técnicas de Tratamiento Digital de Imágenes.

En el presente documento, se darán las bases que demuestran que el proceso de recuento diferencial de glóbulos blancos, puede automatizarse mediante la utilización del Tratamiento Digital de Imágenes. Esto sería de gran utilidad en laboratorios en donde no se cuenta con equipos automatizados de recuento celular, o en laboratorios en donde se requiera la disminución de subjetividad

INTRODUCCIÓN

en el proceso de análisis morfológico y recuento diferencial de glóbulos blancos, mediante frotis sanguíneos.

Este proyecto se organiza de la siguiente manera: En el capítulo 1 se describen algunos conceptos relacionados con hematología que serán de gran utilidad para la comprensión de los siguientes capítulos. En el capítulo 2 se detalla la problemática a resolver y su justificación, definiendo también, los objetivos que se esperan alcanzar. El capítulo 3 se realiza el análisis del problema, con el fin de encontrar variables relevantes que conduzcan a la solución del problema. El capítulo 4 especifica los resultados obtenidos y el capítulo 5 las conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros.

1. HEMATOLOGÍA

La hematología tiene como objeto de estudio la sangre y los órganos hematopoyéticos (órganos en los cuales se producen células sanguíneas) en general. Se encarga del análisis funcional y estructural de las células sanguíneas, sus precursores y las enfermedades relacionadas con éstos (4) (5).

1.1 LA SANGRE

Las sustancias adquiridas o producidas por nuestro organismo deben ser transportadas hasta los lugares en donde son requeridas, y es desde luego la sangre su principal medio de transporte (6). La sangre no es esencialmente líquida (plasma), sino que también está formada por elementos corpusculares o figurados como células sanguíneas. Los elementos figurados constituyen el 45% de la sangre, mientras que el plasma constituye el 55% restante.

1.1.1 Composición de la Sangre.

Entre los elementos figurados de la sangre se encuentran:

- Glóbulos rojos o eritrocitos (RBC).
- Glóbulos blancos o leucocitos (WBC).
- Plaquetas o trombocitos (PLT).

Todos los elementos figurados que componen la sangre son células, cada una con una función específica.

Entre los elementos del plasma se encuentran: Agua (Constituye el 90% del plasma), proteínas, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno entre otros.

1.1.2 Funciones De La Sangre.

Como se mencionó anteriormente, la función principal de la sangre es servir de medio de transporte de sustancias. Ésta capta sustancias alimenticias y oxígeno y los libera en las células de todo el cuerpo. También se encarga de recoger sustancias innecesarias para llevarlas hacia órganos excretorios con el fin de que sean desechadas. Además de transportar sustancias también puede transportar células, las cuales utilizan la sangre para llegar a los órganos en donde deben cumplir su función.

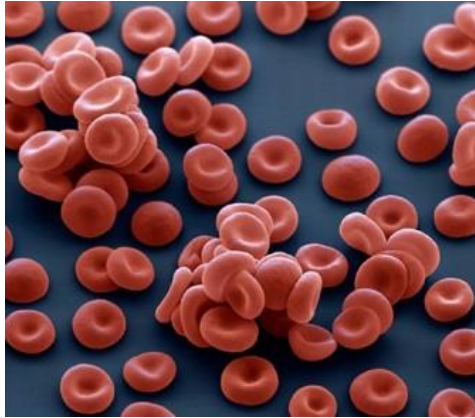
Otra función importante de la sangre es la regulación de la temperatura corporal. Ésta es capaz de absorber grandes cantidades de calor en lugares en donde éste es excesivo y transportarlo a los lugares en donde es escaso.

Hasta hace poco cada uno de los componentes del sistema hematopoyético se estudiaba por separado y su integración fue gracias a la comunicación entre órganos y tejidos que establece la sangre (7), dando las bases de la Hematología como la conocemos hoy en día.

1.2 GLÓBULOS ROJOS

Los glóbulos rojos (RBC), también llamados eritrocitos o hematíes (Figura 1.1), son células sanguíneas cuya función principal es la síntesis de hemoglobina, principal pigmento respiratorio del cuerpo humano (8). Morfológicamente son bicóncavos y no poseen núcleo ni organelos citoplasmáticos.

Figura 1.1 Glóbulos Rojos Normales.



Fuente:

http://www.utchvirtual.net/recursos_didacticos/imagenes/microcosmos/globulos_rojos.htm

1.3 PLAQUETAS

Las plaquetas (PLT) o trombocitos (Figura 1.2) son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo en forma de óvalo o disco. Se forman a partir de la fragmentación de las prolongaciones de los Megacariocitos. Su función es participar en la hemostasia con el objetivo de promover la coagulación y reducir el sangrado.

Figura 1.2 Plaquetas.



Fuente: <http://www.diarioabierto.es/62482/plaquetas-clave-metastasis>

1.4 GLÓBULOS BLANCOS

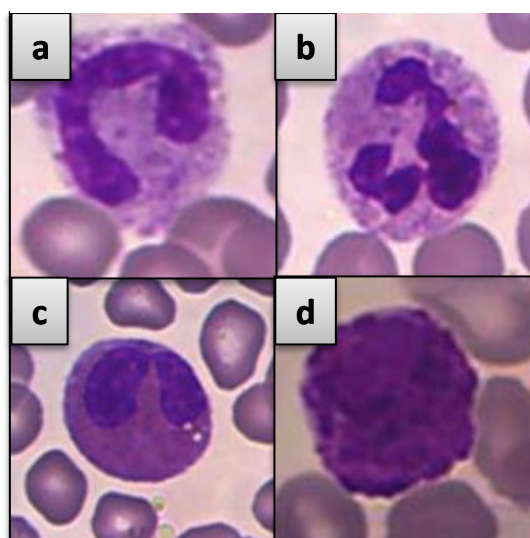
Los glóbulos blancos o leucocitos son células nucleadas con función defensiva. Se originan en la médula ósea (a excepción de algunos linfocitos), y luego utilizan el torrente sanguíneo como medio de transporte para llegar a los tejidos en donde cumplen su función (9).

En la sangre periférica circulan cinco tipos de leucocitos que se originan a partir de tres series hematopoyéticas distintas: Serie granulocítica, serie monocítica y serie linfocítica.

1.4.1 Granulocitos.

Los granulocitos (Figura 1.3) se forman en la médula ósea a partir de células madres. Todos los granulocitos tienen como ancestro en común al Mieloblasto, el cual pasa a través de una serie de fases de maduración hasta llegar a diferenciarse en alguno de los tipos de granulocitos existentes en sangre periférica: Neutrófilo (Cayado o Segmentado), Eosinófilo y Basófilo.

Figura 1.3 . Granulocitos: a) Cayado. b) Segmentado. c) Eosinófilo. d) Basófilo.



Fuente: Autores del proyecto.

HEMATOLOGÍA

1.4.1.1 Cayado o Banda.

Posee un núcleo en forma de banda arqueada, recordando la forma de una herradura. Su citoplasma es de color rosado y contiene gránulos neutrófilos (por lo que también es llamado neutrófilo cayado) pequeños y distribuidos uniformemente. Se encuentran en su mayoría en la médula ósea y sólo del 2 al 5 % llegan a formar parte de la sangre periférica.

1.4.1.2 Segmentado.

Se forma a partir de los neutrófilos cayados por medio de segmentación nuclear en donde cada segmento nuclear es llamado lóbulo, por lo general poseen de 2 a 5 lóbulos conectados por delgadas hebras. Su citoplasma es de color rosado y posee gránulos neutrófilos (por lo que también es llamado neutrófilo segmentado) que en su mayoría son lisosomas. Se pueden encontrar en sangre periférica en porcentajes que van desde el 40 al 70 %.

1.4.1.3 Eosinófilo.

Su característica más notoria es que contiene una gran cantidad de gránulos grandes, esféricos y de color naranja rojizo sobre el citoplasma y raras veces sobre el núcleo. Por lo general posee núcleo bilobulado que se asemeja a un antifaz. Su número en el torrente sanguíneo aumenta con la presencia de reacciones alérgicas y agentes parasitarios.

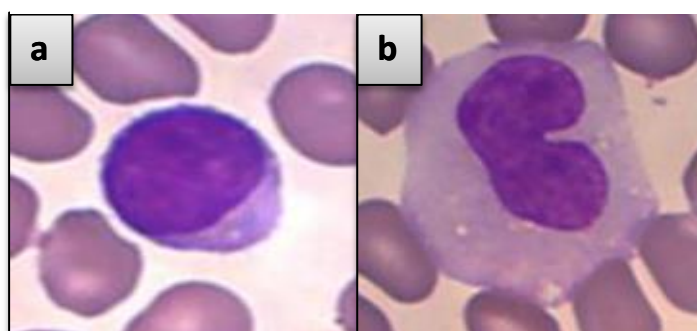
1.4.1.4 Basófilo.

Es el leucocito menos abundante, solo representa entre el 0 y el 1% de los leucocitos totales en sangre periférica. Su citoplasma está repleto de gránulos de un color azul intenso y que cubren casi, o en su totalidad al núcleo e impiden ver su estado de maduración. Su número aumenta con la aparición de reacciones alérgicas.

1.4.2 Agranulocitos.

Los agranulocitos (Figura 1.4) son glóbulos blancos cuya característica principal es la falta o escasez de gránulos citoplásmáticos. Los agranulocitos se componen de dos tipos de glóbulos blancos, los monocitos y los linfocitos, y se forman a partir de la maduración de los Linfoblastos y Monoblastos respectivamente.

Figura 1.4 Agranulocitos: a) Linfocito. b) Monocito.



Fuente: Autores del proyecto

1.4.2.1 Monocito.

Es el leucocito de mayor tamaño que se puede encontrar en sangre periférica. Por lo general posee un citoplasma de color azul grisáceo pero en ocasiones puede ser de color azul o neutro. Tiene gránulos muy pequeños y difíciles de ver. Algunos poseen vacuolas de color blanco en su citoplasma. Su núcleo en general tiene forma de riñón o herradura, aunque también puede ser redondo. Debido a que su morfología es muy variada en ocasiones suele confundirse con linfocitos de tamaño grande. La mayoría de estas células se encuentran en la médula ósea y tan solo un 2 a 6 % llegan a la sangre periférica.

1.4.2.2 Linfocito.

Se originan a partir de células linfoides y su tamaño es muy variado. Poseen una estructura circular. Por lo general poseen un núcleo redondo que no se

segmenta, aunque a veces toma forma arriñonada. Su citoplasma es de color celeste y pueden tener presencia de gránulos de tamaños pequeños.

1.5 HEMOGRAMA

El hemograma, biimetría hemática, cuadro hemático o CSC (Cuento Sanguíneo Completo), es un informe sobre los índices de concentración de los componentes formes de la sangre. Este informe se divide en dos tipos de indicadores: serie roja y serie blanca. Los indicadores de la serie roja se componen de parámetros mensurables relacionados con los glóbulos rojos, mientras que los indicadores de la serie blanca se componen de mediciones de parámetros relacionadas con los glóbulos blancos (10).

El hemograma es de gran utilidad debido a que permite el seguimiento, control o diagnóstico de una patología que de alguna manera esté relacionada con la sangre, y siendo el torrente sanguíneo, el medio principal de transporte celular y de sustancias en los seres humanos, su estudio resulta ser una herramienta muy potente a la hora de dar un diagnóstico.

Entre los indicadores que brinda el hemograma se encuentra el conteo diferencial de glóbulos blancos, también llamado fórmula leucocitaria o simplemente fórmula diferencial, el cual describe la proporción de cada tipo de glóbulo blanco presente en sangre periférica. La Tabla 1.1 muestra las concentraciones normales de las células sanguíneas y los porcentajes normales de cada tipo de glóbulo blanco.

Tabla 1.1 Valores de Referencia Cuadro Hemático Automatizado.

PARÁMETRO	0 – 6 meses	6 – 11 meses	1 – 11 años	12 años en adelante (Hombres)	12 años en adelante (Mujeres)
WBC ($\times 10^3$ cel/uL)	5 – 21	5 – 21	4,5 – 17,5	4,6 – 10	4,6 – 10
RBC ($\times 10^6$ cel/uL)	4 – 6,8	3,2 – 6,8	3,6 – 5,8	4,3 – 5,8	3,9 – 5,4
PLT ($\times 10^3$ cel/uL)	217 – 553	217 – 553	181 – 521	149 – 408	149 – 442
Linfocitos (%)	20 – 70	20 – 70	50 – 70	18 – 46,6	18 – 46,6
Monocitos (%)	1 – 11	1 – 11	1 – 6	0 – 6,3	0 – 6,3
Neutrófilos (%)	17 – 60	17 – 60	25 – 60	48,7 – 77,3	48,7 – 77,3
Eosinófilos (%)	1 – 5	1 – 5	1 – 5	0 – 6	0 – 6
Basófilos (%)	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1

Fuente: Laboratorio Clínico, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander.

1.6 TÉCNICAS DE CONTEO CELULAR

El hemograma puede realizarse de manera automática por medio de equipos especializados de conteo celular, o de manera manual. En el conteo automatizado, el funcionamiento de los equipos de recuento está basado en alguna técnica de análisis celular o en algún principio físico; entre las técnicas más comunes y eficientes se encuentra el de la impedancia eléctrica y la citometría de flujo.

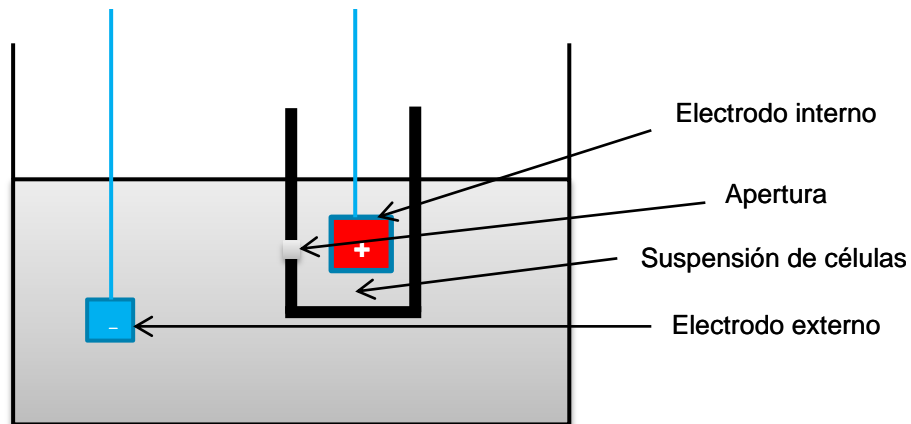
1.6.1 Impedancia Eléctrica.

También llamado Método Coulter. Funciona detectando pequeños cambios en la impedancia eléctrica entre dos electrodos. Las células son suspendidas en un líquido conductor y luego pasan a través de una apertura; debido a que las células se comportan como aislantes, la resistividad entre los electrodos

HEMATOLOGÍA

aumenta al pasar la célula por la apertura. Cada célula produce un pulso eléctrico mensurable que permite su conteo y clasificación. En la Figura 1.5 se describe el funcionamiento del contador de Coulter.

Figura 1.5 Contador de Coulter.

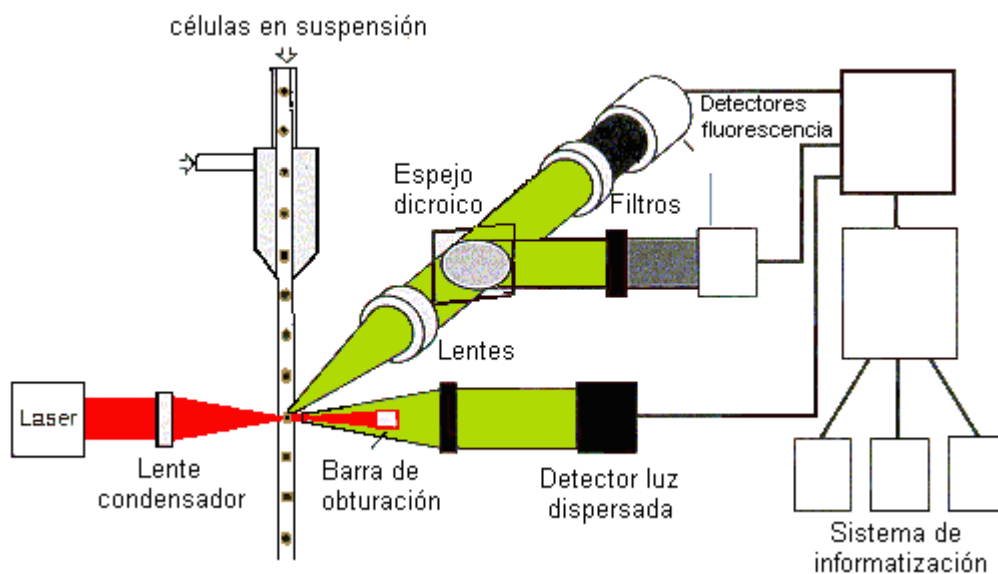


Fuente: Autores del proyecto.

1.6.2 Citometría De Flujo.

Es una técnica que permite la medición de diferentes características celulares. Su principio de conteo y clasificación es la dispersión y refracción de la luz sobre una célula. Funciona dejando pasar células a través de una cavidad en la cual son iluminadas por un láser; la discontinuidad del láser puede ser usada para contar las células, mientras que la refracción de la luz del láser puede ser utilizada para medir densidad y granularidad. La Figura 1.6 expone el funcionamiento común a todos los equipos de citometría de flujo.

Figura 1.6 Citometría de Flujo.



Fuente: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEEFuFVpEViYvxbfZt.php>. Código ISPN de la publicación: EEEFUFVPEVIYVXBFTZ.

1.6.3 Extendido De Sangre Periférica (ESP).

Un extendido de sangre periférica o frotis sanguíneo es un extendido de una gota de sangre coloreada sobre una lámina con la cual se puede apreciar la morfología de las células sanguíneas (11).

Mediante el extendido de sangre, y el microscopio se puede realizar el conteo celular de forma manual, por lo que su óptima realización conlleva a un diagnóstico correcto. Actualmente existen dos métodos ampliamente utilizados en la realización de un frotis sanguíneo: método cubre-objeto y método porta-objeto.

1.6.3.1 Método Cubre-Objeto.

Se obtiene una gota de sangre mediante punción venosa o capilar y libre de anticoagulante. Luego se coloca la gota sobre un cubre-objeto y se coloca otro

HEMATOLOGÍA

cubre-objeto encima de éste pero en forma diagonal hasta que la sangre se diluya completamente. Luego se deja secar al aire.

1.6.3.2 Método Porta-Objeto.

Con este método se extiende una gota de sangre sobre un porta-objeto deslizando uno de los bordes de otro porta-objeto, hasta que la gota quede bien extendida. Luego se deja secar el frotis. Igualmente la sangre se obtiene por punción venosa o capilar y sin anticoagulante.

1.6.3.3 Coloración Del Extendido.

Después de realizado el extendido se procede a colorearlo, esto se logra sometiendo al frotis a un proceso de fijación y tinción. En los laboratorios los colorantes más usados son los basados en el colorante de Romanowski, específicamente el colorante de WRIGHT.

Debido a que el colorante de WRIGHT está constituido por un colorante ácido y uno básico, las estructuras celulares tenderán a teñirse con el colorante de pH contrario, es decir, los componentes ácidos de las células como el ADN del núcleo tenderán a teñirse de un color básico o azulado, mientras que los componentes básicos como algunos gránulos citoplasmáticos de los leucocitos, tenderán a teñirse de color ácido o naranja. En la Figura 1.7 se muestra un extendido de sangre teñida con el colorante de WRIGHT y realizado mediante el método porta-objeto

HEMATOLOGÍA

Figura 1.7 Frotis Sanguíneo Realizado Mediante El Método Porta-Objeto y Teñido Con Colorante De WRIGHT.



Fuente: Autores del proyecto.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día los laboratorios clínicos pueden realizar numerosas pruebas de parámetros biológicos, y darles una representación cuantitativa, con el cual los especialistas pueden confirmar o descartar diagnósticos. Entre las pruebas más requeridas por los especialistas se encuentra el hemograma (ver sección 1.5) y uno de sus indicadores es la fórmula diferencial, la cual describe la proporción y concentración de cada tipo de glóbulo blanco presente en la sangre periférica. Los glóbulos blancos son la base del sistema inmunitario humano por lo que su conteo y clasificación brindan parámetros de referencia para establecer un diagnóstico, prevención o control patológico.

Aunque el hemograma puede realizarse por medio de equipos automatizados (secciones 1.6.1 y 1.6.2), aún se sigue requiriendo del extendido de sangre periférica para corroborar sus resultados. La capacidad de analizar grandes cantidades de células permite a los equipos automatizados eliminar el error estadístico; sin embargo, su principal desventaja es que no permiten una observación morfológica, además, sólo se dedican a contar células normales y señalar la aparición de indicadores biológicos fuera de los rangos de normalidad establecidos clínicamente o el hallazgo de células anormales o desconocidas. Es aquí, cuando se debe realizar una observación manual bajo el microscopio con el objetivo de corroborar la información brindada por el equipo automatizado.

Esta observación manual se realiza por medio de un extendido de sangre periférica (ver sección 1.6.3), el cual es analizado por un hematólogo que informa sobre anomalías que no pudieron ser detectadas durante el recuento automático (12) (13).

2.1 JUSTIFICACIÓN

Las imágenes forman parte de nuestra vida cotidiana, y llegan a ser una fuente de transferencia de todo tipo de información (14). Las imágenes de origen microscópico son de gran importancia en campos científicos, debido a que permiten la captura de fenómenos que no pueden ser observados a simple vista, cómo los que ocurren a nivel celular en áreas como la hematología.

En los laboratorios de hematología aún sigue siendo de gran importancia la realización de hemogramas de manera manual. Debido a que para realizar estos hemogramas manuales se necesita del análisis de información visual, y que el tiempo que toma realizar un hemograma de esta manera está directamente relacionado con la experiencia del hematólogo, y añadiendo que el conteo manual no deja de ser subjetivo y predispuesto a errores humanos (2), se hace evidente la búsqueda de una herramienta computacional que permita realizar análisis morfológico sin perder objetividad en el proceso. El TDI (Tratamiento Digital de Imágenes) es el candidato ideal, puesto que permite manejar la información implícita contenida en imágenes, y en el contexto de la hematología permitiría efectuar dicho análisis morfológico de manera menos subjetiva.

A continuación se nombran algunas desventajas de las técnicas de recuento manual, y se justifica la intervención de técnicas basadas en Tratamiento Digital de Imágenes:

- Los especialistas pueden cometer errores a la hora de realizar el conteo y clasificación manual.
- La información contenida en los frotis de sangre periférica es de carácter estrictamente visual.
- Baja incursión de aplicaciones del Tratamiento Digital de Imágenes en el área de la hematología.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por lo anterior, se planea desarrollar e implementar un algoritmo para la clasificación de glóbulos blancos en sus tres clases principales (monocitos, granulocitos, linfocitos) por medio de técnicas de Tratamiento Digital de Imágenes, con el fin de aportar las bases para la automatización del proceso de recuento diferencial de glóbulos blancos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General.

Desarrollar e implementar un algoritmo que permita la clasificación de glóbulos blancos maduros y normales en sus tres tipos principales: Monocitos, Linfocitos y Granulocitos, a partir de imágenes digitales de frotis sanguíneo de humanos adultos.

2.2.2 Objetivos Específicos.

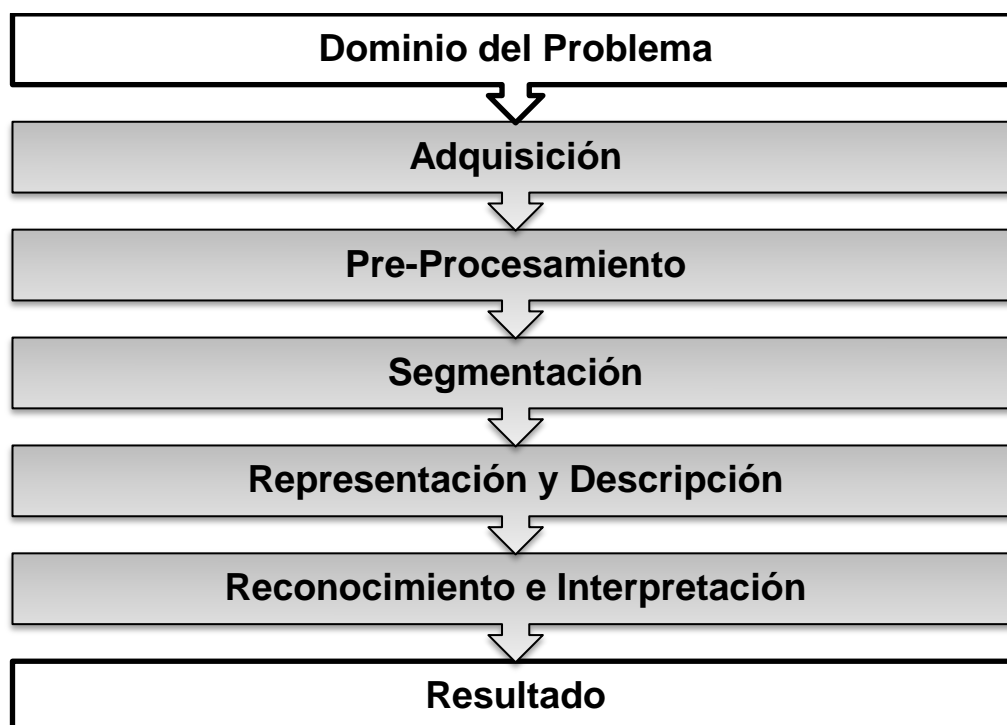
- Identificar las características morfológicas esenciales de los Linfocitos, Monocitos y Granulocitos normales y en última fase de maduración.
- Desarrollar e implementar un clasificador para la diferenciación de Linfocitos, Monocitos y Granulocitos.
- Efectuar pruebas de sensibilidad y especificidad del clasificador desarrollado.

3. SOLUCIÓN PROPUESTA

En este capítulo se describe en detalle el algoritmo y fundamentos que permitieron clasificar a los glóbulos blancos de un frotis sanguíneo mediante técnicas de Tratamiento Digital de Imágenes.

Para una explicación sencilla y ordenada se dividió al algoritmo en distintas etapas bien diferenciadas. Estas etapas son simplemente los pasos fundamentales e intrínsecos del Tratamiento Digital de Imágenes (15), que describen de manera intuitiva la forma de analizar y resolver un problema mediante TDI. En la Figura 3.1 se muestran dichas etapas y su ordenamiento.

Figura 3.1 Etapas del Tratamiento Digital de Imágenes.



Fuente: González, Rafael C, Op, pp. 8.

3.1 DOMINIO DEL PROBLEMA

El conteo diferencial de Glóbulos Blancos de manera manual es realizado por los especialistas con un aumento de 100 ×, ya que éste permite realizar la formula diferencial con mayor precisión y analizar la morfología de los elementos presentes en la sangre con más detalle (16); esto, con el fin de detectar anormalidades morfológicas que no pueden ser detectadas mediante recuento automatizado.

Después de que el especialista logra enfocar el objetivo comienza a determinar y diferenciar los tipos de glóbulos blancos por medio de los parámetros característicos de cada uno. En esta sección enunciaremos las características tenidas en cuenta por los especialistas para la clasificación de glóbulos blancos en tres tipos: Linfocitos, monocitos y Granulocitos.

3.1.1 Características Observadas Por Los Especialistas.

A continuación se listarán las características que buscan en los glóbulos blancos, los especialistas a la hora de realizar el conteo diferencial de manera manual. Esto ayudará a identificar las variables que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar el algoritmo clasificador.

3.1.1.1 Características Observadas En Granulocitos.

Para la identificación de los granulocitos el especialista se basa en las siguientes características: tamaño, morfología nuclear, color del citoplasma, color de los gránulos, concentración y morfología granular. Los granulocitos son las células más fáciles de diferenciar, debido a la presencia exagerada de gránulos en sus citoplasmas, lo que les da una apariencia de rugosidad y no uniformidad.

3.1.1.2 Características Observadas En Linfocitos.

En el caso de los linfocitos los atributos utilizados son los siguientes: tamaño, Área del citoplasma, Color del citoplasma, morfología nuclear, y configuración de la cromatina. Los linfocitos, aunque vienen en una gran variedad de tamaños, por lo general son fácilmente reconocibles; su núcleo redondeado y cromatina densa permiten identificarlos casi sin recurrir a otras características.

3.1.1.3 Características Observadas En Monocitos.

Para los monocitos, que son un por lo general más grandes, es indispensable tener en cuenta el tamaño, la forma de la célula, y las características mencionadas anteriormente como el color del citoplasma, morfología nuclear, configuración de la cromatina, área del citoplasma, concentración y morfología granular.

Con los monocitos se deben tener en cuenta más características debido a que su morfología es muy variada y tienden a ser confundidos con otros tipos de glóbulos blancos.

En conclusión, se puede afirmar que las variables relevantes que se deben tener en cuenta para la clasificación de glóbulos blancos son dos: variables que representan características de región y las que representan características de textura. Para poder hacer que estas variables sean viables computacionalmente es necesario darles una interpretación matemática, es decir, representar las características en forma de ecuaciones que puedan ser codificadas en forma de algoritmo.

En la Tabla 3.1 se ilustran las características principales tenidas en cuenta por el especialista para la identificación de cada tipo de glóbulo blanco. También se agrupan las características en dos clases: Región y Textura.

SOLUCIÓN PROPUESTA

Tabla 3.1 Características Relevantes Tenidas en Cuenta por los Especialistas a la Hora de Realizar Conteo Diferencial.

Tipo de WBC	Características de Región				Características de Textura				
	Tamaño	Morfología Nuclear	Área Citoplasma	Forma Celular	Coloración Granular	Concentración Granular	Morfología Granular	Color Citoplasma	Configuración Cromatina
Linfocito	X	X	X					X	X
Monocito	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Granulocito	X	X			X	X	X	X	

3.2 ADQUISICIÓN

Antes de realizar un procesamiento digital sobre una imagen, se debe transformar dicha imagen a un formato digital. Esto se logra mediante un sistema de adquisición de imágenes (como una cámara fotográfica), la cual hace un muestreo espacial de las intensidades de luz de alguna escena (como por ejemplo células extendidas en una placa de vidrio), permitiendo de esta manera una representación aceptable de la escena real.

Con el fin de obtener un procesamiento óptimo, se debe seguir cierta parametrización en la adquisición de las imágenes. Esto se logra ajustando de manera fija tanto parámetros de los sistemas de adquisición como parámetros de digitalización, es decir, que las condiciones de captura de las imágenes del problema o fenómeno que se esté analizando sean idénticas o similares.

Para este proyecto, las escenas que se capturaron y posteriormente se digitalizaron fueron imágenes de frotis sanguíneos. Los frotis fueron realizados mediante el método porta-objeto (ver sección 1.6.3.2), de personas adultas (entre los 18 y 60 años) y saludables, sin importancia de género. La sangre necesaria para la realización del frotis fue obtenida mediante punción venosa.

3.2.1 Parámetros del Microscopio.

La adquisición de las imágenes fue realizada por medio de un microscopio **OLYMPUS CX31**, ajustado de la siguiente manera:

- Diafragma al 0.1
- Iluminación al máximo
- Aumento a 100x

Se optó por el aumento de 100x debido a que es el utilizado por los hematólogos para realizar el conteo diferencial de glóbulos blancos porque permite visualizar las células con más detalle.

3.2.2 Parámetros de Captura.

Se contó con una cámara **MOTICAM 2000** integrada al microscopio **OLYMPUS**, gestionada por un driver de ordenador y administrada por el programa **MOTIC** sobre el cual se establecieron los siguientes parámetros de captura:

- Exposición de 427.896
- Contraste de 0.57
- Ordenada al 0
- Realce de 0 a 255
- Gamma de 1.00
- Corrección de tono de 10

El formato elegido para las imágenes fue **JPEG**, y la resolución fue de 839 × 1075 píxeles.

SOLUCIÓN PROPUESTA

Todos los parámetros elegidos, tanto del microscopio (a excepción del aumento del microscopio) como los del programa de gestión de captura fueron escogidos de manera subjetiva, es decir, se eligieron los parámetros que experimentalmente dieran el mejor foco y marcaran una clara diferencia entre los distintos elementos presentes en el frotis.

En la Figura 3.2 se presenta el arreglo utilizado para la adquisición de imágenes digitales de frotis sanguíneos.

Figura 3.2 Arreglo Diseñado para la Adquisición de Imágenes Digitales de Frotis Sanguíneos.



Fuente: Autores del proyecto.

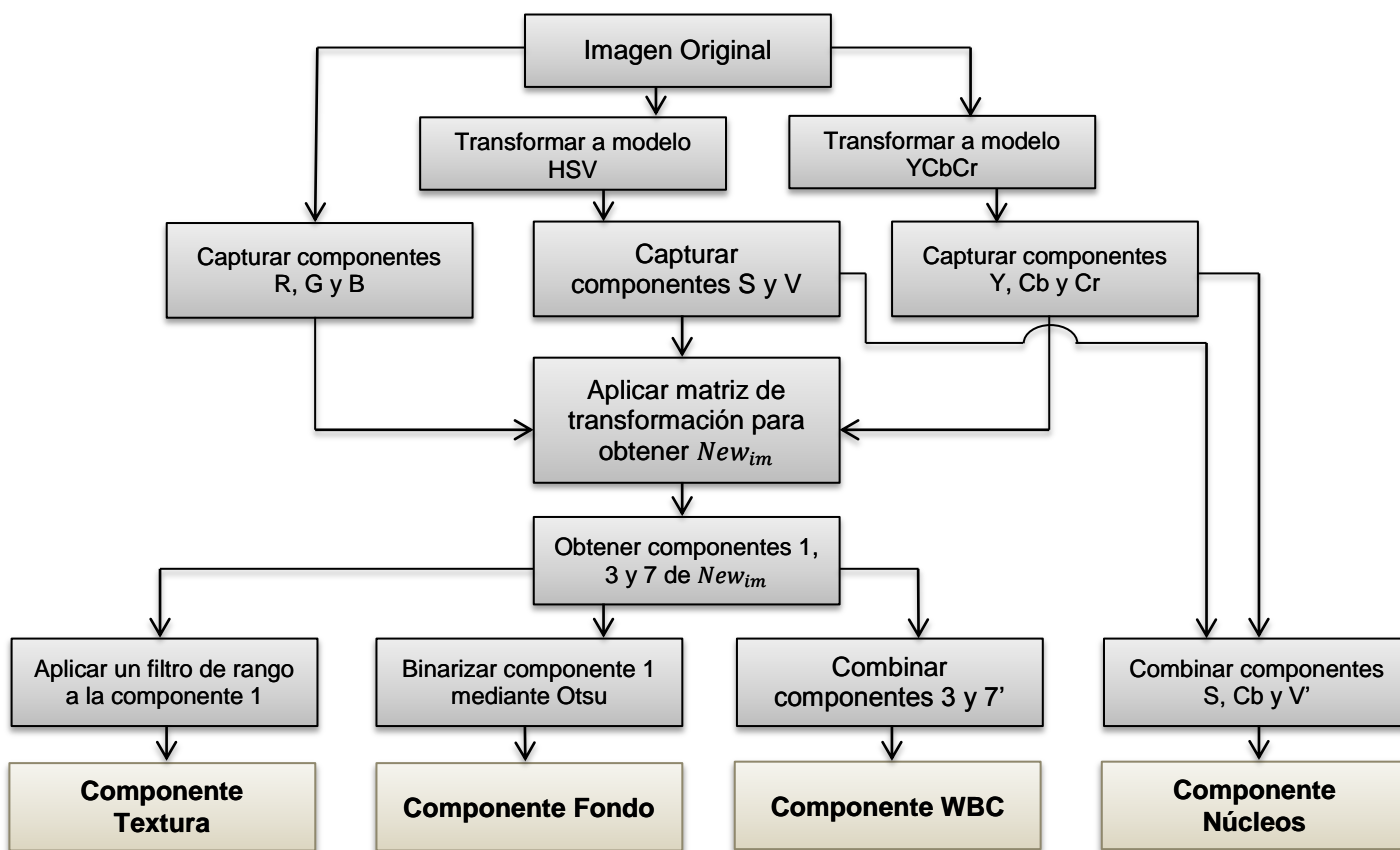
3.3 PRE-PROCESAMIENTO

Para una óptima segmentación y por consiguiente una correcta clasificación, es preciso mejorar la información contenida en la imagen, es decir, acondicionar la imagen de manera que los objetos de interés sean más reconocibles y se descarte información que no sea relevante y que pueda afectar la adecuada separación de los glóbulos blancos presentes en la imagen de los elementos de segundo plano. Con esto se pretende ayudar a los métodos que se utilizarán en la fase de segmentación a converger en resultados deseables.

SOLUCIÓN PROPUESTA

En este proyecto, la fase de Pre-Procesamiento tiene como objetivo la obtención de cuatro componentes a partir de una imagen de frotis sanguíneo en la que haya presencia de glóbulos blancos. Estas cuatro componentes brindarán información crucial para la extracción o segmentación de los leucocitos de la imagen. A continuación en la Figura 3.3 se describe el proceso para la obtención de dichas componentes.

Figura 3.3 Pre-Procesamiento.



Cada componente, R, G, B, S, V, Y, Cb y Cr fue convertida en un vector columna, para luego formar una estructura con 8 columnas (una por cada componente y en el orden en que se mencionaron), la cual se multiplicará por una matriz de transformación; luego cada columna del resultado de la transformación es convertida de vuelta a matrices. A continuación se muestra la matriz de transformación utilizada.

SOLUCIÓN PROPUESTA

0.4467	0.1758	0.0322	-0.2501	-0.6550	0.1181	-0.4559	-0.2343
0.4343	-0.0622	-0.1698	0.1676	0.3003	-0.6240	-0.0283	-0.5196
0.3931	-0.0126	0.4103	0.2857	0.4747	0.5510	-0.2425	-0.0859
-0.1760	0.2284	0.3687	-0.7144	0.3844	-0.2252	-0.2676	-0.0181
0.4504	0.1301	0.2059	-0.3198	-0.0590	0.0927	0.7894	0.0019
0.4400	0.0131	-0.0430	0.0516	0.0598	-0.3125	-0.1819	0.8168
-0.1501	-0.0563	0.7840	0.3510	-0.3139	-0.3673	0.0524	-0.0049
-0.0838	0.9447	-0.0818	0.2984	0.0436	-0.0316	0.0413	0.0006

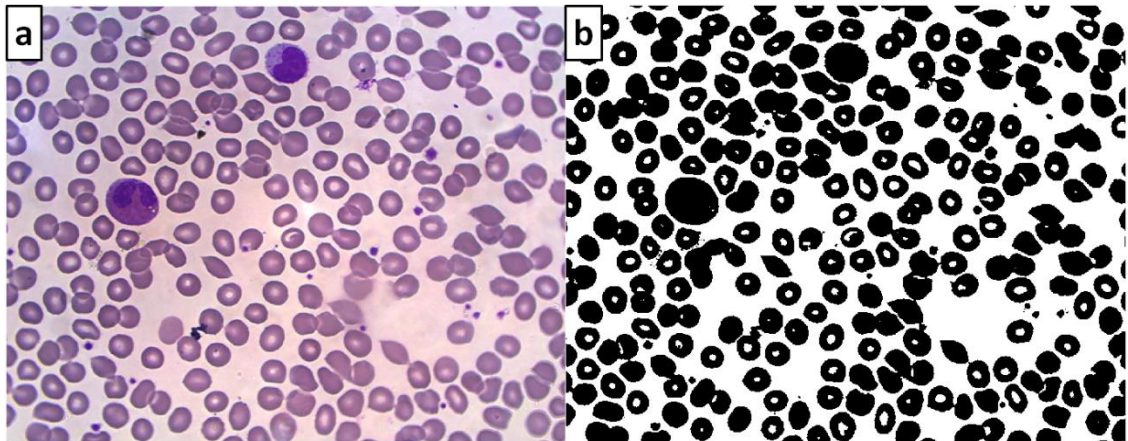
La matriz de transformación fue obtenida mediante la aplicación Análisis de Componentes Principales a un conjunto de 30 imágenes de frotis sanguíneos. Ésta matriz es utilizada para obtener una nueva estructura New_{im} de dimensiones $N \times M \times 8$, es decir, es una estructura conformada por 8 componentes de tamaño $N \times M$ (que también son las dimensiones de la imagen original) y en donde cada componente posee información independiente de las demás. En la sección 3.5.3.1 se dará una explicación más detallada acerca del Análisis de Componentes Principales.

A continuación se describe cada una de las cuatro componentes obtenidas al aplicar el proceso de la Figura 3.3, de acuerdo a la información que contiene cada una.

3.3.1 Componente Fondo.

Se obtiene al binarizar la primera componente de New_{im} mediante un valor umbral hallado por el método de umbralización **Otsu**. Esta componente posee información relevante del fondo de la imagen del frotis: los glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas en general aparecen en color negro, mientras que el fondo está en color blanco (ver Figura 3.4).

Figura 3.4 Componente Fondo. a) Imagen Original. b) Fondo.

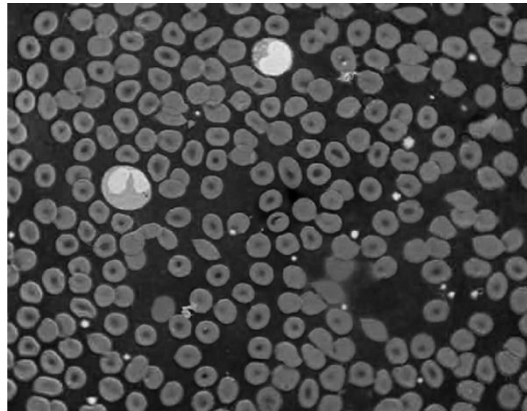


Fuente: Autores del proyecto.

3.3.2 Componente Núcleos.

Se obtiene al combinar las componentes S , Cb y el negativo de V . Como resultado se obtiene una componente con núcleos muy visibles y resaltados, como se aprecia en la Figura 3.5.

Figura 3.5 Componente Núcleos.

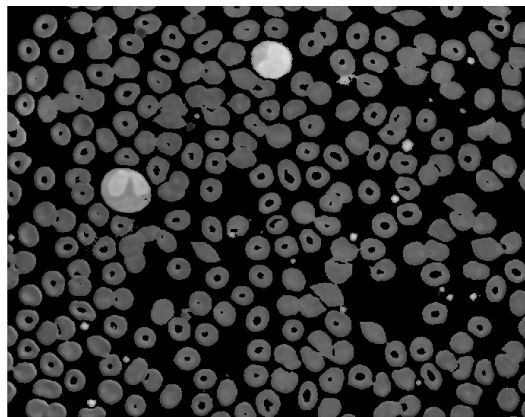


Fuente: Autores del proyecto.

3.3.3 Componente WBC.

Se obtiene al aplicar un **filtro de mediana** de tamaño 11×11 a la combinación de la tercera y al negativo de la séptima componente de New_{im} . Luego se elimina el fondo por medio de la *Componente Fondo*. En la Figura 3.6 se muestra la *Componente WBC*.

Figura 3.6 Componente WBC.



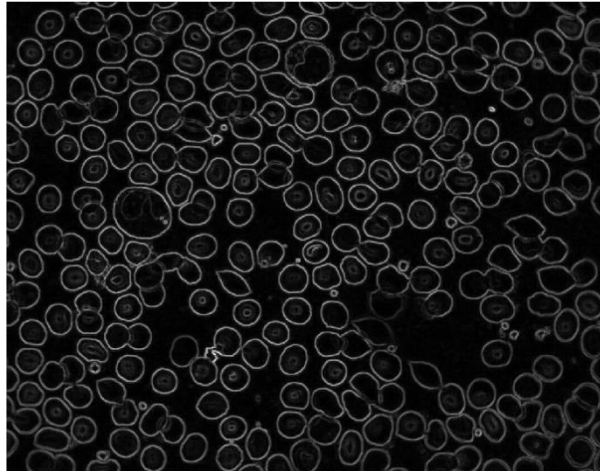
Fuente: Autores del proyecto.

3.3.4 Componente Textura.

La componente de textura se obtuvo al aplicar un **filtro de rango** a la primera componente de New_{im} . Ver Figura 3.7.

Esta componente presenta información acerca de la textura de los glóbulos blancos y será de gran utilidad en la representación de los mismos, debido a que mediante la textura se pueden describir factores de clasificación importantes como la granularidad y densidad de cromatina entre otros.

Figura 3.7 Componente Textura.



Fuente: Autores del proyecto.

3.4 SEGMENTACIÓN

Es en esta fase donde se procede a separar a los glóbulos blancos de los demás objetos de la imagen (glóbulos rojos, plaquetas y fondo del frotis).

La segmentación se basa en dos principios fundamentales:

- Discontinuidad o basada en bordes.
- Similitud o basada en regiones.

Debido a la necesidad de segmentar a los glóbulos blancos, que poseen cierta similitud entre ellos (Linfocitos, Monocitos y Granulocitos) y son bastante diferentes a los demás elementos del frotis, se optó por realizar una segmentación basada en regiones, más exactamente basada en el algoritmo de agrupamiento de las **k-medias**, debido a que éste permite dividir los objetos de una imagen en grupos, de acuerdo a ciertos parámetros de similitud (17).

La segmentación trabaja sobre tres de las cuatro componentes halladas en la fase de Pre-Procesamiento: *Componente Fondo*, *Componente Núcleos* y

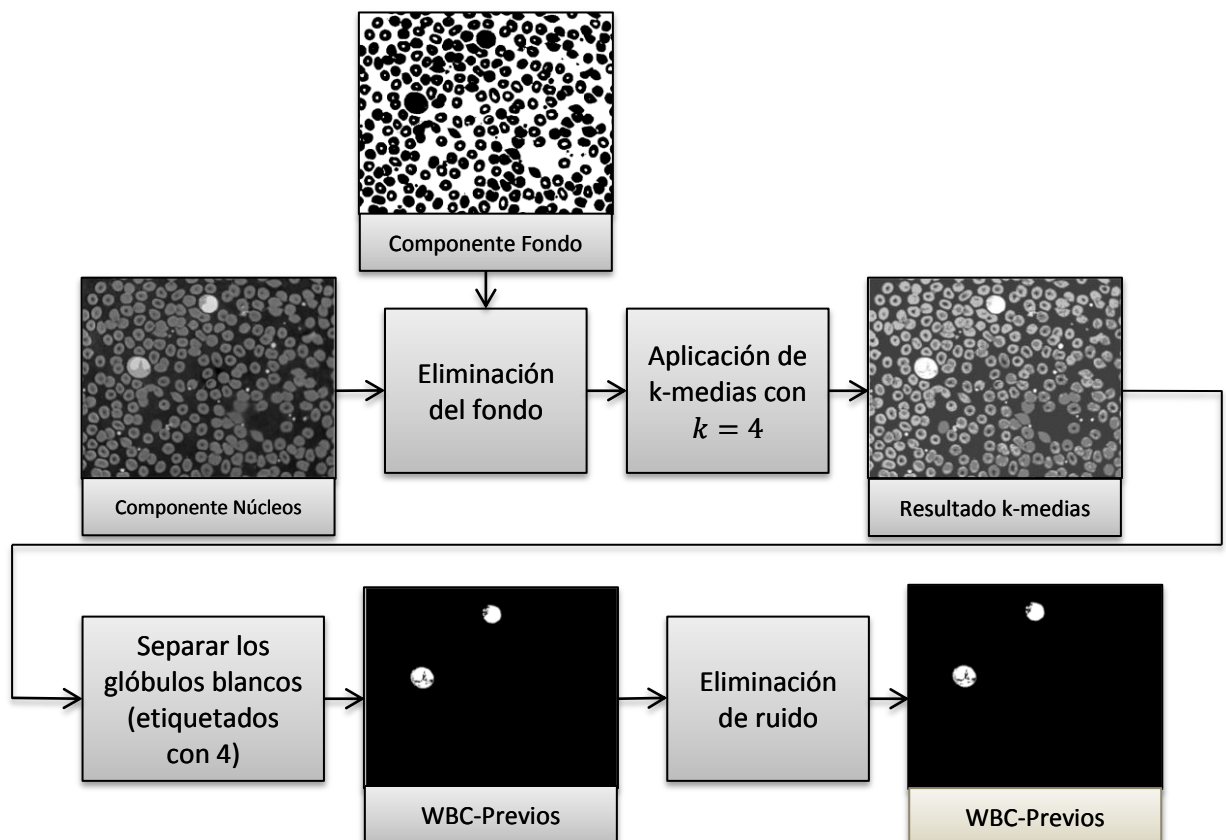
SOLUCIÓN PROPUESTA

Componente WBC, con el fin de extraer cada glóbulo blanco de la imagen y separarlos en dos regiones bien diferenciadas: núcleo y citoplasma.

3.4.1 Pasos Previos para la Obtención de Núcleos y Citoplasmas.

Aquí se explicará la manera en que se obtuvieron ciertas componentes que permitirán la extracción de núcleos y citoplasmas. En la Figura 3.8 se describe la obtención de una componente llamada *WBC-Previos*, la cual contiene información aproximada acerca de la posición de los glóbulos blancos, de gran utilidad en procesos siguientes.

Figura 3.8 Obtención de la Componente *WBC-Previos*.



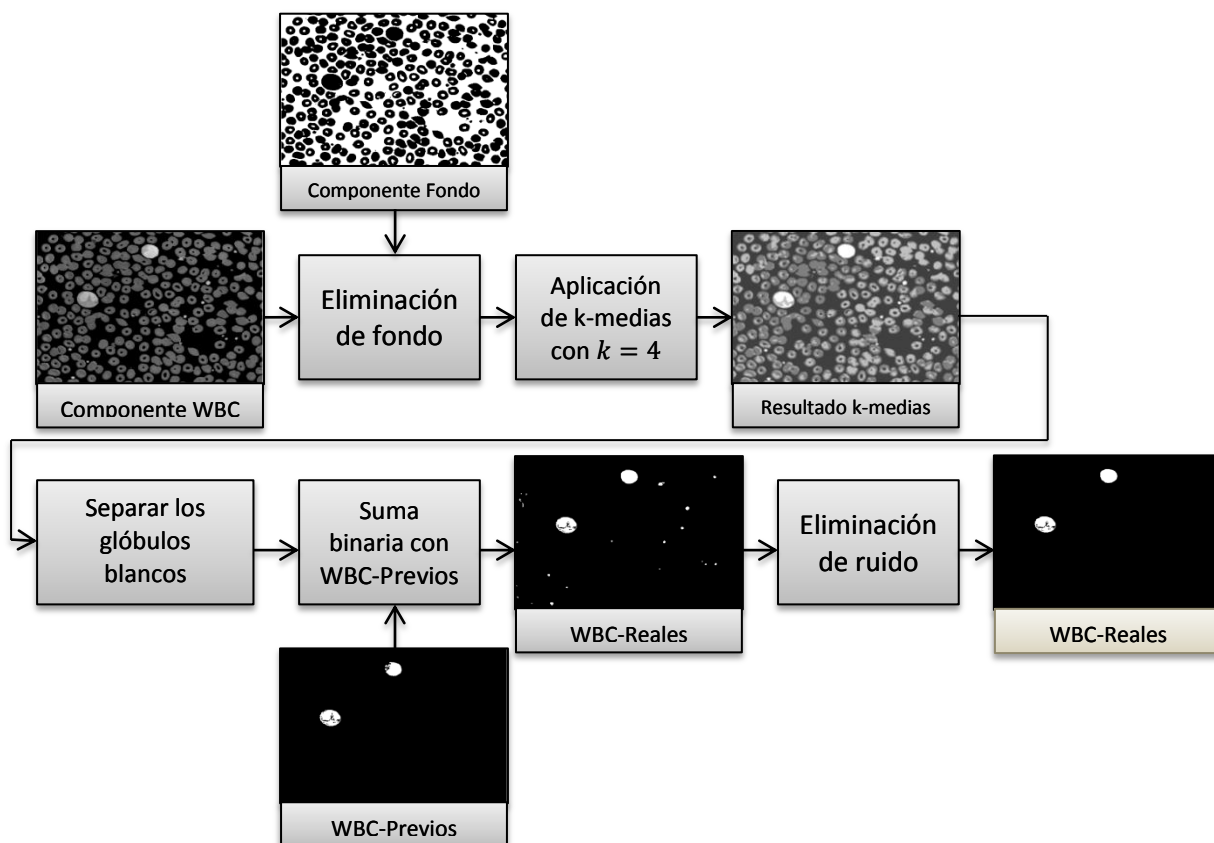
SOLUCIÓN PROPUESTA

La componente WBC-Previos es una imagen binaria, lo cual indica que los píxeles solo pueden tomar dos valores posibles (0 ó 1), en donde el color blanco corresponde a los píxeles con valor de 1 y el color negro a los píxeles con valores de 0.

La eliminación de ruido se hizo utilizando al área como criterio de descarte, en otras palabras, se eliminaron aquellas regiones detectadas que ocupaban un área pequeña como para ser consideradas como glóbulos blancos.

Para la consecución de una componente que abarque casi en su totalidad a las regiones correspondientes a los glóbulos blancos, se utilizó a la Componente WBC hallada en la fase de Pre-Procesamiento y la componente WBC-Previos hallada anteriormente. La obtención de esta componente, llamada WBC-Reales, se describe en la Figura 3.9.

Figura 3.9 Obtención de la Componente WBC-Reales.

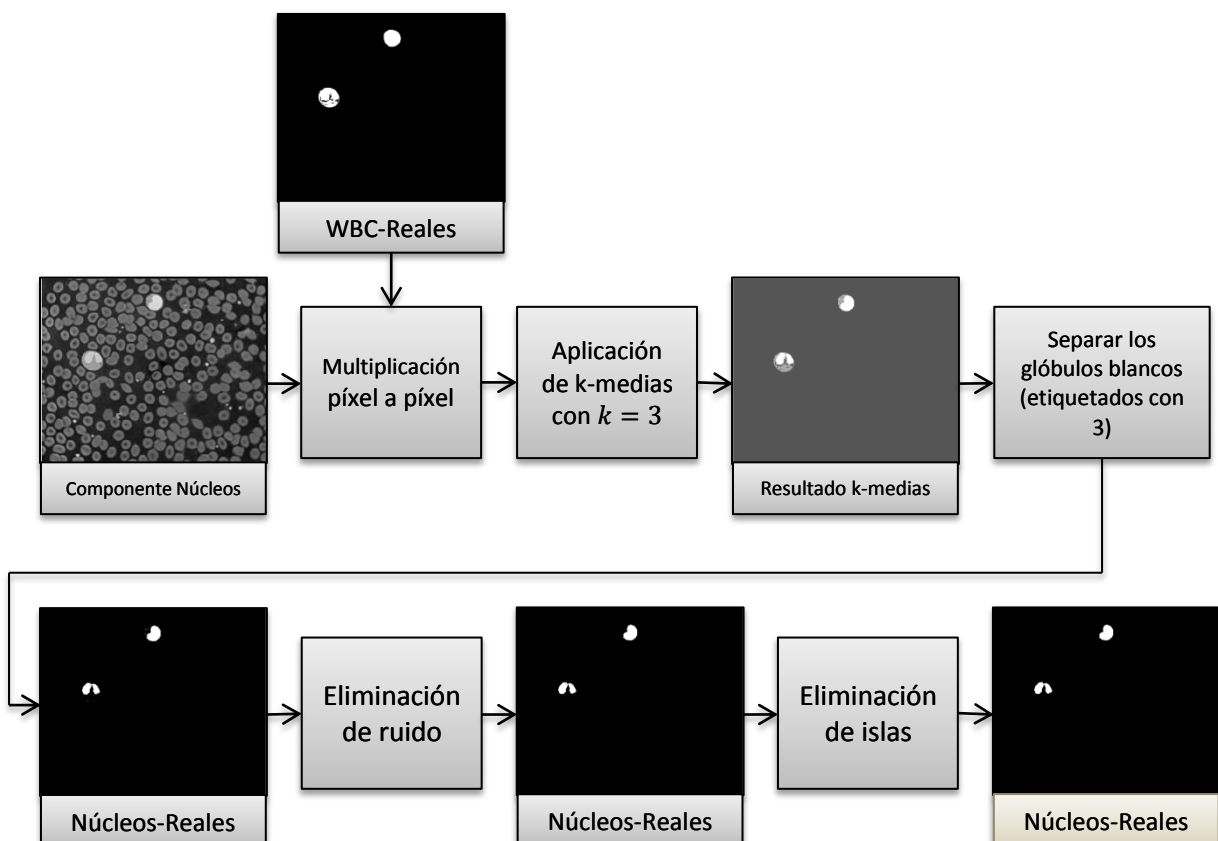


Al igual que en la consecución de la componente WBC-Previos, la eliminación de ruido se realizó teniendo en cuenta al área como criterio. La componente WBC-Reales obtenida es de carácter binario.

3.4.2 Segmentación de Núcleos.

Teniendo en cuenta la información de la componente WBC-Reales, la cual contiene información de la posición de los glóbulos blancos, se puede proceder a encontrar núcleos en esas posiciones, debido a que todos los glóbulos blancos poseen núcleo. En la Figura 3.10 se muestra el proceso de la segmentación de los núcleos.

Figura 3.10 Segmentación de Núcleos.



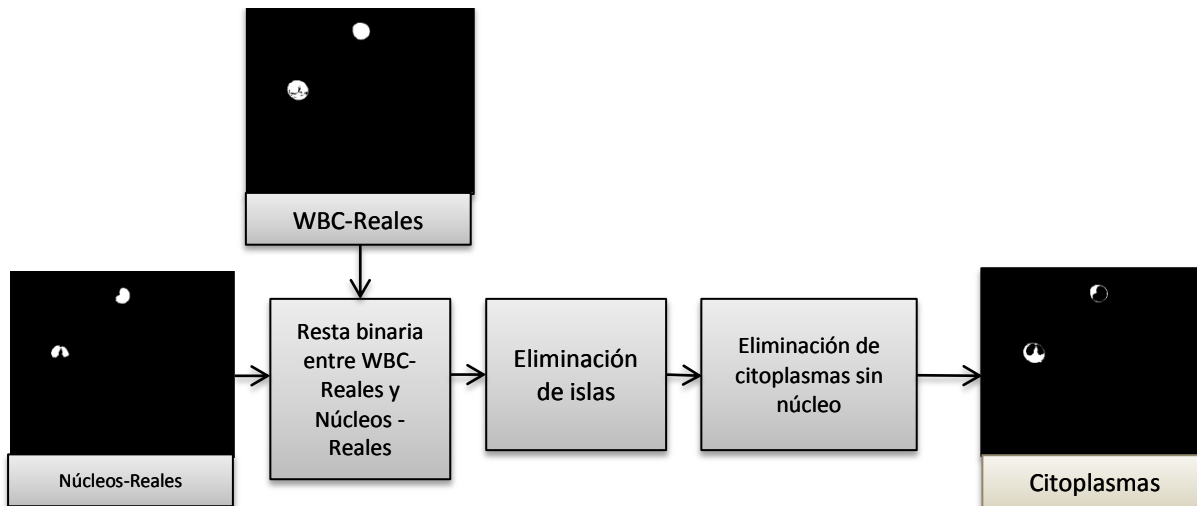
SOLUCIÓN PROPUESTA

La eliminación de islas (pequeños huecos no deseados en la segmentación) se realizó por medio de un cierre de morfología matemática, utilizando un elemento estructurante de tipo disco.

3.4.3 Segmentación de Citoplasmas.

Para la segmentación de los citoplasmas se usó como base la componente WBC-Reales (Figura 3.9) y la componente Núcleos-Reales (Figura 3.10), y al igual que en la segmentación de los núcleos se utilizó un cierre morfológico para la eliminación de islas. También se eliminó a aquellos citoplasmas que en la segmentación de los núcleos no se les halló ninguno. Puesto que todos los glóbulos blancos poseen núcleo, la detección de un citoplasma sin núcleo es un error que debe ser eliminado. La segmentación de los citoplasmas se ilustra en la Figura 3.11.

Figura 3.11 Segmentación de Citoplasmas.



3.5 REPRESENTACIÓN Y DESCRIPCIÓN

Una vez segmentados los glóbulos blancos en la imagen se procede a representarlos o describirlos de manera matemática, con el fin de obtener

SOLUCIÓN PROPUESTA

métricas de comparación que permitan su posterior clasificación. Basándose en los criterios de clasificación de los especialistas (ver sección 3.1), se deben extraer dos tipos de características: de región y de textura.

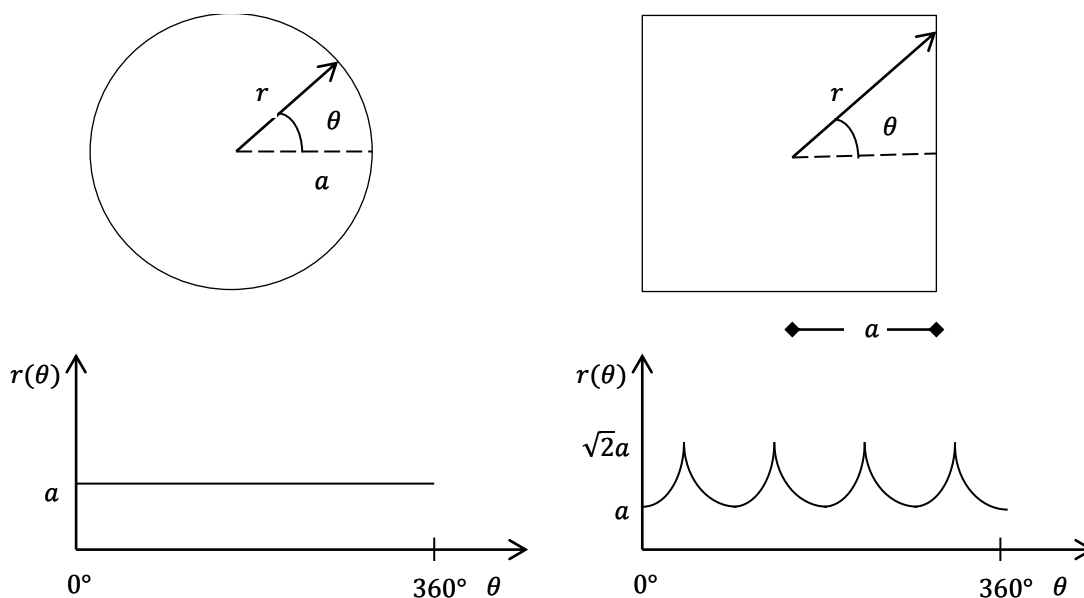
3.5.1 Características de Región.

Son aquellas características que definen las propiedades geométricas de las regiones, y en el caso de los glóbulos blancos, pueden ser representadas por medio de los siguientes descriptores:

3.5.1.1 Desviación de la Firma del Núcleo.

La firma o signatura de una región consiste en la representación unidimensional de la frontera de dicha región. Se calcula determinando la distancia desde el centroide de la región, hasta su borde en función de un ángulo que varía entre 0° y 360° (18) (ver Figura 3.12).

Figura 3.12 Firma o Signatura para un Círculo y un Cuadrado Respectivamente.



Fuente: Visión por Computador, Gonzalo Pajares, Jesús M. de la Cruz. Alfaomega Ra-Ma. Capítulo 8.6.2 Signaturas.

SOLUCIÓN PROPUESTA

Para regiones perfectamente circulares la desviación estándar de la firma es exactamente igual a cero debido a que para cada ángulo, la distancia desde el centroide de la figura hasta su borde va a ser exactamente su radio, por lo que se obtiene una función constante y su desviación estándar será cero. Se puede deducir que para regiones irregulares la desviación de la firma tiende a tomar un número muy positivo mientras que para regiones semi-circulares va a tender a cero. La ecuación 4.1 define a la desviación de la firma.

$$desv_{firma} = \left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\varphi_i - \bar{\varphi})^2 \right)^{1/2} \quad (4.1)$$

$$\bar{\varphi} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \varphi_i$$

Donde φ_i es el i -ésimo dato de la firma de la figura, $\bar{\varphi}$ es la media de dichos datos y n es la cantidad de datos contenidos en φ .

Aplicando el método de la desviación de la firma a los núcleos de los glóbulos blancos podemos obtener una aproximación de la variación de su forma, que es equivalente a la apreciación que realiza el especialista sobre la forma nuclear.

3.5.1.2 Relación Área Núcleo-Célula.

Esta relación indica el porcentaje que ocupa el núcleo del glóbulo blanco en relación con toda la célula. Su cálculo se describe en la ecuación 4.2.

$$Rel_{nucleo-celula} = \frac{\text{Área Núcleo}}{\text{Área Célula}} \quad (4.2)$$

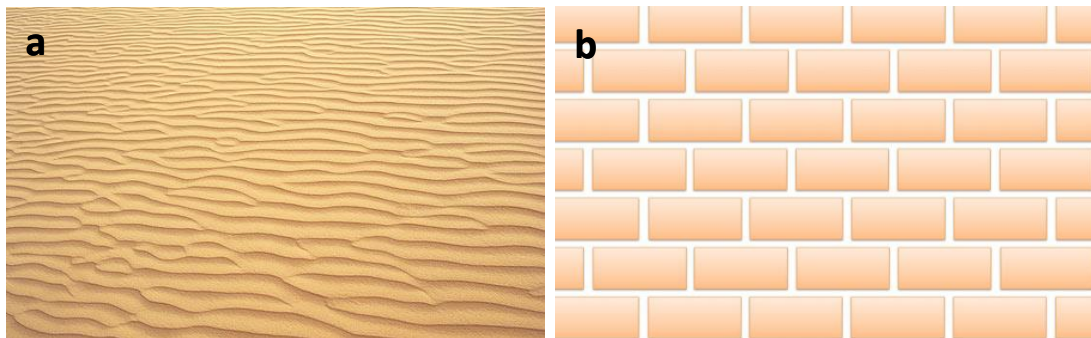
SOLUCIÓN PROPUESTA

Este descriptor toma valores entre cero y la unidad. Entre más espacio ocupe el núcleo dentro de la célula la relación entre el área del núcleo y el área de la célula tenderá a la unidad.

3.5.2 Características de Textura.

Aunque existan diferentes definiciones de textura dependiendo del ámbito en el que se hable, y no haya sido explicada con generalidad en términos matemáticos, se puede definir a la textura como una propiedad en la organización de los elementos constituyentes de una superficie y que se repite formando un patrón (19). Este patrón de repetición no es siempre de carácter determinístico, puede ser regular o incluso aleatorio.

Figura 3.13 Tipos de Texturas: a) Aleatoria. b) Determinista.



Actualmente existen estándares para definir el término textura, y en el contexto del procesamiento digital de imágenes el estándar **IEEE 610.4** define a la textura como: “Un atributo que presenta la distribución espacial de los niveles de gris de una determinada región” (20).

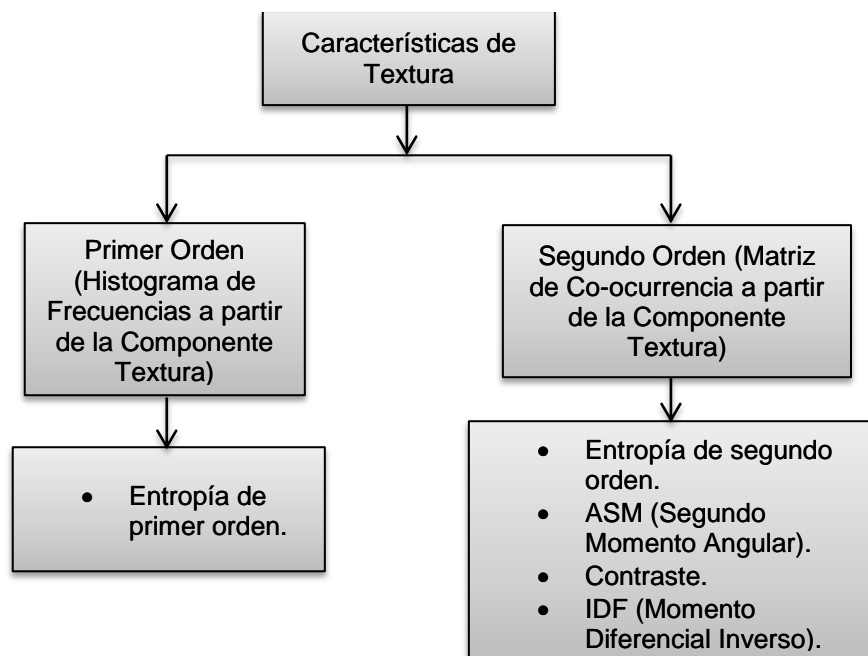
La Figura 3.13 muestra los dos tipos de textura que se pueden encontrar. Las texturas deterministas presentan un patrón base constante y con repetición periódica, mientras que las texturas aleatorias no tienen un patrón base uniforme ni son periódicas.

SOLUCIÓN PROPUESTA

La medición de texturas se puede tratar como un problema de reconocimiento de patrones (21), esto debido a que no siempre posee una distribución espacial uniforme o regular, y por tanto describirla mediante modelos estadísticos es más eficiente. También se puede describir desde el punto de vista de la frecuencia o del dominio espacial, sin embargo, el análisis de texturas en frecuencia se suele utilizar en problemas deterministas y no es conveniente usarlo en glóbulos blancos ya que no puede asegurarse la periodicidad y uniformidad de los patrones de textura. Por esta razón se optó por estadísticas que actúan sobre los niveles de gris, específicamente mediciones estadísticas de primer y segundo orden.

En la realización de este proyecto se optó por dos tipos de textura: De primer orden o basadas en el histograma de frecuencias de los niveles de gris, y de segundo orden o basadas en la matriz de co-ocurrencia. En la Figura 3.14 se describen las características de textura utilizadas.

Figura 3.14 Características de Textura Utilizadas.



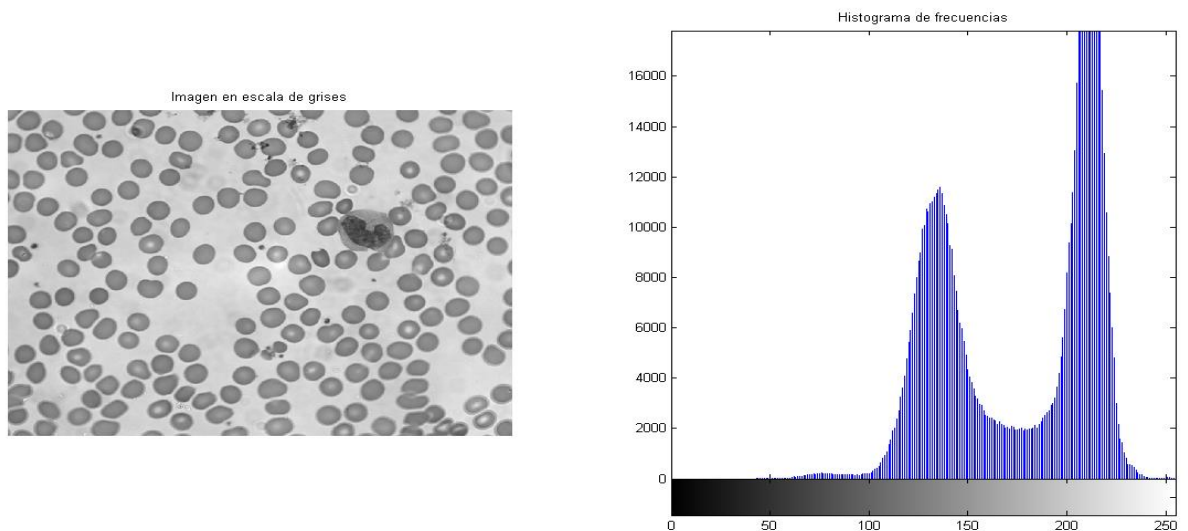
SOLUCIÓN PROPUESTA

La imagen utilizada para el cálculo del histograma de frecuencias de los niveles de gris y de la matriz de co-ocurrencia fue la *Componente Textura* hallada en la fase de Pre-Procesamiento (sección 3.3.4).

3.5.2.1 Histograma de Frecuencias de Niveles de Gris.

El histograma de una imagen o región representa el número de píxeles de la imagen o región en función de sus niveles de intensidad (ver Figura 3.15). Mediante el histograma se puede obtener información espacial referente a la región que se desee analizar, en este caso a los glóbulos blancos presentes en la imagen.

Figura 3.15 Imagen en Escala de Grises y su Histograma de Frecuencias.



Fuente: Autores del Proyecto.

3.5.2.1.1 Entropía de Primer Orden o Basada en el Histograma de Frecuencias:

Se basa en el concepto de entropía de Shannon, e indica la aleatoriedad o desorden en el histograma de frecuencias de los niveles de gris. La entropía de primer orden se define en la ecuación 4.3.

SOLUCIÓN PROPUESTA

$$H_x = - \sum_{i=0}^L p_i \log_2 p_i \quad (4.3)$$

Donde L es la intensidad máxima de los niveles de gris (en caso de imágenes de 8 bits $L = 255$) y p_i es la probabilidad de que aparezca el nivel de gris i en la región de la imagen que se está analizando. La probabilidad p_i se puede obtener a partir del histograma de frecuencias de la siguiente manera:

$$p_i = \frac{h_i}{N}$$

En donde h_i es la frecuencia con que aparece el nivel de gris i en la región de interés y N es el número total de píxeles que conforman dicha región a la que se le quiere calcular su entropía. Sin embargo, al ser la entropía la medida directa del desorden de un sistema, el valor que adquiere depende del “tamaño” de dicho sistema o de su número de estados posibles, por lo que la verdadera medida de la entropía de un sistema está dada por su entropía relativa, mostrada matemáticamente en la ecuación 4.4.

$$H_{rx} = \frac{H_x}{H_{max}} \quad (4.4)$$

$$H_{max} = \log_2 M \quad (4.4.1)$$

Donde M es el número de estados posibles del sistema. En el contexto del Tratamiento Digital de Imágenes M es el número de intensidades de niveles de gris que componen a la región de interés.

3.5.2.2 Matriz de Co-ocurrencia (GLCM).

La matriz de co-ocurrencia o GLCM (Gray Level Co-occurrence Matrix) contiene información espacial sobre la posición relativa entre niveles de intensidad, es decir, es un histograma de frecuencias bidimensional.

Para una imagen I su matriz de co-ocurrencia se define en base a dos parámetros: Una distancia d y una orientación θ . El elemento $GLCM_d^\theta(i, j)$ corresponde a la probabilidad de que un píxel de intensidad i se encuentra a un ángulo θ ó $\theta + 180^\circ$ y a una distancia d de un píxel de intensidad j dentro de la imagen I . La matriz de co-ocurrencia es siempre simétrica y de tamaño $(L + 1) \times (L + 1)$, donde L es la intensidad máxima de los niveles de gris.

En este proyecto se utilizó cuatro variantes de esta matriz, para las orientaciones de $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ y 135° y todas a una distancia $d = 1$.

3.5.2.2.1 Entropía de Segundo Orden:

Al igual que la entropía de primer orden se basa en los conceptos de entropía de Shannon, la diferencia es que ésta se calcula a partir de las probabilidades que genera la matriz de co-ocurrencia.

La ecuación 4.5 indica la entropía de segundo orden para una orientación θ , es decir, para cada una de las cuatro matrices de co-ocurrencia calculadas, por lo que también habrá cuatro variantes de la entropía de segundo orden para el mismo glóbulo blanco.

$$H_{xy}^\theta = - \sum_{i=0}^L \sum_{j=0}^L GLCM_1^\theta(i, j) \log_2 (GLCM_1^\theta(i, j)) \quad (4.5)$$

La entropía de segundo orden, H_{xy} adquiere valores pequeños cuanto más suave sea la textura, es decir, es menos aleatoria. También, al igual que la

SOLUCIÓN PROPUESTA

entropía de primer orden se debe utilizar a la entropía relativa para tener un valor que pueda ser comparado independientemente de los grados de libertad del sistema; para esto se utiliza la ecuación 4.6.

$$H_{rxy}^{\theta} = \frac{H_{xy}^{\theta}}{H_{max}} \quad (4.6)$$

H_{max} se puede hallar por medio de la ecuación 4.4.1.

El valor de la entropía de segundo orden que se va a utilizar como descriptor será la media aritmética de las cuatro entropías calculadas, como se expresa en la ecuación 4.7.

$$H_{rxy} = \frac{H_{rxy}^{0^{\circ}} + H_{rxy}^{45^{\circ}} + H_{rxy}^{90^{\circ}} + H_{rxy}^{135^{\circ}}}{4} \quad (4.7)$$

3.5.2.2.2 ASM:

EL Segundo Momento Angular o Angular Second Moment en inglés, representa la energía de la región de interés. El ASM para una orientación θ se calcula mediante la ecuación 4.8.

$$ASM^{\theta} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} \left(GLCM_1^{\theta}(i, j) \right)^2 \quad (4.8)$$

El ASM toma valores grandes cuanto más suave es la textura, y para intensidades constantes es exactamente igual a la unidad.

Para calcular el descriptor definitivo (ecuación 4.9) del ASM se promedia los cuatro valores obtenidos por cada orientación.

SOLUCIÓN PROPUESTA

$$ASM = \frac{ASM^{0^\circ} + ASM^{45^\circ} + ASM^{90^\circ} + ASM^{135^\circ}}{4} \quad (4.9)$$

3.5.2.2.3 Contraste:

Calcula el valor del contraste a partir de la matriz de co-ocurrencia. El contraste para una orientación θ se obtiene mediante la ecuación 4.10, y su descriptor definitivo se describe mediante la ecuación 4.11.

$$CON^\theta = \sum_{i=0}^L \sum_{j=0}^L (i-j)^2 GLCM_1^\theta(i,j) \quad (4.10)$$

$$CON = \frac{CON^{0^\circ} + CON^{45^\circ} + CON^{90^\circ} + CON^{135^\circ}}{4} \quad (4.11)$$

3.5.2.2.4 IDF:

El Momento Diferencial Inverso o Inverse Difference Moment en inglés, representa la homogeneidad de una región y es inversamente proporcional al contraste. Cuanto menor sea el contraste, IDF tomará valores grandes. Su valor puede ser calculado a partir de la ecuación 4.12, y su descriptor definitivo se expresa en la ecuación 4.13.

$$IDF^\theta = \sum_{i=0}^L \sum_{j=0}^L \frac{GLCM_1^\theta(i,j)}{1 + (i-j)^2} \quad (4.12)$$

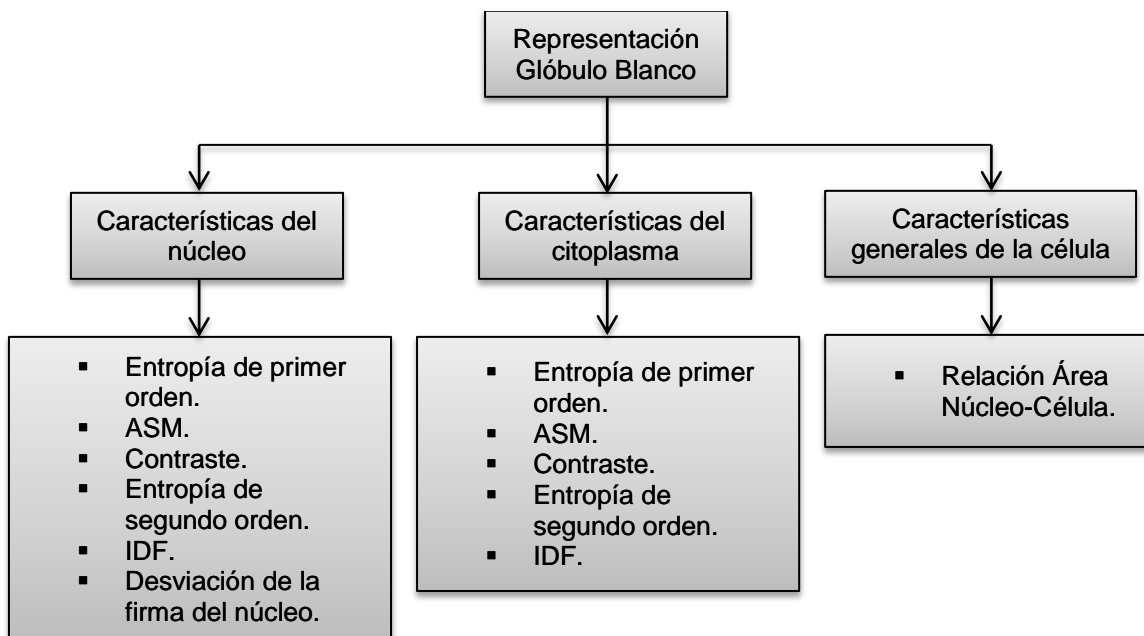
$$IDF = \frac{IDF^{0^\circ} + IDF^{45^\circ} + IDF^{90^\circ} + IDF^{135^\circ}}{4} \quad (4.13)$$

Teniendo en cuenta las características de región y de textura mencionadas anteriormente se procedió a describir los glóbulos blancos de la siguiente manera (ver Figura 3.16), dividiendo su representación en tres partes:

SOLUCIÓN PROPUESTA

características que describirán al núcleo, características que describirán al citoplasma y características generales del glóbulo blanco.

Figura 3.16 Características Extraídas para la Representación Matemática de Glóbulos Blancos.



Para cada glóbulo blanco que se encuentre en la imagen se le extraerán los tres tipos de características ya mencionados, y se procederá a crear tres matrices (una por cada tipo de características), en donde cada fila de cada matriz representa a un mismo glóbulo blanco encontrado en la imagen, y cada una de las columnas representa un parámetro que mide ya sea textura o geometría de una región. A continuación en la Tabla 3.2, la Tabla 3.3 y la Tabla 3.4 se muestra el formato utilizado para las matrices de características.

Tabla 3.2 Formato para la Matriz de Características de los Núcleo.

	Entropía de primer orden	ASM	Contraste	Entropía de segundo orden	IDF	Desviación
Núcleo del glóbulo blanco	Valor1	Valor2	Valor3	Valor4	Valor5	Valor6

Tabla 3.3 Formato para la Matriz de Características de los Citoplasmas.

	Entropía de primer orden	ASM	Contraste	Entropía de segundo orden	IDF
Citoplasma del glóbulo blanco	Valor1	Valor2	Valor3	Valor4	Valor5

Tabla 3.4 Formato para la Matriz de Características de la Célula en General.

	Relación Área Núcleo-Célula
Núcleo-Citoplasma del glóbulo blanco	Valor1

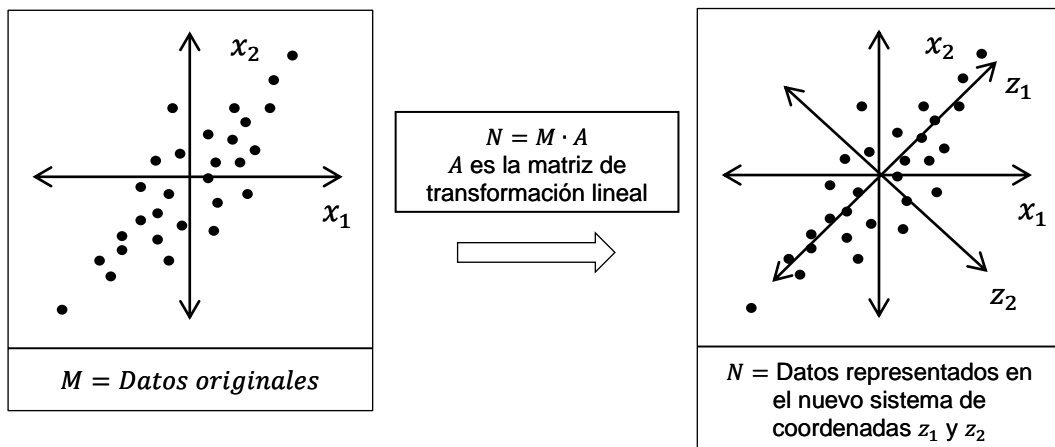
3.5.3 Reducción De Dimensionalidad.

Una vez obtenido el conjunto de características generales de la célula, del núcleo y del citoplasma, se procede a determinar cuáles características de cada conjunto están relacionadas entre sí para eliminar la información redundante. Es por ello que se utiliza el Análisis de Componentes Principales o PCA, que en sus siglas en inglés significan Principal Component Analysis.

3.5.3.1 Análisis De Componentes Principales (PCA).

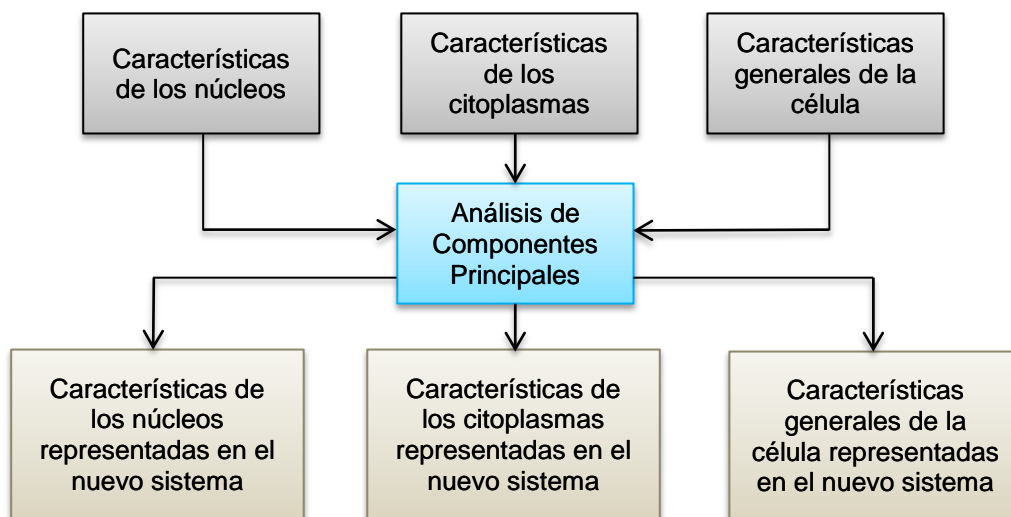
El PCA permite determinar qué componentes o características representan la mayor variabilidad del sistema medido, por lo que puede ser aprovechado para eliminar variables del sistema que contengan información redundante (22). Básicamente la funcionalidad del PCA consiste en realizar una Transformación Lineal sobre los datos originales para que, en el nuevo sistema de representación, la información quede lo más ortogonalmente posible, y de esta manera determinar cuáles son las nuevas componentes que representarán al sistema en su totalidad (Ver Figura 3.17). El criterio utilizado para establecer cuáles son los componentes que representan al sistema es la varianza acumulada, la cual, entre mayor sea, favorece la representación total del sistema.

Figura 3.17 PCA para un Conjunto de Datos.



El PCA es un proceso que requiere de un determinado número de muestras para obtener una matriz de Transformación Lineal que pueda ortogonalizar datos del mismo tipo (Ver Figura 3.18). Como las características extraídas son diferentes tanto para el núcleo, citoplasma y la célula en general, es necesario aplicar PCA a cada conjunto de características, como se puede apreciar en la Figura 3.18.

Figura 3.18 PCA Aplicado a las Características de Glóbulos Blancos.



Para hallar las matrices de transformación se utilizó una muestra de 330 glóbulos blancos, todos bien segmentados, con el fin de no entregar

SOLUCIÓN PROPUESTA

información errónea al PCA. En la elección de las componentes principales de las nuevas representaciones, se eligieron las componentes cuyas varianzas acumuladas lograran ser 1, es decir, aquellas componentes que reprodujeran al sistema en su totalidad sin ningún tipo de pérdida.

El número de componentes necesarias para la total representación de los núcleos, citoplasmas y características generales de la célula se ve reflejado en la cantidad de columnas que posee cada matriz de transformación, mientras que la cantidad de filas es igual a la cantidad de descriptores utilizados en la representación original.

La matriz utilizada para la transformación de las características de los núcleos se muestra a continuación.

$$M_t_{\text{Núcleos}} = \begin{pmatrix} 2.1554851e-004 & 4.9715132e-003 \\ -1.4023465e-005 & -4.0711078e-004 \\ 9.9998344e-001 & -5.7443450e-003 \\ 1.9169652e-004 & 4.1941650e-003 \\ -2.6921846e-004 & -4.9966821e-003 \\ 5.7413117e-003 & 9.9994978e-001 \end{pmatrix}$$

Para la transformación de las características de los citoplasmas se obtuvo la siguiente matriz.

$$M_t_{\text{Citoplasmas}} = \begin{pmatrix} 2.1446821e-004 \\ -2.6071052e-006 \\ 9.9999993e-001 \\ 1.7966264e-004 \\ -2.3216370e-004 \end{pmatrix}$$

La matriz de transformación para las características de la célula general es la matriz identidad de tamaño 1×1 , debido a que la **Relación Área Núcleo-Célula** es el único descriptor utilizado para extraer dichas características.

$$Mt_Célula_General = \begin{vmatrix} 1 \end{vmatrix}$$

3.6 RECONOCIMIENTO E INTERPRETACIÓN

Definido ya el conjunto de características de representación de los glóbulos blancos de la imagen, se procede a clasificar a cada uno en alguno de los siguientes tres grupos: Linfocitos, Monocitos o Granulocitos.

Debido a la similitud e incertidumbre presente entre los tres grupos a clasificar, se decidió implementar un algoritmo basado en inteligencia artificial para realizar la clasificación, más exactamente, se implementó una **Red Neuronal Artificial**. Las redes neuronales artificiales han conseguido una gran aceptación en proyectos con objetivos similares (23), (24), (25), (26), (27) y debido a sus desempeños como clasificadores universales, su uso para resolver problemas ambiguos y subjetivos es bastante común.

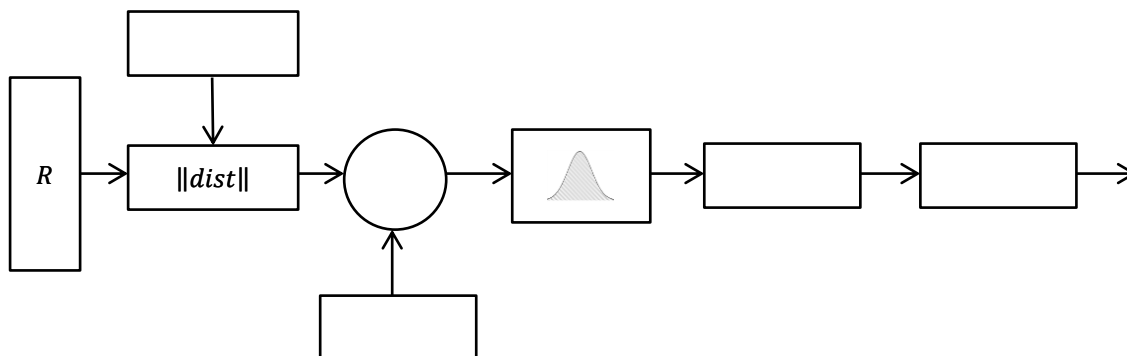
3.6.1 Arquitectura de la Red Neuronal.

Se eligió una Red Neuronal de **Función de Base Radial** o Radial Basis Function en inglés (RBF), debido a que poseen la propiedad particular de maximizar la distancia entre grupos y además requieren de menor tiempo para su entrenamiento. Son un modelo híbrido que utiliza tanto aprendizaje supervisado como no-supervisado (28).

En este proyecto se utilizó una Red Neuronal Probabilística (RNP), con función de base radial, debido a que el problema a resolver es de clasificación y no de aproximación, lo cual conlleva a que la red requiera del uso de la estadística para hallar la probabilidad de que las características de cierto glóbulo blanco caigan dentro de uno de los tres grupos de clasificación (Linfocitos, Monocitos, Granulocitos).

SOLUCIÓN PROPUESTA

Figura 3.19 Arquitectura de la Red Utilizada para la Clasificación. R es el vector de entradas, W son los pesos de la primera capa, $\|dist\|$ es una función de distancia, b_1 es el umbral, LW son los pesos de la segunda capa, C es una función de transferencia compete.



Fuente: Las Redes Neuronales Supervisadas. Pablo García Estévez. 2005.

En la Figura 3.19 se muestra la arquitectura de la Red Neuronal Probabilística utilizada. La red se compone de tres capas: una de entradas, una capa oculta y una de salidas. Cuando una entrada es presentada a la red, la función $\|dist\|$ determina la distancia o acercamiento entre las entradas y los vectores de entrenamiento, los cuales son multiplicados por un umbral y luego enviados a una función de base radial. Este resultado es sumado para cada una de las clases a clasificar, y por último una función de transferencia elige a la clase con la máxima probabilidad.

3.6.2 Entrenamiento.

El conjunto de datos utilizado para el entrenamiento de la red fue el mismo conjunto que se utilizó para la obtención de las matrices de ortogonalización en el proceso de Reducción de Dimensionalidad (sección 3.5.3); esto se hizo con el fin de optimizar el conjunto de imágenes adquiridas. En total la red neuronal se entrenó con 330 glóbulos blancos distribuidos de la siguiente manera:

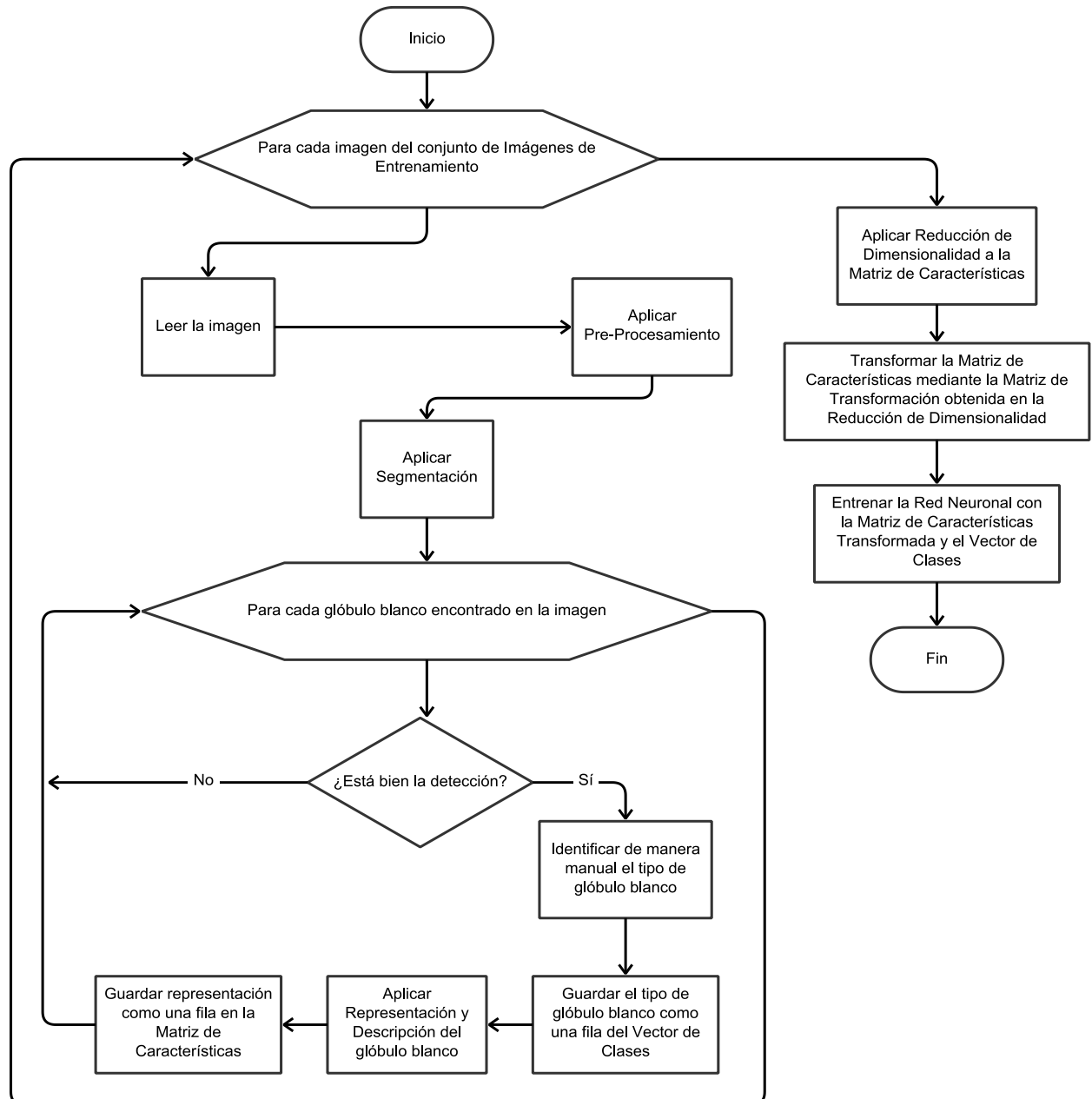
- 130 Linfocitos.
- 60 Monocitos.
- 140 Granulocitos.

El algoritmo de entrenamiento fue diseñado en **MATLAB**, cuyo objetivo consistió en leer un conjunto de imágenes predeterminadas de frotis

SOLUCIÓN PROPUESTA

sanguíneos, luego se les aplicó el algoritmo de reconocimiento de glóbulos blancos descrito en las secciones 3.3 a 3.5, el cual señaló los glóbulos blancos presentes en la imagen de a uno por uno. Con la ayuda de un bacteriólogo se le indicó al algoritmo de entrenamiento qué tipo de glóbulo blanco fue detectado. La Figura 3.20 expone el algoritmo de entrenamiento utilizado.

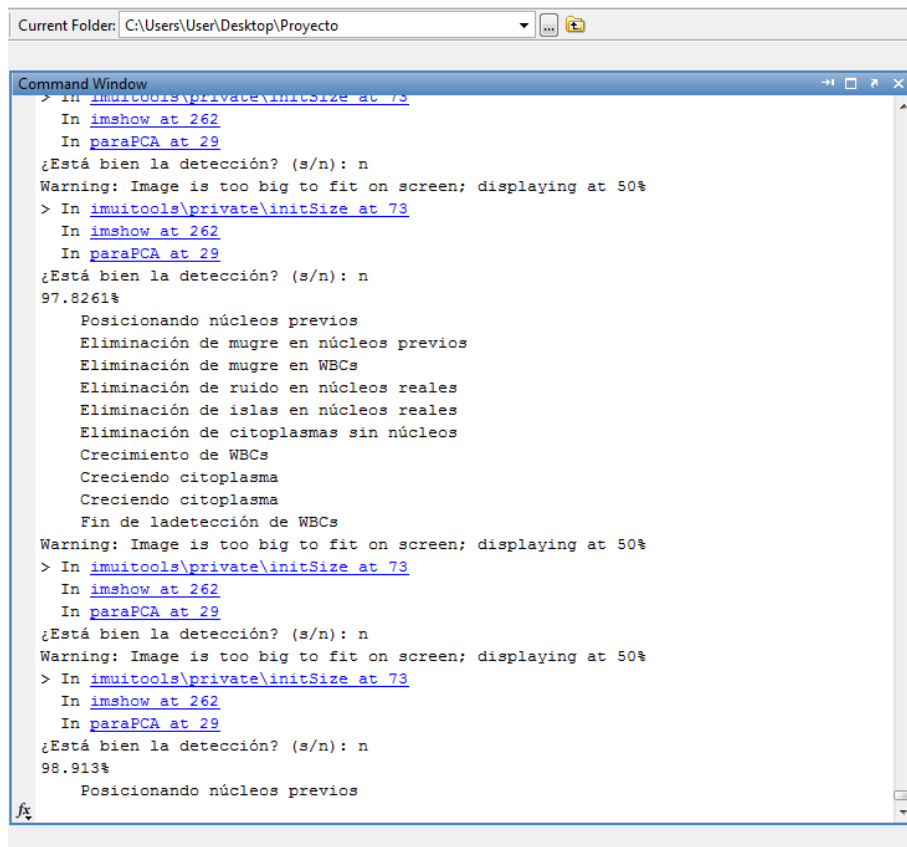
Figura 3.20 Algoritmo de Entrenamiento.



SOLUCIÓN PROPUESTA

La Figura 3.21 y la Figura 3.22 muestran al algoritmo de entrenamiento en ejecución.

Figura 3.21 Algoritmo de Entrenamiento en Ejecución.



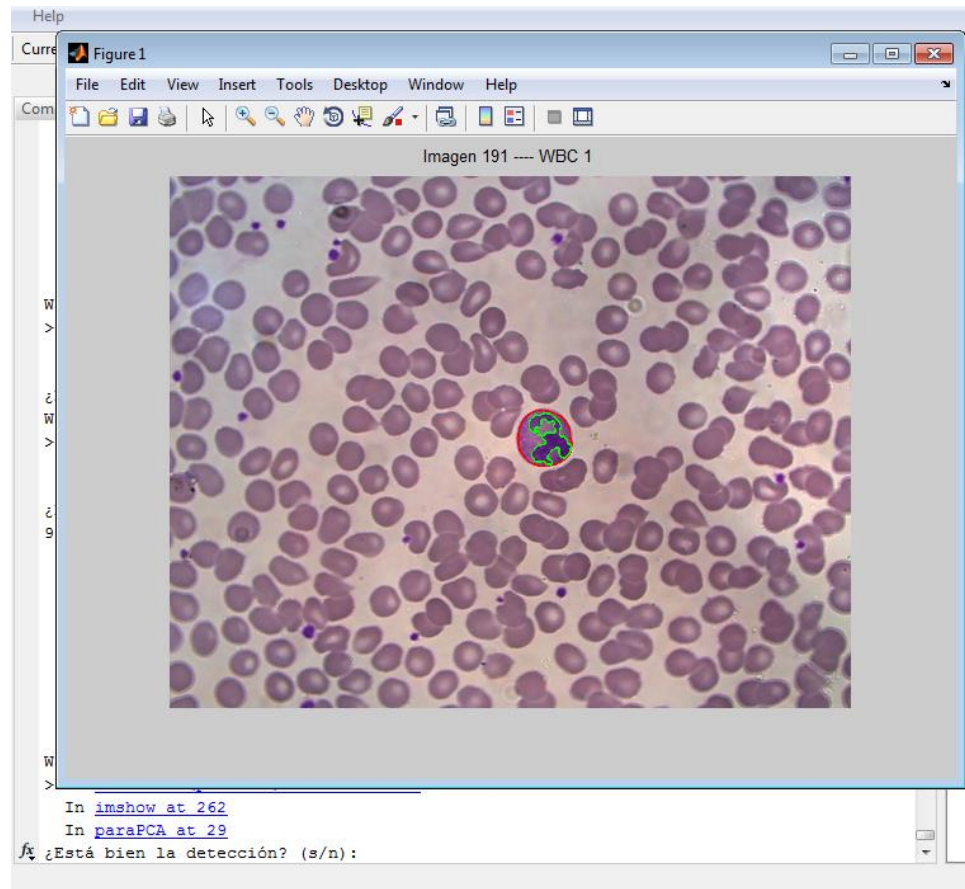
```
Current Folder: C:\Users\User\Desktop\Proyecto

Command Window
> In imuitools\private\initSize at 73
In imshow at 262
In paraPCA at 29
¿Está bien la detección? (s/n): n
Warning: Image is too big to fit on screen; displaying at 50%
> In imuitools\private\initSize at 73
In imshow at 262
In paraPCA at 29
¿Está bien la detección? (s/n): n
97.8261%
    Posicionando núcleos previos
    Eliminación de mugre en núcleos previos
    Eliminación de mugre en WBCs
    Eliminación de ruido en núcleos reales
    Eliminación de islas en núcleos reales
    Eliminación de citoplasmas sin núcleos
    Crecimiento de WBCs
    Creciendo citoplasma
    Creciendo citoplasma
    Fin de ladetección de WBCs
Warning: Image is too big to fit on screen; displaying at 50%
> In imuitools\private\initSize at 73
In imshow at 262
In paraPCA at 29
¿Está bien la detección? (s/n): n
Warning: Image is too big to fit on screen; displaying at 50%
> In imuitools\private\initSize at 73
In imshow at 262
In paraPCA at 29
¿Está bien la detección? (s/n): n
98.913%
    Posicionando núcleos previos
```

Fuente: Autores del proyecto.

En la Figura 3.22, se muestra el resultado de aplicar Pre-Procesamiento y Segmentación a una imagen; se muestra con un borde de color rojo a la región perteneciente al citoplasma y en color verde a la región perteneciente al núcleo. En el fondo se observa que el algoritmo pregunta al bacteriólogo si el glóbulo blanco está bien detectado; en caso de que sí lo esté, se le pedirá al bacteriólogo que señale la clase o tipo al que pertenece ese glóbulo blanco. En caso de que se le indique al algoritmo que la detección no está bien, se ignora ese glóbulo blanco y no se tendrá en cuenta para el entrenamiento de la red neuronal.

Figura 3.22 Algoritmo de Entrenamiento Preguntando Si la Detección Fue Satisfactoria.

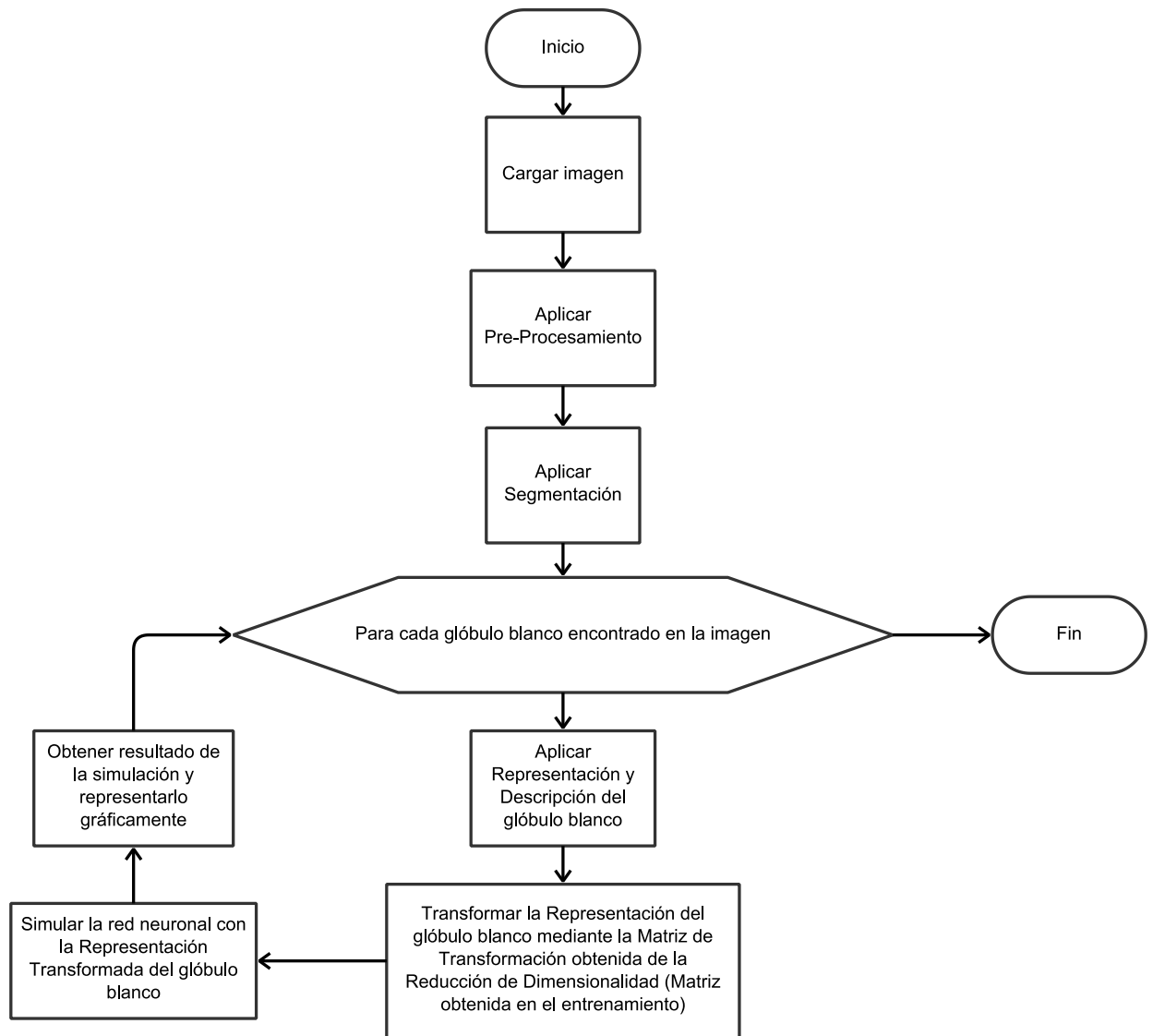


3.6.3 Algoritmo Clasificador.

Una vez la Red Neuronal sea entrenada, se puede empezar a simularla. El objetivo es que la red sea capaz de clasificar glóbulos blancos diferentes a los que ya conoce por medio del entrenamiento. El algoritmo clasificador resulta ser algo similar al de entrenamiento (Figura 3.20), con la diferencia más notoria de que la red no se va a entrenar sino a simular.

El algoritmo clasificador queda descrito en la Figura 3.23. Para mayor conocimiento del funcionamiento de la herramienta ver el capítulo 6.

Figura 3.23 Algoritmo Clasificador.



4. RESULTADOS

Con el fin de evaluar el desempeño del algoritmo clasificador, se realizó una serie de pruebas para medir la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de clasificación. Para las pruebas se seleccionó un conjunto de 76 imágenes digitales de 15 frotis sanguíneos distintos (personas diferentes), adquiridas mediante el proceso descrito en la sección 3.2. En total, de las 76 imágenes se extrajeron 90 glóbulos blancos, bien identificados (núcleos y citoplasmas segmentados correctamente), con los que se procedió a probar el algoritmo clasificador.

4.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

La sensibilidad y especificidad son dos parámetros de gran utilidad, y ampliamente utilizadas para medir el rendimiento de una variable binaria, o que pueda descomponerse en variables binarias.

Debido a que el objetivo de este proyecto es la clasificación, y no la detección de glóbulos blancos, no es posible medir su rendimiento mediante una sola variable. Esto se debe a que los posibles valores de la variable binaria a la que se le desearía medir su sensibilidad y especificidad sería: **Se Clasificó** o **No Se Clasificó**, lo cual sería equivalente a una detección, y no aportaría información relevante sobre el rendimiento del clasificador para cada una de las clases de glóbulos blancos. La variable real a medir es: **Se Clasificó Correctamente** o **No Se Clasificó Correctamente Dentro del Contexto de Un Tipo de Leucocito**, lo que implica la creación de tres variables binarias, una por cada grupo de clasificación (Linfocitos, Monocitos, Granulocitos).

Como primer paso para calcular la sensibilidad y especificidad, se deben especificar cuatro parámetros para cada una de las variables a medir. A continuación se describen los cuatro parámetros necesarios para el cálculo de

RESULTADOS

la sensibilidad y especificidad, en donde la variable x indica alguno de los tres grupos de clasificación.

- ***VP* (Verdadero Positivo):** Es un glóbulo blanco de tipo x y **Se** clasificó como un glóbulo blanco de tipo x .
- ***FP* (Falso Positivo):** **No** es un glóbulo blanco de tipo x y **Se** clasificó como glóbulo blanco de tipo x .
- ***VN* (Verdadero Negativo):** **No** es un glóbulo blanco de tipo x y **No** se clasificó como glóbulo blanco de tipo x .
- ***FN* (Falso Negativo):** **Es** un glóbulo blanco de tipo x y **No** se clasificó como glóbulo blanco de tipo x .

La comprensión de estos parámetros es más evidente en la Tabla 4.1. Cuando la variable real es verdadera, indica que concuerda con la prueba obtenida, y cuando es falsa no.

Tabla 4.1 Descripción de Parámetros para el Cálculo de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos. La Variable x Indica Alguno de los Tres Grupos de Clasificación (Linfocito, Monocito, Granulocito).

		Realidad	
		Es un WBC de tipo x	No es un WBC de tipo x
Prueba	Positivo	<i>VP</i>	<i>FP</i>
	Negativo	<i>FN</i>	<i>VN</i>

Una vez definido cada uno de estos parámetros, se procede a probar el algoritmo clasificador y a contar cada uno de los casos obtenidos (cuántos *VP*, cuántos *FN*, etc.).

De la Tabla 4.1 se puede concluir que lo ideal sería que todas las pruebas cayeran hacia los parámetros *VP* y *VN*, de esta forma se obtendría un rendimiento perfecto.

RESULTADOS

La Tabla 4.2 muestra los parámetros obtenidos para cada uno de los tipos de glóbulos blancos.

Tabla 4.2 Parámetros para el Cálculo de Especificidad, Sensibilidad y Valores Predictivos.

Linfocitos				Monocitos				Granulocitos			
VP	FP	VN	FN	VP	FP	VN	FN	VP	FP	VN	FN
21	13	53	3	1	5	77	7	42	7	25	16

4.1.1 Sensibilidad.

Su valor numérico varía entre 0 y 1 (ó 0 y 100%), e indica la capacidad del algoritmo clasificador para clasificar a los glóbulos blancos de cierto tipo. La sensibilidad queda descrita mediante la ecuación 5.1, donde el subíndice x de nuevo indica alguno de los tres grupos de clasificación (Linfocito, Monocito, Granulocito).

$$Sensibilidad_x = \frac{VP_x}{VP_x + FN_x} \quad (5.1)$$

De la ecuación 5.1 se puede deducir que $VP_x + FN_x$ no es más que la población total de glóbulos blancos de tipo x , sin importar si fueron clasificados como glóbulos blancos de ese tipo o no. La sensibilidad puede ser re-escrita de la siguiente manera para su mayor comprensión.

$$Sensibilidad_x = \frac{\text{WBCs de tipo } x \text{ que se clasificaron como WBCs de tipo } x}{\text{WBCs de tipo } x}$$

A continuación se muestran los resultados de sensibilidad obtenidos para cada uno de los tres tipos de glóbulos blancos.

$$Sensibilidad_{Linfocitos} = \frac{VP_{Linfocitos}}{VP_{Linfocitos} + FN_{Linfocitos}} = \frac{21}{21 + 3} = 0.875 = 87.5\%$$

RESULTADOS

$$\text{Sensibilidad}_{\text{Monocitos}} = \frac{VP_{\text{Monocitos}}}{VP_{\text{Monocitos}} + FN_{\text{Monocitos}}} = \frac{1}{1 + 7} = 0.125 = 12.5\%$$

$$\begin{aligned}\text{Sensibilidad}_{\text{Granulocitos}} &= \frac{VP_{\text{Granulocitos}}}{VP_{\text{Granulocitos}} + FN_{\text{Granulocitos}}} = \frac{42}{42 + 16} = 0.724 \\ &= 72.4\%\end{aligned}$$

Un 87.5% de sensibilidad para los linfocitos, señala que en el 87.5% de los casos un linfocito será clasificado como tal por el algoritmo clasificador. Igualmente para los monocitos, sólo el 12.5% de los monocitos serán clasificados como monocitos y para los granulocitos, el 72.4% de los granulocitos serán clasificados como granulocitos.

4.1.2 Especificidad.

Al igual que la sensibilidad, la especificidad también varía entre 0 y 1, siendo 1 el valor ideal. La especificidad expresa la capacidad del algoritmo para no clasificar glóbulos blancos como tipo x a los glóbulos blancos que no son de ese tipo. La especificidad queda expresada mediante la ecuación 5.2.

$$\text{Especificidad}_x = \frac{VN_x}{VN_x + FP_x} \quad (5.2)$$

Analizando la ecuación 5.2 se puede intuir que $VN_x + FP_x$ es la población total de glóbulos blancos que no son de tipo x , de esta manera la ecuación 5.2 puede ser escrita de la siguiente manera.

$$\text{Especificidad}_x = \frac{\text{WBCs que no son de tipo } x \text{ y no se clasificaron como WBCs de tipo } x}{\text{WBCs que no son de tipo } x}$$

A continuación se describe la especificidad hallada para cada uno de los tres tipos de glóbulos blancos.

RESULTADOS

$$\text{Especificidad}_{\text{Linfocitos}} = \frac{53}{53 + 13} = 0.803 = 80.3\%$$

$$\text{Especificidad}_{\text{Monocitos}} = \frac{77}{77 + 5} = 0.939 = 93.9\%$$

$$\text{Especificidad}_{\text{Granulocitos}} = \frac{25}{25 + 7} = 0.781 = 78.1\%$$

Un 80.3% de especificidad para los linfocitos indica que existe una probabilidad del 80.3% de que un glóbulo blanco que no es linfocito no sea clasificado como tal. Al igual, para los monocitos, el 93.9% de los glóbulos blancos que no son monocitos no serán clasificados como monocitos, y para los granulocitos, el 78.1% de los glóbulos blancos que no son granulocitos no serán clasificados como granulocitos.

4.2 VALORES PREDICTIVOS

Hasta ahora, por medio de la sensibilidad y especificidad solo hemos respondido a la probabilidad de que un glóbulo blanco de tipo x sea clasificado por el algoritmo como uno de ese mismo tipo x (o lo contrario). Sin embargo si queremos saber si un glóbulo blanco clasificado como tipo x es realmente de ese tipo x , debemos utilizar valores predictivos.

4.2.1 Valor Predictivo Positivo.

Es la probabilidad de que un glóbulo blanco sea de tipo x si el clasificador lo clasificó como uno de tipo x . El Valor Predictivo Positivo o VPP se define mediante la ecuación 5.3.

$$VPP_x = \frac{VP_x}{VP_x + FP_x} \quad (5.3)$$

RESULTADOS

El VPP para cada uno de los tres grupos se expresa a continuación.

$$VPP_{Linfocitos} = \frac{21}{21 + 13} = 0.618 = 61.8\%$$

$$VPP_{Monocitos} = \frac{1}{1 + 5} = 0.167 = 16.7\%$$

$$VPP_{Granulocitos} = \frac{42}{42 + 7} = 0.857 = 85.7\%$$

Estos valores indican que existe una probabilidad del 61.8% de que un glóbulo blanco clasificado como linfocito por el algoritmo clasificador, realmente sea un linfocito. Asimismo, el 16.7% de los glóbulos blancos clasificados como monocitos, son realmente monocitos y el 85.7% de los glóbulos blancos clasificados como granulocitos, realmente son granulocitos.

4.2.2 Valor Predictivo Negativo.

Es la probabilidad de que un glóbulo blanco que no fue clasificado como tipo x realmente no sea de tipo x . Su valor puede ser calculado mediante la ecuación 5.4.

$$VPN_x = \frac{VN_x}{VN_x + FN_x} \quad (5.4)$$

A continuación se muestran los resultados de aplicar VPN a cada uno de los tres grupos de clasificación.

$$VPN_{Linfocitos} = \frac{53}{53 + 3} = 0.946 = 94.6\%$$

$$VPN_{Monocitos} = \frac{77}{77 + 7} = 0.917 = 91.7\%$$

RESULTADOS

$$VPN_{Granulocitos} = \frac{25}{25 + 16} = 0.61 = 61\%$$

Estos valores revelan que el 94.6% de los glóbulos blancos que no fueron clasificados como linfocitos, en realidad no eran linfocitos. Asimismo, el 91.7% de los glóbulos blancos que no se clasificaron como monocitos, no eran monocitos y el 61% de los glóbulos blancos que no se clasificaron como granulocitos, no eran granulocitos.

4.3 FUENTES PRINCIPALES DE ERROR

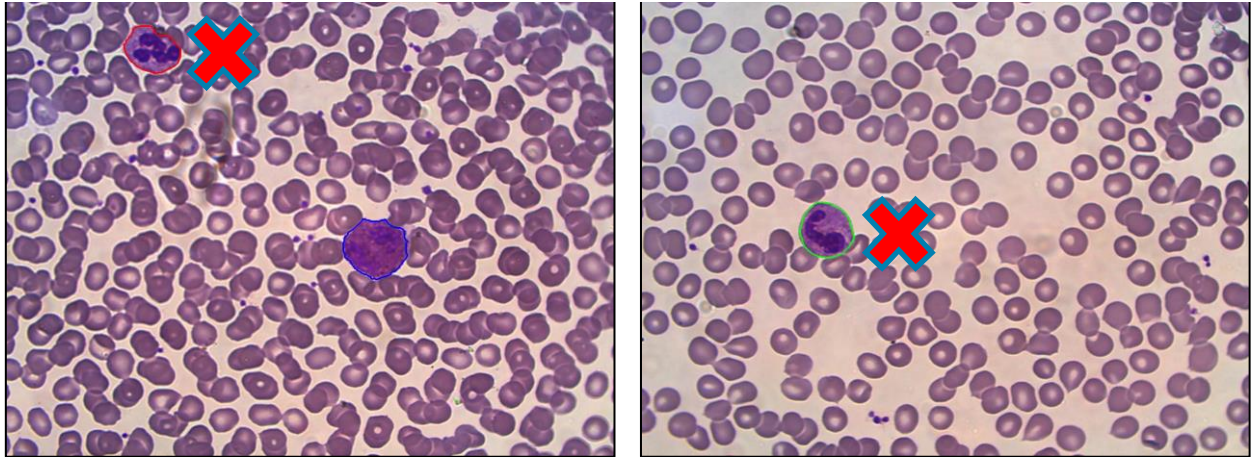
En seguida se lista una serie de hechos que impiden que el algoritmo propuesto logre una correcta clasificación. Algunos de estas fuentes de error son inherentes al problema de la clasificación de leucocitos, sin embargo, otras fuentes importantes son corregibles.

4.3.1 Errores Debidos a las Poblaciones de Leucocitos.

Uno de los problemas más importantes es la reducida población de ciertos tipos de leucocitos, específicamente monocitos y basófilos (tipo de granulocito) para este proyecto. Esto afecta directamente el desempeño de la red neuronal artificial, debido a que no está lo suficientemente entrenada para reconocer esos tipos de glóbulos blancos. En la Figura 4.1 se muestran algunos errores del clasificador, posiblemente causados por falta de más muestras en la etapa de entrenamiento.

RESULTADOS

Figura 4.1 Glóbulos Blancos Mal Clasificados. En la Imagen de la Izquierda, Cerca de la Esquina Superior Izquierda, Un Granulocito Clasificado Como Linfocito. En la Imagen de la Derecha, Un Granulocito Clasificado Como Monocito. El algoritmo clasificador bordea los glóbulos blancos con un color para indicar su clasificación.



Respuesta del Clasificador

Monocito

Linfocito

Granulocito

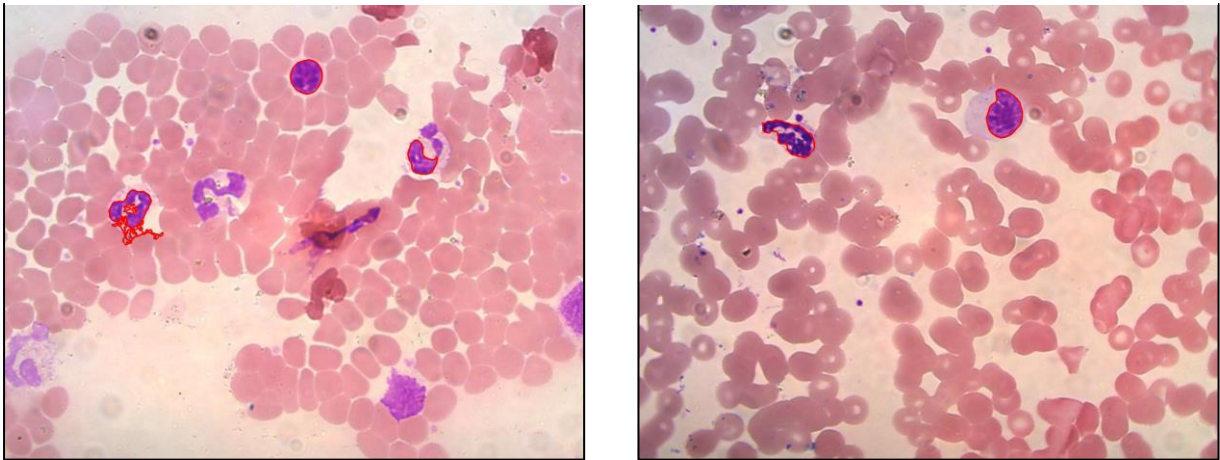
Fuente: Autores del Proyecto.

4.3.2 Problemas Debidos a la Tinción del Frotis.

Una mala técnica en la coloración de los frotis también afecta considerablemente el rendimiento del clasificador. Uno de los problemas más comunes de este tipo, es la poca o excesiva coloración, lo que provoca que las células sanguíneas se tiñan de manera muy similar entre sí, impidiendo una diferenciación correcta. La Figura 4.2 y la Figura 4.3 ilustran problemas de clasificación obtenidos debidos a problemas de tinción. En la Figura 4.2 el citoplasma de los glóbulos blancos es tan transparente que no es reconocido como parte de la célula, incluso algunos glóbulos blancos no son segmentados. En la Figura 4.3 dos machas de tinte son identificadas y clasificadas como glóbulos blancos.

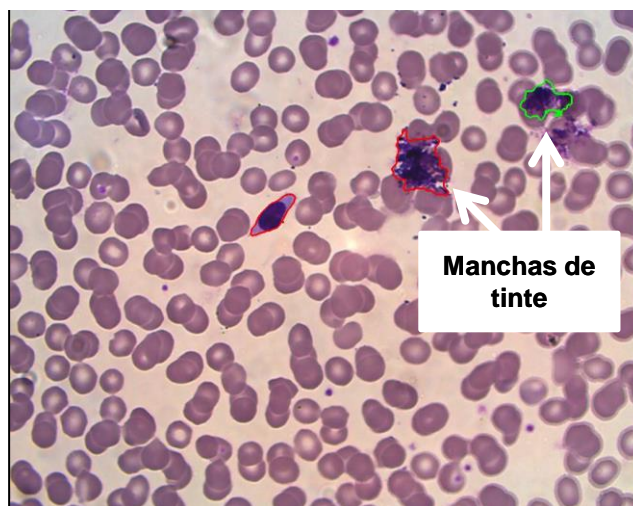
RESULTADOS

Figura 4.2 Imagen Resultado al Aplicar el Algoritmo Clasificador Sobre Dos Imágenes Con Poca Coloración.



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 4.3 Imagen Resultado al Aplicar el Algoritmo Clasificador Sobre una Imagen Con Manchas de Tinte. Las Manchas de Tinte Fueron Identificadas Por el Algoritmo Clasificador Como Glóbulos Blancos.



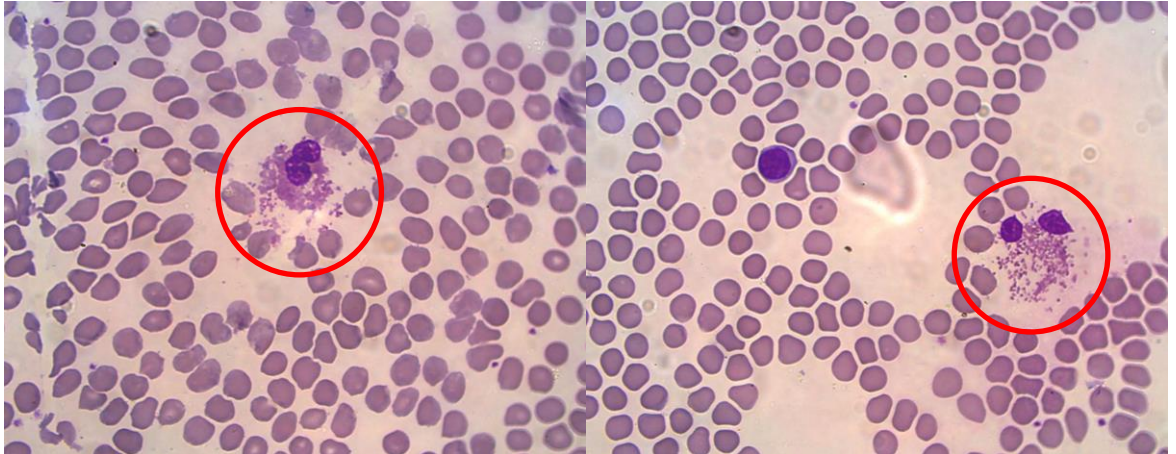
Fuente: Autores del Proyecto.

4.3.3 Errores Debidos a la Técnica del Extendido.

Un frotis realizado con demasiada presión o en un ángulo incorrecto puede causar que las células estallen y sea imposible su clasificación. En la Figura 4.4 se observan dos células estalladas.

RESULTADOS

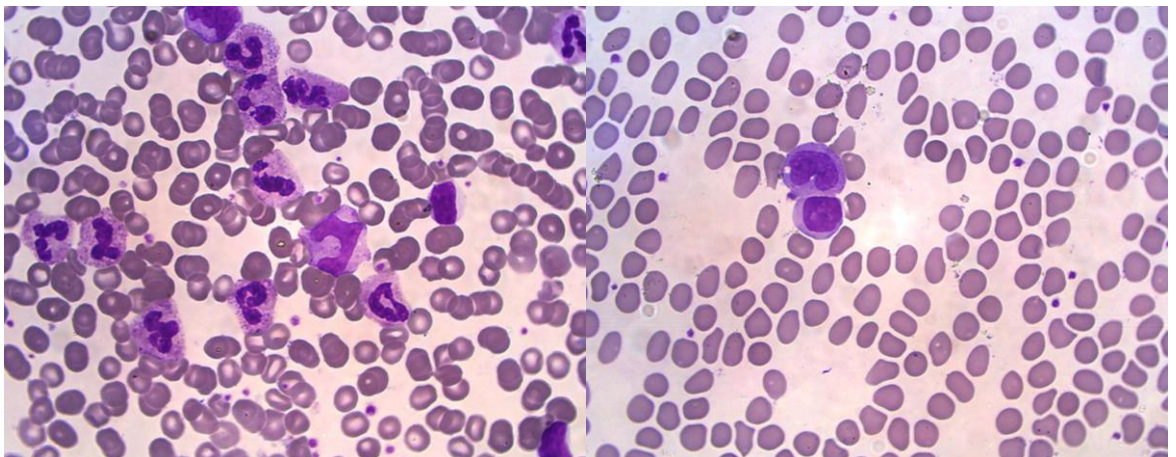
Figura 4.4 Glóbulos Blancos Estallados.



Fuente: Autores del Proyecto.

En cambio, cuando un frotis sanguíneo es realizado con poca presión se obtiene un frotis grueso, en el cual las células están muy juntas, impidiendo la segmentación individual de cada glóbulo blanco. Sin embargo cabe destacar que aún en un frotis ideal existe la posibilidad de que dos o más glóbulos blancos entren en contacto. En la Figura 4.5 se observa un grupo de glóbulos blancos muy juntos entre sí.

Figura 4.5 Glóbulos Blancos Traslapados. En la imagen de la Izquierda, los Glóbulos Blancos se Tocan Debido a Un Frotis Grueso. En la Imagen de la Derecha, los Glóbulos Blancos Se Tocan Debido a la Probabilidad de que Suceda.

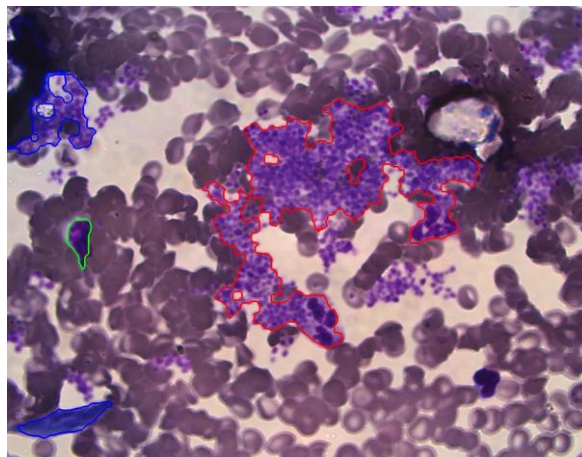


Fuente: Autores del Proyecto.

4.3.4 Errores Por Agregaciones Plaquetarias.

Las agrupaciones de plaquetas en cúmulos son inherentes a los frotis sanguíneos. Los frotis sanguíneos son realizados sin anticoagulantes precisamente para informar sobre agregaciones plaquetarias. El problema de las agregaciones plaquetarias es que son muy similares a los núcleos de los glóbulos blancos, tanto en textura y color, por lo que en la fase de segmentación son identificadas como núcleos y se procede a buscar un citoplasma alrededor. Esto lleva a una segmentación y clasificación incorrectas. En la Figura 4.6 se muestra una gran cantidad de plaquetas agrupadas y clasificadas como glóbulos blancos.

Figura 4.6 Agregaciones Plaquetarias Clasificadas Como Glóbulos Blancos.



Fuente: Autores del Proyecto.

4.3.5 Segmentación Pobre.

Debido a que el proceso de clasificación está ligado a la segmentación, una segmentación pobre o errónea implica una clasificación incorrecta. No obstante, en este proyecto no se hace hincapié en la fase de segmentación, ya que el objetivo principal es la clasificación de los glóbulos blancos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este proyecto se presentó la descripción y fundamento de un algoritmo para la clasificación de glóbulos blancos en imágenes de frotis sanguíneos mediante Tratamiento Digital de Imágenes. A continuación se listan algunas conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros.

5.1 Conclusiones

Durante la realización del presente proyecto se realizaron dos artículos que fueron presentados en los eventos STSIVA 2012 (XVII Simposio de Tratamiento de Señales, Imágenes y Visión Artificial) y SIPAIM 2012 (VIII International Seminar on Medical Information Processing and Analysis). El primero titulado “**Estudio de Métodos de Umbralización para la Detección de Núcleos de Glóbulos Blancos**”, el cual fue presentado en la modalidad de poster, y el segundo titulado “**Detección de Núcleos de Glóbulos Blancos en Imágenes de Frotis Sanguíneo Mediante Umbralización Basada en Histogramas**”, el cual fue presentado como ponencia oral.

La investigación hecha durante el desarrollo del algoritmo clasificador y los dos artículos presentados permitió concluir lo siguiente:

- El proceso de clasificación de glóbulos blancos mediante Tratamiento Digital de Imágenes es completamente viable. Como consecuencia es posible automatizar el proceso de recuento diferencial de glóbulos blancos basándose en técnicas de TDI.
- No se puede asegurar la equidad en la adquisición de las imágenes, debido a que la técnica de elaboración y calidad de los frotis sanguíneos es muy variable, aunque haya estándares internos en los laboratorios. Esta no uniformidad en la elaboración de los frotis conduce a diseñar

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

una fase de Pre-Procesamiento extensa que puede compararse con la complejidad del problema a resolver.

- La baja población de Monocitos y Basófilos (tipo de Granulocito) impacta directamente la sensibilidad y especificidad del algoritmo clasificador. Esto se debe a que la red neuronal artificial no tiene las suficientes muestras para aprender a identificar todas las variantes de estos escasos glóbulos blancos. Esto se evidencia en la baja sensibilidad y alta especificidad del algoritmo para clasificar Monocitos.
- Para la identificación de los glóbulos blancos las técnicas de agrupamiento de regiones, como el algoritmo de las k-medias son más eficientes que los métodos de umbralización.
- Aunque la red neuronal artificial utilizada elimina parte de la subjetividad del proceso de recuento diferencial de glóbulos blancos, no se puede eliminar en su totalidad. Esto debido a que en la etapa de entrenamiento de la red neuronal artificial se utilizó a un bacteriólogo como referencia de clasificación, quién clasifica según su criterio.

5.2 Recomendaciones

- Debido a que uno de los problemas más importantes que impiden una correcta clasificación de leucocitos es la inequidad de condiciones en la adquisición de las imágenes, se recomienda automatizar y estandarizar los procesos de tinción y realización de los extendidos de sangre periférica.
- Aumentar el número de muestras en la etapa de entrenamiento de la red neuronal artificial puede aumentar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.
- La identificación manual de los glóbulos blancos, necesaria en la etapa de entrenamiento, puede ser realizada por distintas personas expertas en la identificación de leucocitos. Esto eliminaría parte de la subjetividad

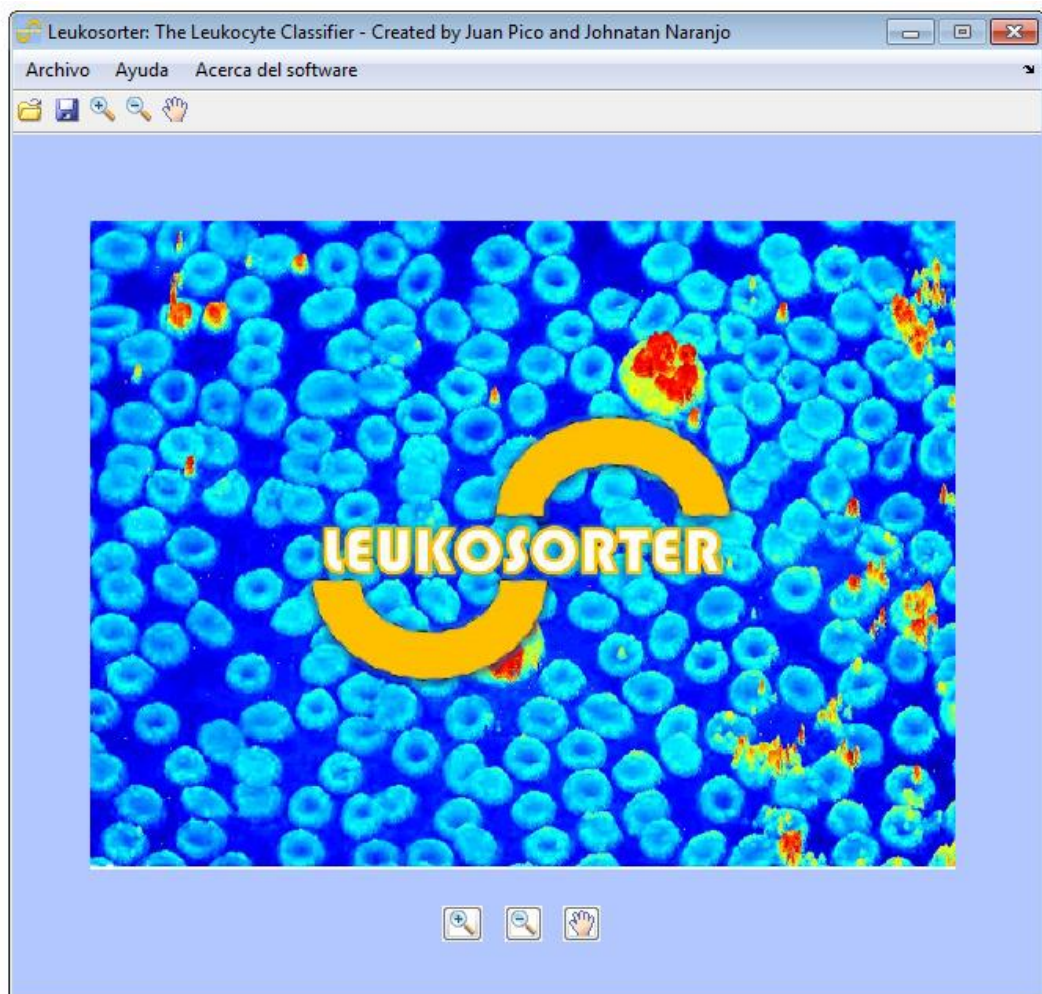
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

presente en el clasificador debido a que no contaría con el criterio de clasificación de una sola persona.

6. FUNCIONAMIENTO DE LA APLICACIÓN SOFTWARE (LEUKOSORTER)

El componente software y todas sus funcionalidades, fueron desarrolladas en **MATLAB 7.10.0 (R2010a)** y luego compiladas al lenguaje **C++**. El primer paso para ejecutar la aplicación es localizar el archivo **Leukosorter0.1.exe**, y acceder al mismo mediante doble clic. Una vez iniciado el programa, se despliega la siguiente ventana de la Figura 6.1.

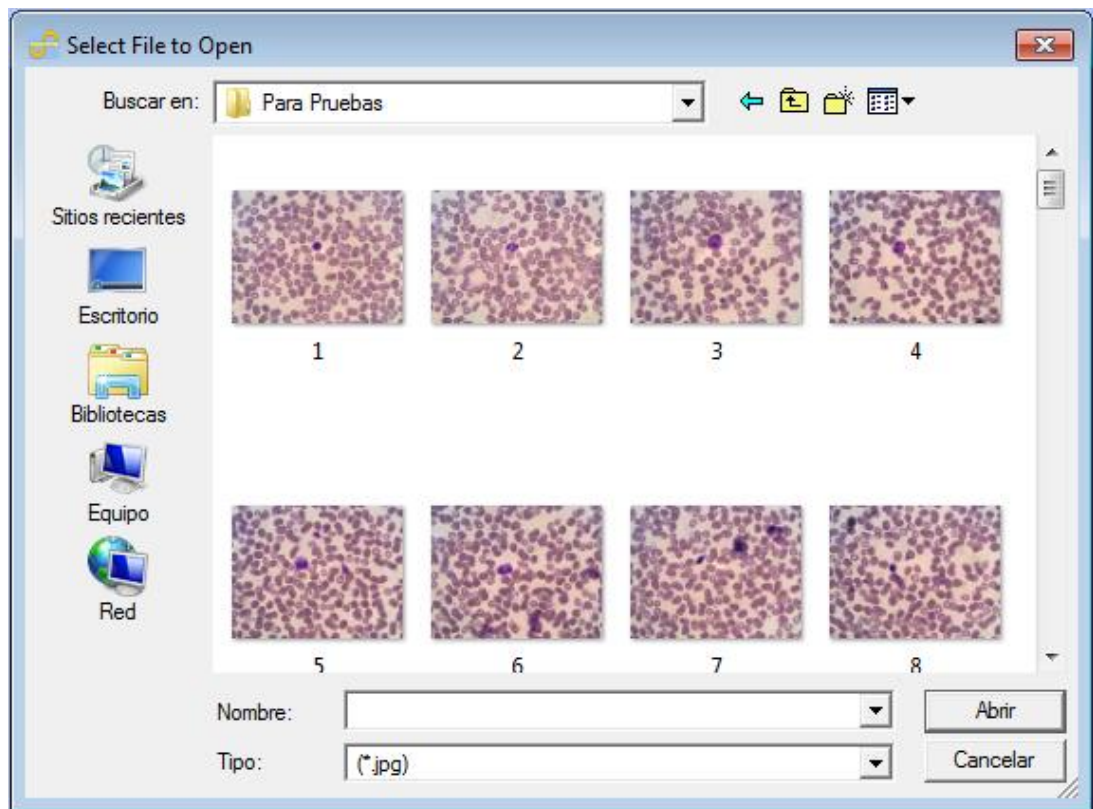
Figura 6.1 Ventana de Inicio de Leukosorter.



FUNCIONAMIENTO DE LA APLICACIÓN SOFTWARE (LEUKOSORTER)

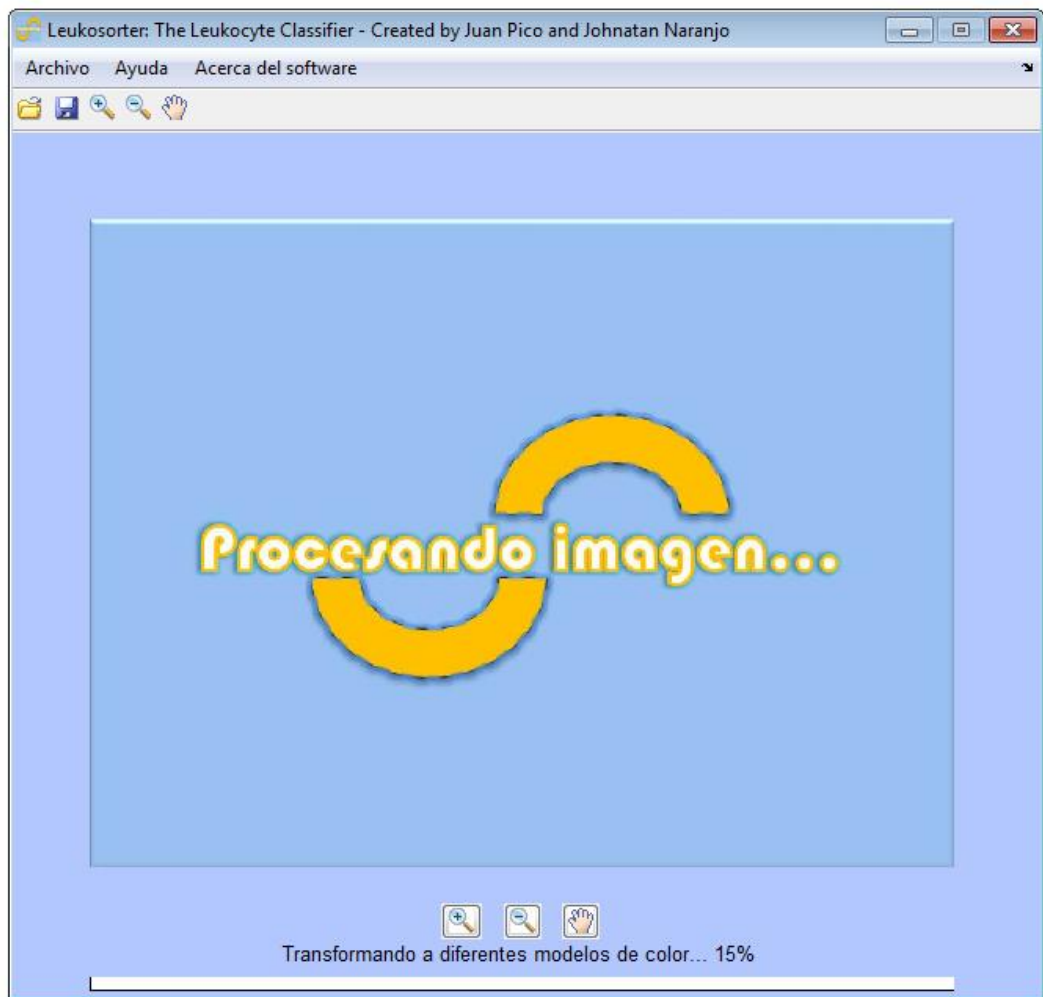
En este momento, el software queda a la espera de que una imagen sea cargada y, para ello, hay que acceder al ícono “Abrir” o seguir la ruta “Archivo - Abrir” para desplegar la ventana de exploración y buscar la imagen a cargar para su posterior procesamiento. En la Figura 6.2 se ilustra la ventana de exploración que se despliega luego de haber accedido a la opción “Abrir”.

Figura 6.2 Ventana de Exploración de Leukosorter.



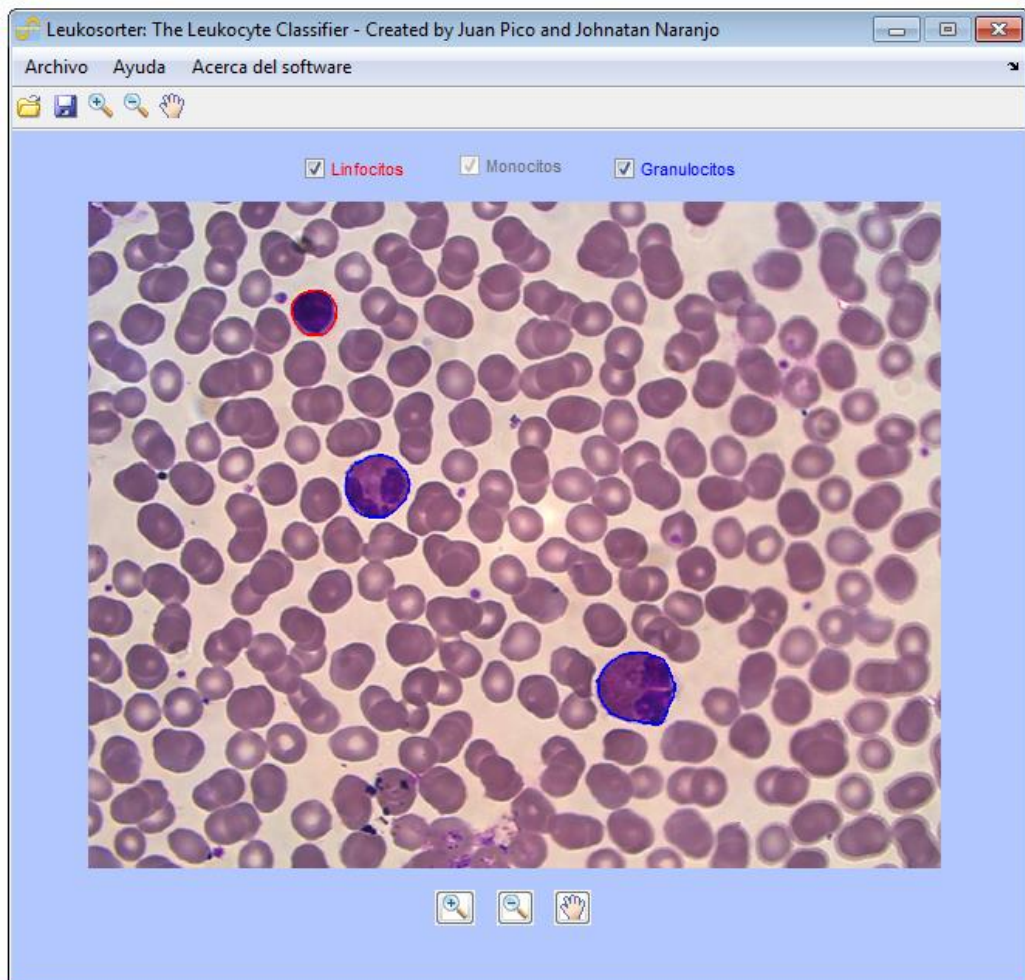
Después de que la imagen haya sido cargada, el programa empieza a procesarla automáticamente. A medida que el proceso avanza, la aplicación muestra la fase del algoritmo que se está ejecutando y el porcentaje del progreso que se lleva hasta ese momento, tal como se ilustra en la Figura 6.3.

Figura 6.3 Leukosorter Procesando una imagen.



Al finalizar el procesamiento, se obtiene una imagen resultado, en la cual se visualiza el resultado de la clasificación por parte de la aplicación (ver Figura 6.4).

Figura 6.4 Clasificación de Glóbulos Blancos Realizada por Leukosorter.



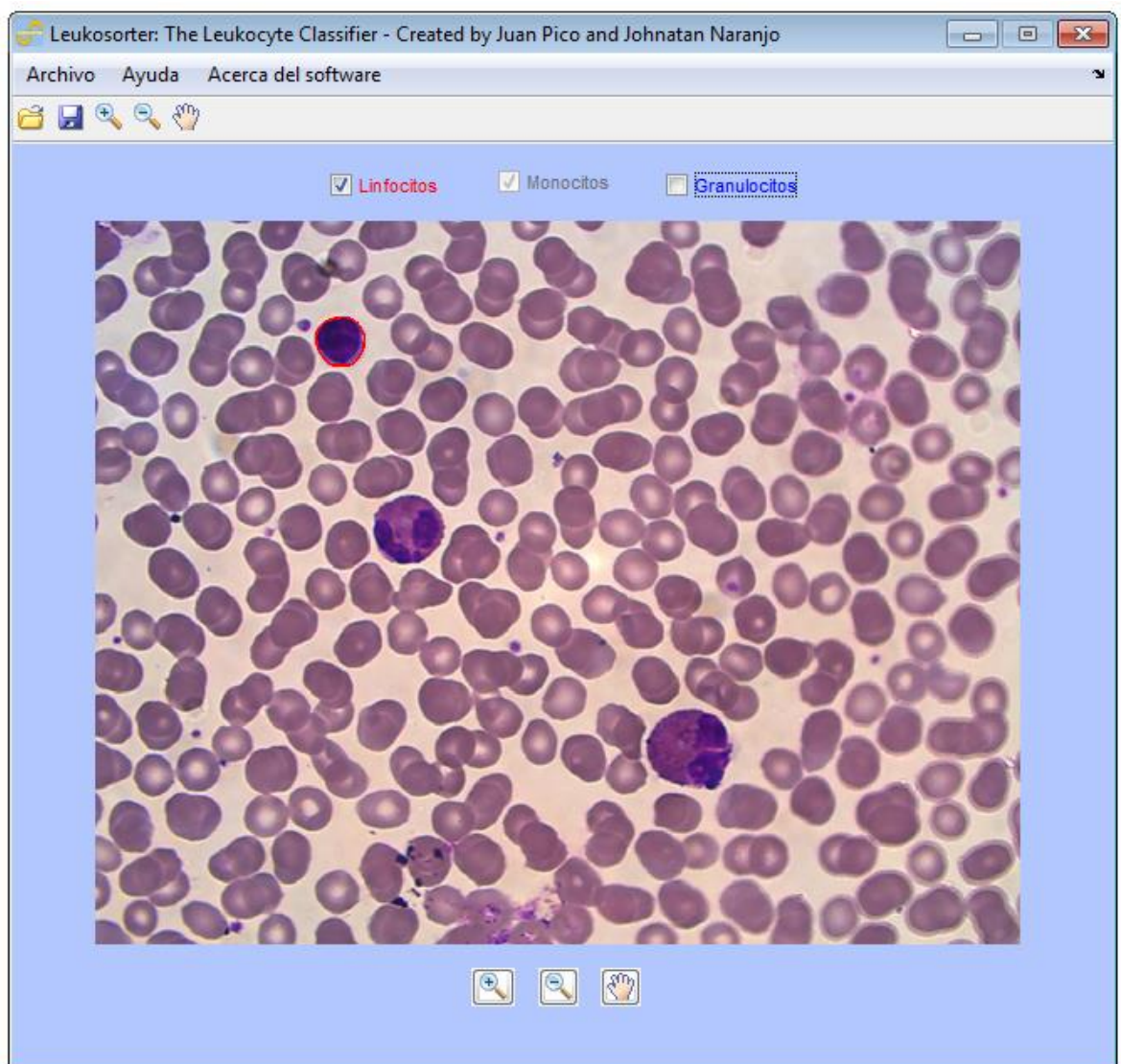
Como se observa en la ilustración anterior, los glóbulos blancos fueron bordeados o etiquetados con diferentes colores. Cada color corresponde a un tipo de Leucocito. En general, las etiquetas de colores rojo, verde y azul corresponden a los Linfocitos, Monocitos y Granulocitos respectivamente. En el caso de la Figura 6.4, ningún glóbulo blanco fue bordeado con color verde, debido a que en la imagen no se encontraron Monocitos.




Los checkboxes que se encuentran en la parte superior del panel, donde se muestra la imagen-resultado, permiten habilitar o deshabilitar las etiquetas o bordes, dejando solo aquellas que se encuentren seleccionadas. En caso de que algún tipo de glóbulo blanco no se encuentre dentro de la imagen y, por consiguiente, no se encuentre asignada una etiqueta, no le será permitido al

FUNCIONAMIENTO DE LA APLICACIÓN SOFTWARE (LEUKOSORTER)

usuario habilitar o deshabilitar el checkbox correspondiente a dicha etiqueta. En la Figura 6.4 el checkbox correspondiente a los Monocitos está deshabilitado, debido a que No hay ningún Monocito en la imagen. Por otro lado, si se deshabilita el checkbox de los Granulocitos, se eliminarán los bordes de los glóbulos blancos clasificados como granulocitos, como se aprecia en la Figura 6.5.

Figura 6.5 Respuesta de Leukosorter al Deshabilitar el Checkbox Correspondiente a los Granulocitos.

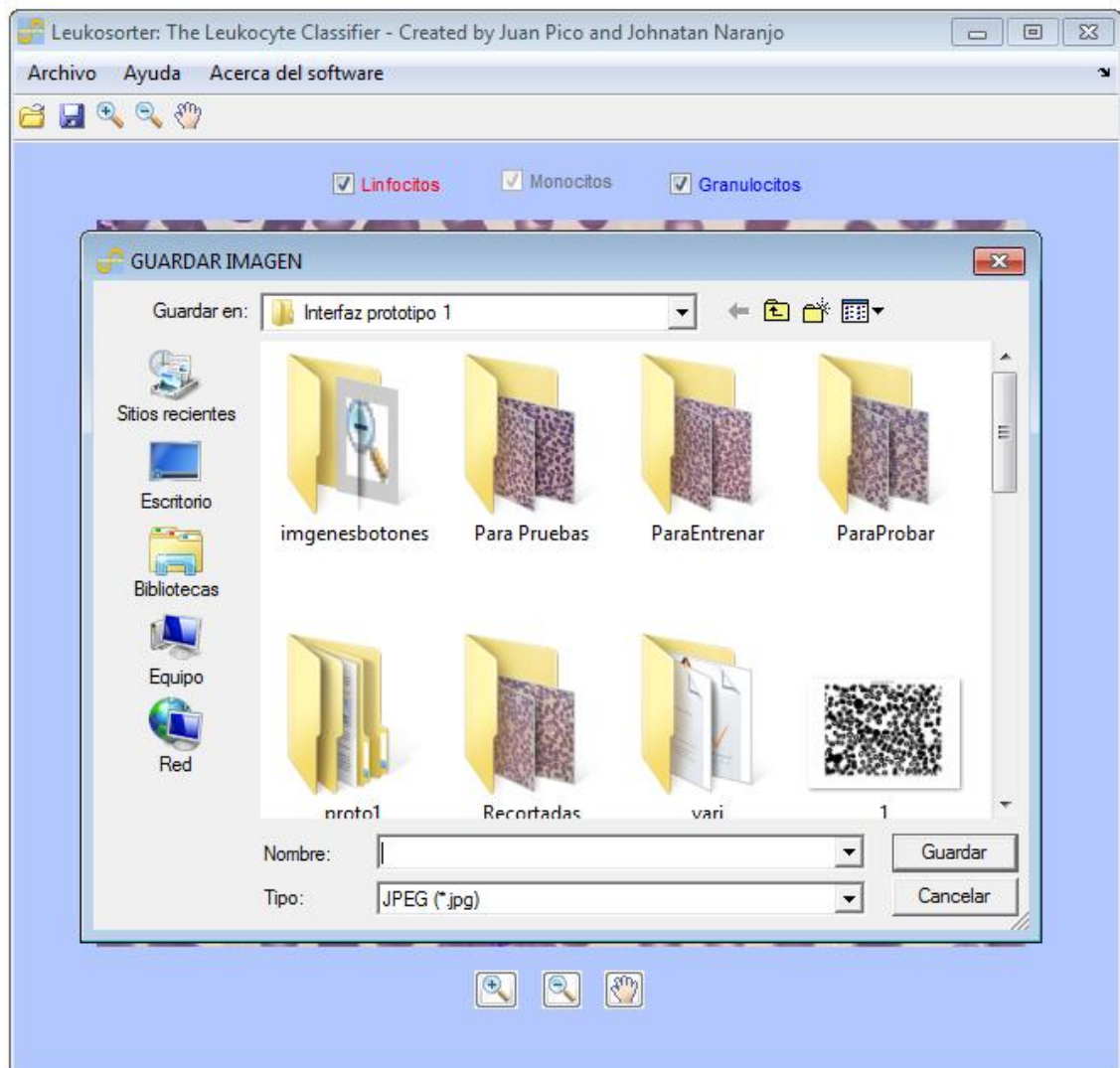


Las herramientas de Pan () y Zoom ( y ) permiten desplazar la imagen a través del panel y hacer zoom respectivamente.

FUNCIONAMIENTO DE LA APLICACIÓN SOFTWARE (LEUKOSORTER)

Para guardar una imagen, es necesario ir a la ruta “Archivo - Guardar” o acceder al ícono “Guardar”, que se encuentra a la derecha del ícono “Abrir”, y dar un clic. A continuación se despliega una ventana de exploración (ver Figura 6.6) que permite elegir el sitio del disco donde se desea guardar la imagen visualizada en nuestro panel (imagen-resultado).

Figura 6.6 Ventana de Exploración para la Futura Ubicación de la Imagen a Guardar.



La opción “Acerca del software”, en la parte superior de la aplicación, despliega una ventana de información sobre el software y sus desarrolladores, como lo demuestra la Figura 6.7.

Figura 6.7 Información Acerca de Leukosorter.



Glosario

Anticuerpo: Son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.

Binarización: Es una técnica del procesamiento de imágenes que consiste en un proceso de reducción de la información de una imagen digital a dos valores: 0 (negro) y 255 (blanco).

Célula Madre: Son células que se encuentran en todos los organismos multicelulares y que tienen la capacidad de dividirse (a través de la mitosis) y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas y de autorrenovarse para producir más células madre.

Citoplasma: Parte de la célula que, rodeada por una membrana, excluye al núcleo.

Conteo Diferencial de Glóbulos Blancos: Es una prueba médica que tiene como propósito determinar la concentración de leucocitos en la sangre de un paciente.

Electrodo: Extremo de un cuerpo conductor en contacto con un medio del que recibe o al que transmite una corriente eléctrica:

Elemento Estructurante: El objetivo de las transformaciones morfológicas es la extracción de estructuras geométricas en los conjuntos sobre los que se opera, mediante la utilización de otro conjunto de forma conocida, al que se le denomina elemento estructurante.

Entropía de Shannon: Magnitud numérica que mide la incertidumbre de una fuente de información.

Equipos Automatizados de Recuento Celular: Son equipos encargados de realizar el recuento celular basados en diferentes técnicas eléctricas y químicas.

Eritrocito: Célula sanguínea esferoidal que contiene la hemoglobina, que aporta el color rojo característico a la sangre y actúa transportando el oxígeno por el organismo.

Extendido de Sangre Periférica: También llamado frotis sanguíneo. Consiste en una gota de sangre extendida sobre una lámina, la cual se colorea por medio de un proceso de tinción y fijación.

Glóbulo Blanco: También llamados leucocitos. Son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas y son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos.

Hemograma: Es un cuadro o fórmula sanguínea en el que se expresan el número, proporción y variaciones de los elementos sanguíneos.

Hematología: Parte de la biología o de la medicina que realiza el estudio histológico, funcional y patológico de la sangre.

Hematopoyesis: Formación o producción de sangre, en especial de sus elementos celulares.

Hemoglobina: Pigmento proteínico colorante de los glóbulos rojos y plasma sanguíneo que permite el transporte de oxígeno en los vertebrados.

Hemostasia: Detención espontánea o artificial de un flujo sanguíneo o hemorragia.

Leucocito: Cada una de las células esferoidales o glóbulos, incoloras o blanquecinas, con citoplasma viscoso, que se encuentran en la sangre y en la linfa y forman parte del sistema inmunológico corporal. Ver también Glóbulo Blanco.

Linfoblasto: Célula madre de los linfocitos, que deriva del hemocitoblasto y da origen al gran linfocito.

Megacariocito: Gran célula (30 de diámetro) cuadrangular cuyo protoplasma hialino es muy basófilo y cuyo núcleo rectangular posee una basta red cromática.

Médula ósea: Es un tipo de tejido que se encuentra en el interior de los huesos largos, vértebras, costillas, esternón, huesos del cráneo, cintura escapular y pelvis.

Mieloblasto: Célula madre de los leucocitos granulados, que deriva del hemocitoblasto y da lugar al promielocito.

Monoblasto: Célula que da origen al monocito. Los monoblastos constituyen el primer paso en el proceso de maduración de los monocitos macrófagos. Tienen entre 12 y 20 μm de diámetro, y como la mayor de los blastos mieloides tienen un núcleo oval muy fino. Nunca aparecen en la sangre periférica normal.

Morfología celular: Forma y tamaño de la célula.

Morfología matemática: Es una teoría y técnica para el análisis y tratamiento de las estructuras geométricas, basada en la teoría de conjuntos, teoría de retículos, topología y funciones aleatorias.

Núcleo: Es un orgánulo membranoso que se encuentra en las células eucariotas.

Órganos Excretorios: Aquellos órganos que se encargan de la eliminación de sustancias en el cuerpo.

Órganos Hematopoyéticos: Donde se localizan las células formadoras de las células sanguíneas.

Otsu: Método de umbralización para la binarización de imágenes digitales. Se basa en la desviación estadística de la frecuencia de los niveles de gris en una imagen.

Patógeno: Nombre dado a todo agente biológico que pueda producir daño o enfermedad a un huésped.

pH: Es la medida de la acidez o alcalinidad de una disolución.

Plaqueta: Son fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares y carentes de núcleo, de 2-3 μm de diámetro, derivados de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos.

Plasma: Es la fracción líquida y acelular de la sangre, es decir, se obtiene al dejar a la sangre desprovista de células como los glóbulos rojos y los glóbulos blancos.

Resistividad Eléctrica: Propiedad de un cuerpo para oponerse a una corriente eléctrica.

Sangre Periférica: Nombre dado a la sangre que circula por todo el cuerpo.

Sistema Inmunitario: Sistema dentro de un cuerpo biológico que se encarga de la protección contra enfermedades.

Bibliografía

1. **Salas, Consuelo y Marat, Luis.** Leucocitos. *Educación Para la Salud Segunda Edición.* México DF : Pearson Educación, 2004, pág. 32.
2. **W.B. Saunders Company.** Control de Calidad Externo. *Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas 2da edición.* Philadelphia : Médica Panamericana, 2002, págs. 50-51.
3. **Hospital Universitario de Santander.** Extendido de Sangre Periférica (ESP). [aut. libro] Hospital Universitario de Santander. *Manual de Técnicas Hematológicas.* Bucaramanga : s.n.
4. **Chávez, Josué.** *La Sangre Componentes y Enfermedades.* 2009.
5. **García de Luna, María del Carmen.** Hitos En la Historia de la Hematología. [aut. libro] María del Carmen García de Luna. *Archivos Bolivianos de Historia de la Medicina.* La Paz : s.n., 2000.
6. **Thieme, Georg.** Composición y Funciones de la Sangre. *Bioquímica: Texto y Atlas 3ra Edición.* Stuttgart : Panamericana, 2003.
7. **Cuéllar Ambrosi, Francisco.** Semiología de la Sangre. [aut. libro] Francisco Cuéllar Ambrosi y Francisco Falabella Falabella. *Fundamentos de Medicina, Hematología.* Medellín : Corporación para Investigaciones Biológicas, 2004.
8. **López, Inés y Solano, Stella.** Serie Eritroide. Frotis de Médula Ósea. *Morfología Celular Sanguínea y Pruebas Diagnósticas en Hematología.* Bucaramanga : Publicaciones UIS, 1997.
9. —. Series Leucocitarias. Frotis de Médula Ósea. Generalidades de los Leucocitos. *Morfología Celular Sanguínea y Pruebas Diagnósticas en Hematología.* Bucaramanga : Publicaciones UIS, 1997.
10. **Failace, Renato.** *Hemograma: Manual de Interpretación 5ta Edición.* s.l. : Panamericana, 2012. 9788536325569.
11. **López, Inés y Solano, Stella.** Estandarización del Extendido de Sangre Periférica. *Morfología Celular Sanguínea y Pruebas Diagnósticas en Hematología.* Bucaramanga : Publicaciones UIS, 1997.
12. **Thelm, H., Diem, H. y Haferlach, T.** The Blood Smear and Its Interpretation (Differential Blood Count, DBC). *Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis.* s.l. : Clinical Sciences, 2004.
13. **Abbott Laboratories de México S.A. de C.V.** Frotis de Sangre Periférica. [aut. libro] Alfonso Ortega. *Atlas de Hematología. Con Interpretación de Histogramas y Escatergramas.* México D.F. : Abbott Diagnosticos, 2002.
14. **Aumont, Jacques.** *La Imagen.* París : Paidós Comunicación, 1990. 978-84-750-9744-2.
15. **Gonzalez, Rafael C. y Woods, Richard E.** Fundamental Steps in Digital Image Processing. *Digital Image Processing.* New Jersey : Prentice Hall, 2001.
16. **López, Inés y Solano, Stella.** Inspección Microscópica del Extendido de Sangre Periférica. *Morfología Celular Sanguínea y Pruebas Diagnósticas en Hematología.* Bucaramanga : Publicaciones UIS, 1997.
17. *The k-means Algorithm.* **Ghosh, Joydeep y Liu, Alexander.** 2009, Vol. 1.
18. **Pajares, Gonzalo y de la Cruz, Jesús M.** Signaturas. *Visión por Computador.* Madrid : RA-MA, 2002.
19. —. Texturas. *Visión por Computador.* Madrid : RA-MA, 2002.
20. **Computer Society.** 610.4-1990 - *IEEE Standard Glossary of Image Processing and Pattern Recognition Terminology.* s.l. : IEEE, 1990. 0-7381-4559-9.
21. **Ballard, Dana H. y Brown, Christopher M.** Texture. *Computer Vision.* s.l. : Prentice Hall, 1982.
22. *PCA-ANN for Classification of Hepatitis-C Patients.* **Yasin, Huda, Jilani, Tahseen A. y Yasin, Madiha Mohammad.** 7, s.l. : International Journal of Computer Applications, 2011, Vol. 14. 0975 – 8887.
23. *Feature Extraction and Classification of Blood Cells for an.* **Guclu, Ongun, y otros, y otros.** Ankara : International Joint Conference on Neural Networks, 2001, Vol. 4. 1098-7576.
24. *White Blood Cell Classification based on the Combination of.* **Yampri, y otros, y otros.** Singapore : 1ST IEEE Conference on Industrial Electronics and Applications, 2006. 0-7803-9514-X.
25. **Martínez Abaunza, Víctor Eduardo.** *Modelo Computacional para Caracterización de Células Endocervicales.* Bucaramanga : Publicaciones UIS, 2007.

Bibliografía

26. —. *Implementación de un Modelo Computacional para Clasificación Normal Displásica de las Células Escamosas de Citologías Cérvico Uterinas*. Bucaramanga : Publicaciones UIS, 2004.
27. **Remolina Caviedes, Juan Francisco y Rodríguez Vega, Adrián Fernando**. *Diseño e Implementación de un Sistema Basado en Redes Neuronales Artificiales para la Caracterización de Células Malignas en Fluido Pleural*. Bucaramanga : Publicaciones UIS, 2007.
28. **García Estévez, P.** *Las Redes Neuronales Supervisadas*. Madrid : s.n., 2005.