

ALGORITMO PARA LA DETECCIÓN DE OBJETOS SUPERPUESTOS EN
IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

MIGUEL FABIÁN ROMERO RONDÓN
LAURA MELISSA SANABRIA ROSAS

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

2014

ALGORITMO PARA LA DETECCIÓN DE OBJETOS SUPERPUESTOS EN
IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

MIGUEL FABIÁN ROMERO RONDÓN
LAURA MELISSA SANABRIA ROSAS

Trabajo de Grado para optar al título de
Ingeniero de Sistemas

Director

MSc. LOLA XIOMARA BAUTISTA ROZO

Codirector

MSc. ALFONSO MENDOZA CASTELLANOS

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

2014

Dedico este trabajo a mi familia por apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado, porque gracias al amor y respeto que hemos cultivado en nuestro hogar hoy cumplo una de mis metas. A Lucy, mi mamá, por escucharme y acompañarme en mis noches de trabajo. A Humberto, mi papá, por sus sabios consejos y su gran sabiduría. Porque son unos padres excepcionales que han sacrificado gran parte de su vida para que sus hijas sean felices. A mis hermanas Carolina y Lucy, por ser esas amigas incondicionales que siempre están ahí para compartir nuestras aventuras y reírnos de todo.

A mi mejor amigo, mi novio y compañero de proyecto, Miguel, quien siempre me ha brindado su amor, ternura y comprensión, haciendo que los días largos de trabajo se conviertan en momentos llenos de alegría.

A mis compañeros de carrera, con los que he compartido momentos maravillosos que han hecho que mi paso por la Universidad sea una parte de mi vida que siempre recordaré con alegría. Porque somos un grupo extraordinario que permanece junto a pesar de las diferencias.

Laura Melissa Sanabria Rosas

Esta dedicatoria es poco para la deuda que en realidad tengo con cada una de las personas que me han apoyado a lo largo de mi carrera universitaria y de mi vida, aun así quiero que sepan lo valiosas que son para mí.

Quiero dedicar mi trabajo en primer lugar a mis padres, porque sin su apoyo, esfuerzo y sacrificio por darme una buena educación, nada de esto sería posible.

A mi madre Sandra, porque me ha dado más amor del que una persona puede recibir, por su dulzura y carisma, y por siempre avivar mis sueños.

A mi padre Miguel, porque gracias a sus sabios consejos, he forjado mi carácter, mis valores y mis principios.

A mi hermana Silvia, por todo el cariño que me ha dado, por siempre tener la palabra adecuada en el momento adecuado para levantarme el ánimo.

A mi hermano Gabriel por ser un amigo ideal, por su lealtad, por traer alegría y escucharme en los momentos que más lo necesito.

A mi novia Melissa, con quien he crecido inmensamente como persona en estos años de universidad; porque me ha enseñado a compartir y me ha enseñado a amar.

A mi familia y a mis amigos por sus constantes palabras de aliento y de ánimo en cada proyecto que emprendo en mi vida, por motivarme y darme la mano cuando necesito apoyo para continuar con mi travesía.

A mis maestros, por su altruista labor de orientarme e iluminar mi camino, por ayudarme a avanzar y mostrarme las oportunidades que tengo para seguir progresando.

Miguel Fabián Romero Rondón

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen:

Al grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica GIIB, por acogernos y brindarnos el espacio para la realización de este proyecto.

A Biosys Ltda. por su constante acompañamiento y por suministrarnos sus equipos durante el diseño del algoritmo y en la realización de las pruebas.

A nuestra directora, la profesora Lola Bautista, por creer en nosotros, apoyarnos y escucharnos cada vez que necesitábamos ayuda.

A nuestro codirector, el profesor Alfonso Mendoza, por su ayuda, sabiduría, consejos y por motivarnos a ser mejores cada día.

Al ingeniero Hugo Gualdrón, por compartir sus conocimientos con nosotros y tomar parte de su tiempo para escucharnos y aconsejarnos.

A la microbióloga Jennifer Ruiz, por su paciencia para solucionar nuestras dudas y por su importante y excelente asesoría.

A la bacterióloga Sandra Salazar, por ayudarnos desinteresadamente en el suministro de las placas para la digitalización de las imágenes.

A nuestros compañeros del GIIB, por hacer más agradables las largas horas de trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	17
1. OBJETIVOS.....	19
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1. LA SANGRE.....	20
2.2. EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA.....	21
2.3. CONTEO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	22
2.4. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.....	25
2.5. PASOS FUNDAMENTALES DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES ..	25
2.5.1. Preprocesamiento.....	25
2.5.2. Segmentación.....	27
2.5.3. Presentación de resultados.....	36
2.6. HERRAMIENTAS PARA EL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.....	38
2.6.1. Matlab.....	38
3. ESTADO DEL ARTE.....	40
4. DISEÑO DEL ALGORITMO.....	42
4.1. ELIMINACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS.....	43
4.2. ELIMINACIÓN DE PLAQUETAS.....	46
4.3. ELIMINACIÓN DEL FONDO.....	47
4.4. DETECCIÓN DE LAS CÉLULAS.....	49
4.4.1. Separación de grupos.....	49
4.4.2. Detección de las células superpuestas.....	53
4.5. TRAZADO DEL BORDE.....	57
4.5.1. Células con dos puntos finales.....	58
4.5.2. Células con más de dos puntos finales.....	60

5. INTERFAZ GRÁFICA.....	62
6. PRUEBAS	65
7. CONCLUSIONES.....	70
8. RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnica del portaobjetos en cuña para la preparación de un frotis de sangre periférica.	22
Figura 2. Método de impedancia eléctrica para el conteo de células sanguíneas	24
Figura 3. Método de dispersión óptica para el conteo de células sanguíneas	24
Figura 4. Ejemplo de dilatación	28
Figura 6. Ejemplo de apertura	28
Figura 7. Ejemplo de cierre	28
Figura 8. Segmentación Watershed	29
Figura 9. Simulación del uso de la transformada watershed con marcadores. (a) inundación inicial. (b) inundación de una cuenca sin marcador. (c) Creación de una represa cuando diferentes marcadores están a punto de unirse. (d) Inundación final, sólo una línea watershed.	30
Figura 10. K-means. (a)Conjunto de datos inicial. (b)Clustering y centroides con $k=2$.	34
Figura 11. Ejemplos de curvas de Bézier	36
Figura 12. Diagrama general del algoritmo.	42
Figura 13. Transformación al modelo HSV. a) Imagen original. b) Imagen convertida al modelo HSV.	43
Figura 14. Canal S de la imagen original	44
Figura 15. Binarización del canal S	44
Figura 16. Eliminación de objetos pequeños.	44
Figura 17. Dilatación morfológica	45
Figura 18. a) Imagen Original. b) Resultado de la eliminación de los glóbulos blancos.	45

Figura 19. Binarización del canal S.	46
Figura 20. Eliminación de residuos pequeños	47
Figura 21. a) Imagen original. b) Resultado de la eliminación de las plaquetas y glóbulos blancos	47
Figura 22. Mejoramiento de la imagen	48
Figura 23. Imagen mejorada.	48
Figura 24. Imagen a blanco y negro.	49
Figura 25. Relleno de los centros de los glóbulos rojos.	50
Figura 26. Resultado de las operaciones de apertura y cierre sobre la imagen binarizada	50
Figura 27. Eliminación de los objetos que tocan el borde.	51
Figura 28. Bosquejo de la distribución de probabilidad dependiendo del área del glóbulo para que pertenezca a uno de los conjuntos de la clasificación (Individual, Dos glóbulos, Tres glóbulos).	52
Figura 29. Primera separación general de grupos de células. En rojo las células individuales, de color verde los grupos de dos células y en azul grupos de tres o más.	53
Figura 30. (a) Componente conexo. (b) Erosión para separar el componente conexo.	54
Figura 31. Watershed utilizando los resultados de la erosión como marcadores	54
Figura 32. Gráfica en 3D de las erosiones iterativas.	55
Figura 33. Resultado de Hough	56
Figura 34. Resultado de k-means.	56
Figura 35. Watershed utilizando los resultados de k-means como marcadores	57
Figura 36. Células con dos puntos finales en su borde.	58

Figura 37. Células con más de dos puntos finales en su borde.	58
Figura 38. Puntos de control de Bézier. (a) Puntos anteriores a los puntos finales. (b) Arco usando los puntos finales.	59
Figura 39. Borde de una célula suavizado con Bézier.	59
Figura 40. Resultado del borde de una célula suavizado con Bézier.	59
Figura 41. Borde de una célula trazado a partir de un círculo.	60
Figura 42. Resultado del borde de una célula trazado a partir de un círculo.	60
Figura 43. Resultado de la detección del borde de todas las células presentes en la imagen	61
Figura 44. Pantalla de Inicio	62
Figura 45. Vista Cargar imagen	63
Figura 46. Vista Cargar Nueva Imagen	63
Figura 47. Detectar Superposición	64
Figura 48. Barra de herramientas	64

RESUMEN

TÍTULO:

ALGORITMO PARA LA DETECCIÓN DE OBJETOS SUPERPUESTOS EN IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS *

AUTORES:

LAURA MELISSA SANABRIA ROSAS
MIGUEL FABIÁN ROMERO RONDÓN **

PALABRAS CLAVE:

Glóbulos rojos, Hematología, Hough, K-means, Procesamiento digital de imágenes, Superposición, Watershed.

DESCRIPCIÓN:

El hemograma es uno de los exámenes médicos más solicitados, ya que ofrece información detallada sobre las tres líneas celulares presentes en la sangre: la serie roja, la serie blanca y la serie plaquetaria. La serie roja está compuesta por los glóbulos rojos, los cuales son utilizados para la detección de múltiples enfermedades hematológicas, mediante el conteo o la inspección visual de estas células. Generalmente estos procedimientos los realizan equipos especializados que representan grandes costos para los centros médicos, ya que implica grandes inversiones en su compra y mantenimiento. Además, para emitir algunos diagnósticos el especialista debe hacerlo de forma manual, observando en el microscopio las células sanguíneas, lo que implica mayor esfuerzo físico por el gran número de muestras que se toman diariamente. Con el propósito de facilitar este trabajo, se han propuesto diferentes técnicas de procesamiento digital de imágenes para la detección y clasificación de glóbulos rojos, pero se ha encontrado un problema muy común que es la presencia de células superpuestas, lo cual genera diversos errores en los resultados. Por esta razón, se propone la implementación de un algoritmo en una herramienta computacional, utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes, que permita abordar el problema de superposición en imágenes de frotis celular, con el fin de dar soporte al especialista en el proceso de lectura visual, siendo este la base para trabajos futuros en análisis estadísticos de células sanguíneas.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática.
Director: Lola Xiomara Bautista Roza. Codirector: Alfonso Mendoza Castellanos

ABSTRACT

TITLE:

ALGORITHM FOR DETECTION OF OVERLAPPING OBJECTS IN MICROSCOPIC IMAGES OF BLOOD CELLS *

AUTHORS:

LAURA MELISSA SANABRIA ROSAS
MIGUEL FABIÁN ROMERO RONDÓN **

KEYWORDS:

Red Blood Cells, Hematology, Hough, K-means, Digital Image Processing, Overlap, Watershed.

DESCRIPTION:

The hemogram is one of the most requested medical tests, as it presents details about the three cell lines in the blood: red series, white series and platelet series. The red series is composed of red blood cells, which are used to detect multiple hematological diseases by counting or visual inspection of the cells. These procedures are usually made with specialized equipment that represents large costs for medical centers, as it involves large investments in purchase and maintenance. In addition, to issue some diagnostics specialist must do it manually, observing under the microscope the blood cells, implying greater physical effort by the large number of samples taken daily. In order to facilitate this work, different techniques of digital image processing for detection and classification of red blood cells have been proposed, but a common problem is the presence of overlapping cells, which generates various errors results. Therefore, the implementation of an algorithm in a computational tool, using digital image processing technics to address the problem of overlapping in cellular smear images in order to support the clinician in visual reading process is proposed and this will be the basis for future work on statistical analysis of blood cells.

* Bachelor Thesis

** Physicomechanical Engineering Faculty. System engineering school. Director: Lola Xiomara Bautista Roza. Codirector: Alfonso Mendoza Castellanos.

INTRODUCCIÓN

La sangre está compuesta por una parte líquida, conocida como plasma, y elementos formes como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas [1]; para su análisis se realiza un estudio llamado hemograma, el cual consiste en el conteo del número de elementos figurados que hay en cierto volumen de sangre y permite confirmar o presumir diversas enfermedades de acuerdo a las alteraciones presentadas en el recuento.

El cuadro hemático o hemograma es una de las pruebas que con mayor frecuencia se solicitan al laboratorio clínico, y uno de los estudios que mayor información aporta al médico sobre la homeostasis¹ de un individuo [2]. En la actualidad se realiza de forma automática mediante equipos especializados, calibrados de acuerdo a los rangos establecidos por el fabricante; cuando el conteo está por fuera de este rango, o se necesita analizar el estado de maduración, las características tintoriales, el contenido de los gránulos, las inclusiones y formas celulares, se debe recurrir a la observación de las células utilizando el microscopio, a partir de un extendido de sangre periférica, convirtiéndose en un proceso tedioso para los especialistas.

Con el propósito de facilitar este trabajo y hacerlo más eficiente, se ha desarrollado una amplia gama de algoritmos en el procesamiento digital de imágenes, para la captura, representación, clasificación y análisis de objetos en imágenes microscópicas. Aun así, en la automatización de tareas como la segmentación, o la clasificación de elementos en una imagen, se ha encontrado un problema muy común que es la presencia de células superpuestas, el cual está estrechamente relacionado con una preparación inadecuada del extendido.

¹ Homeostasis: propiedad de los organismos vivos que consiste en su capacidad de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

Por esta razón, con este proyecto se pretende implementar un algoritmo que permita realizar la detección de objetos superpuestos en imágenes microscópicas de células sanguíneas, realizando una revisión profunda del estado del arte para escoger las técnicas más adecuadas.

Este documento se encuentra organizado de la siguiente manera. En el siguiente capítulo se muestran los objetivos planteados para este proyecto. En el capítulo 3 se explican algunos conceptos y definiciones, necesarios para la comprensión de la solución propuesta. Con el fin de mostrar las mejores técnicas utilizadas en el procesamiento digital de imágenes, se realiza la revisión del estado del arte en el capítulo 4. En los capítulos 5 y 6 se especifican los pasos del desarrollo del algoritmo y su implementación. Posteriormente, se presentan las pruebas realizadas al algoritmo implementado para hallar los indicadores de especificidad y sensibilidad. Por último, se encuentran los capítulos de conclusiones y recomendaciones.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar un algoritmo que permita realizar la detección de objetos superpuestos en imágenes microscópicas de células sanguíneas mediante procesamiento digital de imágenes.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el procedimiento adecuado que permita realizar la detección de células sanguíneas superpuestas en imágenes microscópicas, tomando como base la revisión del estado del arte.
2. Implementar un algoritmo que permita realizar la detección de dos o tres objetos superpuestos en imágenes microscópicas de células sanguíneas.
3. Diseñar una interfaz gráfica para el algoritmo implementado, que permita una fácil manipulación por parte del profesional.
4. Calcular indicadores de especificidad y sensibilidad para el algoritmo implementado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA SANGRE

La hematología es el estudio de los tejidos y componentes que forman la sangre. Normalmente, las funciones de la sangre son la entrega de nutrientes, hormonas, y oxígeno a los tejidos; la recolección y eliminación de los residuos del metabolismo celular; la prevención de fugas mediante el cierre de los agujeros en los vasos sanguíneos. La sangre representa del 5% al 7% del peso corporal y se compone de dos elementos principales [3] [4].

- **Elementos celulares**
 - **Glóbulos rojos:** Son las células responsables de llevar el oxígeno y el dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos, a través de la hemoglobina. La célula tiene forma de disco y es bicóncava. Su vida útil es limitada por su suministro de energía, ya que no tiene un núcleo definido.
 - **Glóbulos blancos:** Son células nucleadas incoloras, cuya función principal es la protección contra los organismos invasores.
 - **Plaquetas:** Son células no nucleadas, en forma de disco. Las plaquetas se liberan para evitar fugas o hemorragias causadas por defectos inherentes o adquiridos en las paredes de los vasos sanguíneos. Estas células tienen una vida útil de alrededor de 1 semana.

- **Plasma**

Es la porción líquida de la sangre en la que los elementos celulares se suspenden y se distribuyen por todo el cuerpo.

Hemograma

El examen de sangre periférica o hemograma es una parte rutinaria de la evaluación del paciente que realiza la mayoría de los médicos, independientemente de su especialidad. Debido a su accesibilidad y cercanía a todos los tejidos, la sangre a menudo proporciona la evidencia más temprana de los cambios en el estado de salud y el desarrollo de la enfermedad.

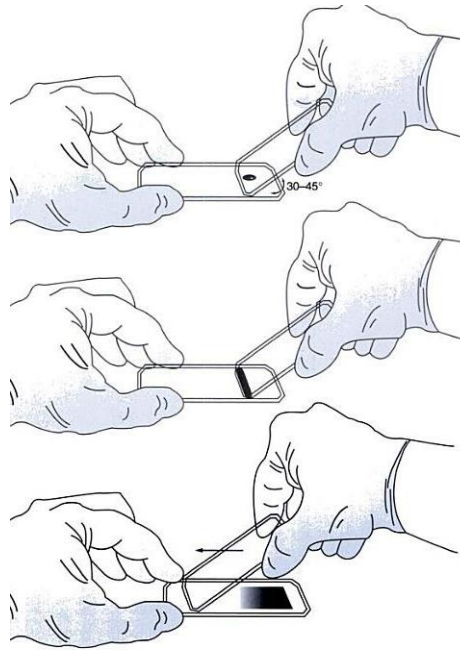
2.2. EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA

Un frotis de sangre preparado en forma adecuada es esencial para asegurar la evaluación correcta de la morfología celular. Se encuentra disponible una variedad de métodos para la preparación y la tinción de los frotis de sangre [5].

Preparación de un frotis con la técnica del portaobjetos en cuña

La preparación de extendidos con la técnica del portaobjetos en cuña es la más conveniente y común para hacer un frotis de sangre periférica. Esta técnica requiere al menos de dos portaobjetos de vidrio, limpios, de 75 x 25 mm. Uno de ellos se utiliza como soporte del extendido sanguíneo y el otro como portaobjetos extensor. Una gota de sangre anticoagulada se coloca en un extremo y el extensor se desliza hacia atrás hasta que toma contacto con la gota de sangre y se sostiene en esta posición hasta que la sangre se esparce por todo el ancho del portaobjetos. Todo el procedimiento se muestra en la figura 1.

Figura 1. Técnica del portaobjetos en cuña para la preparación de un frotis de sangre periférica.



Fuente: Jacqueline H. Carr, Atlas de Hematología Clínica.

Tinción del frotis de sangre periférica

El propósito de teñir los frotis sanguíneos es identificar las células y reconocer fácilmente la morfología a través del microscopio. La tinción de Wright-Giemsa es la utilizada con mayor frecuencia para frotis de sangre periférica. Ambas contienen eosina y azul de metileno; por lo tanto, se denominan tinciones polícromas [6].

2.3. CONTEO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Antes, los recuentos de sangre se realizaban por técnicas manuales lentas y tediosas, donde se usaban cámaras de recuento, microscopios, tubos de vidrio, colorímetros, centrifugas y unos reactivos simples. Aunque estos métodos eran capaces de producir resultados satisfactorios si se realizaban de forma correcta,

resultaban muy poco fiables debido a un alto grado de imprecisión, y también eran muy lentos. Por esto, se crearon métodos automatizados. Durante casi dos décadas la impedancia eléctrica fue el único método que automatizaba el conteo, pero en los años 70, la tecnología de dispersión de luz fue desarrollada y luego, en los 80, se presentó el procesamiento de imágenes [7] [8].

Métodos automatizados

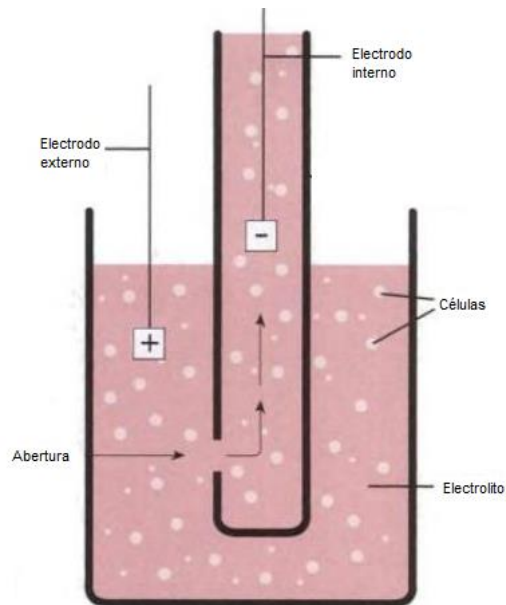
- **Impedancia eléctrica**

Todos los contadores de células de impedancia eléctrica se basan en los principios de Coulter, el cual consiste en diluir una solución que conduce la electricidad, llamada electrolito, por el cual fluye una corriente eléctrica, que se transmite de un electrodo a otro a través de una abertura, como se muestra en la figura 2. Como las células sanguíneas son malas conductoras de la electricidad, cada vez que pasa a través de la abertura, produce una interrupción del circuito proporcional al tamaño de la célula, lo cual permite saber la cantidad y el tamaño de las células [9].

- **Dispersión óptica**

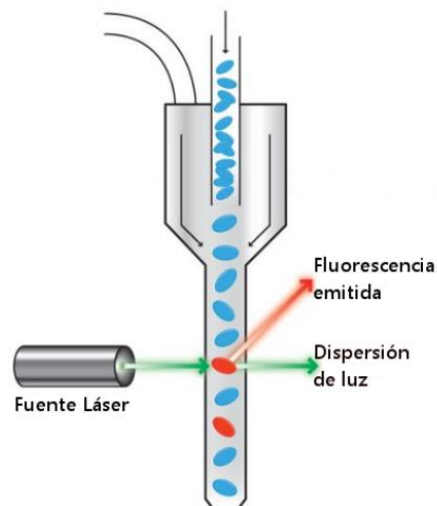
En los sistemas de dispersión óptica, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser (ver Figura 3). La fuente de luz es generalmente una lámpara de tungsteno o un láser de helio-neón (amplificación de luz por emisión estimulada de radiación). La luz transmitida y dispersada cada vez que pasan las células a través del tubo, se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células [10].

Figura 2. Método de impedancia eléctrica para el conteo de células sanguíneas



Fuente: Bernadette F. Rodak, Hematology: Clinical Principles and Applications

Figura 3. Método de dispersión óptica para el conteo de células sanguíneas



Fuente: Castellanos & Hasbón. Herramienta computacional para la detección de glóbulos rojos en imágenes microscópicas de células sanguíneas.

2.4. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Una imagen puede ser definida como una función de dos dimensiones, $f(x, y)$, donde x e y son coordenadas de un plano, y la amplitud de 'f' en cualquier par de coordenadas (x, y) es la intensidad o nivel de gris de la imagen en ese punto. Cuando x , y , y los valores de amplitud de f son cantidades discretas finitas, entonces la imagen se denomina imagen digital [11].

La transformación de imágenes digitales con un computador es llamada procesamiento digital de imágenes, la cual ha sido desarrollada en respuesta a los diferentes problemas que se tienen con las imágenes tradicionales, como son el mejoramiento, restauración, segmentación, almacenamiento y transmisión [12].

2.5. PASOS FUNDAMENTALES DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Los pasos que se requieren para el procesamiento digital de imágenes son: la adquisición de la imagen, preprocesamiento, segmentación, representación y extracción de características, y por último, el reconocimiento y la interpretación [13] [14]. Para este proyecto, se tomaron las etapas de Preprocesamiento, Segmentación y una última que llamaremos Presentación de resultados.

2.5.1. Preprocesamiento

El objetivo de este paso generalmente es el mejoramiento y la restauración de la imagen, con lo cual se pretende resaltar ciertas características de la imagen o eliminar el ruido.

- **Escala de grises**

Una imagen en escala de grises sólo cuenta con información sobre la intensidad de la luz, no del color de la misma.

Las imágenes a color por lo general tienen tres canales, así que hay que mezclar esa información en un solo canal, almacenando la información de intensidad y perdiendo la información del color.

El espacio de color más común en imágenes digitales es el RGB, el cual significa que la intensidad de las partes rojas, verdes y azules se almacenan de forma independiente. Si se usa el promedio de estos tres canales, se obtiene la versión a escala de grises de la imagen.

Existe otra opción, la cual se usa en este proyecto, que consiste en cambiar el espacio de color de la imagen a una que represente la luz o el brillo en un solo canal y luego escoger ese canal como la imagen a escala de grises. Uno de esos espacios de color es el HSL (Hue, Saturation, Lightness - Matiz, Saturación y Luminosidad). Primero, se convierte la imagen en RGB a HSL y se escoge el canal L, ya que produce un resultado mucho mejor que tomar el promedio de los canales RGB [15].

- **Filtro**

El nombre filtro es tomado del procesamiento en el dominio de la frecuencia, donde filtrado se refiere a aceptar (pasar) o rechazar ciertos componentes de frecuencia. Por ejemplo, un filtro que pasa las bajas frecuencias es llamado filtro *paso bajo*. El efecto neto producido por un filtro paso bajo es desenfocar (suavizar) la imagen. Se puede lograr un suavizado similar directamente en la imagen usando filtros espaciales (también llamados máscaras, kernels, plantillas, y ventanas) [16].

2.5.2. Segmentación

Es el proceso en el cual la imagen se convierte en pequeños segmentos para poder extraer atributos más precisos de la imagen. Usualmente se usan algoritmos que se basan en la discontinuidad o similitud de los píxeles.

- **Umbralización**

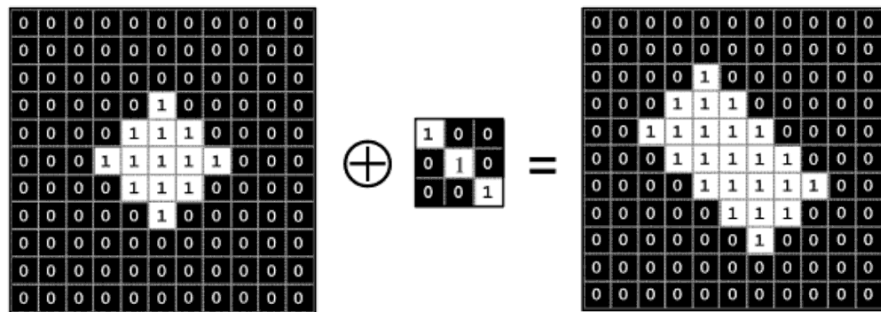
Es una técnica útil para establecer fronteras en imágenes que contienen objetos sólidos en fondos de alto contraste. Existen un gran número de métodos de segmentación para imágenes en escala de grises, los cuales se clasifican si usan información global o local de la imagen. La umbralización global o fija, funciona bien si los objetos de interés tienen una uniformidad en sus niveles de gris y están en un fondo desigual pero con niveles de gris relativamente uniformes. Pero en la mayoría de los casos, el umbral usado en un área de la imagen no funciona bien en otras partes de la misma [17].

Por esta razón, en este proyecto se usó una técnica de umbralización adaptativa, llamada Otsu, ya que es un algoritmo no supervisado que usa el histograma de la imagen para hallar la varianza máxima de los objetos y el fondo, y así, dinámicamente establecer un umbral [18].

- **Operaciones morfológicas**

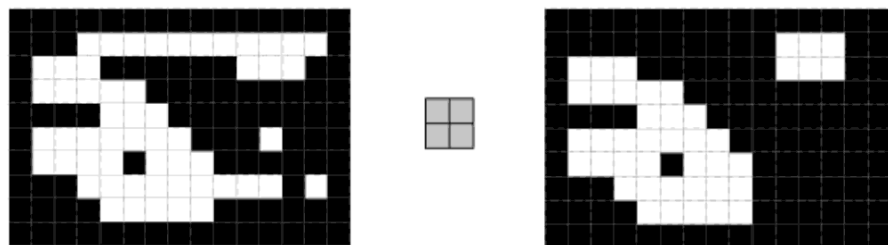
Las dos operaciones morfológicas más comunes son la *dilatación* y la *erosión*. La dilatación tiende a expandir bordes o regiones, mientras que la erosión reduce o incluso elimina las regiones pequeñas. En las figuras 4 y 5 se muestran ejemplos donde se puede observar el elemento estructurante, el cual determina de qué manera se dilata o erosiona la imagen original [19] [20].

Figura 4. Ejemplo de dilatación



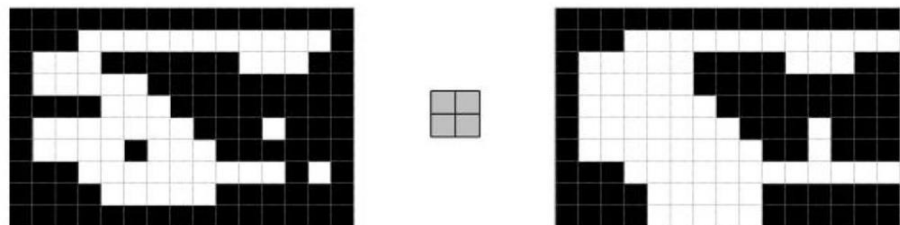
Fuente: Huiyu Zhou, Digital Image Processing.

Figura 5. Ejemplo de apertura



Fuente: Huiyu Zhou, Digital Image Processing.

Figura 6. Ejemplo de cierre



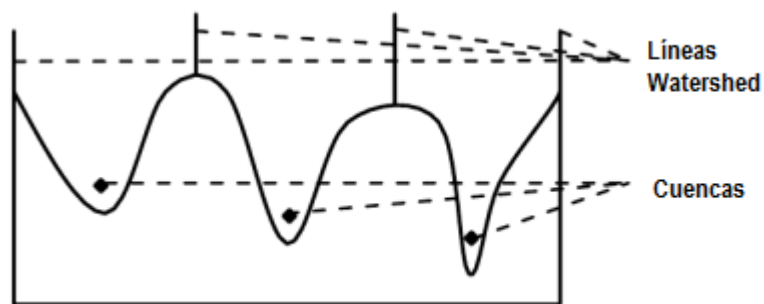
Fuente: Huiyu Zhou, Digital Image Processing.

- **Watershed**

Para usar la transformada watershed, se considera la imagen como una superficie topográfica, conformada por montañas y cuencas, donde el nivel de gris de la imagen representa las altitudes. La región con un nivel de gris constante constituye la zona plana de una imagen, los bordes de la región corresponden a las zonas más altas y las regiones donde el gradiente es pequeño, corresponden a las cuencas de captación, como se muestra en la figura 8. Si se simula una lluvia sobre esa superficie, inundaría los diferentes mínimos de la imagen, dejando en la superficie las líneas watershed que separan cada una de las cuencas.

El algoritmo básico de watershed funciona bien si cada mínimo local corresponde a un objeto de interés, porque la línea watershed representaría los bordes de los objetos. Pero si hay más mínimos locales que objetos de interés, la imagen se sobre segmenta. Para evitar esto, el algoritmo utiliza marcadores.

Figura 7. Segmentación Watershed

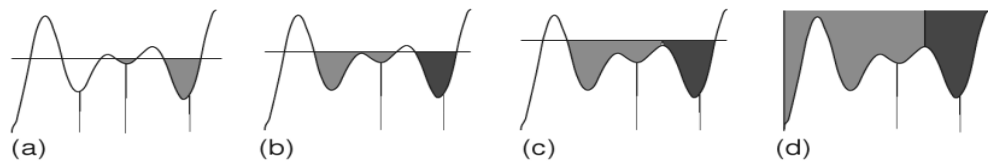


Fuente: Jayaraman, Digital Image Processing.

Un marcador puede ser un sólo punto o un conjunto de puntos, que señala con colores las diferentes regiones. Posteriormente se inundan los huecos

que corresponden al mismo color, pero si el nivel del agua empieza a mezclarse con la de otro color, se construye una represa para evitar que se unan. En la figura 9 se muestra un ejemplo.

Figura 8. Simulación del uso de la transformada watershed con marcadores. (a) inundación inicial. (b) inundación de una cuenca sin marcador. (c) Creación de una represa cuando diferentes marcadores están a punto de unirse. (d) Inundación final, sólo una línea watershed.



Fuente: Qiang Wu, Microscope Image Processing.

Algoritmo:

Sean M_1, M_2, \dots, M_R los conjuntos que denotan las *coordenadas* de los puntos en el mínimo regional de una imagen $g(x, y)$. Sea $C(M_i)$ un conjunto que denota las coordenadas de los puntos en la cuenca asociada con el mínimo regional M_i . La notación \min y \max será utilizada para denotar los valores mínimo y máximo de $g(x, y)$. Finalmente, $T[n]$ representa el conjunto de coordenadas (s, t) para la cual $g(s, t) < n$, es decir:

$$T[n] = \{(s, t) \mid g(s, t) < n\}$$

Geoméricamente, $T[n]$ es el conjunto de coordenadas de los puntos en $g(x, y)$ que se encuentran debajo del plano $g(x, y) = n$.

La topografía será inundada en un número *entero* de incrementos, desde $n = \min + 1$ a $n = \max + 1$. En cualquier paso n del proceso de inundación,

el algoritmo necesita conocer el número de puntos que están por debajo del nivel de inundación.

Sea $C_n(M_i)$ el conjunto de coordenadas de puntos en la cuenca asociada con el mínimo M_i que está inundado en la etapa n . $C_n(M_i)$ está dada por:

$$C_n(M_i) = C(M_i) \cap T[n]$$

Ahora, se denota $C[n]$ como la unión de las cuencas inundadas en la etapa n :

$$C[n] = \bigcup_{i=1}^R C_n(M_i)$$

El algoritmo para encontrar las líneas watershed se inicializa con $C[\min + 1] = T[\min + 1]$. Entonces se procede recursivamente, calculando $C[n]$ a partir de $C[n - 1]$. Un procedimiento para obtener $C[n]$ a partir de $C[n - 1]$ es el siguiente: Se denota como Q al conjunto de componentes conexos en $T[n]$. Entonces, para cada componente conexo $q \in Q[n]$, hay tres posibilidades:

1. $q \cap C[n - 1]$ está vacío.
2. $q \cap C[n - 1]$ contiene un componente conexo de $C[n - 1]$.
3. $q \cap C[n - 1]$ contiene más de un componente conexo de $C[n - 1]$.

La construcción de $C[n]$ a partir de $C[n - 1]$ depende de cuál de estas tres condiciones cumple. La condición 1 ocurre cuando se encuentra un nuevo mínimo, en cuyo caso el componente conexo q se incorpora en $C[n - 1]$ para formar $C[n]$. La condición 2 ocurre cuando q cae dentro de la cueca de algún mínimo regional, en cuyo caso q se incorpora en $C[n - 1]$ para formar $C[n]$. La condición 3 ocurre cuando se encuentra toda, o parte de una línea watershed que separa dos o más cuencas [16].

- **Hough**

La transformada de Hough es reconocida por ser un poderoso método de procesamiento de imágenes para la detección de curvas, formas y movimiento en imágenes con ruido. Paul Hough propuso originalmente el método para la detección de líneas rectas en fotografías de una cámara de burbujas pero ha sido modificado y extendido de varias maneras, para detectar líneas, círculos, curvas parabólicas e hiperbólicas; para la estimación de movimiento 2D y 3D; para el reconocimiento de objetos [23].

La transformada de Hough tiene propiedades importantes que la hacen atractiva para la detección de formas:

1. Reconoce curvas y líneas parcialmente deformes, lo cual es un problema para otros métodos de detección de formas.
2. Detecta formas en presencia de datos randómicos o no relacionados.
3. Detecta diferentes variaciones de la misma forma en una sola operación.
4. Procesa cada pixel de forma independiente; por lo tanto, es posible procesar en paralelo para implementaciones de aceleración de hardware.

Algoritmo ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.:

Sea $\mathbb{X} \subset \mathbb{R}^N$ un conjunto N -dimensional de coordenadas e $\mathbb{I} = \{I(x): \mathbb{X} \rightarrow \mathbb{R}\}$ es el espacio de todas las imágenes definidas sobre \mathbb{X} . Se considera también $\mathbb{P} \subset \mathbb{R}^M$ como el parámetro espacial M -dimensional y la función de restricción $C(x, p): (\mathbb{X}, \mathbb{P}) \rightarrow \mathbb{R}$, que define una plantilla deseada. La plantilla representa un conjunto de puntos paramétricos en el conjunto de coordenadas espaciales que satisface la ecuación $C(x, p) = 0$ para $p \in \mathbb{P}$.

Cada valor del parámetro $p \in \mathbb{P}$ define alguna transformación geométrica de la plantilla en el espacio \mathbb{X} .

La principal característica de la realización de la Transformada de Hough en la práctica, consiste en la utilización del *mapeo de votos* que es un mapeo desde el conjunto de coordenadas espaciales de \mathbb{X} hasta el espacio de todos los subconjuntos del espacio de parámetros:

$$H_C: \mathbb{X} \rightarrow \mathbb{P}^*, \quad \mathbb{P}^* = \{P^*, P^* \subset \mathbb{P}\}$$

Se define el mapa de votación por la fórmula:

$$H_C(x) = \{p \in \mathbb{P}, C(x, p) = 0\}, x \in \mathbb{X}$$

Significa que para cada punto $x \in \mathbb{X}$ el mapa de votación define un conjunto de parámetros para los cuales x ha votado. Utilizando esta definición la Transformada de Hough se puede escribir de la siguiente manera:

$$TH_C(I, p) = \int_x I(x) \delta(\rho(H_C, p)) dx$$

Donde $\rho(P^*, p): \mathbb{P}^*, \mathbb{P} \rightarrow \mathbb{R}$ es una distancia entre el parámetro p y el subconjunto \mathbb{P}^* en el espacio de parámetros.

El algoritmo que realiza la transformada de Hough funciona con espacios discretos \mathbb{X} y \mathbb{P} . En este caso, la transformada puede escribirse de la siguiente manera:

$$TH_C(I, p) = \sum_{\substack{x \in \mathbb{X} \\ I(x)=1}} 1_{p \in H_C(x)}$$

A partir de esta ecuación, se puede notar que cada valor $TH_C(I, p)$ es igual al número de votos que son dados para el parámetro $p \in \mathbb{P}$ para todos los

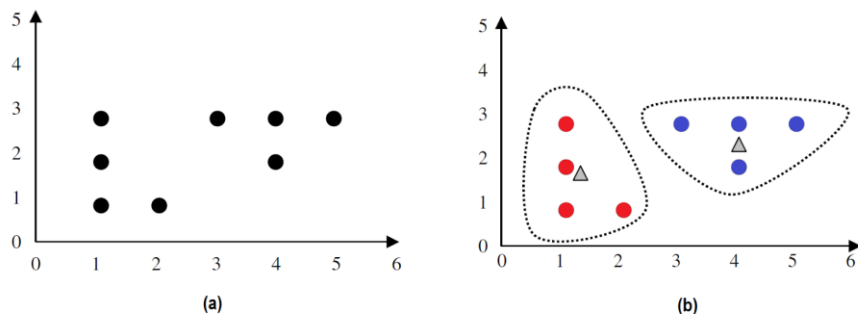
puntos de los objetos de la imagen, es decir, $x \in \mathbb{X}, I(x) = 1$.

- **K-means**

El algoritmo k-means es un algoritmo de clustering iterativo que divide un grupo de datos en un número k de clústeres. Este algoritmo es relativamente rápido, fácil de implementar y muy común en la práctica. Además, es uno de los más importantes en minería de datos [25].

El proceso de clustering funciona de la siguiente manera: primero, se seleccionan k centroides (el centroide de un clúster es normalmente la media de los puntos en ese clúster) iniciales, donde k es especificado por el usuario e indica el número de clústeres deseados. Cada punto de los datos es asignado al centroide más cercano, y cada colección de puntos asignada a un centroide forma un clúster. Posteriormente el centroide de cada clúster es actualizado basado en los puntos asignados a ese clúster. Este proceso se repite hasta que ningún punto cambie de clúster. En la figura 10 se muestra un ejemplo donde k es igual a 2 [26].

Figura 9. K-means. (a)Conjunto de datos inicial. (b)Clustering y centroides con k =2.



Fuente: Junjie Wu, Advances in K-means Clustering: A Data Mining Thinking

Algoritmo:

Inicialización: Establecer los K centroides $\{m^{(k)}\}$ en valores aleatorios.

Eta de asignación: Cada punto n se asigna a su centroide más cercano. El cluster supuesto para el cluster $k^{(n)}$, al cual pertenece el punto $x^{(n)}$, se denota de la siguiente manera:

$$\hat{k}^{(n)} = \underset{k}{\operatorname{argmin}}\{d(m^{(k)}, x^{(n)})\}$$

Donde $d(x, y) = \frac{1}{2} \sum_i (x_i - y_i)^2$. Una representación alternativa y equivalente de esta asignación de puntos a los clusters está dada por “responsabilidades”, las cuáles son variables indicadoras $r_k^{(n)}$. En el paso de asignación se establece $r_k^{(n)}$ en uno, si el centroide k es el más cercano al punto $x^{(n)}$; de otra forma es cero.

$$r_k^{(n)} = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{k}^{(n)} = k \\ 0 & \text{si } \hat{k}^{(n)} \neq k \end{cases}$$

Eta de actualización: Los parámetros del modelo, los centroides, se ajustan para que concuerden con los centroides de los puntos de los cuales son responsables.

$$m^{(k)} = \frac{\sum_n r_k^{(n)} x^{(n)}}{R^{(k)}}$$

Donde $R^{(k)}$ es la responsabilidad total del centroide k .

$$R^{(k)} = \sum_n r_k^{(n)}$$

Repetir el paso de asignación y el paso de actualización hasta que las asignaciones no cambien [27].

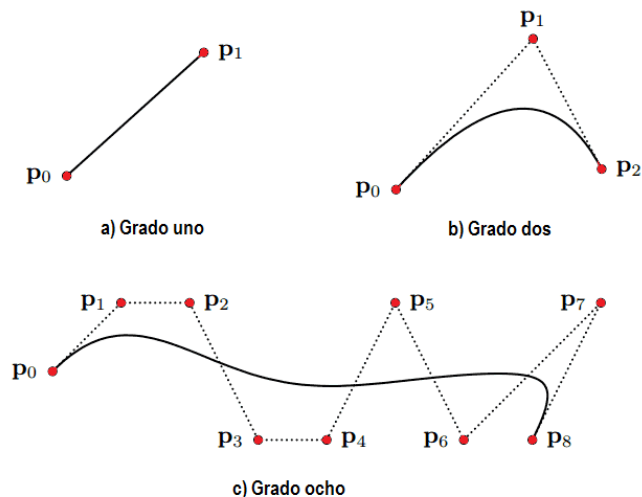
2.5.3. Presentación de resultados

Después de segmentar la imagen en regiones de interés y de extraer las características y objetos relevantes, se procede a presentar al usuario final los resultados.

- **Curvas de Bézier**

Dos de las representaciones matemáticas más importantes de curvas y superficies usadas en gráficas digitales son Bézier y B-Spline. El desarrollo original de las curvas de Bézier la realizaron dos hombres franceses en la industria automovilística; Pierre Bézier en Renault y Paul de Casteljaou en Citroën.

Figura 10. Ejemplos de curvas de Bézier



Fuente: Duncan Marsh, Applied Geometry for Computer Graphics and CAD.

Las curvas de Bézier son curvas polinómicas que tienen una representación matemática particular. Su popularidad es debido al hecho de que poseen un número de propiedades matemáticas que facilitan su manipulación y análisis, y no se requiere conocimiento matemático para usarlas. Una curva de Bézier de grado n está compuesta por una secuencia de $n+1$ puntos, los cuales se llaman puntos de control, en la figura 11 se muestran las curvas de grado uno, dos y ocho **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Esta interpolación fue utilizada porque permite suavizar el trazo del borde de las células en las partes superpuestas, tomando como puntos de control el borde ya detectado y un arco trazado entre los puntos en los que no hay información del borde.

Algoritmo:

Una definición recursiva para la curva de Bézier de grado n la expresa como una combinación lineal punto a punto (interpolación lineal) de un par de puntos en dos curvas de Bézier de grado $n - 1$.

Sea $B_{P_0P_1\dots P_n}$ la curva de Bézier determinada por cualquier selección de puntos P_0, P_1, \dots, P_n .

Las condiciones de la función recursiva son las siguientes:

$$B_{P_0}(t) = P_0$$

$$B(t) = B_{P_0P_1\dots P_n}(t) = (1 - t)B_{P_0P_1\dots P_{n-1}}(t) + tB_{P_1P_2\dots P_n}(t)$$

La fórmula puede ser expresada de forma explícita de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
B(t) &= \sum_{i=0}^n \binom{n}{i} (1-t)^{n-i} t^i P_i \\
&= (1-t)^n P_0 + \binom{n}{1} (1-t)^{n-1} t P_1 + \dots \\
&\dots + \binom{n}{n-1} (1-t) t^{n-1} P_{n-1} + t^n P_n, \quad t \in [0,1]
\end{aligned}$$

Donde $\binom{n}{i}$ son los coeficientes binomiales.

2.6. HERRAMIENTAS PARA EL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

2.6.1. Matlab

Matlab es un potente lenguaje diseñado para la computación técnica, El nombre proviene de Matrix LABORatory, dado que el tipo de dato básico que gestiona es una matriz (array). MATLAB puede ser utilizado en computación matemática, modelado y simulación, análisis y procesamiento de datos, visualización y representación de gráficos, así como para el desarrollo de algoritmos.

El programa estándar comprende una serie de herramientas (funciones) que pueden ser utilizadas para resolver problemas comunes. Pero MATLAB incorpora, además, otras librerías llamadas toolboxes, que son colecciones de funciones especializadas y diseñadas para resolver problemas muy específicos [30].

- **Toolbox de procesamiento de imágenes**

Proporciona un conjunto completo de algoritmos, funciones y aplicaciones para el procesamiento, el análisis y la visualización de imágenes. Puede realizar mejoras de imágenes, enfoque de imágenes borrosas, reducción de ruido, segmentación de imágenes, transformaciones geométricas y registro de imágenes. Muchas de las funciones de la toolbox son multiproceso, para aprovechar los ordenadores con varios núcleos o procesadores [31].

3. ESTADO DEL ARTE

Para este proyecto se realizó una revisión del estado del arte con el fin de determinar las técnicas más adecuadas para el desarrollo del algoritmo. En este proceso se encontraron diferentes formas de abordar el problema de la superposición de células.

En [32] [33] [34] [35] [36] [37] usan la transformada watershed, en la cual se presentan problemas de sobre segmentación pero se aclara que se obtienen mejores resultados si se utilizan marcadores. Por esto, la mayoría de investigadores recomiendan realizar un preprocesamiento apropiado de las imágenes o una selección previa de los objetos para escoger de forma adecuada estos puntos de referencia.

En otras investigaciones [38] [39] [40] [41] [42] [43], se ha realizado la separación con técnicas que se basan en el borde de los objetos, donde se tienen en cuenta su concavidad o convexidad, para encontrar los puntos de máxima curvatura y posteriormente unirlos con alguna técnica de triangulación. Los errores de estos métodos se observan cuando las células tienen un borde irregular, debido muchas veces al preprocesamiento de la imagen, lo cual causa la deformación de los objetos.

Díaz et al [44], propusieron la creación de la plantilla de una célula a partir de las células individuales encontradas en la imagen. Usando métodos estadísticos de verosimilitud hace comparaciones entre los grupos de células y la plantilla, encontrando las diferentes células presentes en dichos grupos.

La forma más sencilla es usar la operación morfológica de erosión, como se muestra en [45] [46] [47], pero este método sólo es efectivo cuando la convexidad

de los grupos es suficientemente profunda. Algunas alternativas para solucionar este problema es realizar la erosión a ciertas partes de la célula, sin embargo es muy limitado debido a la sensibilidad de los parámetros, además el gasto computacional es alto [48].

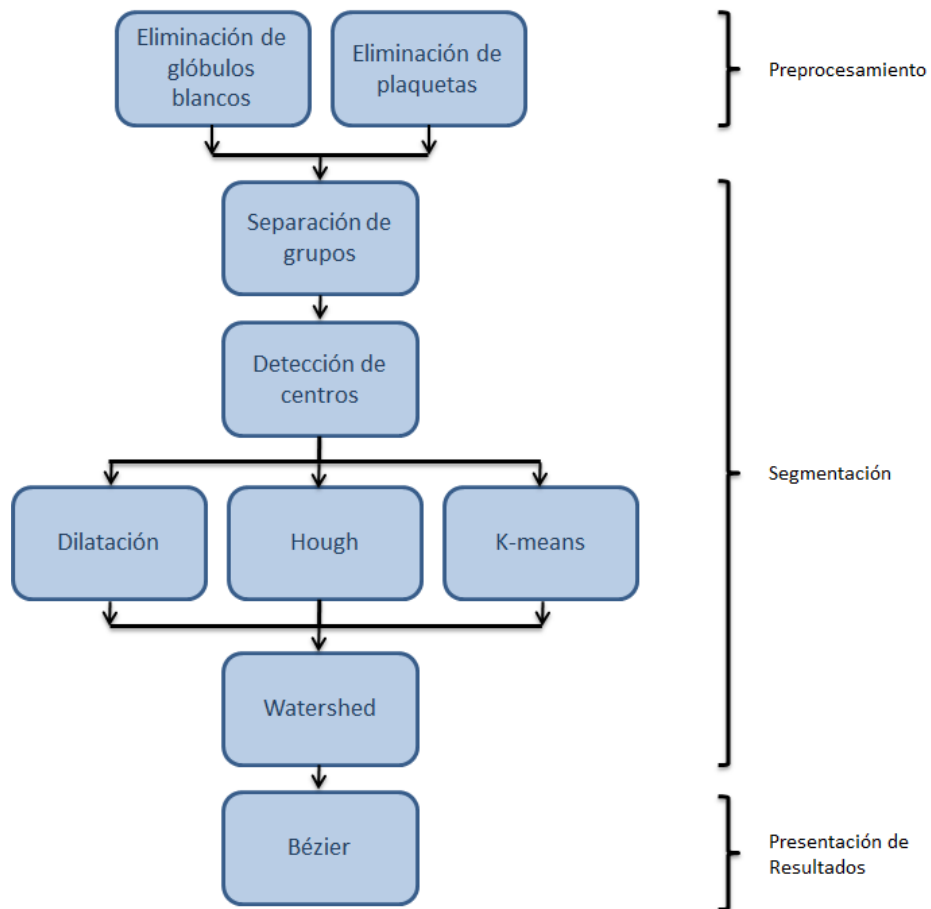
Otros métodos como [49] [50] asumen que las células tienen forma de elipse y usan diferentes técnicas para entrenar el algoritmo encontrando esta figura geométrica en los diferentes grupos. El principal problema es dividir el contorno de las células en segmentos para asignarlos a los diferentes tipos de elipses presentes en la imagen, además, implica un alto costo computacional.

Otra alternativa que se propone en [51] [52] [53] es usar la transformada de Hough para detectar formas circulares y así, segmentar glóbulos rojos en imágenes de extendidos de sangre periférica.

4. DISEÑO DEL ALGORITMO

A partir de las mejores técnicas encontradas en el estado del arte, se diseñó un algoritmo que tiene como objetivo la detección de dos o tres glóbulos rojos superpuestos. En la figura 12 se presenta el diagrama de flujo general del algoritmo.

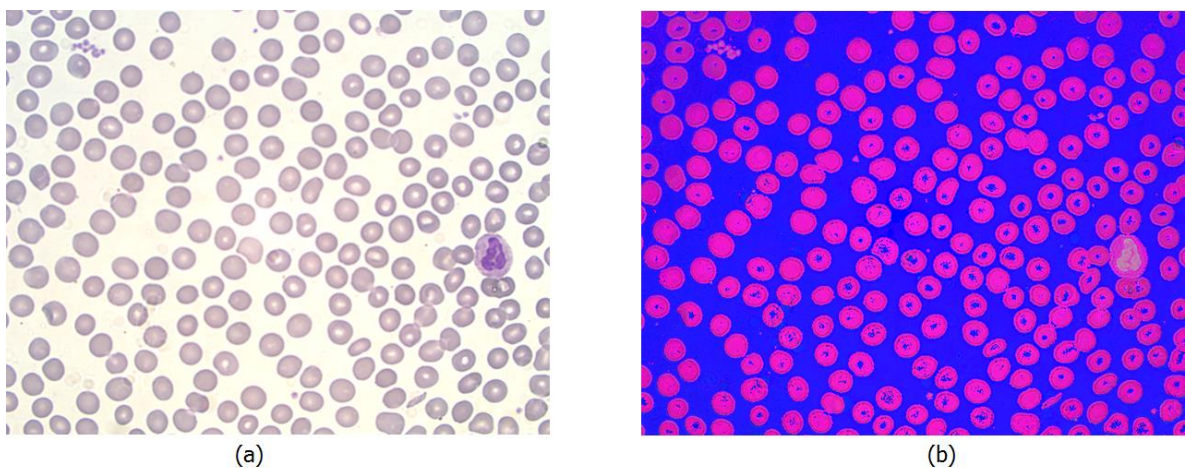
Figura 11. Diagrama general del algoritmo.



4.1. ELIMINACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS

Con el fin de resaltar los glóbulos blancos, se realiza el preprocesamiento de la imagen, convirtiendo la imagen del modelo de color RGB al modelo HSV, el resultado se muestra en la figura 13.

Figura 12. Transformación al modelo HSV. a) Imagen original. b) Imagen convertida al modelo HSV.



Se escoge el canal S, ya que tiene un mayor contraste, haciendo que se distingan claramente las plaquetas y los núcleos de los glóbulos blancos, como se muestra en la Figura 14.

Para hacer más rápido el procesamiento, se binariza la imagen. Se utilizó el método de Otsu para crear una imagen a blanco y negro que contiene los núcleos de los glóbulos blancos y las plaquetas.

Como se observa en la figura 15, todavía queda ruido en la imagen. Por esto, se eliminan los objetos pequeños utilizando apertura morfológica, el resultado se muestra en la figura 16.

Figura 13. Canal S de la imagen original

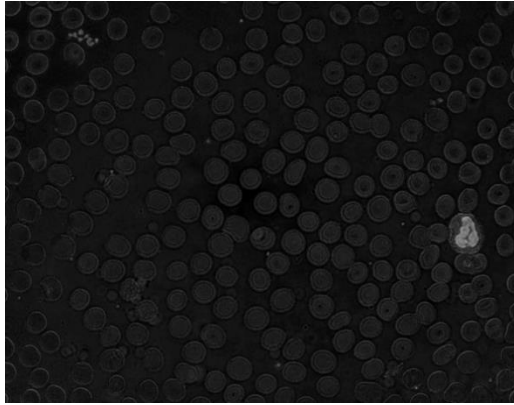


Figura 14. Binarización del canal S

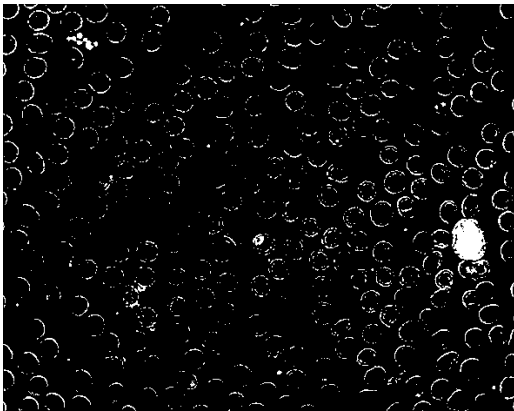


Figura 15. Eliminación de objetos pequeños.



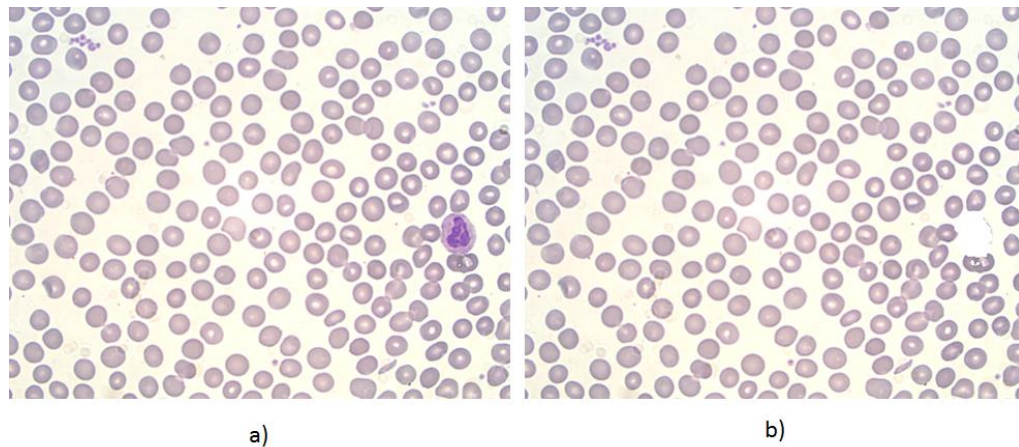
Posteriormente se hace una dilatación con un elemento estructurante tipo disco, para tratar de tomar la mayor parte del citoplasma de los glóbulos blancos, este resultado se puede observar en la Figura 17.

Figura 16. Dilatación morfológica



Finalmente, mediante una resta con la imagen original, se elimina la mayor parte de los glóbulos blancos. En la Figura 18 se presenta la eliminación de los glóbulos blancos sobre la imagen inicial.

Figura 17. a) Imagen Original. b) Resultado de la eliminación de los glóbulos blancos.

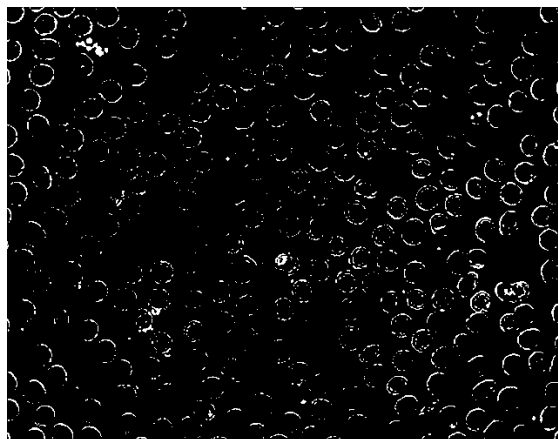


4.2. ELIMINACIÓN DE PLAQUETAS

Como se observa en el punto anterior, la extracción del canal S y la binarización también hacen posible distinguir las plaquetas, por esta razón estos pasos se repiten para eliminar las plaquetas.

Posteriormente, se realiza una resta entre la imagen binarizada del canal S y la binarización de la imagen original. El resultado de esta sustracción se muestra en la Figura 19.

Figura 18. Binarización del canal S.



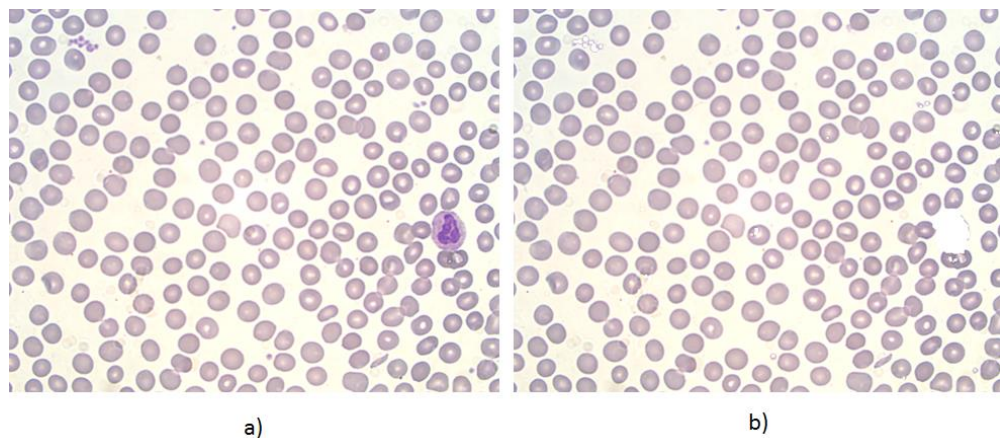
A pesar de este proceso, todavía queda ruido en la imagen, por lo que se procede a eliminar los objetos de áreas muy pequeñas utilizando la operación morfológica de apertura con un elemento estructurante tipo disco; el resultado de la eliminación del ruido se muestra en la Figura 20.

En la Figura 21 se presenta el resultado de la eliminación de glóbulos blancos y plaquetas de la imagen original.

Figura 19. Eliminación de residuos pequeños



Figura 20. a) Imagen original. b) Resultado de la eliminación de las plaquetas y glóbulos blancos



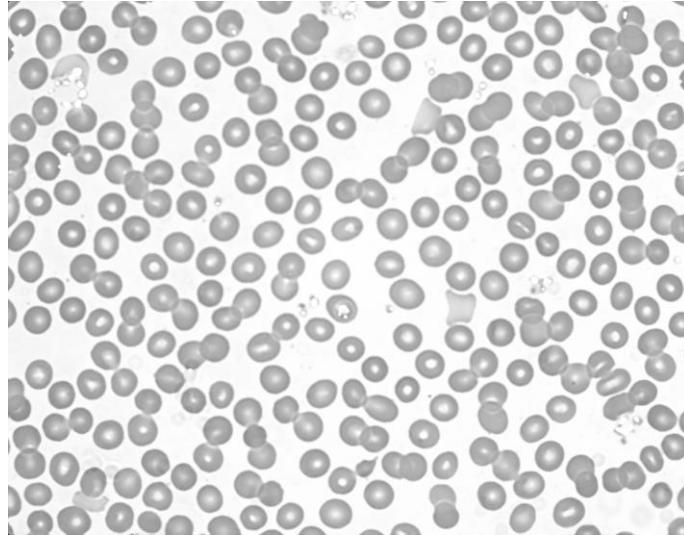
4.3. ELIMINACIÓN DEL FONDO

En este paso se quiere eliminar el fondo, ya que esto mejora la iluminación de la imagen.

Como primer paso se convierte la imagen a escala de grises, se usa el filtro de la mediana, para eliminar el ruido salt & pepper presente en la imagen y se hace un cierre morfológico con un elemento estructurante tipo disco, la imagen filtrada se

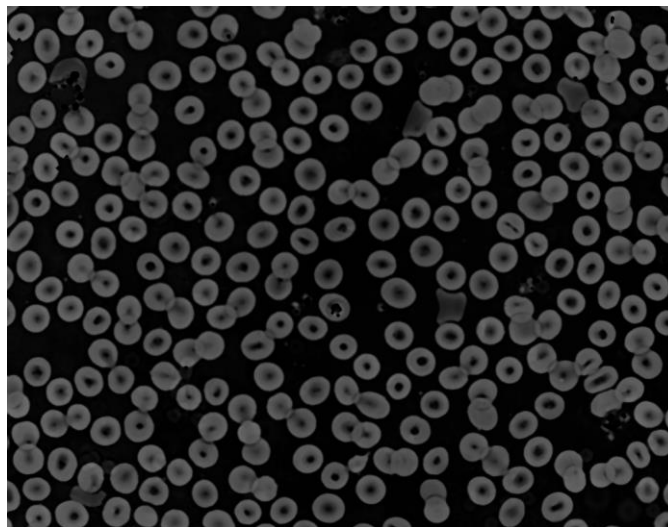
muestra en la Figura 22.

Figura 21. Mejoramiento de la imagen



Para obtener el fondo, se hace un cierre con un elemento estructurante tipo disco, de un tamaño bastante grande, creando una máscara aproximada del fondo y posteriormente mediante una resta con la imagen, se obtiene la figura 23.

Figura 22. Imagen mejorada.

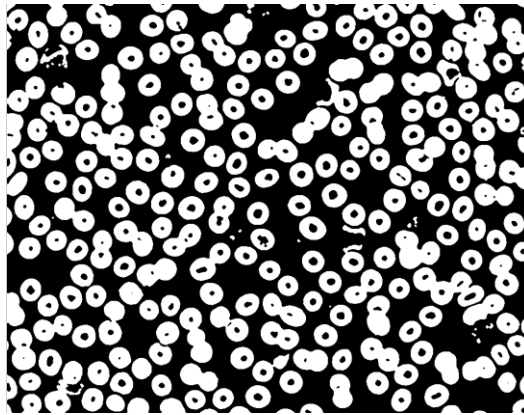


4.4. DETECCIÓN DE LAS CÉLULAS

4.4.1. Separación de grupos

Si se binariza la imagen obtenida en la Figura 23, utilizando el método de umbralización estadística de Otsu, se obtiene como resultado la imagen en blanco y negro que se presenta en la Figura 24.

Figura 23. Imagen a blanco y negro.



Como resultado de la binarización, se pueden apreciar huecos en el interior de las células, debido a la iluminación y a la forma cóncava de los glóbulos rojos. Por lo tanto, se rellenan estos espacios negros, utilizando una técnica que emplea dilatación morfológica para cerrar sólo los centros de los glóbulos rojos, el resultado de esta operación se puede observar en la Figura 25.

El ruido que aún se presenta en la Figura 25, se elimina utilizando una apertura morfológica con un elemento estructurante de tipo disco y posteriormente se realiza un cierre morfológico sobre la imagen para cerrar los glóbulos rojos que se abrieron en el paso de binarización debido a la iluminación en su superficie, este resultado se presenta en la Figura 26.

Figura 24. Relleno de los centros de los glóbulos rojos.

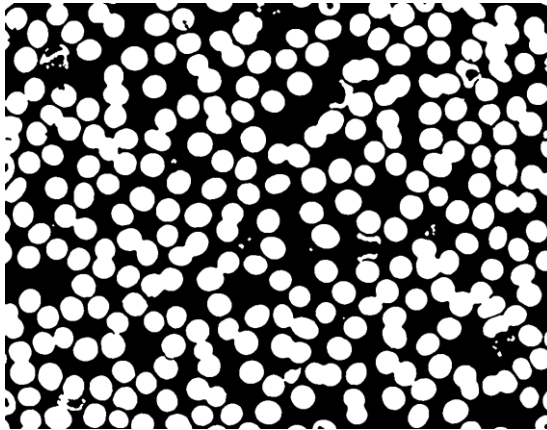
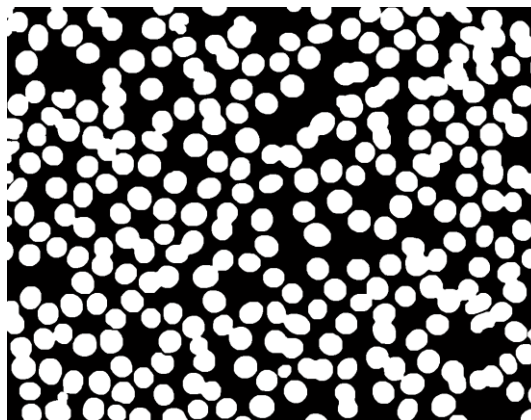
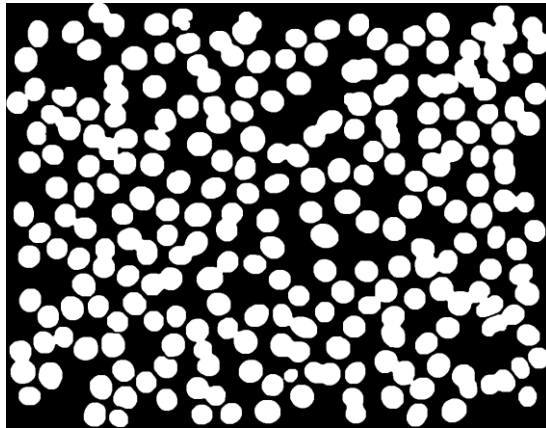


Figura 25. Resultado de las operaciones de apertura y cierre sobre la imagen binarizada



Es importante señalar que a partir de este paso se eliminan los objetos que tocan el borde de la imagen, ya que la información que se puede tomar de ellos es insuficiente, en la Figura 27 se muestra el resultado de la eliminación de estos objetos.

Figura 26. Eliminación de los objetos que tocan el borde.



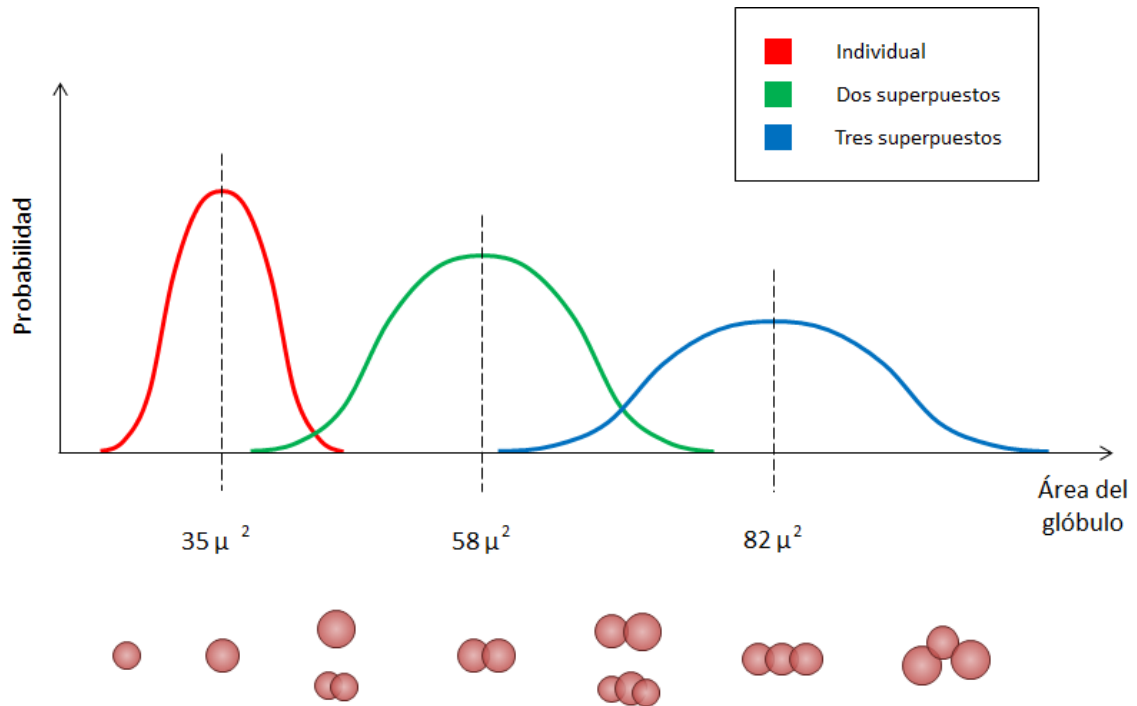
Cada uno de los objetos que se presentan en la Figura 27, se puede ver como un *componente conexo*² de la imagen.

Teniendo en cuenta que el área circular de un glóbulo rojo, ronda en promedio los 35 micrómetros; se puede graficar un bosquejo de las curvas de distribución de las áreas para los glóbulos rojos individuales, 2 glóbulos rojos superpuestos, y 3 o más glóbulos rojos superpuestos, como se muestra en la Figura 28.

A partir de esta idea se puede realizar una primera clasificación de los componentes conexos encontrados en la imagen, de acuerdo a su área; para tener una noción de la cantidad de glóbulos que pueden estar en cada uno de ellos.

² Sea S un subconjunto de los píxeles de una imagen. Dos píxeles p y q , se dice que están conectados en S , si existe un camino entre ellos que contiene sólo píxeles que pertenecen a S . Para cada píxel p en S , el conjunto de píxeles que están conectados a éste en S , se le llama componente conexo de S .

Figura 27. Bosquejo de la distribución de probabilidad dependiendo del área del glóbulo para que pertenezca a uno de los conjuntos de la clasificación (Individual, Dos glóbulos, Tres glóbulos).

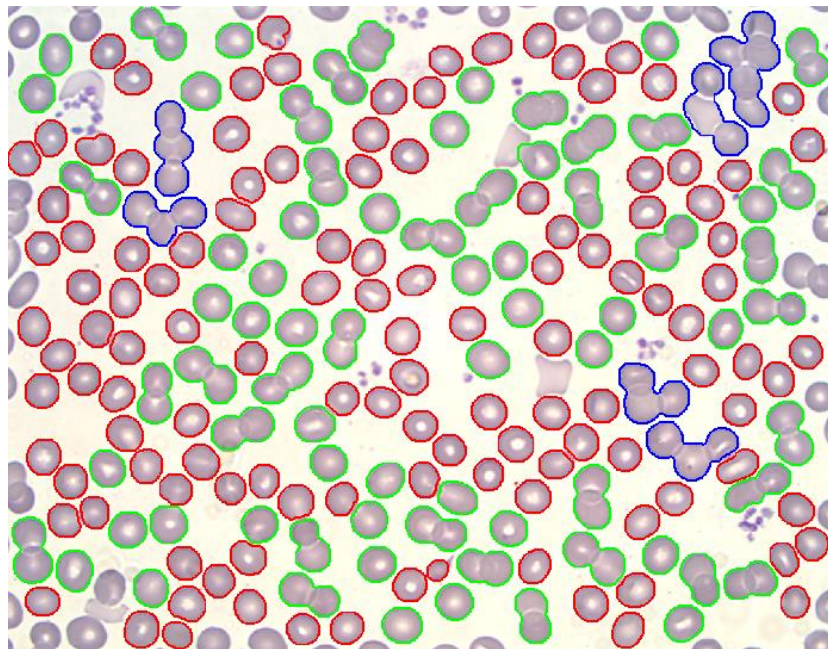


Como se observa en la Figura 29, los errores de clasificación se pueden presentar en la intersección de las curvas de distribución de probabilidad. Para resolver estos errores, se realiza lo siguiente:

- Para resolver el error en la detección de una célula individual o dos células superpuestas, se utiliza la envolvente convexa, si ésta es igual al borde de la célula, se clasifica este componente conexo como una célula individual, en caso contrario, se clasifica como un grupo de dos células.
- Para resolver el error en la clasificación de los grupos de dos o tres células, se usa Hough para detectar el número de círculos presentes, si el resultado

difiere con una variación mínima del número de glóbulos detectados de acuerdo al área, se toma como verdadera la cantidad que determina Hough. Pero si por el contrario, la diferencia es mayor a 1, se mantiene el número de glóbulos definidos por el área. Este procedimiento también es útil para clasificar entre grupos de más de tres células.

Figura 28. Primera separación general de grupos de células. En rojo las células individuales, de color verde los grupos de dos células y en azul grupos de tres o más.



4.4.2. Detección de las células superpuestas

4.4.2.1. Usando erosión

Posterior a la clasificación de los grupos de células, se necesita conocer el centroide de cada uno de los glóbulos que conforman el componente conexo. Como primer intento para conocer este centro, se utilizan erosiones sucesivas.

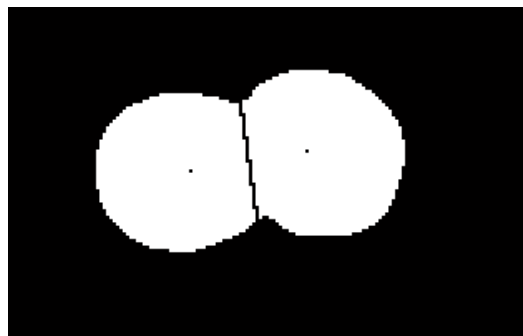
Para esto, se crea una imagen por cada componente conexo que no fue clasificado como individual. Primero se hacen erosiones de manera iterativa hasta que el componente conexo se separe, es decir, hasta que se encuentren dos componentes conexos en el caso de los grupos de dos células y tres componentes conexos en el caso de los grupos de tres células.

Figura 29. (a) Componente conexo. (b) Erosión para separar el componente conexo.



Ahora, se busca la línea que permita separar las células. Para esto se utiliza watershed. Se halla el centro de masa de los componentes que quedaron en la figura 30(b) para usarlos como marcadores. En la figura 31 se muestran los centroides y la línea de watershed, trazados sobre el componente conexo.

Figura 30. Watershed utilizando los resultados de la erosión como marcadores

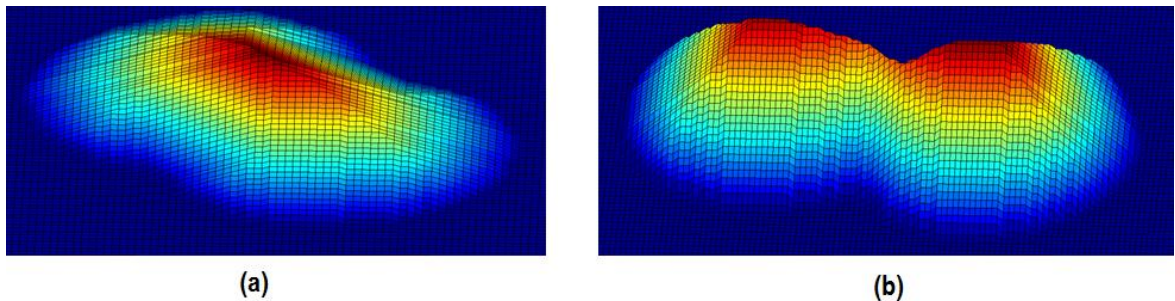


4.4.2.2. Usando Hough

En la figura 32 se muestra las erosiones iterativas de dos grupos de células diferentes, realizadas en el punto anterior, en 32(a) se muestra la que no logró separarse y en 32(b) se observa que las células se separaron después de cierto número de iteraciones.

El problema que se presenta es que después de la erosión, algunas células no se separan, sin embargo, se tomó ventaja de la morfología de las mismas (generalmente los glóbulos rojos tienen forma circular), utilizando la transformada de Hough, la cual busca círculos que tengan un rango de radios dado.

Figura 31. Gráfica en 3D de las erosiones iterativas.



A continuación, en la Figura 33, se muestran los centros de los círculos detectados por Hough en grupos de dos y tres células.

Posteriormente, usando como marcadores estos centros, watershed encuentra las líneas de superposición.

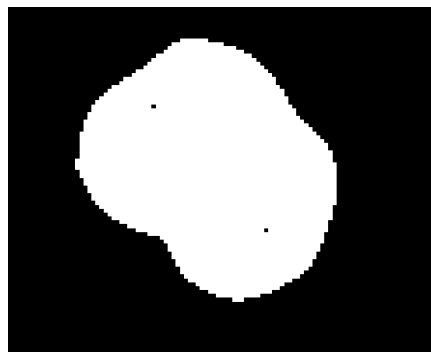
Figura 32. Resultado de Hough



4.4.2.3. Usando k-means

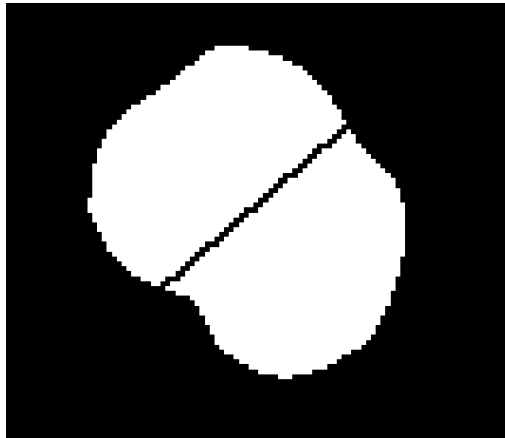
Después de los pasos anteriores, todavía quedan células sin separar, muchas de estas tienen formas irregulares, por esto es importante usar un método que no dependa de la morfología del objeto. La tercera técnica que se usa es k-means, a la cual se le pasa como parámetro el conjunto de puntos que pertenecen al borde y esta halla una aproximación de los centros de cada célula, como se muestra en la figura 34.

Figura 33. Resultado de k-means.



De nuevo, usando como marcadores el resultado de k-means, watershed detecta las líneas de superposición. Este resultado se presenta en la Figura 35.

Figura 34. Watershed utilizando los resultados de k-means como marcadores



4.5. TRAZADO DEL BORDE

El objetivo de esta última etapa es graficar el borde de todos los glóbulos presentes en la imagen. Para esto, se empieza con los grupos de células superpuestas, graficando los arcos que completan los glóbulos en las zonas que se intersecan.

Primero separamos cada glóbulo, utilizando las imágenes resultantes de cada uno de los pasos anteriores, se halla su borde y posteriormente obtenemos los puntos finales de ese borde. En este paso encontramos dos tipos de células, el primero es el que se muestra en la figura 36 donde se encuentran sólo dos puntos finales.

El segundo tipo se observa en la figura 37, en la cual se muestra una célula que tiene más de dos puntos finales en su borde.

Figura 35. Células con dos puntos finales en su borde.

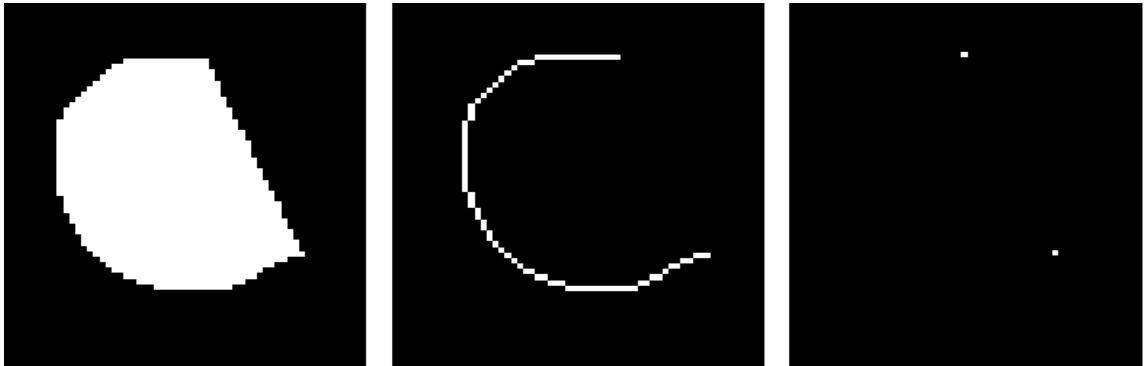


Figura 36. Células con más de dos puntos finales en su borde.

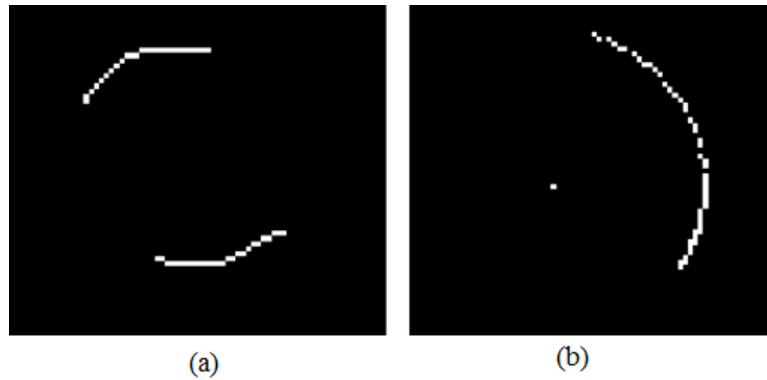


4.5.1. Células con dos puntos finales

Para el caso de las células con dos puntos finales, se usa Bézier para suavizar el borde faltante de la célula, usando como puntos de control lo siguiente:

- 50 puntos tomados del borde (25 puntos anteriores a cada punto final), como se observa en la figura 38(a)
- El arco que se forma usando los dos puntos finales y el centro de masa de la célula (ver figura 38(b)).

Figura 37. Puntos de control de Bézier. (a) Puntos anteriores a los puntos finales. (b) Arco usando los puntos finales.

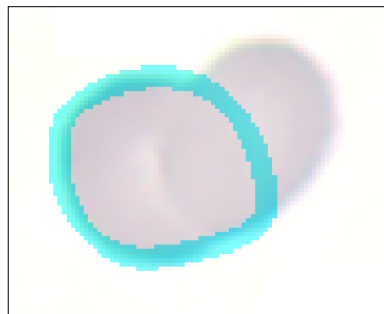


En la figura 39 se observa el resultado de Bézier, el cual es una curva suavizada del borde de la célula y en la figura 40 se muestra el resultado en el grupo original al que pertenece este objeto.

Figura 38. Borde de una célula suavizado con Bézier.



Figura 39. Resultado del borde de una célula suavizado con Bézier.



4.5.2. Células con más de dos puntos finales

Para este tipo de células no se utilizó Bézier, ya que presenta diversos problemas: aumenta el tiempo de ejecución, se tienen menos puntos de control y el borde de estos objetos es muy irregular. Por lo tanto, se midió la distancia de cada punto del borde con el centro de masa de la célula y se escogió un radio promedio para trazar un círculo; y así definir el borde de esta célula. Los resultados de este paso se observan en las figuras 41 y 42.

Figura 40. Borde de una célula trazado a partir de un círculo.

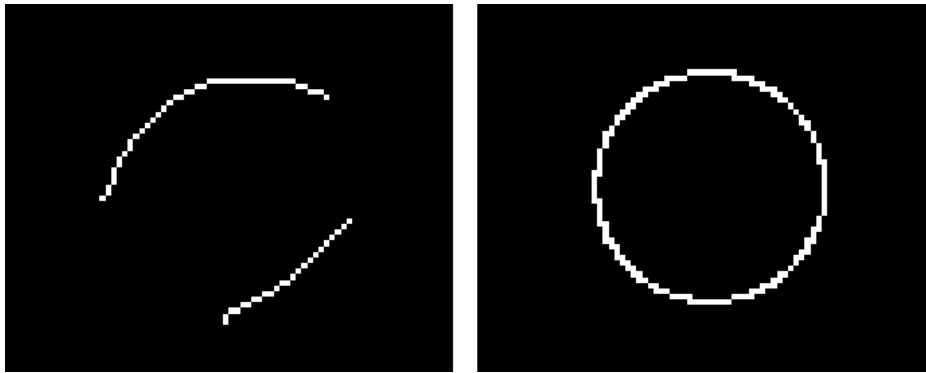
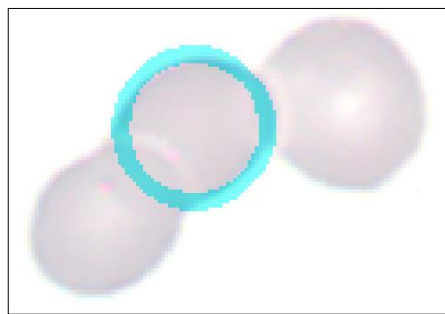


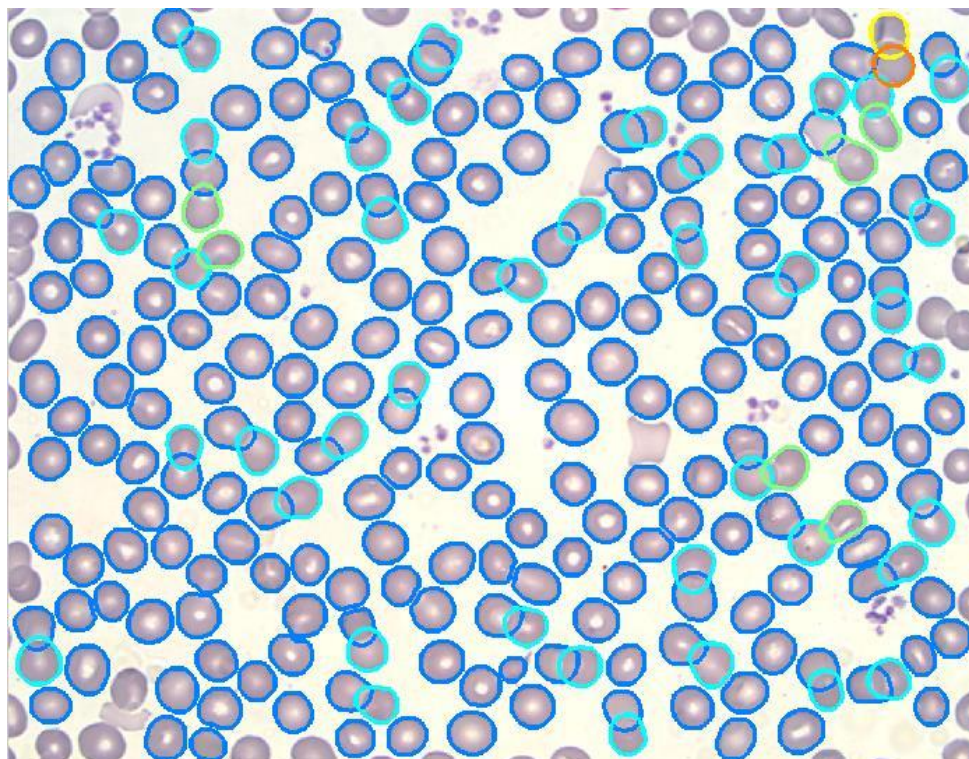
Figura 41. Resultado del borde de una célula trazado a partir de un círculo.



Esto se realiza de forma iterativa con cada uno de los componentes conexos presentes en la imagen y finalmente se obtienen resultados como el de la figura 43, donde se observa que el algoritmo también logra clasificar grupos de más de

tres células.

Figura 42. Resultado de la detección del borde de todas las células presentes en la imagen



5. INTERFAZ GRÁFICA

La interfaz fue desarrollada utilizando la Interfaz Gráfica de Usuario de Matlab. La persona que ingresa a la interfaz, se encuentra con una ventana que da la opción de cargar la imagen para trabajar, como se aprecia en la figura 44.

Figura 43. Pantalla de Inicio



Una vez el usuario hace clic en cargar imagen, aparece una ventana que permite navegar por los directorios del sistema operativo, para buscar la imagen deseada. Esto se observa en la Figura 45.

Cuando se elige la imagen y se hace clic en Abrir, la imagen se carga y se muestra inmediatamente en un lienzo preparado para este propósito. Ahora el usuario tiene dos opciones, que se representan en los botones ubicados a la derecha del lienzo donde se muestra la imagen que se cargó.

La primera de ellas es Cargar Nueva Imagen, que permite cambiar la imagen con la que se va a trabajar, como se observa en la Figura 46, la segunda es Detectar

la superposición, que utilizando el algoritmo desarrollado para el presente proyecto, muestra la imagen resultante donde se presentan los glóbulos rojos separados, como se presenta en la Figura 47. Además, en la parte inferior derecha se muestra el conteo y el diámetro promedio de los glóbulos rojos detectados en la imagen.

Figura 44. Vista Cargar imagen

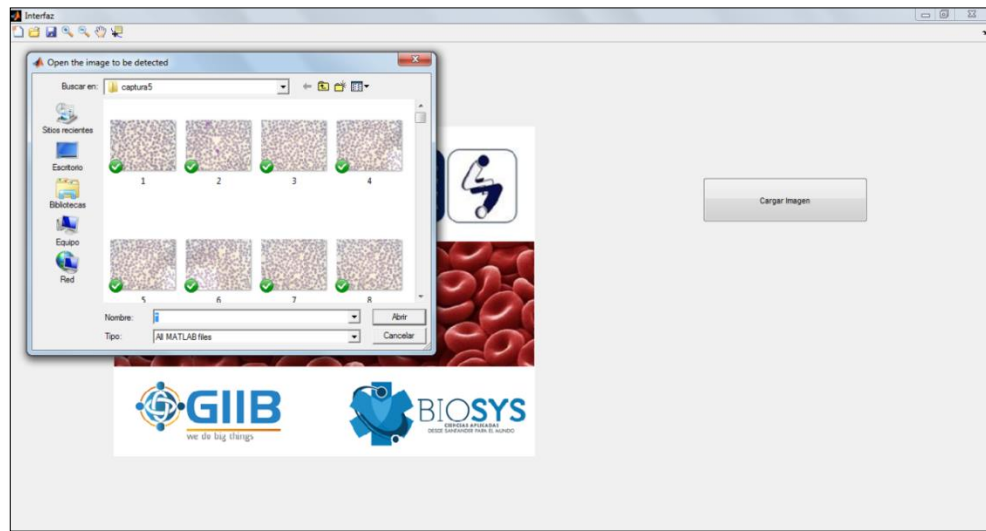


Figura 45. Vista Cargar Nueva Imagen

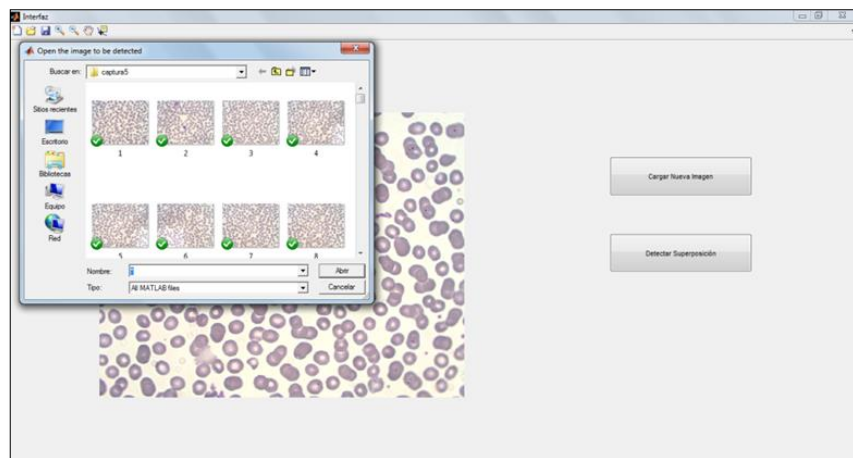
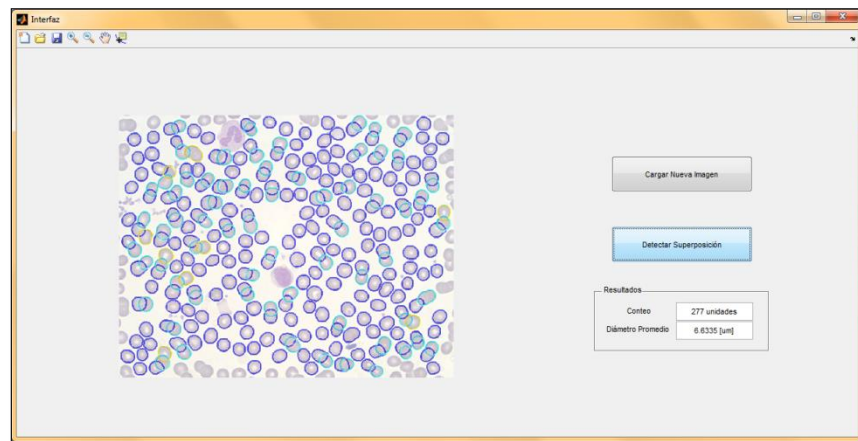


Figura 46. Detectar Superposición



La interfaz tiene una barra en la parte superior, que como se muestra en la Figura 48, contiene las siguientes herramientas:

- Nuevo: Reinicia el programa a sus valores por defecto.
- Abrir Archivo: Permite cargar una imagen.
- Guardar Figura: Guarda la figura actual que está en el lienzo.
- Aumentar: Hace Zoom In (Aumento) sobre la Figura actual.
- Alejar: Hace Zoom out (Alejamiento) sobre la Figura actual.
- Desplazarse: Se desplaza sobre la figura cuando la misma ha sido aumentada.
- Posición del Cursor: Muestra datos sobre la ubicación de un indicador sobre la Figura.

Figura 47. Barra de herramientas



6. PRUEBAS

Para las pruebas se utilizó un computador con un procesador Intel Core I3, su tiempo de ejecución por imagen fue de 24,36 segundos. Se tomaron imágenes de 1600 x 1200, las cuales fueron recortadas para eliminar las regiones negras que el objetivo deja sobre la imagen, finalmente la resolución de las imágenes es de 1076 x 840.

Se seleccionaron 50 imágenes, en las cuales están presentes los tres tipos de células, incluso con manchas y desenfocadas. En la tabla 1 se observa la descripción de los parámetros usados para calcular los índices de sensibilidad y especificidad. En la tabla 2 están los valores obtenidos en cada una de las imágenes.

Tabla 1. Descripción de indicadores

Indicador	Descripción
VP1(Verdaderos Positivos de una célula)	Células individuales detectadas correctamente.
VN1 (Verdaderos Negativos de una célula)	Células que no son individuales y no se clasificaron como individuales.
FP1 (Falsos Positivos de una célula)	Células que no son individuales y se clasificaron como individuales.
FN1 (Falsos Negativos de una célula)	Células individuales no detectadas.
VP2(Verdaderos Positivos de grupos de dos células)	Grupos de dos células detectados correctamente.
VN2 (Verdaderos Negativos de grupos de dos células)	Grupos que no son de dos células y no se clasificaron como dos células.
FP2 (Falsos Positivos de grupos de dos células)	Grupos que no son de dos células y se clasificaron como dos células.
FN2 (Falsos Negativos de grupos de dos células)	Grupos de dos células no detectados.

VP3(Verdaderos Positivos de grupos de tres células)	Grupos de tres células detectados correctamente.
VN3 (Verdaderos Negativos de grupos de tres células)	Grupos que no son de tres células y no se clasificaron como tres células.
FP3 (Falsos Positivos de grupos de tres células)	Grupos que no son de tres células y se clasificaron como tres células.
FN3 (Falsos Negativos de grupos de tres células)	Grupos de tres células no detectados.
Mayor a 3	Grupos de más de tres células
Correctos	Grupos de más de tres células clasificados correctamente

Tabla 2. Pruebas del algoritmo - Parte 1.

Muestra	VP1	VN1	FP1	FN1	VP2	VN2	FP2	FN2	VP3	VN3	FP3	FN3	Mayor a 3	Correctos
Muestra 1	126	65	3	0	52	136	0	3	13	178	0	0	0	0
Muestra 2	163	40	0	0	36	167	0	0	3	200	0	0	1	1
Muestra 3	180	29	0	0	25	184	1	0	4	205	0	0	0	0
Muestra 4	164	31	0	0	29	166	0	0	2	193	0	0	0	0
Muestra 5	196	7	0	0	7	196	0	0	0	203	0	0	0	0
Muestra 6	176	25	0	1	26	176	1	0	0	202	0	0	0	0
Muestra 7	192	9	0	0	9	192	0	0	0	201	0	0	0	0
Muestra 8	191	5	0	2	7	191	2	0	0	198	0	0	0	0
Muestra 9	187	7	0	0	7	187	0	0	0	194	0	0	0	0
Muestra 10	190	6	0	0	6	190	0	0	0	196	0	0	0	0
Muestra 11	176	28	0	0	27	176	0	1	0	204	1	0	1	1
Muestra 12	166	38	0	0	35	169	0	0	3	201	0	0	0	0
Muestra 13	177	31	0	0	30	178	0	0	1	207	0	0	0	0
Muestra 14	162	44	0	0	39	167	0	0	4	202	0	0	1	1
Muestra 15	148	57	1	0	51	153	0	1	5	199	0	1	1	0
Muestra 16	143	64	1	0	57	149	2	1	6	201	0	0	1	1
Muestra 17	141	59	1	0	52	147	0	1	7	193	0	0	0	0
Muestra 18	143	52	1	0	41	153	0	1	9	186	0	0	2	2
Muestra 19	166	46	0	1	41	172	0	0	4	209	0	0	2	2
Muestra 20	145	53	0	1	49	150	0	0	3	196	0	0	2	2
Muestra 21	150	44	0	1	42	153	0	0	2	193	0	0	1	1
Muestra 22	195	9	0	0	9	195	0	0	0	204	0	0	0	0
Muestra 23	136	52	11	0	38	139	3	11	7	180	0	1	7	7
Muestra 24	129	68	8	0	49	140	0	8	19	178	0	0	0	0
Muestra 25	133	53	9	0	42	135	2	9	6	180	0	0	5	5

Tabla 3. Pruebas del algoritmo - Parte 2.

Muestra	VP1	VN1	FP1	FN1	VP2	VN2	FP2	FN2	VP3	VN3	FP3	FN3	Mayor a 3	Correctos
Muestra 26	191	3	0	0	3	191	0	0	0	194	0	0	0	0
Muestra 27	164	48	0	0	45	167	1	0	2	210	0	0	1	1
Muestra 28	148	42	0	1	41	150	1	0	1	190	0	0	1	1
Muestra 29	150	44	0	0	41	153	0	0	2	192	0	0	1	1
Muestra 30	164	38	0	0	33	169	0	0	4	198	0	0	1	1
Muestra 31	172	24	0	0	23	173	0	0	1	195	0	0	0	0
Muestra 32	202	7	0	0	7	202	0	0	0	209	0	0	0	0
Muestra 33	200	8	0	0	8	200	0	0	0	208	0	0	0	0
Muestra 34	165	32	0	0	29	168	0	0	3	194	0	0	0	0
Muestra 35	166	42	0	1	42	167	0	0	1	208	0	0	0	0
Muestra 36	155	51	0	0	45	161	0	0	6	200	0	0	0	0
Muestra 37	132	72	0	0	62	142	1	0	9	195	0	0	1	1
Muestra 38	123	65	9	0	55	124	1	9	7	181	0	0	3	3
Muestra 39	132	66	6	0	52	140	1	6	13	185	0	0	1	1
Muestra 40	145	54	6	0	50	143	0	6	3	196	0	0	1	1
Muestra 41	152	50	1	0	40	161	0	1	6	196	0	0	4	4
Muestra 42	193	1	0	0	1	193	0	0	0	194	0	0	0	0
Muestra 43	148	56	5	0	51	148	0	5	3	201	0	0	2	2
Muestra 44	136	64	0	0	55	145	1	0	9	191	0	0	0	0
Muestra 45	154	50	0	0	39	165	0	0	9	195	0	0	2	2
Muestra 46	126	62	3	0	45	140	0	3	16	172	0	0	1	1
Muestra 47	187	1	0	0	1	187	0	0	0	188	0	0	0	0
Muestra 48	186	2	0	0	2	186	0	0	0	188	0	0	0	0
Muestra 49	160	41	0	0	39	162	0	0	2	199	0	0	0	0
Muestra 50	133	61	0	0	50	144	0	0	11	183	0	0	0	0

La sensibilidad indica la capacidad del algoritmo para detectar como grupos de dos o tres células aquellos grupos que realmente lo son, su fórmula se muestra en la ecuación 1.

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

Ecuación 1. Ecuación de la Sensibilidad

La especificidad indica la capacidad de no detectar como grupos de dos o tres células a los grupos que no lo son, su fórmula se observa en la ecuación 2.

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

Ecuación 2. Ecuación de la Sensibilidad

En la siguiente tabla se encuentran los resultados de los indicadores para cada grupo de células:

Tabla 4. Resultado de indicadores

Grupo	Sensibilidad	Especificidad
Células individuales	0,999	0,967
Grupos de 2 células	0,962	0,998
Grupos de 3 células	0,991	0,999

Para verificar la importancia que tiene el algoritmo desarrollado en su área de aplicación, se consultó a una especialista Microbióloga y Analista, quien respondió que los resultados facilitan el conteo, y la evaluación de alteraciones de forma y tamaño de los glóbulos rojos.

7. CONCLUSIONES

- La iluminación del microscopio, la tinción de la placa y la realización del extendido de forma adecuada, son características muy importantes para lograr hacer una segmentación correcta.
- Es importante que las imágenes sean tomadas en el área de observación que es usada por el especialista, ya que en esta zona la forma de los glóbulos rojos permite que Hough ofrezca mejores resultados, porque las células presentes en otras regiones de la placa normalmente se deforman.
- La utilización de Watershed, Hough y K-means de forma separada, no representan una técnica efectiva, ya que cada una de ellas tiene sus limitaciones. Por lo tanto, se desarrolló un algoritmo que toma ventaja de las características de cada una de estas técnicas combinándolas para obtener mejores resultados.
- La interfaz desarrollada en Matlab, ayuda a observar los resultados del algoritmo y su aplicabilidad, permitiendo la interacción con el usuario y una fácil manipulación por parte del mismo.
- Los índices de especificidad y sensibilidad obtenidos, son muestra de la alta efectividad del algoritmo desarrollado para la detección y clasificación de glóbulos rojos superpuestos.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la búsqueda de otra característica diferente al área para la segmentación de grupos de más de tres células, ya que en estos casos el área superpuesta es mayor y se hace más difícil identificar la cantidad de células presentes en cada grupo.
- La utilización de operaciones morfológicas para eliminar los glóbulos blancos no es la forma más eficaz de hacerlo, ya que su forma, tamaño y coloración son muy variados en un mismo extendido. Se recomienda la implementación de una técnica más avanzada para su identificación y su posterior segmentación.
- Es importante la estandarización de un protocolo para la preparación del tinte, porque se ha notado que ésta depende de la persona que lo realiza y por ese mismo motivo puede variar considerablemente el color de las células en imágenes de dos placas diferentes.
- Para trabajos futuros, se recomienda profundizar en estadísticas de los resultados cuantitativos como conteo, área, diámetro o perímetro de los glóbulos, ya que el trabajo realizado en este proyecto facilita la obtención de este tipo de datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ROGERS, Kara. Blood: Physiology and Circulation. Nueva York: Britannica Educational, 2010. 239 p.

- [2] SILVA, Maria et al. Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Gallego de Salud. Sevilla: Editorial Mad, 2006. 443 p.

- [3] COTTER, Susan. Quick Look Series in Veterinary Medicine: Hematology. Teton NewMedia, 2001. 150 p.

- [4] BESA, Emmanuel. National medical series for independent study: Hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 1992. 335 p.

- [5] CARR, Jacqueline. Atlas de Hematología Clínica. Madrid: Médica Panamericana, 2010. 276 p.

- [6] MUÑOZ, María. y Morón, Cecilia. Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología. Instituto Nacional de Salud, Serie de Normas Técnicas. Lima: Ministerio de Salud del Perú, 2005. 88 p.

- [7] BAIN, Barbara. Blood Cells: A Practical Guide. John Wiley & Sons, 2008. 488 p.

- [8] HANDIN, Robert. Blood: Principles and Practice of Hematology. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304 p.

- [9] ESTRIDGE, Barbara. Basic Medical Laboratory Techniques. Cengage Learning, 2000. 620 p.

- [10] RODAK, Bernadette. Hematology: Clinical Principles and Applications. Missouri: Elsevier Health Sciences, 2007. 880 p.
- [11] NAGABHUSHANA, S. Computer Vision and Image Processing. Delhi: New Age International, 2005. 242 p.
- [12] PETROU, Maria. Image Processing: The Fundamentals. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. 818 p.
- [13] ANNADURAI, S. Fundamentals of Digital Image Processing. Dorling: Pearson Education India, 2007. 440 p.
- [14] ABHISHAK, Yadav. Digital Image Processing. Delhi: Laxmi Publications, 2009. 224 p.
- [15] MONTABONE, Sebastian. Beginning Digital Image Processing: Using Free Tools for Photographers. New York: Apress, 2010. 312 p.
- [16] GONZÁLEZ, Rafael y WOODS, Richard. Digital image processing. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 976 p.
- [17] JAYARAMAN. Digital Image Processing. Image Enhancement. Nueva Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2011. 723 p.
- [18] DENG, Wei. Future Control and Automation: Proceedings of the 2nd International Conference on Future Control and Automation (ICFCA 2012). Londres: Springer Science & Business Media, 2012. 520 p.
- [19] SEMMLOW, John. Biosignal and Medical Image Processing. Nueva York: CRC Press, 2004. 448 p.

- [20] ZHOU, Huiyu. Digital Image Processing: Part II. Bookboon, 2010. 91 p.
- [21] JAYARAMAN. Digital Image Processing. Image Segmentation. Nueva Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2001. 723 p.
- [22] WU, Qiang. Microscope Image Processing. California: Academic Press, 2010. 576 p.
- [23] NG, E. Ophthalmological Imaging and Applications. Boca Raton: CRC Press, 2014. 529 p.
- [24] HLINDZICH, D y MAENNER, R. Medical feature matching and model extraction from MRI/CT based on the Invariant Generalized Hough/Radon Transform. En: 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 608-612.
- [25] WU, Xindong. The Top Ten Algorithms in Data Mining. Boca Raton: CRC Press, 2009. 208 p.
- [26] JUNJIE, Wu. Advances in K-means Clustering: A Data Mining Thinking. Londres: Springer Science & Business Media, 2012. 194 p.
- [27] MACKAY, David. Information Theory, Inference and Learning Algorithms. Cambridge University Press, 2003. 628 p.
- [28] FAROUKI, Rida T. The Bernstein polynomial basis: A centennial retrospective. Computer Aided Geometric Design, 2012, vol. 29, no 6, p. 379-419.

- [29] MARSCH, Duncan. Applied Geometry for Computer Graphics and CAD. Washington: Springer Science & Business Media, 2006. 365 p.
- [30] GILAT, Amos. Matlab: una introducción con ejemplos prácticos. Nueva Jersey: Reverte, 2006. 331 p.
- [31] The Mathworks Inc. Image Processing Toolbox. Available from Internet: <http://www.mathworks.com/products/image/>.
- [32] CLOPPET, Florence and BOUCHER, Arnaud. Segmentation of complex nucleus configurations in biological images. Pattern Recognition Letters, 2010, vol. 31, no 8, p. 755-761.
- [33] SHARIF, J. MISWAN, et al. Red blood cell segmentation using masking and watershed algorithm: A preliminary study. En: Biomedical Engineering (ICoBE), 2012 International Conference on. IEEE, 2012. p. 258-262.
- [34] VETA, Mitko, et al. Marker-controlled watershed segmentation of nuclei in H&E stained breast cancer biopsy images. En: Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on. IEEE, 2011. p. 618-621.
- [35] XU, Shengzhou; LIU, Hong; SONG, Enmin. Marker-controlled watershed for lesion segmentation in mammograms. Journal of digital imaging, 2011, vol. 24, no 5, p. 754-763.
- [36] DI CATALDO, Santa, et al. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. Computer methods and programs in biomedicine, 2010, vol. 100, no 1, p. 1-15.
- [37] KARVELIS, Petros; LIKAS, Aristidis; FOTIADIS, Dimitrios I. Identifying

- touching and overlapping chromosomes using the watershed transform and gradient paths. *Pattern Recognition Letters*, 2010, vol. 31, no 16, p. 2474-2488.
- [38] WEN, Quan; CHANG, Hang; PARVIN, Bahram. A Delaunay triangulation approach for segmenting clumps of nuclei. En *Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on. IEEE, 2009. p. 9-12.
- [39] KUMAR, Saravana, et al. A rule-based approach for robust clump splitting. *Pattern Recognition*, 2006, vol. 39, no 6, p. 1088-1098.
- [40] KOTHARI, Sonal; CHAUDRY, Qaiser; WANG, May D. Automated cell counting and cluster segmentation using concavity detection and ellipse fitting techniques. En: *Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on. IEEE, 2009. p. 795-798.
- [41] WANG, Hui; ZHANG, Hong; RAY, Nilanjan. Clump splitting via bottleneck detection and shape classification. *Pattern Recognition*, 2012, vol. 45, no 7, p. 2780-2787.
- [42] BERGE, Heidi, et al. Improved red blood cell counting in thin blood smears. En *Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, 2011 IEEE International Symposium on. IEEE, 2011. p. 204-207.
- [43] LATORRE, Antonio, et al. Segmentation of neuronal nuclei based on clump splitting and a two-step binarization of images. *Expert Systems with Applications*, 2013, vol. 40, no 16, p. 6521-6530.
- [44] DÍAZ, Gloria; GONZALEZ, Fabio; ROMERO, Eduardo. Automatic clump splitting for cell quantification in microscopical images. En: *Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications*. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 763-772.

- [45] ARCELLI, Carlo; DI BAJA, G. Sanniti. Quenching points in distance labeled pictures. En: Seventh international conference on pattern recognition. 1984.
- [46] THOMPSON, Deborah B., et al. Scene segmentation in a machine vision system for histopathology. En OE/LASE'90, 14-19 Jan., Los Angeles, CA. International Society for Optics and Photonics, 1990. p. 40-47.
- [47] DI RUBERTO, Cecilia, et al. Analysis of infected blood cell images using morphological operators. Image and Vision Computing, 2002, vol. 20, no 2, p. 133-146.
- [48] ONG, S. H., et al. Decomposition of digital clumps into convex parts by contour tracing and labelling. Pattern Recognition Letters, 1992, vol. 13, no 11, p. 789-795.
- [49] BAI, Xiangzhi; SUN, Changming; ZHOU, Fugen. Splitting touching cells based on concave points and ellipse fitting. Pattern recognition, 2009, vol. 42, no 11, p. 2434-2446.
- [50] LIU, Lifeng; SCLAROFF, Stan. Shape-guided split and merge of image regions. En Visual Form 2001. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 367-377.
- [51] PRIYANKARA, G. P. M., et al. An extensible computer vision application for blood cell recognition and analysis. Department of Computer Science and Engineering, University of Moratuwa, Sri Lanka, 2006.
- [52] GUAN, Pearl P.; YAN, Hong. Blood cell image segmentation based on the Hough transform and fuzzy curve tracing. En Machine Learning and Cybernetics (ICMLC), 2011 International Conference on. IEEE, 2011. p. 1696-1701.

- [53] MCLAUGHLIN, Robert A. Randomized Hough transform: improved ellipse detection with comparison. *Pattern Recognition Letters*, 1998, vol. 19, no 3, p. 299-305.

BIBLIOGRAFÍA

ABHISHAK, Yadav. Digital Image Processing. Delhi: Laxmi Publications, 2009. 224 p.

ANNADURAI, S. Fundamentals of Digital Image Processing. Dorling: Pearson Education India, 2007. 440 p.

ARCELLI, Carlo; DI BAJA, G. Sanniti. Quenching points in distance labeled pictures. En: Seventh international conference on pattern recognition. 1984.

BAI, Xiangzhi; SUN, Changming; ZHOU, Fugen. Splitting touching cells based on concave points and ellipse fitting. Pattern recognition, 2009, vol. 42, no 11, p. 2434-2446.

BAIN, Barbara. Blood Cells: A Practical Guide. John Wiley & Sons, 2008. 488 p.

BERGE, Heidi, et al. Improved red blood cell counting in thin blood smears. En Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on. IEEE, 2011. p. 204-207.

BESA, Emmanuel. National medical series for independent study: Hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 1992. 335 p.

CARR, Jacqueline. Atlas de Hematología Clínica. Madrid: Médica Panamericana, 2010. 276 p.

CLOPPET, Florence and BOUCHER, Arnaud. Segmentation of complex nucleus configurations in biological images. Pattern Recognition Letters, 2010, vol. 31, no 8, p. 755-761.

COTTER, Susan. Quick Look Series in Veterinary Medicine: Hematology. Teton NewMedia, 2001. 150 p.

DENG, Wei. Future Control and Automation: Proceedings of the 2nd International Conference on Future Control and Automation (ICFCA 2012). Londres: Springer Science & Business Media, 2012. 520 p.

DI CATALDO, Santa, et al. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. Computer methods and programs in biomedicine, 2010, vol. 100, no 1, p. 1-15.

DI RUBERTO, Cecilia, et al. Analysis of infected blood cell images using morphological operators. Image and Vision Computing, 2002, vol. 20, no 2, p. 133-146.

DÍAZ, Gloria; GONZALEZ, Fabio; ROMERO, Eduardo. Automatic clump splitting for cell quantification in microscopical images. En: Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 763-772.

ESTRIDGE, Barbara. Basic Medical Laboratory Techniques. Cengage Learning, 2000. 620 p.

FAROUKI, Rida T. The Bernstein polynomial basis: A centennial retrospective. Computer Aided Geometric Design, 2012, vol. 29, no 6, p. 379-419.

GILAT, Amos. Matlab: una introducción con ejemplos prácticos. Nueva Jersey: Reverte, 2006. 331 p.

GONZÁLEZ, Rafael y WOODS, Richard. Digital image processing. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 976 p.

GUAN, Pearl P.; YAN, Hong. Blood cell image segmentation based on the Hough transform and fuzzy curve tracing. En Machine Learning and Cybernetics (ICMLC), 2011 International Conference on. IEEE, 2011. p. 1696-1701.

HANDIN, Robert. Blood: Principles and Practice of Hematology. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304 p.

HLINDZICH, D y MAENNER, R. Medical feature matching and model extraction from MRI/CT based on the Invariant Generalized Hough/Radon Transform. En: 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 608-612.

JAYARAMAN. Digital Image Processing. Image Enhancement. Nueva Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2011. 723 p.

JUNJIE, Wu. Advances in K-means Clustering: A Data Mining Thinking. Londres: Springer Science & Business Media, 2012. 194 p.

KARVELIS, Petros; LIKAS, Aristidis; FOTIADIS, Dimitrios I. Identifying touching and overlapping chromosomes using the watershed transform and gradient paths. Pattern Recognition Letters, 2010, vol. 31, no 16, p. 2474-2488.

KOTHARI, Sonal; CHAUDRY, Qaiser; WANG, May D. Automated cell counting and cluster segmentation using concavity detection and ellipse fitting techniques. En: Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on. IEEE, 2009. p. 795-798.

KUMAR, Saravana, et al. A rule-based approach for robust clump splitting. Pattern Recognition, 2006, vol. 39, no 6, p. 1088-1098.

LATORRE, Antonio, et al. Segmentation of neuronal nuclei based on clump splitting and a two-step binarization of images. *Expert Systems with Applications*, 2013, vol. 40, no 16, p. 6521-6530.

LIU, Lifeng; SCLAROFF, Stan. Shape-guided split and merge of image regions. En *Visual Form 2001*. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 367-377.

MACKAY, David. *Information Theory, Inference and Learning Algorithms*. Cambridge University Press, 2003. 628 p.

MARSCH, Duncan. *Applied Geometry for Computer Graphics and CAD*. Washington: Springer Science & Business Media, 2006. 365 p.

MCLAUGHLIN, Robert A. Randomized Hough transform: improved ellipse detection with comparison. *Pattern Recognition Letters*, 1998, vol. 19, no 3, p. 299-305.

MONTABONE, Sebastian. *Beginning Digital Image Processing: Using Free Tools for Photographers*. New York: Apress, 2010. 312 p.

MUÑOZ, María. y Morón, Cecilia. *Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología*. Instituto Nacional de Salud, Serie de Normas Técnicas. Lima: Ministerio de Salud del Perú, 2005. 88 p.

NAGABHUSHANA, S. *Computer Vision and Image Processing*. Delhi: New Age International, 2005. 242 p.

NG, E. *Ophthalmological Imaging and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2014. 529 p.

ONG, S. H., et al. Decomposition of digital clumps into convex parts by contour tracing and labelling. *Pattern Recognition Letters*, 1992, vol. 13, no 11, p. 789-795.

PETROU, Maria. *Image Processing: The Fundamentals*. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. 818 p.

PRIYANKARA, G. P. M., et al. An extensible computer vision application for blood cell recognition and analysis. Department of Computer Science and Engineering, University of Moratuwa, Sri Lanka, 2006.

RODAK, Bernadette. *Hematology: Clinical Principles and Applications*. Missouri: Elsevier Health Sciences, 2007. 880 p.

ROGERS, Kara. *Blood: Physiology and Circulation*. Nueva York: Britannica Educational, 2010. 239 p.

SEMMLOW, John. *Biosignal and Medical Image Processing*. Nueva York: CRC Press, 2004. 448 p.

SHARIF, J. MISWAN, et al. Red blood cell segmentation using masking and watershed algorithm: A preliminary study. En: *Biomedical Engineering (ICoBE)*, 2012 International Conference on. IEEE, 2012. p. 258-262.

SILVA, Maria et al. *Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Gallego de Salud*. Sevilla: Editorial Mad, 2006. 443 p.

The Mathworks Inc. *Image Processing Toolbox*. Available from Internet: <http://www.mathworks.com/products/image/>.

THOMPSON, Deborah B., et al. Scene segmentation in a machine vision system

for histopathology. En OE/LASE'90, 14-19 Jan., Los Angeles, CA. International Society for Optics and Photonics, 1990. p. 40-47.

VETA, Mitko, et al. Marker-controlled watershed segmentation of nuclei in H&E stained breast cancer biopsy images. En: Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on. IEEE, 2011. p. 618-621.

WANG, Hui; ZHANG, Hong; RAY, Nilanjan. Clump splitting via bottleneck detection and shape classification. Pattern Recognition, 2012, vol. 45, no 7, p. 2780-2787.

WEN, Quan; CHANG, Hang; PARVIN, Bahram. A Delaunay triangulation approach for segmenting clumps of nuclei. En Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on. IEEE, 2009. p. 9-12.

WU, Qiang. Microscope Image Processing. California: Academic Press, 2010. 576 p.

WU, Xindong. The Top Ten Algorithms in Data Mining. Boca Raton: CRC Press, 2009. 208 p.

XU, Shengzhou; LIU, Hong; SONG, Enmin. Marker-controlled watershed for lesion segmentation in mammograms. Journal of digital imaging, 2011, vol. 24, no 5, p. 754-763.

ZHOU, Huiyu. Digital Image Processing: Part II. Bookboon, 2010. 91 p.