

SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL PARA LA CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS HEMATOLOGICAS



CARLOS ALBERTO ZAMBRANO VELASCO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2005

SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL PARA LA CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS HEMATOLOGICAS

CARLOS ALBERTO ZAMBRANO VELASCO

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Físico

Director:
MSc. Jauri León-Téllez

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2005

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado

AGRADECIMIENTOS

El autor manifiesta sus más sinceros agradecimientos a:

- ❖ El Grupo de Óptica y Láser – GOL – por el gran apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo. Principalmente al profesor Jauri León-Téllez porque creyó en mis ideas y confió en mis capacidades. A los profesores Edgar Leonairo Pencue y Mario Patiño cuyas críticas y aportes ayudaron al apropiado desenvolvimiento en el desarrollo del proyecto.
- ❖ El laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca y especialmente al Doctor Franklin Correa y a la Doctora Julieta Montero, por su valiosa colaboración y constante esfuerzo para sacar adelante este proyecto.
- ❖ El Departamento de Física por ofrecerme la oportunidad de formarme como ingeniero y como físico, y por permitirme conocer y explorar la grandeza del conocimiento humano.
- ❖ La Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca por ofrecer el apoyo para el desarrollo del proyecto marco dentro del que se desarrolla este trabajo.
- ❖ A la unidad de Microscopía Electrónica por brindarme el espacio, tiempo y sus conocimientos, los cuales fueron muy importantes para el desarrollo de este trabajo.
- ❖ La Universidad del Cauca por permitirme un espacio para formarme científica, tecnológica y humanamente.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 IMAGENOLOGIA MEDICA.....	15
<i>1.1.1. Medir sobre una imagen.</i>	17
2. ENTORNO MEDICO	18
2.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS	18
<i>2.1.1. El plasma.</i>	21
<i>2.1.2. Eritrocitos.</i>	21
<i>2.1.3. Trombocitos.....</i>	22
<i>2.1.4. Leucocitos.</i>	23
<i>2.1.4.1. Granulocitos.....</i>	24
<i>2.1.4.2. No granulocitos o linfoides.....</i>	25
2.2. EL EXAMEN HEMATOLÓGICO	28
2.3. LA MICROSCOPIA EN LA HEMATOLOGÍA	32
<i>2.3.1. Microscopía de campo claro.</i>	35
<i>2.3.2. Microscopía de campo oscuro.....</i>	37
<i>2.3.3. Microscopía de contraste de fase.....</i>	38
3. SISTEMAS DE VISION ARTIFICIAL	45
3.1. CONCEPCION DE UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL	47

3.2. ARQUITECTURA DE UN SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL.	48
3.2.1. Adquisición y digitalización de la imagen.	50
3.2.2. Preprocesamiento.	51
3.2.3. Segmentación.	52
3.2.4. Extracción de características.	53
3.2.5. Clasificación.	54
3.3. SISTEMAS DE INSPECCIÓN AUTOMATIZADA DE CELULAS	57
4. METODOLOGÍA Y MATERIALES DE DESARROLLO.	60
4.1 VISION DE BAJO NIVEL. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SISTEMA.	61
4.1.1. Materiales y equipos disponibles.	61
4.1.1.1. Recolección de las muestras.	61
4.1.1.2. Equipo de visión.	62
4.1.1.3. Microscopio.	63
4.1.1.4. Software.	63
4.1.2. Adquisición de las imágenes.	67
4.2 VISIÓN DE NIVEL INTERMEDIO. SEGMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE CARACTERÍSTICAS	68
4.2.1. Segmentación.	68
4.2.1.1. Algoritmo K-Means.	70
4.2.2. Operaciones Morfológicas.	76
4.2.3. Etiquetado.	79
4.2.4. Extracción de Características.	80

4.2.4.1. Características de forma.....	80
4.2.4.2. Características de color.....	80
4.2.4.3. Selección de las características.....	81
4.3 VISION DE ALTO NIVEL. RECONOCIMIENTO DE PATRONES Y CLASIFICACION	84
<i>4.3.1. Generalidades del clasificador.....</i>	<i>85</i>
<i>4.3.2. Redes Neuronales Artificiales.....</i>	<i>86</i>
<i>4.3.3. Entrenamiento del clasificador.....</i>	<i>89</i>
4.4. RESULTADOS Y EVALUACION.....	92
5. LOGROS ADICIONALES ALCANZADOS	112
5.1 ANOMALÍAS DE LOS ERITROCITOS.....	113
5.2 ANOMALÍAS DE LOS LEUCOCITOS.....	118
5.3 NECESIDAD DEL EXAMEN DE LA EXTENSIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA	122
6. OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES.....	124
APORTES DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	126
PERSPECTIVAS Y TRABAJO FUTURO	127
GLOSARIO DE TÉRMINOS MÉDICOS.....	129
REFERENCIAS.....	132
ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bases celulares en el proceso de la hematopoyesis.....	20
Figura 2. Relacion de tamaño entre los eritrocitos y las plaquetas.....	23
Figura 3. Tipos de leucocitos granulocitos maduros observados en sangre periférica....	24
Figura 4. Tipos de leucocitos linfoides maduros presentes en la sangre periférica.	26
Figura 5. Microscopio óptico moderno.....	34
Figura 6. Comparación de muestras usando microscopía de campo claro.	36
Figura 7. Ejemplos de imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro.	38
Figura 8. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases.	40
Figura 9. Comparación del mismo campo visual usando microscopía de fases y microscopía DIC.	42
Figura 10. Componentes principales de un sistema de visión artificial y su clasificación de acuerdo a los niveles de visión.....	50
Figura 11. Esquema general del sistema de inspección visual automatizado.....	55
Figura 12. Arquitectura para el sistema de inspección visual automatizada de células sanguíneas.	56
Figura 13. Ejemplo de la interfaz gráfica de QWin.....	65
Figura 14. Ejemplo de la interfaz gráfica de Quips	66
Figura 15. Frotis de sangre periférica con tinción de <i>Wright</i>	68
Figura 16. Ejemplo gráfico que muestra cada uno de los pasos del algoritmo k-means para segmentar grupos en una imagen.....	72
Figura 17 imagen típica adquirida con el sistema implementado	74

Figura 18. Resultado de la segmentación usando un valor de $k=2$.	75
Figura 19. Resultado de la segmentación usando un valor de $k = 3$.	75
Figura 20. Resultado de la segmentación usando un valor de $k = 4$.	76
Figura 21. Separación de las células mediante operadores morfológicos	78
Figura 22. Imagen final segmentada.	79
Figura 23. Correlación entre el diámetro y el perímetro.	83
Figura 24. Correlación del área y la redondez.	83
Figura 25. Modelo básico de una neurona artificial.	87
Figura 26. Imagen digital de un frotis de sangre periférica.	93
Figura 27. Descomposición cromática en los canales R, G, y B	94
Figura 28. Descomposición cromática en los canales H, S e I.	94
Figura 29. Histograma del canal rojo de la imagen.	96
Figura 30. Histograma del canal verde de la imagen.	97
Figura 31. Histograma para el canal azul de la imagen.	98
Figura 32. Histograma del canal tono de la imagen	99
Figura 33. Histograma del canal de saturación de la imagen.	100
Figura 34. Histograma para el canal de iluminación de la imagen.	101
Figura 35. Resultado de segmentar la imagen 26 usando el algoritmo K-means.	102
Figura 36. Células completamente separadas	102
Figura 37. Segmentación de los núcleos celulares.	103
Figura 38. Ilustración del proceso de detección de las células y de sus núcleos	104
Figura 39. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares.	105
Figura 40. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares.	105

Figura 41. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares	106
Figura 42. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares.....	106
Figura 43. Recuento celular obtenido mediante un <i>Coulter</i>	110
Figura 44. Eliptocitos.....	116
Figura 45. Esferocitos y un eritrocito nucleado.....	116
Figura 46. Dacriocitos	116
Figura 47. Células diana, acantocitos y un eritrocito nucleao	117
Figura 48. Célula falciforme y eritrocitos con punteado basófilo.....	117
Figura 49. Cuerpo de howell-jolly	117
Figura 50. Eritrocitos infectados por malaria (<i>falciparum vivax</i>)	118
Figura 51. Ejemplo de una imagen obtenida de una muestra de lla	119
Figura 52. Ejemplo de una muestra con llc	120
Figura 53. Ejemplo de una leucemia lgc.....	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Conteo normal de leucocitos en la sangre periférica.....	26
Tabla 2. Matriz de confusión del clasificador usando el conjunto de prueba.....	108
Tabla 3. Recuento diferencial de células elaborado por el sistema implementado	110
Tabla 4. Enfermedades que pueden presentar un recuento total normal pero que son reveladas en el examen de extendido de sangre periférica.	123

1. INTRODUCCIÓN

La visión artificial es un campo que se ha venido desarrollado vertiginosamente en los últimos años y ha logrado expandir sus horizontes o campo de acción, atrás quedaron ya los primeros proyectos y líneas de investigación dirigidas principalmente al sector industrial, militar e incluso al de las telecomunicaciones donde la visión artificial juega un papel sumamente importante en la presentación y en la mejora de la calidad de las imágenes.

Pero es en el campo de la medicina donde últimamente ha tomado un mayor auge, gracias al desarrollo en la tecnología de la computación gráfica, a la reducción de costos en los equipos personales y al avance en los equipos modernos de tomas de imágenes como los de resonancias magnéticas, tomografías, angiografías, ecografías, rayos X, etc.

Hoy en día la medicina nos ofrece ante todo la seguridad en sus diagnósticos, gracias a la unión con la más moderna tecnología de punta, lejana quedó ya aquella época en la que la medicina, practicada de forma precaria, nos presentaba respuestas obtenidas como fruto de la experiencia o de una manera intuitiva. La gran mayoría de procedimientos clínicos o técnicas de diagnóstico se basan tanto en la observación como en la experiencia del médico o del especialista que saben reconocer las diferentes características de los padecimientos y, de esta manera, toman decisiones respecto a los tratamientos a seguir y estiman la evolución de la enfermedad.

En el campo de la medicina, existen diversos problemas donde la tecnología y la informática moderna pueden aportar innumerables soluciones como la

clasificación automática de cromosomas, el realce de imágenes de rayos X, el mejoramiento de las imágenes de ultrasonido, la reconstrucción tridimensional a partir de tomografías, en la neurofisiología e incluso para la educación, ya que en la actualidad, cualquier estudiante puede practicar procedimientos clínicos o quirúrgicos, sin necesidad de hacerlo directamente sobre un paciente real; la navegación virtual le permite aprender sin riesgos[1,2,3].

El diagnóstico médico se beneficia claramente con la información aportada por imágenes obtenidas con distintos tipos de sensor. El cálculo de dosis en dosimetría clínica se realiza sobre imágenes de tomografía computarizada, para el análisis funcional de órganos y tejidos se utilizan imágenes de tomografía por emisión de positrones, sin embargo la delimitación de los tumores se realiza mejor con imágenes de resonancia magnética nuclear[3].

Naturalmente, la salud humana es, entre todas las cosas en nuestras vidas, la más importante. El efecto positivo que brinda la tecnología en cualquiera de sus formas en ella, es indudablemente lo más esencial. Siempre habrá cada vez más pacientes por tratar y gente más sana que querrá seguir reduciendo al mínimo, el riesgo de enfermarse. Por lo tanto, debido a la necesidad de realizar procedimientos y tareas cada vez más sofisticados e innovadores, enfocados principalmente hacia el sector salud, el desarrollo de sistemas inteligentes siempre será necesario.

Uno de los muchos ejemplos es el **conteo de células** sobre una muestra de sangre periférica o **frotis de sangre periférica** como se le conocerá de ahora en adelante en el presente trabajo. En la mayoría de las fases del diagnóstico y de la investigación médica, la sangre de una persona se analiza rutinariamente. Cualquier clase de contribución que este análisis brinde, se aprecia considerablemente, puesto que reduce la carga de trabajo de los médicos, brinda una mayor seguridad y disminuye la incertidumbre en el diagnóstico. La composición de la sangre revela información importante en el diagnóstico sobre

los pacientes así como también, se convierte en su carta de presentación ante los médicos o especialistas.

Con base en todo lo expresado anteriormente, se presenta, mediante este trabajo, la implementación de un **sistema de visión artificial** para la **clasificación de células en frotis de sangre periférica** mediante técnicas de la **microscopía óptica**. La clasificación se realiza de acuerdo al tamaño, forma, color y contenido presente tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, todo esto con el objetivo de minimizar los errores que se puedan presentar y facilitar de algún modo, el desarrollo de técnicas automatizadas de diagnóstico médico que reemplacen labores altamente repetitivas, tediosas y monótonas. Igualmente como un **aporte** adicional del trabajo se presenta la capacidad del sistema para **identificar** y **diagnosticar** algunas anomalías o enfermedades hematológicas, que si bien, no estaba incluida dentro de los objetivos iniciales del trabajo, dadas las condiciones en las que se desarrolló el sistema y viendo las facultades alcanzadas por el mismo, se procedió a dar un paso más allá y alcanzar la capacidad de diagnóstico del sistema.

El presente documento está organizado de la siguiente manera: en el capítulo introductorio se exponen los conceptos básicos de las materias relacionadas con el trabajo, en el capítulo 2 se da una breve introducción a los conceptos básicos de la hematología y la microscopía óptica. En el capítulo 3 se presenta una descripción general sobre los sistemas de visión artificial y sus componentes. El capítulo 4 contiene la explicación del método implementado, la descripción de las herramientas de desarrollo y el análisis de desempeño del sistema.

En el capítulo 5 se presentan los aportes y logros adicionales alcanzados y el impacto obtenido durante el desarrollo del sistema y que inicialmente no se encontraban estipuladas para el desarrollo de este trabajo. En este capítulo se muestran las habilidades alcanzadas por el sistema para emitir diagnósticos y detectar enfermedades. Finalmente, en el último capítulo se muestran las

observaciones y conclusiones, junto con los aportes, las perspectivas y el trabajo futuro a desarrollar.

1.1 IMAGENOLOGIA MEDICA

Para presentar las nuevas perspectivas que se abren para la imagen médica en el futuro es conveniente establecer algunos conceptos y definiciones, que serán necesarios para estudiar las diferentes técnicas de imagen médica.

Definiremos **imagen médica** como una representación pictográfica de la distribución espacial de una o más propiedades físicas o químicas dentro del cuerpo humano. De acuerdo a la manera en la cual la imagen es obtenida y al tipo de información que puedan brindar acerca del cuerpo humano o de la región del cuerpo humano sobre la que se trabaje, se pueden distinguir dos categorías de imágenes médicas: estructurales y funcionales.

Las primeras son aquellas que brindan información morfológica o anatómica del cuerpo humano, y se pueden medir parámetros como tamaño, forma, textura, posición, color y composición de la estructura anatómica. Dentro de esta categoría, encontramos diversas modalidades de imágenes médicas como los rayos X, ultrasonografía, tomografía computarizada, angiografía, microscopía óptica y electrónica, fluoroscopia, mamografía y la resonancia magnética[1,3].

Por otra parte, las imágenes médicas de tipo funcional, ofrecen información acerca de la fisiología y del comportamiento bioquímico del cuerpo humano o de la región del cuerpo humano sobre la que se trabaje. Entre las características que permite observar este tipo de imágenes se pueden señalar algunas como: transporte de flujo, metabolismo, química de los tejidos y órganos, propiedades de absorción, etc. Como ejemplos de este tipo de imágenes, encontramos la tomografía por emisión de positrones, la tomografía computarizada por emisión sencilla de fotón,

resonancia magnética funcional, espectroscopia de resonancia magnética, perfusión de resonancia magnética y perfusión de tomografía computarizada.

Las imágenes médicas se han convertido en unas ayudas importantes para el profesional de la medicina. Se utilizan estas imágenes específicamente para emitir diagnósticos, determinar un curso de tratamiento y, obviamente, evaluar los cambios que vayan ocurriendo con el tiempo. La aparición de dispositivos de captura sofisticados, tales como equipos de tomografía computarizada o resonancia magnética nuclear, han marcado un cambio revolucionario sobre las prácticas de diagnóstico, al permitir la reconstrucción de cortes internos del cuerpo con una alta precisión [2].

Sin embargo, sin importar el tipo de imagen médica que se tenga o el modo de captura con el que se haya obtenido, siempre van a haber dos parámetros de especial interés, los cuales se deben tener en la cuenta a la hora de realizar un estudio o un análisis tanto de medida como de funcionamiento, estos parámetros son el contraste y la resolución.

El **contraste** determina qué es lo que se ve en la imagen; técnicamente se define como diferencia de intensidad entre dos áreas, medida en valor absoluto o relativo (contraste relativo). Lo más importante, en el contexto que nos ocupa, es tener claro el origen de dicho contraste, esto es, saber qué parámetro físico o químico es el que está siendo representado en forma de intensidad luminosa.

Por su parte, el concepto de **resolución espacial** nos ayuda a caracterizar la imagen desde el punto de vista de su capacidad para discernir detalles. Es frecuente definir resolución como la distancia mínima que la imagen es capaz de resolver o separar, medida en unidades de longitud del mundo físico. Este modo de medir la resolución es el más intuitivo, pero no el único utilizado: según el tipo de imagen se puede expresar la resolución en puntos por pulgada, pares de líneas por centímetro, etc. En resumen, el contraste de una imagen determina qué

podemos ver en ella, y su resolución espacial nos indica el grado de detalle con que se representará dicha información.

1.1.1. Medir sobre una imagen. Una consecuencia de la evolución de los métodos de adquisición y procesamiento de las imágenes médicas, proporcionando cada vez más tipos de contraste diferentes y más información funcional, es la necesidad de obtener datos cuantitativos. En efecto, es frecuente que simple observación visual de las imágenes no permita extraer toda la información presente en las mismas, especialmente cuando tratamos con un número elevado de imágenes, como puede ser el caso de estudios dinámicos que analizan la evolución en el tiempo. La imagen se convierte, así, en un instrumento de medida.

El procesamiento digital de imágenes, incluye un conjunto de técnicas que operan sobre la representación digital de una imagen, con el fin de destacar algunos de los elementos que conforman la escena, de modo que se facilite su posterior análisis, bien sea por parte de un usuario o de un sistema automatizado. En general, las técnicas de procesamiento de imágenes son aplicadas cuando resulta necesario realzar o modificar una imagen para mejorar su apariencia o para destacar algún aspecto específico de la información contenida en la misma, o cuando se requiere medir, contrastar o clasificar algún elemento contenido en la misma.

Sobre imágenes morfológicas se obtienen básicamente parámetros cuantitativos de tipo geométrico: distancias lineales, diámetros, áreas, perímetros o volúmenes. La información que se puede extraer de estudios funcionales es más variada e interesante: se puede medir concentraciones relativas de metabolitos o medios de contraste, su variación con el tiempo, etc.

2. ENTORNO MEDICO

Para una mejor comprensión del trabajo presentado en este documento, es necesario dar una introducción acerca del ambiente médico en el que se desarrolla el trabajo y más específicamente sobre la hematología. En primer lugar se presenta una breve introducción sobre la fisiología de las células sanguíneas humanas, una explicación respecto al paciente hematológico, su cuidado y lo relacionado con el examen que se le realiza. Finalmente, se presenta una breve introducción sobre la microscopía óptica y la aplicación de las distintas técnicas presentes en la hematología.

2.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

¿Cuáles son las células sanguíneas? ¿A qué se parecen? ¿Qué funciones realizan? ¿Cómo puedo reconocer las diversas categorías que existen entre ellas? A continuación se presenta una corta descripción de las células de la sangre, algunas de sus características más importantes y sus funciones principales.

En la medicina, el estudio de la sangre y sus componentes se denomina hematología. La sangre consiste de una suspensión de células especiales en un líquido llamado plasma. En un hombre adulto, la sangre representa aproximadamente $1/12$ del peso corporal y ocupa un volumen cercano a los 5 o 6 litros. La sangre está conformada en un 55% por un líquido llamado plasma en el que se encuentran en suspensión diversas células: **eritrocitos** o glóbulos rojos (43%), **leucocitos** o glóbulos blancos y **trombocitos** o plaquetas (2%). Además hay una parte gaseosa (oxígeno, anhídrido carbónico, etc.) La sangre realiza muchas funciones importantes; lleva el oxígeno a los tejidos finos y recogen el

dióxido de carbono (CO₂), transporta las sustancias nutritivas (aminoácidos, azúcares, sales minerales), las hormonas, las enzimas y las vitaminas; recoge los materiales excretados que serán eliminados a través del filtro renal. La sangre también desempeña un rol muy importante dentro de la defensa del cuerpo humano contra los gérmenes y bacterias, gracias a la actividad de los leucocitos[4].

La formación de las células sanguíneas recibe el nombre de hematopoyesis. En el adulto, la **hematopoyesis** se desarrolla principalmente en la médula ósea, debido a su capacidad para permitir el anidamiento, crecimiento y diferenciación de las células germinales. Todas las series celulares son producidos por células primitivas llamadas **células madres**. En la figura 1, se puede observar la diferenciación de las células durante el proceso de la hematopoyesis. De las diversas células madres comprometidas derivan estadios intermedios y, por último, los precursores morfológicamente reconocibles de las líneas celulares diferenciadas, es decir, los proeritroblastos, mieloblastos, eosinoblastos, megacarioblastos y monoblastos. Estos, a su vez, forman la descendencia de células maduras, que en condiciones normales son las únicas que deberían estar presentes en la sangre periférica. La hematopoyesis es un proceso estrechamente regulado que responde con enorme precisión a las demandas funcionales que presenta el organismo. Los niveles de los distintos tipos de células presentes en la sangre periférica, se mantienen entre límites definidos con adaptaciones rápidas cuando se presentan algunas infecciones bacterianas, parasitarias o reacciones alérgicas. Alteraciones o anomalías en la médula ósea pueden provocar una producción excesiva de leucocitos, como en la **leucemia** o en las reacciones leucemoides; puede producir cantidades insuficientes de células, como en las **anemias, trombocitopenias** o la **leucopenia**.

Que este proceso esté delicadamente regulado lo atestigua el hecho de que, cuando se produce una hematopoyesis extramedular, en la sangre periférica aparecen todas las formas de células sanguíneas anormales y primitivas que no

pasan a la sangre durante la hematopoyesis medular normal. Por tal motivo, para poder realizar un buen diagnóstico se debe tener muy en cuenta los aspectos anteriores, y el sistema de inspección automático de células sanguíneas debe reconocer no sólo las células maduras, sino también los estadios intermedios y precursores [4-6].

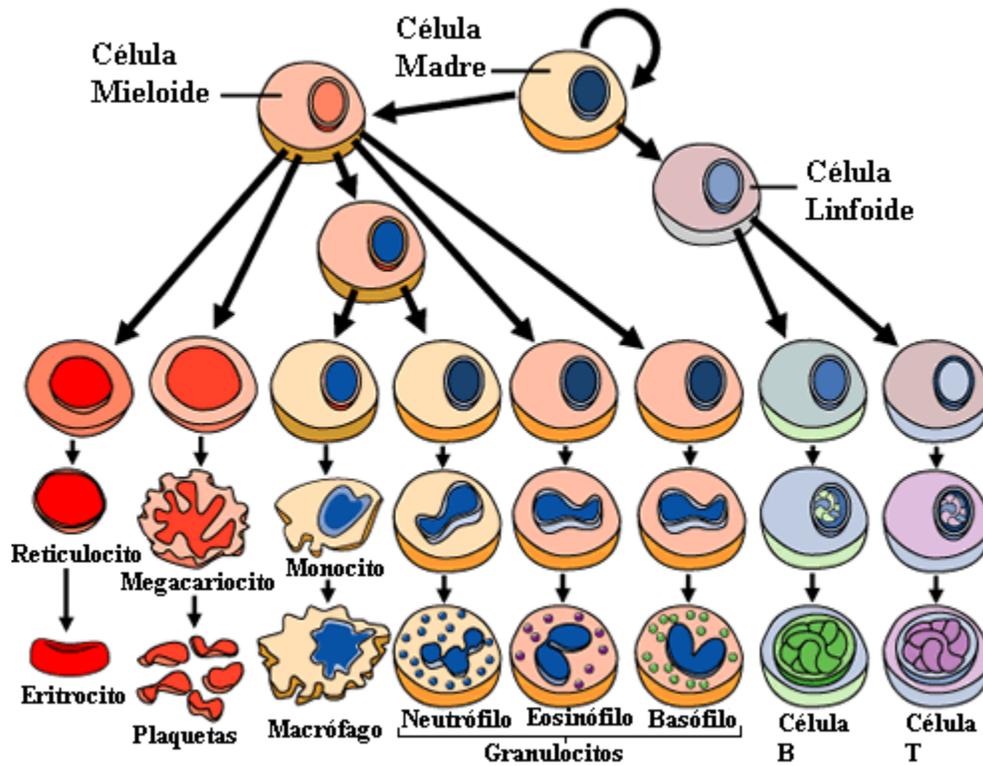


Figura 1. Bases celulares en el proceso de la hematopoyesis. La célula madre pluripotencial común, genera los estados tardíos e intermedios y estos a su vez a las células maduras. Fuente [6]

Como las células sanguíneas maduras tienen un ciclo de vida limitado, es indudable que deben ser reemplazadas constantemente. Esto puede conseguirse gracias a la capacidad que poseen las células madres no solo de diferenciarse, sino también de autoregenerarse. A continuación se explicará brevemente cada uno de los elementos constituyentes de la sangre y algunas de sus principales características.

2.1.1. El plasma. Se conoce como plasma, al suero libre de células, este se puede obtener por la centrifugación de la sangre. El plasma es un líquido levemente alcalino, con un color amarillento típico. Consiste en 90 % de agua y un 10 % de material orgánico y mineral. Estas sustancias orgánicas se componen de los glúcidos (glucosa), de los lípidos (colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, lecitina, grasas), de las proteínas (globulinas, albúminas, fibrinógeno), de las glicoproteínas, de las hormonas (gonadotropinas, eritropoyetinas, trombopoyetinas), de los aminoácidos y de las vitaminas. Las sustancias minerales se disuelven en forma iónica, y se disocian en los iones positivos y negativos.

2.1.2. Eritrocitos. Los eritrocitos, también llamados hematíes o glóbulos rojos son las células de la sangre más numerosas, su número se encuentra entre los 4-6 millones/mm³ y presentan forma de un disco bicóncavo. Los eritrocitos humanos normales presentan un diámetro de 7.5 a 8.3 μm, que disminuye ligeramente con la edad celular. Su espesor varía entre 1.5 y 2.5 μm y poseen un volumen aproximado de 83 μm³.

Los eritrocitos son ricos en hemoglobina, una proteína capaz de unirse fácilmente al oxígeno, por lo que son las células responsables de proporcionar el oxígeno a los tejidos finos y en parte de recuperar el CO₂ producido como desecho, sin embargo, la mayoría de estos desechos son llevados por el plasma, en forma de carbonatos solubles; la hemoglobina también presenta una intensa coloración rojiza aunque el color es menos intenso en el centro (halo) donde la célula es más delgada que en la región periférica, esta propiedad es utilizada para estimar mediante técnicas de colorimetría su concentración en la sangre. En el frotis o extendido con algún tipo de tinción como el de Wright o Giemsa¹ se presentan como corpúsculos circulares con borde neto y liso.

¹ Procesos de tinción empleados para resaltar y hacer visibles algunas células incoloras como los leucocitos.

En el hombre y en todos los mamíferos, los eritrocitos no presentan núcleo, en los otros vertebrados (peces, anfibios, reptiles y aves) si presentan un núcleo. En los mamíferos, la carencia del núcleo de los glóbulos rojos, permite más sitio para la hemoglobina y la forma redondeada de estas células aumenta la superficie y el cociente del volumen citoplásmico. Estas características hacen más eficiente la difusión del oxígeno por estas células. La vida media de los eritrocitos es cerca de 120 días. Cuando llegan al final de su vida, son atrapados por el bazo donde son destruidos.

2.1.3. Trombocitos. Los trombocitos o plaquetas, a pesar de presentar una forma casi redonda, no son considerados células reales, en realidad son fragmentos de células producidas durante el proceso hematopoyético o de producción de células sanguíneas. Son cuerpos incoloros, esféricos, desprovistos de núcleo, con un diámetro medio alrededor de 1 a 2 μm , lo que equivale a aproximadamente la tercera parte del diámetro de los eritrocitos, la diferencia de tamaños se puede observar fácilmente en la figura 2, donde se aprecian claramente los eritrocitos y las plaquetas aparecen indicadas con flechas. Las plaquetas presentan una gran variación en cuanto a la forma, las hay desde redondeadas hasta alargadas, con formas como cigarrillos puros. Su ciclo de vida se calcula en cuatro días.

Su principal función es parar la pérdida de sangre de las heridas. Para poder lograrlo, ellas agregan y liberan factores que promueven la coagulación sanguínea. Entre ellas están la serotonina, que reduce el diámetro de los vasos lesionados y disminuye el flujo sanguíneo y, la fibrina, que atrapa las células y forma la coagulación. En los extendidos con tinciones, presentan un color púrpura intenso con diminutos gránulos rojos o de color azul intenso.

Su densidad en la sangre se encuentra entre 200.000-300.000/ mm^3 así, en condiciones normales, debe existir una plaqueta por cada 10 o 20 eritrocitos presentes.

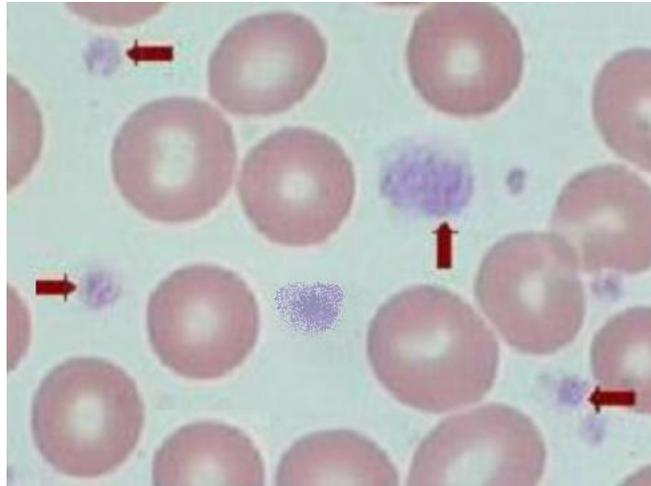


Figura 2. Relacion de tamaño entre los eritrocitos y las plaquetas. Estas ultimas aparecen señaladas con flechas rojas. Imagen adquirida por el sistema implementado.

2.1.4. Leucocitos. Los leucocitos o glóbulos blancos son mucho menos numerosos que los eritrocitos; hay un promedio de cerca de $7.500/\text{mm}^3$, pero fluctúan entre $5.000\text{-}10.000/\text{mm}^3$ en las diferentes personas, y aun en la misma persona, a diferentes horas del día, la cantidad de leucocitos es mínima en las primeras horas de la mañana, y máxima a la tarde.

Las personas deficientemente nutridas tienen un número de leucocitos inferior al normal, y una menor resistencia a las infecciones y enfermedades; Estas células no contienen hemoglobina por lo tanto son incoloras, sin embargo, pueden distinguirse realizando algún tipo de tinción sobre el frotis; son más grandes que los eritrocitos, poseen núcleo y se desplazan activamente por medio de movimientos amiboidales, los leucocitos pueden desplazarse en contra de la corriente sanguínea, y aun deslizarse a través de las paredes de los vasos sanguíneos y penetrar en los tejidos. Su principal función es la defensa del cuerpo contra virus, bacterias e infecciones, pero en ocasiones pueden atacar los tejidos normales del propio cuerpo. Según su estructura celular se clasifican en granulocitos y no granulocitos o linfoides.

2.1.4.1. Granulocitos. El término granulocito es debido a la presencia de gránulos en el citoplasma de estas células. Son leucocitos de 12-15 micras de diámetro. Su núcleo presenta diversas lobulaciones, por esa razón también se conocen como polimorfonucleares; todos poseen gránulos citoplasmáticos evidentes y su citoplasma contiene granulación.

En los diversos tipos de granulocitos, los gránulos son diferentes y nos ayudan a distinguirlos. De hecho, estos gránulos tienen una diversa afinidad hacia manchas neutrales, ácidas o básicas y dan al citoplasma diversos colores. Así pues, los granulocitos se distinguen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los tres tipos son móviles y capaces de ingerir bacterias, pero los neutrófilos son más activos que los otros dos. Los núcleos de los neutrófilos poseen de 3 a 5 lóbulos, y su citoplasma contiene pequeños gránulos que se tiñen de color lavanda pálido. Los eosinófilos poseen núcleos con dos o tres lóbulos, y grandes gránulos que se tiñen de rojo brillante con la eosina que contiene el colorante de Wright. Los núcleos de los basófilos son, habitualmente, bilobulados, y su citoplasma contiene grandes gránulos que se tiñen de azul oscuro.

En la figura 3, se presenta un ejemplo de cada uno de los tipos de leucocitos granulocitos maduros que normalmente se deben observar en la sangre periférica.



Figura 3. Tipos de leucocitos granulocitos maduros observados en sangre periférica. Imágenes adquiridas mediante el sistema implementado

En la imagen anterior se puede observar claramente la coloración característica que presenta cada una de las células, al igual que la presencia de gránulos dentro del citoplasma, los cuales son propios en esta clase de leucocitos. En la imagen también se puede observar, las distintas lobulaciones que presentan cada uno de los núcleos celulares.

2.1.4.2. No granulocitos o linfoides. Estas células a diferencia de las anteriores se caracterizan por ser mononucleadas y de tamaño variable, se distinguen dos clases de células los linfocitos y monocitos.

Los linfocitos, que son los glóbulos blancos más pequeños, tienen un diámetro de 6-8 micras. Poseen un núcleo grande, esférico o ligeramente mellado, basófilo y, en ocasiones, contiene una discreta granulación azurófila, presenta una pequeña cantidad de citoplasma en forma de capa delgada alrededor del núcleo; el citoplasma no posee gránulos. Los linfocitos son menos móviles que los demás leucocitos. Son células que además de estar presentes en la sangre, se ubican también en los tejidos y órganos linfoides, al igual que en la circulación linfática y los vasos linfáticos.

Entre los órganos linfáticos se incluyen el timo, la médula ósea, el bazo, y los tejidos linfoides del tracto respiratorio y gastrointestinal. Son los principales efectores de la respuesta inmune específica. Los monocitos son células de tamaño grande pero variable, son las más grande dentro de todas las células sanguíneas, suelen medir de 15 a 22 μm de diámetro. El núcleo de estas células varía de formas: redondo, en forma de riñón, ovalado o lobulado y en ocasiones aparece doblado. El núcleo es voluminoso y generalmente ubicado de forma excéntrica. La cromatina se dispone en filamentos bien definidos. El citoplasma es difuso y se tiñe de color azul claro o gris con la coloración de *Wright*.

En la figura 4, se presenta un ejemplo de los leucocitos de la serie linfoide o no granulocítica observados normalmente en la sangre periférica.

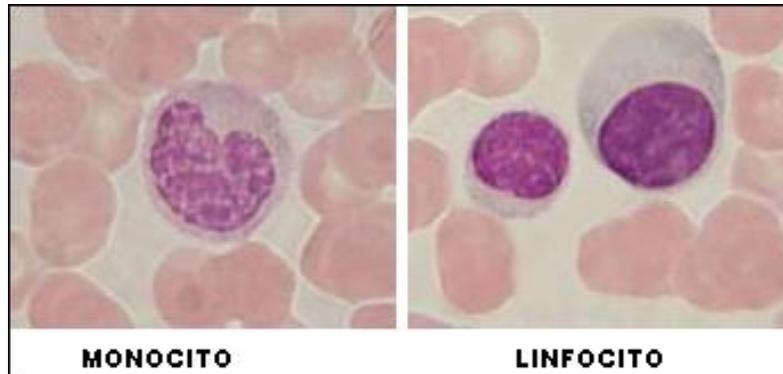


Figura 4. Tipos de leucocitos linfoides maduros presentes en la sangre periférica. Imágenes adquiridas con el sistema implementado.

Los leucocitos además de variar en formas y tamaño, también lo hacen en número, siendo esta una de las características fundamentales a la hora de realizar un diagnóstico, o de evaluar el resultado de un examen. Sin embargo, ya se encuentran algunos valores o rangos en porcentajes, que deben presentar los leucocitos normalmente dentro de una persona sana, estos valores igualmente varían dependiendo de la edad de la persona. En la Tabla 1, se presentan estos valores.

Tabla 1. Conteo normal de leucocitos en la sangre periférica.

Edad (años)	Neutrófilos		Eosinófilos		Basófilos		Linfocitos		Monocitos	
	Rango	%	Rango	%	Rango	%	Rango	%	Rango	%
1	1.5 - 8.5	31	0.05 - 0.7	2.6	0 - 0.2	0.4	4 - 10.5	61	0.05 - 1.1	4.8
4	1.5 - 8.5	42	0.02 - 0.65	2.8	0 - 0.2	0.6	2 - 8	50	0 - 0.8	5
6	1.5 - 8	51	0 - 0.65	2.7	0 - 0.2	0.6	1.5 - 7	42	0 - 0.8	4.7
10	1.8 - 8	54	0 - 0.6	2.4	0 - 0.2	0.5	1.5 - 6.5	38	0 - 0.8	4.3
21	1.8 - 7.7	59	0 - 0.45	2.7	0 - 0.2	0.5	1 - 4.8	34	0 - 0.8	4

Fuente: [4]. Nota: los valores se encuentran en unidades $\times 10^3/\mu\text{L}$

La principal función de los leucocitos es proteger al cuerpo contra los organismos patógenos. Los neutrófilos y los monocitos destruyen a las bacterias que invaden el organismo, ingiriéndolas de un modo similar al que emplea la amiba para ingerir partículas de alimento.

El englobamiento de una partícula por una célula se denomina fagocitosis. Se ha observado que los neutrófilos fagocitan entre 5 y 25 bacterias, y los monocitos hasta 100 antes de morir.

La cantidad de eosinófilos aumenta significativamente cuando el cuerpo es infectado por un animal parásito, tal como el *Trichinella, nematelminto*² que causa la triquinosis. Estos leucocitos posiblemente intervengan, de algún modo para contrarrestar los efectos del parásito. Los estados alérgicos, tales como la fiebre del heno, el asma y la alergia por absorción de proteínas extrañas, también se caracterizan por un gran aumento de eosinófilos circulantes. La inyección de hormonas corticoadrenales (cortisona o hidrocortisona), causa a los pocos minutos una disminución de dicho número, que se reduce a la mitad (o menos) del valor normal.

El número de leucocitos circulantes aumenta en la mayoría de las infecciones, pudiendo elevarse el recuento a más de 20.000 leucocitos por milímetro cúbico en la apendicitis o en la neumonía. Se cree que los tejidos inflamados liberan una sustancia (“factor promotor de leucocitosis”) que por la corriente sanguínea llega a la médula ósea, donde estimula la producción y liberación de leucocitos, particularmente neutrófilos. La cantidad de leucocitos que hay en la sangre refleja la gravedad de la infección, y el recuento leucocitario periódico se utiliza para controlar el grado de recuperación del paciente. Algunas enfermedades se caracterizan por el aumento de un determinado tipo de leucocitos, y la fórmula leucocitaria es útil para el diagnóstico.

² Gusano parásito, que se instala en el intestino delgado de varios mamíferos, especialmente en el cerdo, de donde pasa al hombre.

El número de linfocitos aumenta en la tos convulsiva y en la anemia perniciosa, en las quemaduras producidas por el sol, en las enfermedades crónicas como la tuberculosis, y en las personas que viven a grandes alturas o en los trópicos. La fiebre tifoidea y el paludismo determinan, habitualmente, un aumento del número de monocitos; la neumonía, la apendicitis y otras infecciones bacterianas agudas, aumentan en forma típica el número de neutrófilos. El incremento de la cantidad de eosinófilos se produce en las infecciones por tenias, anquilostomas y otros animales parásitos, y en la escarlatina, el asma y algunas enfermedades de la piel[4-7].

El organismo posee un segundo tipo de protección contra las enfermedades: la producción de proteínas específicas denominadas anticuerpos, en respuesta a la presencia de sustancias extrañas en la sangre o los tejidos denominadas antígenos [5].

2.2. EL EXAMEN HEMATOLÓGICO

El cuidado de un paciente comienza con el intento de determinar la naturaleza de su enfermedad, el examen en sangre periférica se realiza en todos los pacientes afectados de enfermedades importantes, debido al gran valor que posee el hallazgo de una anemia o de una leucocitosis. Se puede definir una amplia gama de anomalías en la sangre periférica, mediante estudios cuantitativos o cualitativos. El **frotis de sangre periférica** obtenido por punción capilar y coloreado con algún tipo de proceso de tinción como el de *Wright* o *Giemsa*, suministra un medio para estudiar la sangre y determinar las variaciones y anormalidades de estructura, forma y tamaño de las células; su contenido de hemoglobina y sus propiedades de coloración. Es útil en el estudio de algunas alteraciones hematológicas y como indicador de la respuesta y los efectos de diferentes tratamientos. Permite además observar agrupaciones de células, cada una con su morfología característica.

La determinación numérica de los eritrocitos o leucocitos y plaquetas en la sangre periférica, ha sido durante mucho tiempo un método fundamental en hematología. Antiguamente el **recuento eritrocitario** no se realizaba como un procedimiento corriente debido a las limitaciones técnicas y también porque existían métodos más satisfactorios para valorar el grado de anemia. Sin embargo, el reciente desarrollo de los contadores celulares electrónicos ha renovado el interés hacia el recuento eritrocitario, a pesar de que el margen de error sigue elevado. A fin de obtener unos datos cuantitativos verdaderos, el número de células en una muestra sanguínea perfectamente medida y diluida debe dar siempre un recuento reproducible.

En la actualidad existen dos formas de realizar pruebas hematológicas; la primera de ellas utiliza equipos e instrumentos automáticos altamente sofisticados que pueden llegar a manejar más de 20 parámetros contables de la sangre; estos equipos se basan generalmente en cuatro principios físicos fundamentales: descenso de la conducción eléctrica (contador *Coulter*, *Hemalog* y el SMA 7A); deflexión de ondas de radio, dispersión óptica y fluorescencia (*Autocitómetro* y el *Hem-Alyzer*). Estos instrumentos son bastantes eficientes pero carecen de la posibilidad de la supervisión de los datos, por lo tanto un error en la información, implica necesariamente la repetición del estudio del frotis, además de su elevado costo. Los grandes laboratorios y clínicas manejan estos equipos [4,8,9].

El otro método y el más utilizado por los profesionales consiste en analizar el frotis de sangre mediante técnicas de microscopía óptica (campo claro, oscuro, diferencial de fase, etc.) El análisis de las células sanguíneas a través de estas técnicas para la diferenciación, clasificación y conteo, es un proceso que consume mucho tiempo y es altamente dependiente del operario y de la capacidad de discriminación visual que posea. El frotis de sangre se debe acondicionar para su visualización. Pero cuando las condiciones de las imágenes observadas a través del microscopio no son muy buenas, o cuando se cuenta con un gran número de ellas, el trabajo de analizarlas se vuelve sumamente pesado y monótono, siendo

propenso a errores, o bien, que por agotamiento físico y/o mental del especialista, se evite realizar un estudio minucioso. Es aquí donde el desarrollo de algoritmos de análisis de imágenes permitirá automatizar muchas de las tareas, y se convertirá en una gran herramienta del analista humano, dejándole las imágenes preanalizadas o cuantificadas, para que sólo se concentre en el trabajo más creativo, la interpretación o diagnóstico final[8,9].

El hematólogo requiere dos tipos de conteo de células sanguíneas para el diagnóstico y la investigación. El primero se denomina **cuadro hemático completo** y el segundo **conteo diferencial** de células sanguíneas. El cuadro hemático completo se puede llevar a cabo por instrumentos automáticos como los citómetros o el *Coulter*, pero dan una información tosca sobre la composición de la célula. Por otra parte, el **conteo diferencial** es mucho más confiable pero, actualmente es un procedimiento manual realizado por los expertos de la hematología usando el microscopio óptico. En el conteo diferencial, un experto cuenta, hasta un número de 100 glóbulos blancos del frotis y calcula el porcentaje de ocurrencia de cada uno de los tipos de células que contó. Los resultados revelan información sumamente importante sobre el estado de salud actual del paciente[4,8]

En el transcurso de los últimos años se ha experimentado un aumento progresivo de los análisis ordinarios realizados por los laboratorios clínicos. Los problemas prácticos que ello ocasionaba, han dado gran auge al desarrollo de técnicas automáticas; se ha presenciado un incremento continuo en la eficacia y utilidad de los aparatos automáticos y se ha traducido por una disponibilidad y utilización siempre crecientes de la instrumentación automatizada. La mayor parte de este equipo es muy costoso; no obstante, la eficacia perfeccionada ha tendido a disminuir los costos generales de las pruebas de laboratorio. Además, los análisis así obtenidos demuestran una disminución de los errores técnicos accidentales, aumentando así la calidad de los resultados.

Antes del advenimiento de los instrumentos automatizados las determinaciones más frecuentes en el laboratorio de hematología eran la concentración de hemoglobina, el valor hematocrito, el recuento leucocitario, y la valoración microscópica cualitativa y cuantitativa del frotis de sangre periférica. Otras determinaciones menos frecuentes incluyen el recuento eritrocitario, de reticulocitos y plaquetas y una serie de índices que se derivan de los hematíes. De estas pruebas solo la hemoglobina y el valor hematocrito pueden realizarse mediante técnicas manuales de una forma simple y rápida. Por el contrario, los métodos manuales de recuento celular han sido engorrosos y pesados e implican un menor grado de precisión.

En un estudio [10], el recuento manual de los hematíes expresaba un coeficiente de variación del 8.2%. Probablemente, en los laboratorios con mucho trabajo, los recuentos cotidianos den un coeficiente de variación mucho mas alto 20%. La variabilidad en el recuento de las plaquetas es semejante y puede aumentar cuando el número de plaquetas está disminuido. Los errores son debidos a la dilución sanguínea, al intentar hacer una distribución uniforme de las células, al medir una muestra mal extraída, o al realizar un conteo erróneo de las células. Esto ultimo sucede cuando hay una superposición celular, cuando existen anomalías en la forma o tamaño de las células, de tal modo que son mal interpretadas visualmente. La automatización de un laboratorio aumenta la eficiencia en el trabajo porque permite un mejor uso del espacio y una importante racionalización de la labor de cada miembro del laboratorio, y requiere un menor número de muestras.

En el mundo de la patología, la evaluación cuantitativa de una muestra microscópica está basada en el análisis visual de la imagen por el patólogo con el objetivo de detectar y clasificar sus características de diagnóstico. Por lo general, una buena interpretación depende de la cantidad de observaciones realizadas por el patólogo experimentado y de la capacidad individual del mismo para tomar la decisión producto de la combinación de un buen análisis visual y de su

conocimiento teórico; así, utilizando estos criterios, la interpretación puede proveer información valiosa para la terapia o diagnóstico a seguir. Desafortunadamente, la estrategia adecuada de selección terapéutica depende de evaluaciones subjetivas y en muchas ocasiones los resultados varían entre los patólogos. Con el fin de poder minimizar estos desacuerdos entre los criterios de diagnóstico, se hace necesario usar nuevas tecnologías como el análisis de imágenes, que permitan una evaluación cuantitativa basada en algún tipo de medida objetiva sobre la imagen[11,12].

La motivación del desarrollo de este trabajo es el intento por automatizar el procedimiento de un conteo diferencial de células sanguíneas, mediante la microscopía óptica, utilizando técnicas avanzadas del procesamiento de imágenes, la visión computacional y el aprendizaje de máquina.

2.3. LA MICROSCOPIA EN LA HEMATOLOGÍA

Debido al gran entusiasmo y a la fascinación que siempre tuvo el hombre por querer conocer y ver de que estaban hechas las cosas, surgen instrumentos de inimaginable beneficio como los microscopios. Las unidades básicas de todos los seres vivos son las células, casi todas son de tamaño muy pequeño y no alcanzamos a verlas a simple vista. El poder resolutivo del ojo humano es de aproximadamente 200 μm , es decir la menor distancia visible por el ojo humano, por debajo de ese valor no está en la capacidad de distinguir nada. Los microscopios se utilizan para mejorar y poder elevar nuestro poder de resolución.

En 1665 *Robert Hooke* utilizando un microscopio óptico simple, examinó un corte de corteza, y, encontró que esta estaba compuesta por una masa de diminutas cámaras, que llamó “**células**”; en realidad sólo vio las paredes celulares, ya que cuando mueren, las células ya no presentan ningún tipo de contenido celular y solamente se conservan las paredes celulares. Las primeras lentes que fueron metódicamente empleadas en la observación microscópica dentro de la biología

fueron las pulidas por *Antony Van Leeuwenhoek* (1632-1723), quien en el siglo XVII, desarrolló una especial habilidad para pulir lentes de la mejor calidad. *Leeuwenhoek* estudió todo tipo de muestras, utilizando para sus observaciones lentes simples, pulidas en la forma que tienen actualmente las lupas y, montadas en engarzaduras de oro y plata. Con estos instrumentos *Leeuwenhoek* descubrió los glóbulos de la sangre, diversos protozoarios y las bacterias[13].

El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. El microscopio compuesto, que dispone de varias lentes con las que se logran aumentos mayores, y se consiguen corregir aberraciones de tipo cromático y esférico fue inventado por el holandés *Zacharias Jensen*. Este microscopio estaba compuesto por una lente objetivo convexa y un ocular cóncavo[13,14].

La utilización del microscopio, ya fuera éste simple o compuesto, permitió que científicos excepcionales como *Robert Hooke* (1635-1713), *Marcello Malpighi* (1628-1694) y *Leeuwenhoek* reconocieran y establecieran la importancia de estudiar la organización microscópica de los seres vivos. Las consecuencias de este nuevo enfoque, el análisis de la estructura de los seres vivos, es aún en la actualidad, un tema de intenso trabajo científico que está lejos de ser completamente resuelto.

Los avances posteriores en la construcción de microscopios se han basado en el perfeccionamiento de la óptica y la iluminación, sin modificarse en su esencia los principios básicos de operación de este magnífico instrumento. Los microscopios más modernos vienen equipados con dispositivos de captura de imágenes como cámaras analógicas o digitales. En la figura 5, se puede observar el esquema de un microscopio óptico compuesto moderno, junto con el camino que recorre la luz desde la fuente hasta el ocular o a la cámara si es el caso.

El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre a la distancia focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes [13,14].

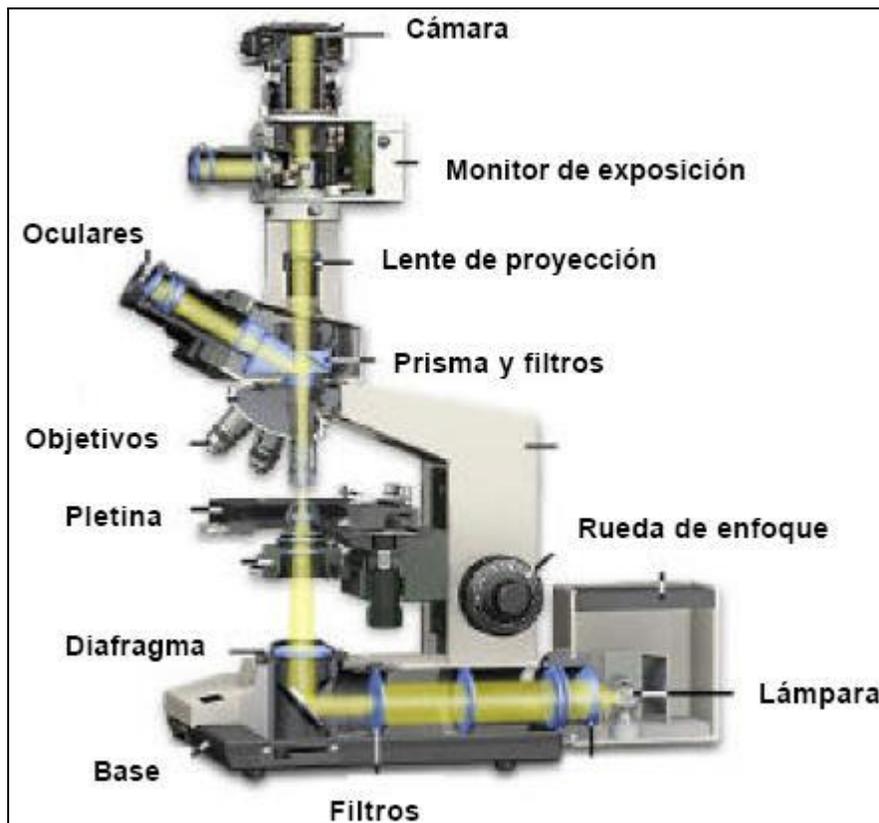


Figura 5. Microscopio óptico moderno. Fuente [15]

El equipamiento adicional de un microscopio consta de un armazón con un soporte que sostiene el material examinado y de un mecanismo que permite acercar y alejar el tubo para enfocar la muestra. Las muestras que se examinan con un microscopio son transparentes y se observan con una luz que los atraviesa. El soporte tiene un orificio por el que pasa la luz. Bajo el soporte se

encuentra un espejo que refleja la luz para que atraviese el frotis. El microscopio puede contar con una fuente de luz eléctrica que dirige la luz a través de la muestra. Los microscopios ópticos actuales tienen un poder resolutivo de $0,2\ \mu\text{m}$, unas mil veces la del ojo humano [15].

Durante la exposición de la muestra en el microscopio, debe tenerse en cuenta ciertos parámetros como la resolución y la visibilidad del microscopio, además del tipo de técnica microscopía que se va a realizar, ya sea de campo claro, oscuro, diferencial de interferencia o de contraste de fase, ya que cada una de ellas tiene sus propias características, y además con cada una de ellas se debe tener un manejo diferente de la imagen debido a la variedad de tonalidades de colores y matices que manejan.

2.3.1. Microscopía de campo claro. Cuando en el microscopio, se hace que la luz proveniente de la fuente converja en el frotis gracias a una lente condensadora o a un juego de ellas, capaces de formar un cono de luz que pueda llegar a las lentes de los objetivos, la técnica recibe el nombre de microscopía de campo claro. El material a observar debe contener un alto grado de contraste, y de no ser así, es necesario teñirlo con colorantes específicos de modo que permita aumentar el contraste y revelar detalles que no se puedan apreciar de otra manera; sin embargo, el proceso de tinción, implica la muerte de los especímenes o de los tejidos [13,16].

La observación de muestras vivas ha estado limitada, ya que éstas poseen grosores variables los cuales transmiten y reflejan la luz de manera no uniforme. Es bien conocido que cuando una sección es gruesa ($>40\ \mu\text{m}$) y contiene células dispuestas en varios planos y orientadas de diversas maneras, poco se puede lograr tratando de enfocar un grupo de células; las imágenes de aquellas que se encuentran por arriba o por abajo y que están fuera de foco, proyectan sombras

que degradan la imagen, haciéndola borrosa, disminuyendo el contraste, la resolución, la pureza y claridad de la imagen.

Desde el siglo XIX, este problema se ha resuelto fijando y cortando los tejidos en rebanadas muy delgadas (hasta de 0.5 micras), esto elimina, en su mayoría, la distorsión debida a las regiones que se encuentran fuera del plano focal de la lente y, pueden obtenerse imágenes de muy alta resolución. Sin embargo, este procedimiento de fijación y corte involucra a su vez la destrucción de los tejidos.

En la figura 6, se presentan dos ejemplos de imágenes de muestras obtenidas con microscopía de campo claro, una de sangre viva sin realizarle el proceso de tinción y otra de una muestra fijada (muerta) y teñida.

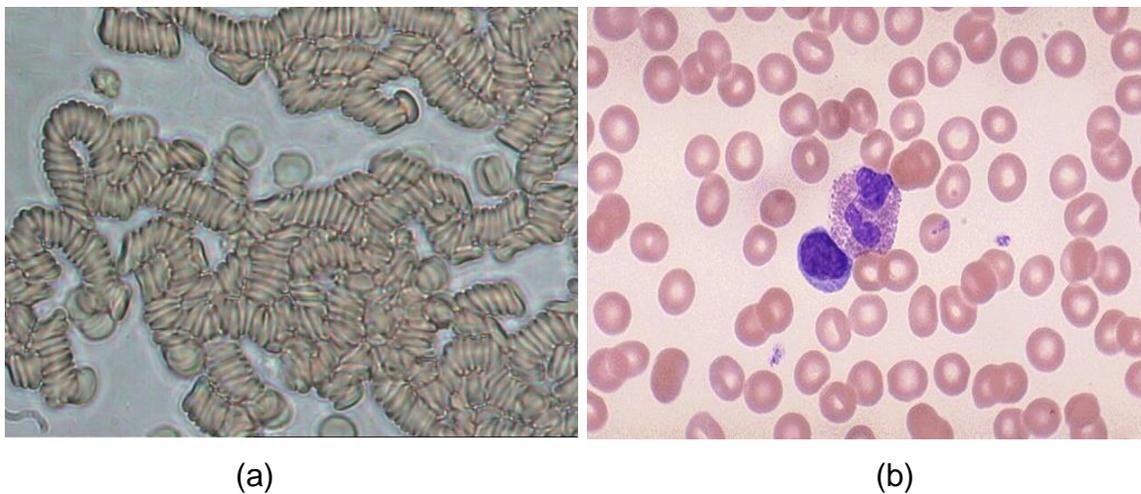


Figura 6. Comparación de muestras usando microscopía de campo claro. (a) Muestra *in vivo*. (b) Muestra teñida y fijada. Imágenes adquiridas por el sistema implementado.

En la primera, se aprecia fácilmente el efecto denominado velo o borrosidad, es especialmente notable en los especímenes vivos, en los que no se tiene control sobre el grosor de la muestra; por el contrario, en la segunda imagen se observa una muestra fijada y teñida que presenta un alto contraste; se aprecian claramente los bordes y los detalles muy bien definidos de las estructuras que conforman los especímenes, los cuales permiten realizar una muy buena

evaluación. Además, en la primera imagen no se aprecian algunos elementos como los leucocitos o plaquetas, que si aparecen en la segunda imagen después del proceso de tinción.

Dado que, la gran mayoría de los estudios morfológicos que se han realizado sobre las células sanguíneas tanto sanas como enfermas, se han efectuado utilizando muestras teñidas observadas bajo iluminación de campo claro, este es el tipo de microscopía más común dentro de la hematología, además, permite una mejor y más eficiente diferenciación de cada una de las distintas series de células sanguíneas.

2.3.2. Microscopía de campo oscuro. Es una técnica única capaz de hacer visible elementos biológicos transparentes y sin manchas o tinciones que no se observan en la microscopía de campo claro. Este tipo de microscopía utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el frotis y un condensador especial tan grande como los rayos de luz que pasan al objetivo.

El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz, bloqueando la luz que normalmente atraviesa y rodea al espécimen, y sólo recoge la luz proveniente de los rayos oblicuos que se reflejan en el objeto y los usa para formar la imagen. Por ello las fracciones brillantes del frotis aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Los objetos que no podían ser observados con la microscopía de contraste de fase son ahora observables con la microscopía de campo oscuro [13,16].

En la figura 7, se observan dos ejemplos de imágenes obtenidas con la técnica de microscopía de campo oscuro. La primera de ellas corresponde a una muestra viva, donde aún se observa el aglutinamiento normal de las células *in vivo* y el velo procedente del grosor de la muestra explicado anteriormente; sin embargo, a

diferencia de la muestra *in vivo* con microscopía de campo claro, en esta imagen se pueden observar claramente dos leucocitos, aunque no se puede definir la clase de leucocito a la que corresponden (monocito, linfocito, neutrófilo, etc.). La segunda imagen, corresponde a una muestra cortada y fijada, donde desaparece el aglutinamiento y el velo borroso que presentan las muestra *in vivo*, pero al igual que la anterior no se obtiene mayor detalle sobre cada uno de los elementos que conforman el frotis y por lo tanto es casi imposible catalogar cada una de las células en las diferentes clases que existen.

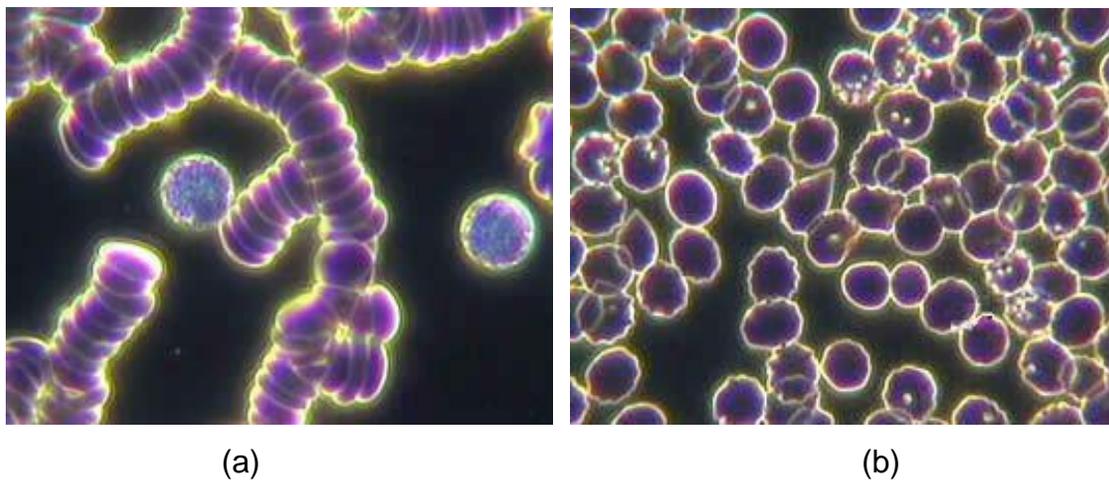


Figura 7. Ejemplos de imágenes obtenidas mediante la microscopía de campo oscuro. (a) Muestra de sangre *in vivo*. (b) Muestra teñida y fijada. Imágenes adquiridas por el sistema implementado.

2.3.3. Microscopía de contraste de fase. Para contrarrestar parte de las limitantes en la observación de especímenes vivientes, en el año 1935, *Fritz Zernike* desarrolló el microscopio de contraste de fases. Se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin colorear. Los detalles de un objeto en el microscopio óptico estándar se ven debido a que los objetos tienen partes de diferente densidad; por lo tanto, objetos completamente transparentes, como algunas células vivas, son difícilmente distinguibles.

El contraste de fases es especialmente útil para observar especímenes transparentes, debido a que hace distinguibles detalles que no lo son con el microscopio estándar. El contraste de fases se basa en que los objetos transparentes tienen pequeñas variaciones en su índice de refracción de un punto a otro; esto genera un espectro de difracción por detrás del plano focal del objetivo. Las ondas difractadas por las irregularidades del objeto se encuentran fuera de fase respecto a las que no han sido refractadas; al introducir al microscopio un desplazamiento artificial de la fase de las ondas no difractadas se produce un efecto de interferencia y aumento en el contraste del campo.

El microscopio de fase ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo en el microscopio de fase el cono de luz es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda ($\lambda/4$); por otro lado, la luz difractada por el objeto, es separada de la luz incidente original en aproximadamente media longitud de onda ($\lambda/2$), de manera que puedan interferir destructivamente y cambiar la intensidad. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente, haciéndolo visible [13,16].

Este tipo de microscopio es muy útil a la hora de examinar especímenes delgados, células aisladas o tejidos vivos sin colorear, permitiendo ver detalles con una claridad y resolución nunca antes alcanzada.

Una desventaja de este método es que no se puede usar cuando la muestra es demasiado gruesa, ya que se degrada la calidad de la imagen; otra desventaja de esta técnica es la aparición de halos de luz alrededor de algunos objetos (efecto halo). Se cree que este halo presente en el eritrocito representa el movimiento molecular de la hemoglobina dentro del hematíe. Todo lo que interfiera en el

movimiento molecular, como cristalización, degranulación, indentación o fijación hará desaparecer este halo [4].

En la figura 8, se presentan dos ejemplos de imágenes obtenidas usando la técnica de contraste de fases. Se puede observar claramente el efecto halo que rodea a todos los elementos presentes en el frotis. En estas imágenes aparecen también, objetos que normalmente serían transparentes o invisibles en la técnica de campo claro, aún realizando procedimientos de tinción, algunos de estos elementos corresponden a cadenas proteínicas, parásitos, bacterias, etc.

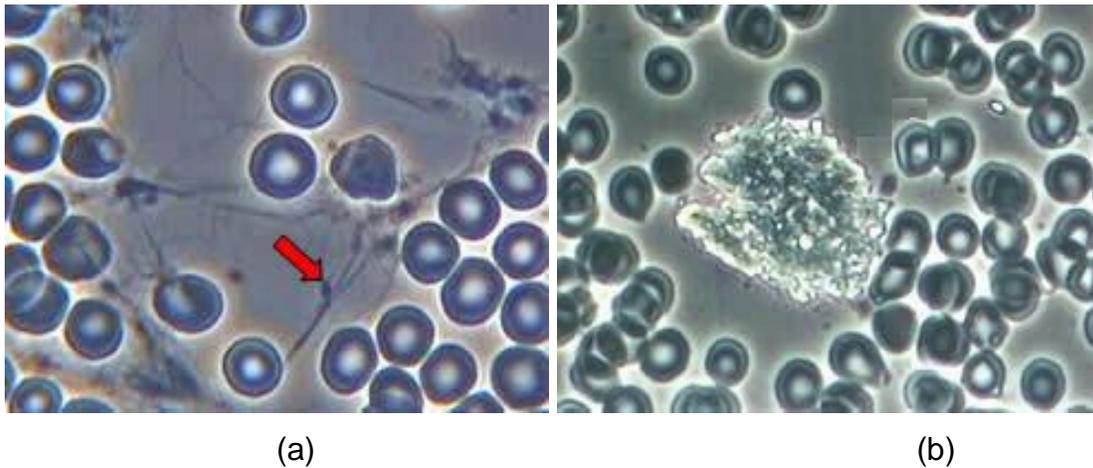


Figura 8. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases, donde se pueden apreciar sustancias transparentes a otras técnicas. (a) Fibrina. (b) Colesterol.

En la figura 8a, se pueden observar en forma de espinilla proteínas conocidas como fibrina, las cuales se encuentran involucradas en el proceso de coagulación sanguínea. Una de ellas aparece señalada con una flecha roja. En la figura 8b, se puede observar en la parte central de la imagen un conglomerado bastante grande de colesterol presente en el flujo sanguíneo.

2.3.4. Microscopía de contraste diferencial de interferencia. Se basa en una propiedad óptica denominada birrefringencia; en este tipo, la muestra se ubica en

medio de dos placas polarizadas (*polaroid*), dentro del condensador se ubica un prisma especial llamado *Nomarski*, el cual actúa como divisor de haz.

La luz modificada por la estructura birrefringente, atraviesa la segunda placa, mientras que por el contrario si la muestra no es birrefringente, la luz no atraviesa la segunda placa y las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado. Esta técnica al igual que la de contraste de fases convierte la información de fases en un aumento en el contraste de la imagen. Como resultado de esto, la intensidad de cualquier punto de la imagen es proporcional a la diferencia de fase generada por el espécimen, lo que determina un aumento notable de la definición de las regiones que tienen diferentes grosores, o índices de refracción; particularmente los bordes de cualquier estructura.

Las técnicas de contraste de fases y contraste diferencial de interferencia (DIC, por sus siglas en inglés *Differential Interference Contrast*) son técnicas complementarias, capaces de producir imágenes de alto contraste de muestras biológicas que por lo general serían transparentes al campo de visión de la microscopía de campo claro. Quizá la diferencia más importante entre estas dos técnicas sea la base óptica sobre la cual se forman las imágenes. En el contraste de fases se producen imágenes cuyos valores de intensidad son función de la longitud del camino óptico de la luz que atraviesa el espécimen. Las regiones demasiado densas, presentan un camino óptico mucho más largo y aparecen en la imagen mucho más oscuro que el fondo de la imagen. Por otra parte, las zonas más delgadas del espécimen, presentan un índice de refracción mucho menor que el del medio que las rodea y aparecen como zonas mucho más iluminadas cuando se superponen sobre el medio gris de fondo.

En la técnica DIC, la situación es muy diferente, es el gradiente de longitud del camino óptico el actor primario responsable de introducir contraste en las

imágenes de los especímenes. Un gradiente pronunciado en el camino óptico, genera un excelente contraste y las imágenes presentan un falso relieve tridimensional característico de la técnica DIC. Por otra parte las regiones con un gradiente poco profundo, producen un contraste bajo y a menudo aparecen en la imagen con el mismo nivel de intensidad que el fondo [13,16].

En la figura 9, podemos hacer una comparación entre la microscopía de contraste de fases y DIC, al mismo campo de visión se tomaron dos imágenes, la primera (figura 9a) usando microscopía de contraste de fases y la otra con microscopía DIC. En la primera de ellas, se observa que los eritrocitos humanos presentan el halo distintivo a su alrededor. Se puede notar que la parte central es más brillante que la periferia debido a una reducción en la longitud del camino óptico en esta región. En la figura 9b, se puede observar que el halo que rodeaba a los eritrocitos ha desaparecido, pero las imágenes adquieren un aspecto de falso relieve o tridimensionalidad, producido por la orientación asimétrica del eje del prisma *Nomarski* (noroeste a sureste), respecto del eje óptico del microscopio, dando como resultado que los bordes de las células ubicados en la parte superior izquierda, sean mucho más brillantes que los ubicados en el lado opuesto (inferior derecha) de las células.

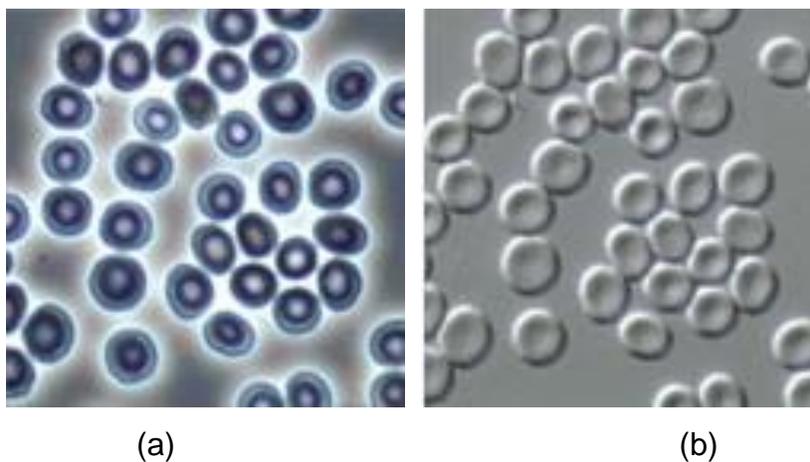


Figura 9. Comparación del mismo campo visual usando diferentes técnicas microscópicas. (a) Microscopía de fases, donde se observa el efecto halo. (b) Microscopía DIC con su apariencia de falso relieve. Imágenes tomadas por el sistema implementado.

Una ventaja primordial de la microscopía DIC sobre la de contraste de fase, es la facultad de utilizar el instrumento a la máxima capacidad de apertura numérica sin producir efectos de enmascaramiento de las láminas de fase o del anillo del condensador, los cuales restringen severamente el tamaño del condensador y la apertura del objetivo. El mayor beneficio es mejorar la resolución axial, en particular, por la capacidad de la microscopía DIC de producir imágenes excelentes de alta resolución sin limitaciones en los tamaños de la apertura. La técnica de microscopía de DIC se usa cuando el espécimen es muy grueso como para ser observado mediante la microscopía de contraste de fases. La microscopía DIC permite observar los aspectos tridimensionales de la superficie del eritrocito y valorar la profundidad de la depresión central del disco bicóncavo[13].

Además de las técnicas anteriormente descritas, existen otras más como la microscopía confocal o la de fluorescencia. En la primera, se hace pasar la luz que incide sobre la muestra por un pequeño agujero o ranura y enfocarla en el plano de la imagen de un objetivo de gran apertura numérica. De esta manera, la luz que es reflejada por el punto que se encuentra en el plano focal del objetivo, regresa al mismo y es reenfocada y transmitida a su vez por un pequeño agujero o ranura sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada o emitida por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente. Debido a que las aperturas tanto de la iluminación como del retorno de la imagen tienen un foco común, se ha denominado este tipo de microscopios como microscopio confocal. La técnica de microscopía de fluorescencia, se basa en la propiedad de ciertas moléculas (fluoresceína, rodamina) de excitarse con radiación de longitud de onda corta y emitir radiación de una longitud de onda mayor dentro del espectro visible, produciendo así una imagen luminosa contra un fondo oscuro [13,16].

A pesar de que las imágenes que se obtienen usando estas técnicas de microscopía son superiores respecto de las obtenidas por las anteriores, no fueron

de mayor interés en el desarrollo de este proyecto, ya que no se contaba con todos los elementos necesarios para desarrollarlas y emplearlas, además las imágenes brindadas por la microscopía de campo claro sobre muestras teñidas brindaban la información necesaria para el desarrollo de los requerimientos establecidos en el proyecto.

3. SISTEMAS DE VISION ARTIFICIAL

Los sistemas de visión artificial, visión computacional o visión de máquina como se le conocen, son aquellos sistemas cuya función principal es reconocer y localizar objetos en el ambiente basados en imágenes extraídas del mismo, mediante técnicas automatizadas con el fin de extraer cualquier tipo de información y poder así, tomar decisiones. La visión artificial, es una teoría que incorpora elementos de procesamiento digital de imágenes, cuyo interés deriva principalmente de dos áreas de aplicación: la mejora de la información pictórica para la interpretación humana, y el procesamiento de los datos de la escena para la percepción autónoma por una máquina.

Nos podemos preguntar si la visión artificial no es una forma de procesamiento de imágenes o de reconocimiento de patrones. Aunque existe algún solapamiento, las diferencias son muy importantes, especialmente en su objetivo final. El procesamiento digital de imágenes es una ciencia que permite modificar, examinar y manipular imágenes digitales, originalmente continuas, en un computador. Los algoritmos de procesamiento de imágenes se describen como procedimientos paso a paso cuyo único objetivo es mejorar la calidad de las imágenes para su posterior utilización o interpretación ya sea por parte de un sistema automatizado o por personal humano [17]. El propósito de la visión artificial, es inferir el estado del mundo físico a partir de las imágenes del mundo[18].

La principal motivación en este campo es la capacidad que pueden tener las máquinas para procesar información en forma visual. Las herramientas necesarias para un sistema de visión incluyen hardware para la adquisición y almacenamiento de las imágenes y software para procesar e interpretar las imágenes. Aunque en

la actualidad existen diversas soluciones de hardware y software para el desarrollo de aplicaciones de visión, el avance de las tecnologías, componentes y métodos, sumado a una disminución en los costos, permite tener soluciones específicas, de bajo costo, a diversos problemas.

Los sistemas de visión artificial apuntan, junto con la ayuda del conocimiento de diversas áreas (electrónica, matemática, biología, medicina, mecánica, computación, comunicación visual, etc.) obtener un conjunto de técnicas y metodologías que puedan dar soporte al desarrollo de teorías y productos lo suficientemente eficientes y confiables para aplicaciones prácticas. Se pueden citar por ejemplo, la automatización de procesos de control de calidad, identificación y clasificación de piezas o productos, la exploración o navegación automática de vehículos entre otras.

Según Nalwa [19], podríamos decir que la visión artificial se describe como la deducción automática de la estructura y propiedades de un mundo tridimensional, posiblemente dinámico, bien a partir de una o varias imágenes bidimensionales de ese mundo. Las imágenes pueden ser monocromáticas o multibanda , pueden provenir de una o de varias cámaras e incluso estas pueden ser fijas o móviles. Las estructuras y propiedades que se quieren deducir incluyen no solo sus propiedades geométricas, sino también sus propiedades materiales como el color, la textura, e incluso la composición.

Esta sección empieza con una introducción a la concepción de los sistemas de visión artificial y en concreto a la inspección visual automatizada. Se explica, con ayuda de un modelo simplificado, la terminología relacionada. Posteriormente se presentan los principales componentes o elementos que conforman los sistemas de visión artificial. Finalmente, se presenta una revisión de la investigación y el estado del arte acerca de la clasificación automatizada de las células sanguíneas.

3.1. CONCEPCION DE UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL

Los sistemas de visión artificial completan tareas de inspección con un alto nivel de flexibilidad y repetibilidad, nunca se cansan, ni se aburren, no se distraen y pueden ser ubicados en ambientes de trabajo donde por razones de seguridad, los inspectores humanos no podrían trabajar.

La **inspección** es proceso de control para determinar automáticamente si un producto, elemento o artículo se desvía de un conjunto de características dadas o de las especificaciones de fabricación[20]. El proceso de **inspección** implica la medida de determinadas propiedades de un producto como las dimensiones geométricas, superficies, posición, orientación, etc. La **inspección visual** significa inspección basada en información pictórica observada ya sea por un sensor de visión artificial o por un operario humano. Por lo tanto, la **inspección visual automatizada** significa inspección visual por medio de la visión artificial. Por consiguiente, el término **sistema de visión artificial para clasificación de células sanguíneas** es equivalente a **sistema de inspección visual automatizada de células sanguíneas**, como se designará de ahora en adelante[21].

Mientras los sistemas de inspección visual automatizada exceden a los operadores humanos en términos de ambiente de trabajo, sí dependen de la forma en que el ojo humano interactúa con el cerebro para procesar imágenes y tomar decisiones. Para un inspector humano, los ojos proporcionan información del ambiente que lo rodea, el cerebro descifra lo que los ojos ven apoyado en experiencias previas con objetos similares. Basándose en esta interpretación, se toman decisiones y acciones[22]. En forma similar, los sistemas de visión artificial ven al objeto, lo analizan y toman decisiones fundamentados en especificaciones o criterios previamente establecidos[23-26].

De acuerdo a Malamas et al[27], la mayoría de las aplicaciones desarrolladas en los procesos de inspección visual automatizada, están relacionadas con al menos uno de los cuatro tipos de inspección: estructural (si hay objetos perdidos o cuerpos extraños), superficial (si la superficie tiene la calidad adecuada), dimensional (medida del tamaño y la forma) y operacional (si el dispositivo opera de manera correcta o precisa).

En el caso del sistema de inspección automatizado de células propuesto, se trata de la combinación de al menos tres de estos tipos de inspección: (1) estructural por lo que muchas veces se busca la presencia de cuerpos u objetos extraños, restos celulares, bacterias, parásitos, (2) superficial debido a que se buscan características específicas tanto en el núcleo celular como en el citoplasma y (3) dimensional puesto que, se realizan medidas sobre el tamaño y la forma en general de las células, además, cuando se encuentran defectos o anomalías estos deben ser medidos y cuantificados para una mejor interpretación o elaboración del diagnóstico.

3.2. ARQUITECTURA DE UN SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL.

Los sistemas de visión artificial se describen como herramientas multidisciplinarias utilizados para distintos fines diversos. Los procedimientos varían muchísimo en función del área de trabajo. Los tratamientos de las imágenes varían de acuerdo a la naturaleza, la calidad y el conocimiento previo que se tenga sobre el entorno de trabajo.

En cuanto a la naturaleza de las imágenes, se puede decir que estas provienen de distintas áreas como la medicina, biología, agricultura, medios industriales o de laboratorios, las cuales presentan diferentes elementos e información variada presente dentro de las mismas.

Los requisitos de calidad de una imagen varían de acuerdo con la aplicación. La resolución, depende de las dimensiones de la matriz de la imagen, del número de niveles de grises, del intervalo entre las imágenes (en el caso de una secuencia de imágenes). Características como el número y distribución de los detalles y la presencia de áreas con una variación gradual de brillo influyen de modo negativo en la calidad de las imágenes. Las condiciones del ambiente de iluminación influyen en la calidad de la información disponible (regiones, detalles, contornos, contrastes, etc.).

Por último, el conocimiento inicial del medio o de la escena de estudio es un elemento importante en el procesamiento y análisis de la imagen, ya que si se tiene un conocimiento previo sobre el objeto a estudiar, se puede realizar un estudio mucho más directo y no se pierde tiempo ni esfuerzos en objetos que no sean de interés. Por el contrario, cuando no se posee conocimiento sobre la escena a trabajar, se debe realizar un estudio más completo y profundo para poder suplantar la falta de conocimiento con lo que el análisis se hace más lento y pesado.

Las técnicas de procesamiento de imágenes de acuerdo al grado de abstracción que tengan o a la naturaleza del modelado requerido para llevar a cabo el análisis, se pueden dividir en tres niveles o categorías: bajo, medio y alto.

El análisis de bajo nivel, está orientado a la determinación de las propiedades locales de la imagen como lo son el color, la textura, elementos de borde, binarización, atenuación, etc. En el procesamiento de bajo nivel, los datos de entrada son los píxeles de la imagen original y los datos de salida representan propiedades de la imagen en forma de valores numéricos asociados a cada uno de los píxeles. Por su parte, en el análisis de nivel medio se determinan las propiedades geométricas o atributos fotométricos producidos como resultado de una lista de características, algunos de los atributos descritos pueden ser los contornos, regiones, superficies, objetos o elementos presentes dentro de la

imagen, etc. Por último, el análisis de alto nivel está orientado al desarrollo de modelos semánticos encargados de generar a partir de la lista de características previamente generadas en el análisis intermedio, una relación o interpretación general del contenido de la imagen [27-29].

En la figura 10 se presentan de manera general, los componentes principales que conforman un sistema de visión artificial [27,29].

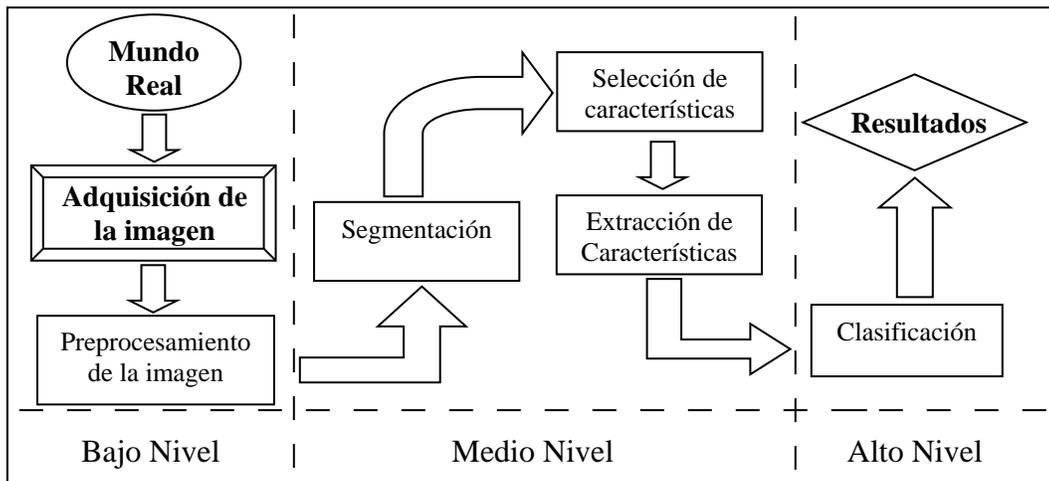


Figura 10. Componentes principales de un sistema de visión artificial y su clasificación de acuerdo a los niveles de visión.

La figura muestra que el objetivo principal de todo sistema de inspección visual automatizada es desplegar un resultado o un conjunto de resultados, a partir de un determinado problema proveniente del mundo real. En la gráfica también se puede observar la separación por niveles de procesamiento que presentan los sistemas de visión artificial. A continuación se explicarán cada una de las etapas o módulos que componen el sistema.

3.2.1. Adquisición y digitalización de la imagen. La adquisición de la imagen es una parte fundamental y crítica dentro de un sistema de visión artificial, ya que si se pierde información durante este proceso es sumamente difícil recuperarse.

Para ello necesitamos un sistema de iluminación, los sensores y la tarjeta digitalizadora o *framegrabbers* para digitalizar la señal producida por el sensor.

El sensor puede ser a monocromático o multibanda, sensible a una determinada región del espectro electromagnético que produce una imagen del dominio del problema. Una vez que el sensor ha estado expuesto por un cierto tiempo, la información almacenada en él, es digitalizada por la tarjeta y, de ser necesario se realizan algunas correcciones de no-linealidad que se puedan presentar, con la imagen ya digitalizada, se procede a almacenarla en el *buffer* de memoria del sistema para su posterior procesamiento. Entre los dispositivos de captura o sensores se encuentran: Cámaras fotográficas, cámaras de estado sólido, digitalizadores (escáner), sensores de ultrasonido, rayos X, tomógrafos, etc.

Las cámaras más utilizadas en este momento, son las denominadas CCD (Dispositivos de carga acoplada, por sus siglas en inglés), Un CCD es un conjunto de fotodiodos que almacenan luz y la transfieren en forma de señal eléctrica, estos fotodiodos están conectados de tal manera que la salida de uno sirve como entrada del próximo, la carga se transfiere mediante un registro de desplazamiento horizontal y otro vertical. Estas características se traducen en innumerables ventajas tales como un amplio rango dinámico, altos grados de integración, altas velocidades de integración, respuesta lineal, posibilidad de operar en varias bandas, y gran versatilidad para su diseño. Para una revisión sobre estos y otros dispositivos revisar las referencias [28, 29].

3.2.2. Preprocesamiento. Después de capturar la imagen, esta es sometida a modificaciones con el fin de mejorarla de acuerdo a los parámetros a analizar, por lo general se busca principalmente eliminar el ruido presente y realzar los detalles de los objetos de interés; eliminar las ambigüedades generadas por la iluminación; detectar homogeneidades o discontinuidades locales; deducir la geometría de la superficie local a partir de sombras, texturas, análisis estéreo, flujo óptico, etc;

acentuar o perfilar las características de una imagen tales como bordes y límites; contrastar la imagen para que sea más útil la visualización gráfica y el análisis de la misma; mejorar la calidad de algunas partes de imagen y transformar la imagen a otro espacio de representación.

Al final lo que se debe obtener es una imagen cuya relación señal ruido sea muchísimo mayor que la de la original. El éxito de esta etapa influye en la confiabilidad y en la certeza de los resultados obtenidos en las etapas posteriores[17,27,28,31,].

3.2.3. Segmentación. En muchas ocasiones, para poder medir es necesario identificar previamente los objetos de interés en la imagen. El separar la imagen en unidades significativas es un paso importante en la visión computacional para poder lograr el reconocimiento de los objetos. Este proceso se llama segmentación, y puede realizarse de modo manual, automático o mixto. Lógicamente, cuanto más componente manual exista más lenta y tediosa resulta la segmentación. Los métodos automáticos, sin embargo, son incapaces de obtener resultados adecuados en la mayoría de las situaciones, y ello a pesar del enorme esfuerzo de investigación invertido en los últimos años.

En este proceso se debe tener una buena relación de lo que se desea encontrar, ya que una segmentación tosca, dilata la solución satisfactoria del problema, mientras que una segmentación débil por lo general implica caer en errores tarde o temprano[17,28,29].

La principal causa de esta dificultad radica en la necesidad de utilizar conocimiento previo para identificar objetos en la imagen, no siendo suficiente con la información presente en la propia imagen. Por esta razón, la segmentación sigue siendo el principal **cuerno de botella** para los métodos avanzados de tratamiento de imagen; hoy por hoy la mayor parte de estos procedimientos

avanzados requieren mucha intervención del operador, lo que los hace de difícil aplicación en la práctica diaria.[33,34]

3.2.4. Extracción de características. Durante este proceso los objetos que han sido segmentados previamente son medidos y sus principales especificaciones o propiedades son extraídas, formando de cada uno de los objetos un vector denominado vector de características, este contiene la información relevante para la clasificación. La información extraída de los objetos de la imagen puede ser de tipo cuantitativo o cualitativo.

La información extraída es de tipo **cuantitativo** cuando corresponde a medidas como áreas, longitudes, perímetros, ángulos de orientación etc y es de tipo **cualitativo** cuando se realiza la verificación de la correcta realización del trabajo como el ensamblado, el embotellado, el etiquetado, el empaquetado y el estado en general del objeto o elemento a medir [22].

Los parámetros que mide el extractor de características dependen específicamente de la aplicación a trabajar. Cuando se establece una aplicación, se seleccionan las características propias más convenientes que nos podrán ayudar en el proceso de la clasificación. En primera instancia, se tienen en cuenta las características que usaría una persona para poder distinguir una clase de otra; sin embargo muchas veces, estas características no son suficientes o algunas no son fácilmente medibles por la técnica empleada, por lo que se requiere seleccionar otro conjunto de características que si permitan distinguirlos.

La selección de características, debe hacerse también pensando en no incurrir en un elevado costo computacional, sino que debe hacerse con un conjunto prudente de características, pero que permita asegurar una buena discriminación y no caer en errores.

3.2.5. Clasificación. Es el proceso por el que se asigna una etiqueta a cada uno de los objetos medidos, este proceso de etiquetado, ubica a los objetos medidos en distintas clases, las cuales comparten características similares que las ayudan a diferenciarse unas de otras.

El clasificador compara el valor de la característica calculada de una región detectada con los valores de las características definidas durante el proceso de entrenamiento o de aprendizaje, y selecciona la clase para el objeto o región medido.

En la actualidad existen distintos tipos de clasificadores automáticos, cada uno con metodologías y aplicaciones diferentes, sin embargo los más utilizados son las redes neuronales, los de tipo discriminante, como el de vecino más próximo o mínima distancia; los tipo estadístico como el bayesiano, gaussiano, o MAP (*máximo a posteriori*) [28, 35]

En realidad, las aplicaciones desarrolladas son ligeramente más complejas. En ocasiones el procesamiento y análisis de imágenes requiere de muchas más funciones y métodos que los mencionados anteriormente. Además en muchos casos, se necesitan realizar varios cálculos de características y diversas etapas de clasificación, por lo que sería mucho más fácil dividirlo; mientras que en otras, debido a la gran cantidad de datos a procesar, es necesario realizar procedimientos y análisis en paralelo.

En la figura 11 se presenta el esquema general del sistema de inspección visual automatizado de células sanguíneas.

Esta figura, a su vez, es un diagrama pictórico del montaje implementado para el desarrollo del proyecto; como se puede observar en ella, el frotis se ubica sobre el portaobjetos del microscopio, el cual tiene en su parte superior adaptada la

cámara de estado sólido, encargada de capturar la imagen proveniente del objetivo del microscopio, la imagen capturada es enviada a la tarjeta digitalizadora, la cual convierte la señal proveniente de la cámara en una imagen digital y al mismo tiempo cumple la función de interfaz con el computador. En el computador, se almacena la información, se procesa la imagen, se analiza y se despliega el resultado final al médico o al especialista que lo necesite.

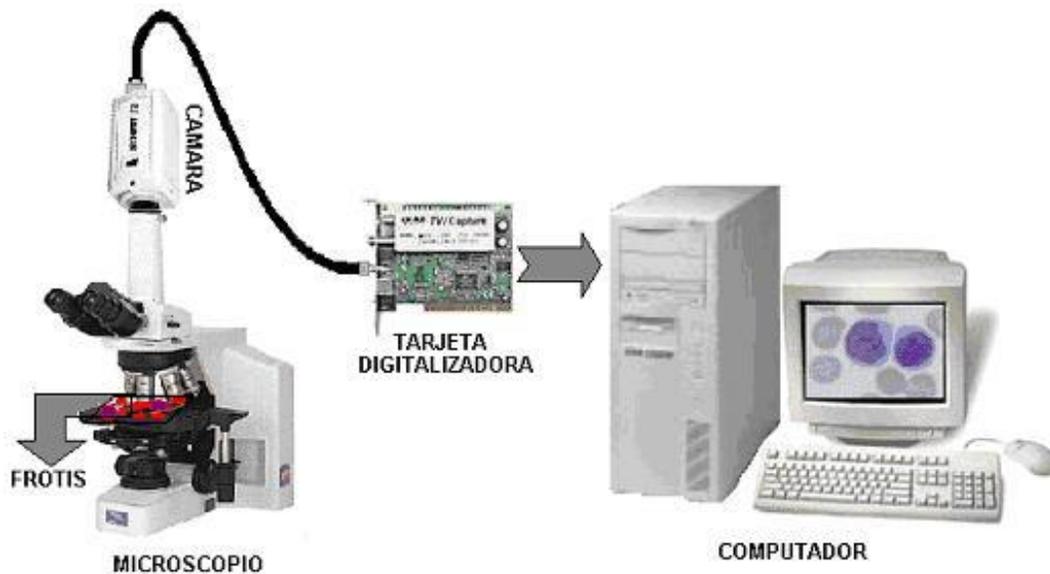


Figura 11. Esquema general del sistema de inspección visual automatizado.

En la figura 12 se muestra la arquitectura general para implementar un sistema de inspección visual automatizado, orientado a la diferenciación y clasificación tanto de los eritrocitos como de los leucocitos.

Como se puede observar, se ha dividido todo el proceso en secciones representadas por cuadros, las cuales corresponden a tareas específicas que se deben desarrollar y que en conjunto brindan la posibilidad al sistema de ejecutar su función principal para la cual ha sido implementado. A continuación se dará una

explicación breve de cada uno de los componentes dentro de la arquitectura del sistema de visión artificial implementado.

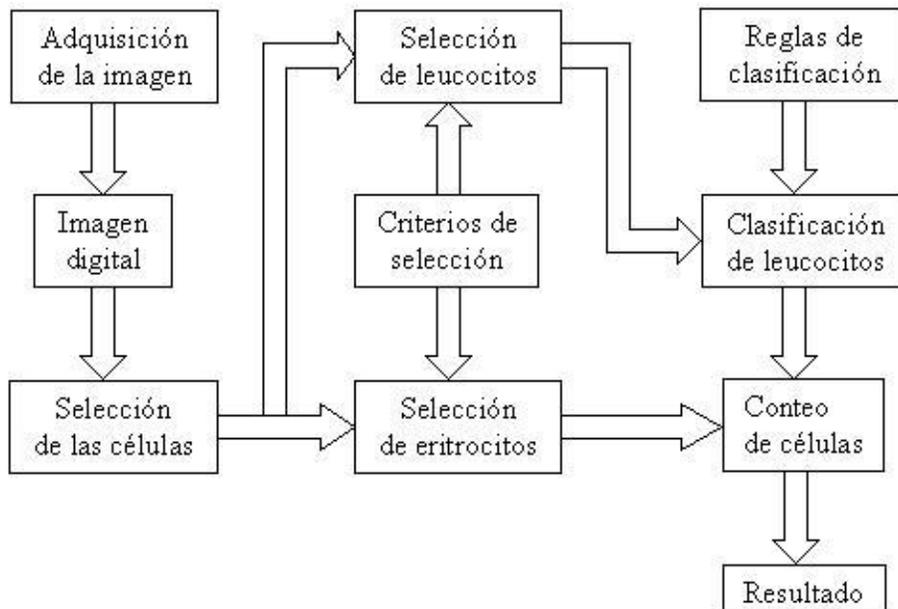


Figura 12. Arquitectura para el sistema de inspección visual automatizada de células sanguíneas.

La **adquisición de la imagen**, o formación de la imagen digital, consiste en capturar una imagen del frotis o placa, ubicado sobre el microscopio, corregir los perfiles de iluminación que inciden sobre la muestra, con ayuda del sistema interno de iluminación con el que cuenta el microscopio, y finalmente trasladar los datos a la unidad de procesamiento. Durante la **selección de las células**, se realiza una detección preliminar de todos los objetos (células) presentes en la imagen, con el fin de realizar una primera segmentación y separar el fondo de los objetos que deseamos analizar.

Una vez separadas las células del fondo, se procede a darles una primera clasificación y se realiza la **selección de leucocitos** y **selección de eritrocitos**, todo esto con la ayuda de unos criterios de selección previamente establecidos. Posteriormente con los leucocitos ya seleccionados y aislados, se procede a clasificarlos, mediante un vector de características, en la fase de **clasificación de leucocitos**. Finalmente, cuando todas las células estén detectadas y clasificadas, se cuentan y se pasa una lista con los datos obtenidos y se elabora el **resultado** final.

Para una revisión completa de los métodos y sistemas de tratamiento y análisis de imágenes revisar Castleman [28] y González [29]; para visión artificial De la Escalera [17] y Nalwa [19]. Son también de gran importancia y sumamente útiles las revistas especializadas, las cuales presentan las últimas innovaciones y tendencias que se desarrollan del tema, algunas de ellas son: *Image and Vision Computing*, *Computers and Industrial Engineering*, *Optical Engineering*, *Pattern Recognition*, *Pattern Recognition Letters*, *Computer Vision and Understanding* y *Photonics Spectra*.

3.3. SISTEMAS DE INSPECCIÓN AUTOMATIZADA DE CELULAS

Los sistemas de inspección automatizada basados en información visual son planteados y desarrollados principalmente para suplir necesidades presentes en las diversas aplicaciones mecánicas y electrónicas que se puedan presentar, su introducción en otros campos diferentes a estos, se encuentra muy restringida por la necesidad de operar en ambientes no controlados y por la inexactitud en la definición clara, objetiva y precisa de la tarea de inspección[36]. A pesar de la gran demanda que existe en el mundo entero, por el análisis de los extendidos de células sanguíneas, en realidad son muy pocos los esfuerzos que han sido orientados hacia la automatización de este importante problema[37].

En este sentido, la factibilidad de la inspección automática de frotis de sangre periférica por medio de técnicas de visión artificial aún no ha sido investigada en profundidad. De hecho, en este caso, el diseño de los sistemas de visión es más difícil de lo normal, ya que por lo general, las células tanto sanas varían mucho de una a otra no sólo en su forma, sino también en su tamaño o color. Además si el sistema de inspección va a ser usado para fines patológicos, debe tenerse presente también el hecho de que las células enfermas, anómalas o anormales se distribuyen como objetos irregulares, con una forma, distribución, color y tamaño aleatorios, por lo que se obtienen imágenes que no se pueden tratar con la ayuda de técnicas tradicionales, como la umbralización, operadores morfológicos clásicos, modelamiento rígido, etc.[36].

Sin embargo, se han presentado algunas aproximaciones iniciales con algunos sistemas comerciales y experimentales de inspección visual automatizada de células[37-40]. Estos sistemas han logrado alcanzar un éxito relativamente óptimo, teniendo en cuenta las especificaciones con las que fueron desarrollados inicialmente. La gran mayoría de los sistemas que han sido desarrollados, funcionan solo para la clasificación de leucocitos, algunos se desempeñan muy bien bajo tipos específicos de anomalías y unos muy pocos funcionan para los eritrocitos.

Pagani et al[9], desarrollaron un clasificador automático de glóbulos blancos sanos; en este sistema, la segmentación es llevada a cabo mediante procedimientos de saturación y un clasificador Bayesiano es el responsable de la categorización de las células. Sinha et al[41] usaron un algoritmo de segmentación de leucocitos llamado EM por sus siglas en inglés (*Expectation Maximization*). Katz [42] sugiere realizar una extracción de características a una región de interés que contiene al leucocito segmentado mediante técnicas de detección de bordes usando el operador de *Canny*. Para la clasificación, evalúa varios tipos de clasificadores como las redes neuronales, WEKA, instancia lbk, bayesianos entre

otros, pero llega a la conclusión que la red neuronal es la más efectiva en el proceso de clasificación.

Otros trabajos desarrollados se enfocan directamente en algunas enfermedades o anomalías específicas, tal es el caso del trabajo de Markiewicz et al [43] que desarrollaron un método de detección automática de leucemia mieloide usando imágenes de médula ósea, aplicando la transformada *watershed* y análisis de características como concavidades, simetrías, áreas, densidad y texturas. Foran et al [44] se ocuparon en el proceso de discriminación de algunas anomalías entre ellas, linfoma de las células manto que por lo general se puede confundir con una leucemia linfocítica crónica o linfoma de célula central folicular. Para ello emplearon análisis de patrones como áreas, color, forma, textura y coeficientes de Fourier. Pinzón et al [45] trabajaron sobre la problemática asociada a la malaria y obtuvieron un sistema que detecta la parasitemia y produce una medida de la cantidad inicial de eritrocitos infectados por trofozoitos (parásitos) jóvenes; empleando para ello las transformadas de Hough y Watershed.

Como se puede observar, a pesar de que se han realizado varios trabajos sobre esta temática, no se ha logrado desarrollar un sistema completo que opere no solo sobre los leucocitos sino también sobre los eritrocitos y que opere tanto en las células sanas como en las enfermas; tal y como **sí se presenta** en este trabajo de grado.

4. METODOLOGÍA Y MATERIALES DE DESARROLLO

En la actualidad no existen guías o metodologías de desarrollo que describan paso a paso el proceso de articulación de un método de clasificación o de inspección visual automatizada. Debido a la falta de conocimiento laboral sobre la metodología de desarrollo de estos sistemas de inspección, es mucho más fácil, práctico y viable dejarse guiar por sistemas cuya eficacia y rendimiento ya han sido comprobados con anterioridad. Sin embargo, existen factores que impiden o limitan el desarrollo normal de estos sistemas, principalmente debido a la falta de estudios completos y formales sobre esta área. Por lo general las limitaciones que se presentan a la hora de realizar estos estudios son debidas a factores de tipo político, como lo es el secreto industrial, la protección de metodologías de desarrollo y la reglamentación en las publicaciones científicas.

El propósito principal en el desarrollo del sistema de inspección presentado en este documento es encontrar un método simple, efectivo y confiable para la clasificación de células sanguíneas basado en su forma, tamaño, color y estructura nuclear. En esta sección se describen los detalles del método desarrollado y el análisis de desempeño correspondiente. La parte inicial trata sobre los aspectos generales del sistema implementado, o visión de bajo nivel como se le denomina. Se presenta el ambiente software con el que se elaboró el sistema, junto con las herramientas hardware y los materiales empleados en el desarrollo del proyecto. A continuación se mostrará lo concerniente a la extracción de características o visión de medio nivel. Posteriormente se dará la presentación del proceso de clasificación y evaluación final o visión de alto nivel como se le conoce. El capítulo concluye con lo referente a los resultados obtenidos y su correspondiente discusión.

4.1 VISION DE BAJO NIVEL. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SISTEMA

En las secciones siguientes se presenta una descripción detallada tanto de los componentes como del funcionamiento generalizado del método de inspección automatizado de células que se diseña sobre la idea del concepto del sistema de clasificación propuesto en la figura 8 del capítulo 3. La secuencia del método propuesto para la inspección visual del color, tamaño, forma y composición del núcleo de las células, basada en el diagrama propuesto en la figura 10 (sección 3.2), es presentada. En las secciones subsiguientes se describen los pasos detallados de la metodología de desarrollo del proyecto.

4.1.1. Materiales y equipos disponibles. En esta sección se describe detalladamente como se obtuvieron las muestras los frotis en sangre periférica para el desarrollo del método de inspección. Luego se especifican los componentes del equipo de visión, el microscopio, y demás, junto con las especificaciones y parámetros adecuados para la aplicación, también se menciona brevemente el software empleado en el desarrollo del método para la inspección de células sanguíneas.

4.1.1.1. Recolección de las muestras. Para el desarrollo del proyecto se utilizaron las muestras de los pacientes recibidos en el laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca, ubicado en el Hospital Universitario San José. Los extendidos o frotis correspondieron únicamente a muestras extraídas de sangre periférica, no se usaron en este proyecto muestras provenientes de médula ósea. La tinción de las extensiones sanguíneas con colorantes policromáticos permite la identificación de los diversos tipos celulares presentes en la sangre. Los colorantes policromáticos son mezcla de azul de metileno alterado por calentamiento en solución de $NaHCO_3$, o en bicromato ácido y eosina. Los reactivos más comúnmente utilizados son los de *Giemsa* y el de *Wright*, este

último fue el empleado para la coloración de los extendidos. Las extensiones teñidas de manera conveniente presentan aproximadamente una tonalidad rosada; al microscopio, los hematíes son de color rosáceo. En algunas extensiones los hematíes pueden ser azules, esto puede ser debido a una tinción demasiado prolongada, lavado inadecuado o colorante o líquido diluyente excesivamente alcalinos. Otras extensiones muestran enrojecimiento excesivo de los hematíes y escasa tinción de los núcleos, que es debido a una tinción inadecuada, lavado excesivo, o colorante o líquido diluyente excesivamente ácidos[4,8].

Hay que recordar que, cuando se realiza una extensión sanguínea, se produce un traumatismo mecánico de las células durante dicho proceso. Además, las células se aplanan sobre la lámina y en ocasiones se producen artefactos y a la hora de efectuar la valoración hay que tener bien presente este hecho. Los extendidos deben ser observados con el aceite de inmersión para poder apreciar muy bien los detalles de las células [8].

4.1.1.2. Equipo de visión. El equipo utilizado para la toma de imágenes consta de una cámara de vídeo MOS (por sus siglas en inglés *Metal Oxide Semiconductor*) a color que envía una señal de vídeo YC (siglas en inglés de Luminancia y Color) a una tarjeta de adquisición de imágenes, donde se digitaliza, obteniéndose una imagen RGB lista para el procesamiento.

La cámara a color utilizada es de marca Javelín, modelo JE3362 con un sensor de 1/3" pulgada, la sensibilidad es buena por lo que puede operar hasta con 1.1 lux de iluminación. Viene equipada con un sistema de balance automático del blanco, la señal de salida de video de la cámara es de tipo NTSC (por sus siglas en inglés, *National Television Standards Committee*). La cámara se puede conectar a la red eléctrica mediante un adaptador que genere 12 voltios[46].

La tarjeta digitalizadora es una tarjeta comercial de TV. para computador de la casa Zoltrix serie Wonder Pro, consiste en un *framegrabber* que captura señales análogas monocromas o a color. Se conecta al bus PCI del computador. Decodifica señales de diferentes tipos de codificación, que incluyen CVBS y YC sobre NTSC o PAL (por sus siglas en inglés *Phase Alternate Line*) para video a color y RS170 y CCIR (Comité Internacional de la Radio) para video de intensidad. Al digitalizarlas las convierte en RGB 8:8:8, YUV 4:2:2 o YUV 4:1:1 La velocidad de adquisición puede llegar a ser de hasta 60 imágenes por segundo.

4.1.1.3. Microscopio. El microscopio que se utilizó para el desarrollo del proyecto fué un Nikon Microphot, con capacidad para desarrollar microscopía de campo claro, campo oscuro, DIC, contraste de fases y fluorescencia. El sistema de iluminación es controlado mediante una perilla de control y un despliegue numérico que indica el valor de la intensidad de la luz empleada. El microscopio cuenta un tambor de objetivos variables y se pueden montar objetivos de 10x, 20x, 40x y 100x. Además cuenta con un doble sistema de aumento ubicado después de la lente de proyección (figura 3) con valores de 1x, 1.25x, 1.5x y 2x, con lo que se pueden alcanzar aumentos de hasta 200x.

Sin embargo para el desarrollo del sistema de inspección visual se trabajó con imágenes producidas con un aumento total de 40x. El microscopio también cuenta en su parte lateral inferior con un sistema de filtros que permiten una mejor definición de la imagen. El microscopio posee dos ruedas de enfoque ubicadas a cada lado del mismo, el cual permite realizar un enfoque muy suave y bastante definido. En la parte superior del microscopio, se encuentra el sistema de adaptación de la cámara para la toma de imágenes, al cual se le puede acoplar una cámara de fotografía o una de video[15].

4.1.1.4. Software. Para conseguir un desarrollo software apropiado para cumplir los requerimientos del proyecto, el trabajo se dividió en dos partes. La primera consiste en una etapa de prueba, donde se experimentaría con una serie de

librerías y paquetes especializados de procesamiento digital de imágenes, con el fin de encontrar cuales son los algoritmos y procedimientos de tratamiento digital de imágenes más apropiados para lograr un excelente desempeño del sistema de inspección automatizado.

Después de encontrar los algoritmos apropiados para la ejecución del proyecto, se procedió a generar o “migrar” estos algoritmos en un paquete software de libre distribución, con el objetivo de generar una aplicación de libre uso y que pudiera implementarse en el laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca sin preocupaciones de licencias.

Entre las librerías y paquetes especializados que se emplearon se encuentran el *IMAQ Vision* para *Labview* y el *toolbox* de procesamiento de imágenes de *Matlab*, pero principalmente se presenta el ambiente de procesamiento de imágenes QWin/QUIPS, ya que fue la plataforma básica de desarrollo durante las primeras etapas de solución de este proyecto.

El ambiente de procesamiento y análisis de imágenes QWin/QUIPS es una aplicación sofisticada desarrollada por *Leica Microsystems*. Funciona bajo el ambiente de los sistemas operativos *Microsoft® Windows™*. Este paquete de desarrollo funciona en una estación de procesamiento de imágenes *Leica Q550IW*. Provee una interfaz gráfica de usuario bastante amigable y de fácil acceso a una gran cantidad de operadores de procesamiento y cálculo de imágenes [47,48].

La figura 13 muestra la interfaz típica de QWin. En ella se puede observar la barra de título que presenta la información de la imagen junto con los parámetros para la calibración de la imagen. Debajo del título se encuentra la barra de menús, desde los cuales se puede acceder a todas los operadores y funciones que brinda la aplicación. Aunque al lado derecho se pueden observar dos recuadros en los que

se encuentran las funciones de uso más común para la adquisición, procesamiento, análisis y despliegue de imágenes.

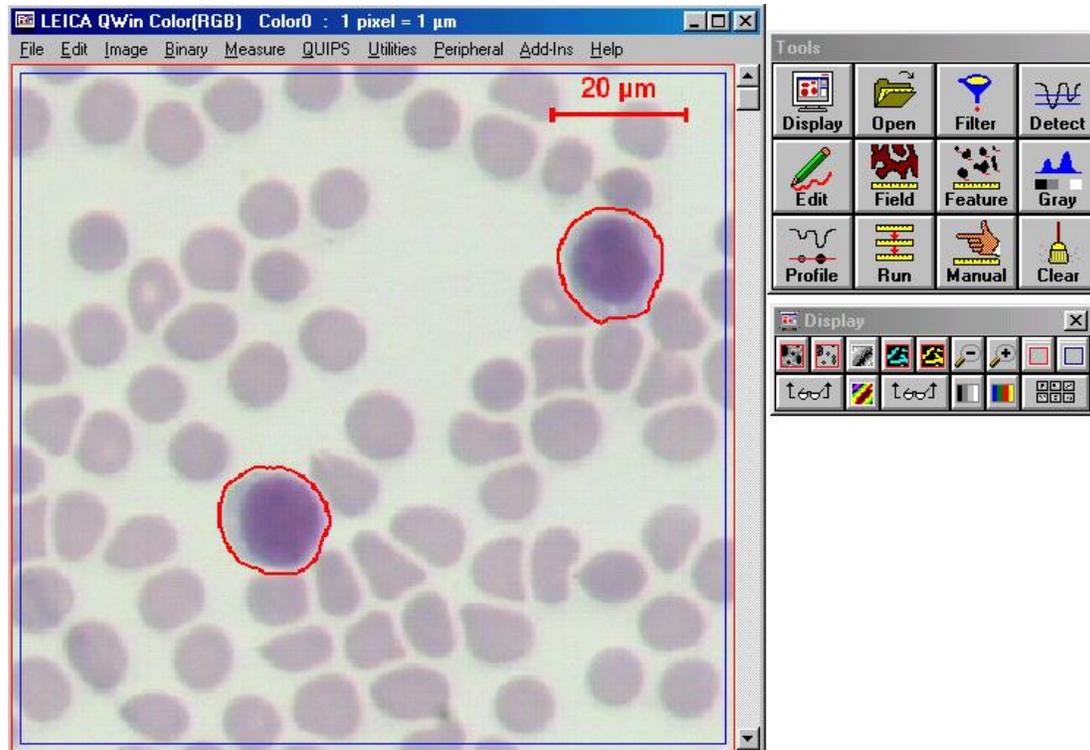


Figura 13. Ejemplo de la interfaz gráfica de Qwin

Además, una de las principales ventajas que presenta esta aplicación es la inclusión de una herramienta denominada QUIPS (*Quantitative Interactive Programming System*), que permite la facilidad de generar una secuencia de operaciones e instrucciones de análisis de imágenes, las cuales se conocen como rutinas y permiten ser empleadas con posterioridad o revisarlas y hacer correcciones sobre la misma[49,50].

Desde el punto de vista del diseño de algoritmo, una rutina es más ventajosa que un programa convencional. La principal diferencia radica en que no es necesario crear un programa escribiendo las instrucciones, sino que se crea interactivamente usando las facilidades de los diálogos y los menús, además presenta la ventaja de

poder observar directamente el resultado de la instrucción empleada y ver si funciona o no de acuerdo a los requerimientos del sistema.

La figura 14, presenta la interfaz gráfica de QUIPS, en ella se puede observar las líneas de comandos e instrucciones que se realizan sobre la imagen desplegada en la interfaz de QWin. En este caso se presenta una parte de la rutina empleada para detectar los leucocitos.

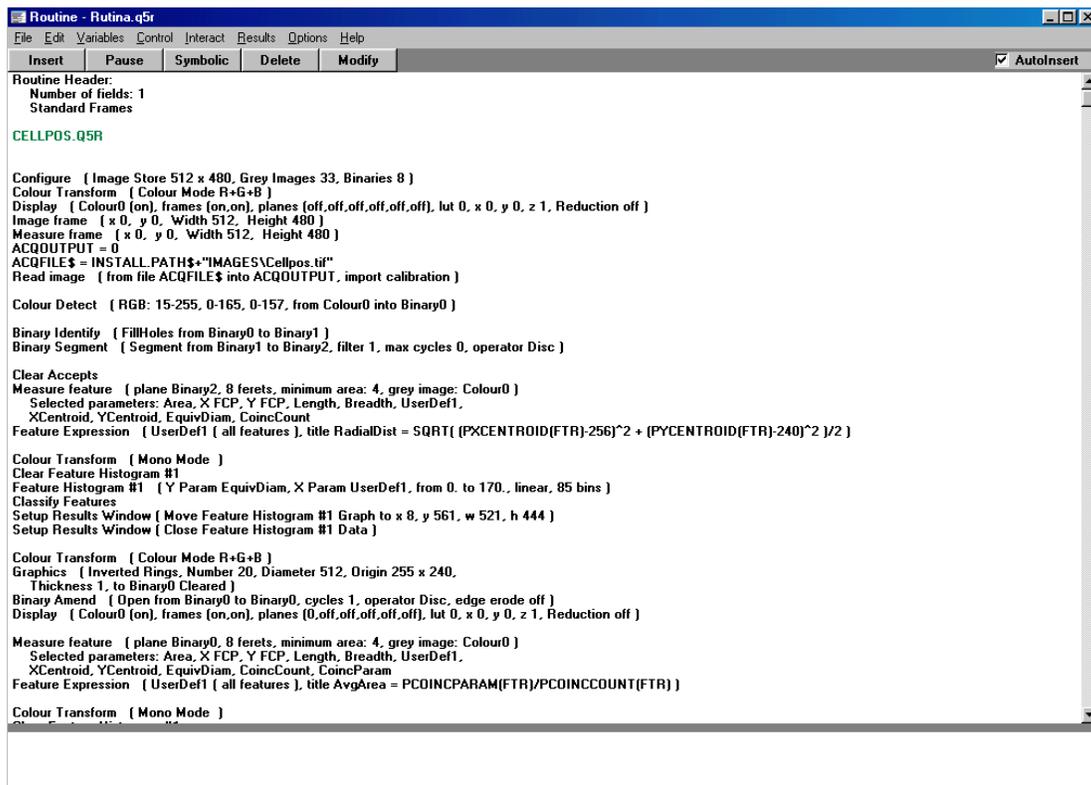


Figura 14. Ejemplo de la interfaz gráfica de QUIPS

El paquete software de libre distribución empleado en la parte final del proyecto fue **Java** de *Sun Microsystems*. Junto con el paquete básico de desarrollo se trabajó con dos extensiones o “apis” como se le conocen formalmente llamadas **JAI** y **JMF**. La primera contiene las clases y librerías necesarias para realizar aplicaciones con imágenes, pero no contiene ninguna clase o librería que realice

funciones de procesamiento digital de imágenes, por lo cual se tuvo la necesidad de desarrollar también las clases básicas de procesamiento digital de imágenes.

El segundo paquete contiene las herramientas necesarias para trabajar con dispositivos multimedia y de captura de imagen, con esta librería se diseñó e implementó las clases encargadas de realizar la adquisición de las imágenes provenientes de la fuente de video generada por la cámara.

4.1.2. Adquisición de las imágenes. Las imágenes adquiridas y empleadas en este trabajo son a color, con una resolución de 640 x 480, que es la de la cámara. En cuanto a la definición, cada canal posee una profundidad de 256 niveles de gris, que se pueden almacenar en 8 bits por píxel. Como se trata de una imagen RGB a color, se deben manipular 3 canales por píxel, con lo que la imagen se almacena en un arreglo de 24 bits por píxel. Cada imagen se almacena en formato JPG o BMP.

Para la adquisición de las imágenes las placas o extendidos fueron colocados manualmente sobre el portaobjetos del microscopio y asegurándose de que la luz proveniente del condensador iluminara de una manera uniforme el extendido. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento total de 40x, de modo que se pudiera lograr un balance entre el número de células dentro de la imagen o campo de visión y la definición de cada una de las células; es decir si se trabaja con aumentos mayores, se conseguía una mayor definición en cuanto a las características propias de cada célula pero, no se lograba un amplio campo de visión y se necesitaría procesar muchas más imágenes, haciendo más lento y menos robusto el sistema; por el contrario si el aumento era muy pequeño, el campo de visión aumentaba pero no se lograba obtener una buena definición de cada una de las células.

Para la toma de las imágenes se procedió a emplear el mismo sistema de rastreo de células empleados por lo operarios humanos, es decir se toman imágenes de la placa siguiendo siempre un camino predeterminado y asegurándose de no repetir en el mismo lugar. En la figura 15 se puede observar el camino mas empleado por los especialistas para el rastreo y conteo de células en los extendidos con tinción.

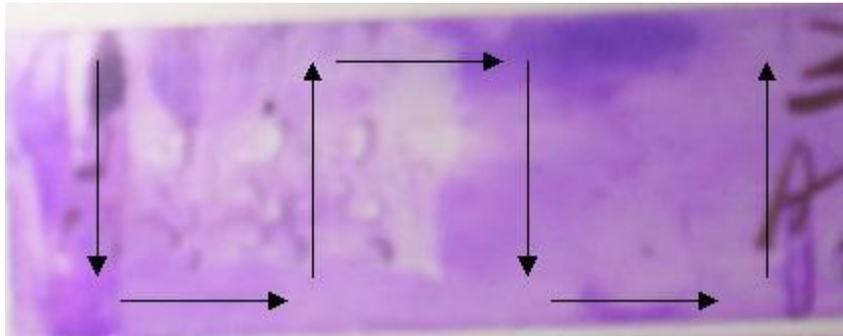


Figura 15. Frotis de sangre periférica con tinción de *Wright*. Las flechas indican el camino a seguir para adquirir las imágenes.

4.2 VISIÓN DE NIVEL INTERMEDIO. SEGMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE CARACTERÍSTICAS

Durante este parte del proyecto, lo que se pretende es seleccionar cada una de las células que conforman la imagen sin interesarnos todavía que clase de célula es y aislarlas del fondo. La ventaja de este procedimiento es que se pueden analizar completamente y por separado cada una de las células que conforman la imagen y así, poder medir sus características o propiedades que ayudaran posteriormente a una correcta clasificación.

4.2.1. Segmentación. Una de las etapas críticas y principales dentro del desarrollo del proyecto consiste en la segmentación de la imagen. Durante esta etapa, la imagen es dividida en regiones que son ocupadas por los objetos de

interés o de estudio y son separadas del fondo, que es como se le conoce a la región ocupada por todo aquello que no nos interesa analizar.

El nivel al que se realiza esta subdivisión depende de la aplicación en particular, es decir, la segmentación terminará cuando se hayan detectado todos los objetos presentes en la imagen y que sean de interés para la aplicación. En la mayor parte de los casos, una buena segmentación provocará una solución correcta, por lo que, se debe poner todo el esfuerzo posible en el desarrollo de esta etapa. La segmentación va a dar lugar en ultima instancia al éxito o fallo final del proceso de análisis.

Sin embargo, las regiones no siempre son claramente definidas; a veces es más apropiado mirarlas como subconjuntos difusos de la imagen. Es obvio que las regiones son importantes para la interpretación de las imágenes pues pueden corresponder a objetos en la escena. Una imagen puede contener varios objetos y además cada objeto puede contener varias regiones que correspondan a partes del mismo. Para poder realizar una interpretación correcta de una imagen, esta debe ser dividida en regiones que contengan objetos o al menos partes de ellos[51].

Por lo general, los algoritmos de segmentación de imagen se basan en dos propiedades básicas de los niveles de gris de la imagen, las discontinuidades y las similitudes. Dentro de la primera categoría se intenta dividir la imagen buscando cambios bruscos en el nivel de gris. Las áreas de interés en esta categoría son la detección de puntos, de líneas y de bordes en la imagen. Las áreas dentro de la segunda categoría están basadas en las técnicas de umbral, división, fusión y crecimiento de regiones[52].

Para el desarrollo del proyecto se decidió en primera instancia utilizar las técnicas de umbralización. Sin embargo, debido a que esta técnica es altamente

dependiente del sistema de iluminación, y, dado que el sistema debe ser manipulado por distintos operarios, donde cada uno de ellos acomoda la iluminación del microscopio de acuerdo a sus propias capacidades visuales, es prácticamente imposible realizar un control sobre la iluminación; por lo tanto, se decide emplear procedimientos de segmentación que fueran independientes de la iluminación. Después de realizar varios procesos de ensayo y error, tratando de encontrar el método más apropiado de segmentación, se llegó a la conclusión de que el más adecuado es el proceso de agrupación o *clustering* basado en el algoritmo de *K-Means*.

4.2.1.1. Algoritmo K-Means. Este algoritmo, presentado originalmente por McQueen en 1967, permite aglomerar o agrupar objetos basados en características o atributos en un número k de grupos, siendo k un número entero positivo[53]. En general este algoritmo se puede expresar de la siguiente manera[54]:

Partiendo de la matriz de datos $X_{N \times P}$, la función que se pretende minimizar en el proceso de clasificación es la suma total de cuadrados de los errores T , cuya expresión viene dada por:

$$T_k = \sum_{k=1}^K E_{(k)}^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N I[O_i \in C_k] e_{i(k)}^2 \quad (1)$$

Siendo $E_{(k)}^2$ la suma de cuadrados de los errores para el grupo C_k . $I[O_i \in C_k]$ será igual a 1 si el objeto O_i ha sido asignado a C_k o de lo contrario, si O_i no ha sido asignado a C_k , $I[O_i \in C_k]$ será igual a 0. $e_{i(k)}^2$ es la distancia euclidiana al cuadrado de cada objeto al centroide de C_k y corresponde a:

$$e_{i(k)}^2 = \sum_{j=1}^P (x_{ij} - \bar{x}_{(k)j})^2 \quad (2)$$

donde:

$$\bar{x}_{(k)j} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^N I[O_i \in C_k] x_{ij} \quad (3)$$

$$n_k = \sum_{i=1}^N I[O_i \in C_k] \quad (4)$$

En la práctica, dada una partición inicial en k grupos, la técnica se basa en el siguiente algoritmo iterativo:

1. Seleccionar el número de *clusters* K .
2. Cálculo de las posiciones de los centroides $\bar{x}_{(k)}$ de los K *clusters*.
3. Para cada objeto, cálculo de su distancia a los K centroides, $e_{i(k)}^2$.
4. Asignar cada objeto al cluster cuyo centroide es el más próximo.
5. Determinar las fronteras de cada *cluster*.
6. Repetir los pasos 4 y 5 hasta que las fronteras de los *clusters* no cambien significativamente.

A continuación se explicaran brevemente cada uno de los pasos del algoritmo. En la figura 16 se presenta un ejemplo gráfico que ilustra cada uno de los pasos del algoritmo.

Inicialmente se tiene un conjunto de datos aleatorios y se creen que están organizados en algunos subgrupos (figura 16a). Partiendo de una selección inicial de k centroides (Figura 16b), cada uno de los elementos de la colección se asigna al grupo con el centroide más cercano (Figura 16c). A continuación, se calcula la posición del centroide de cada uno de los grupos resultantes.

En los primeros pasos se obtienen las mayores diferencias entre los centroides originales y los calculados luego de las reasignaciones, estos pasos se repiten hasta que los k centroides no cambian luego de una iteración, esto es equivalente a decir que el valor de la función utilizada como criterio de optimización no varía.

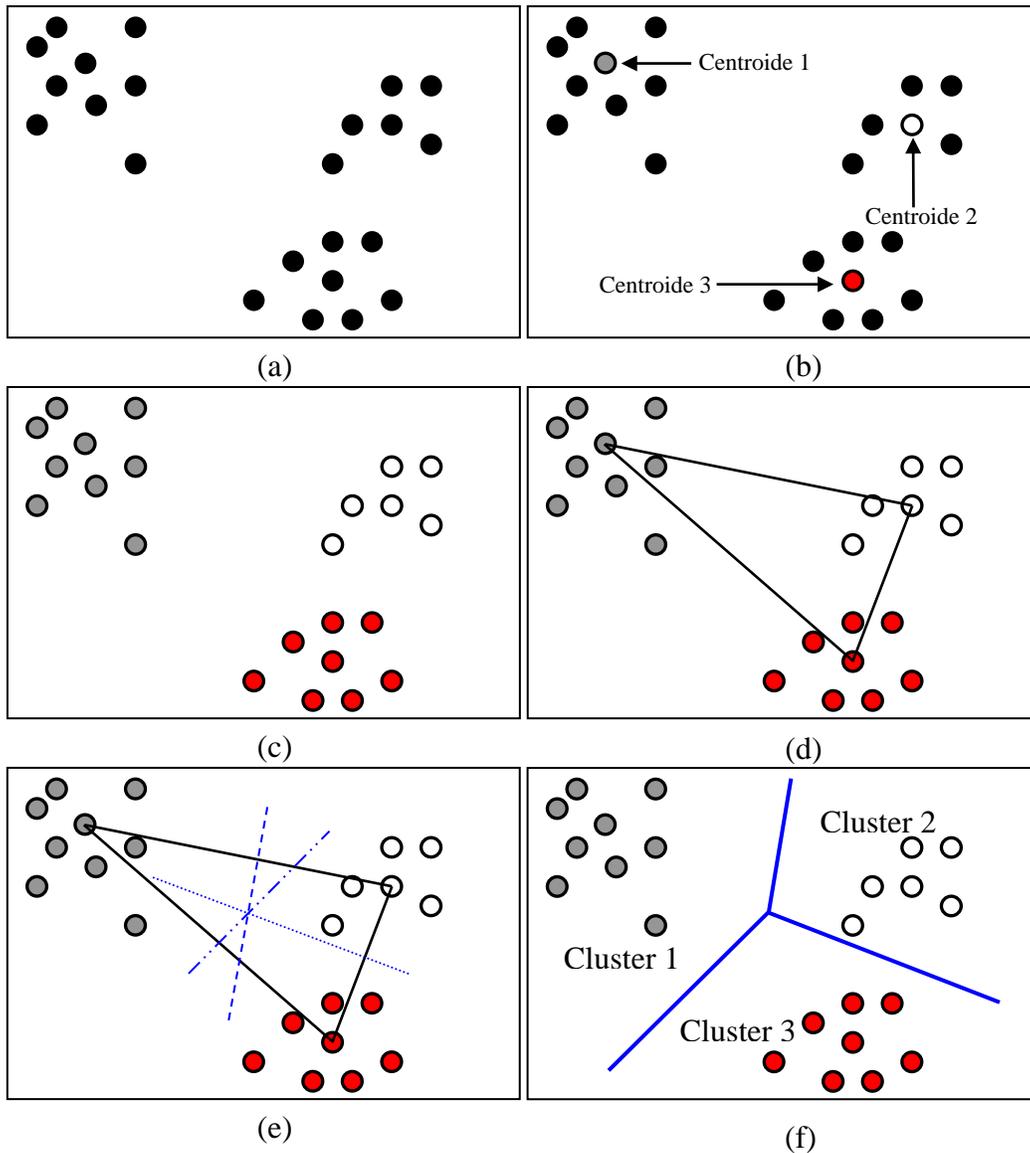


Figura 16. Ejemplo gráfico que muestra cada uno de los pasos del algoritmo K-means para segmentar grupos en una imagen.

Una vez elegido los centroides, se mide la distancia de cada uno de los objetos al centroide más cercano y se asigna el registro a ese *cluster*. Posteriormente se procede al calculo de las fronteras de cada uno de los *clusters*, para ello se entrelazan cada uno de los centroides tal y como se ve en la figura 16d.

Después de haber obtenido cada uno de los grupos se deben calcular las fronteras de cada uno de los cluster. Para ello trazamos una recta perpendicular a cada una de las rectas que definen las distancias entre los centroides (Figura 16e), con las rectas perpendiculares ya trazadas, se calcula la frontera de cada uno de los cluster, teniendo en cuenta las intersecciones de las rectas perpendiculares a las rectas equidistantes de cada uno de los centroides. Con esto se puede definir individualmente la frontera de cada uno de los grupos. El resultado se puede ver en la figura 16f.

Para el caso del desarrollo de este proyecto, los píxeles de las imágenes a analizar pertenecen a una sola clase, ya que cada uno de ellos corresponde a una y sólo una célula, es imposible que un píxel de una imagen pertenezca a más de una célula.

En la figura 17 se presenta una imagen obtenida con el sistema, en ella se pueden apreciar claramente dos leucocitos ubicados a cada lado de la imagen, el núcleo de cada linfocito también se puede apreciar con una tonalidad morada. Esta imagen será segmentada usando el algoritmo *K-Means* pero empleando diferentes valores del parámetro *k*.

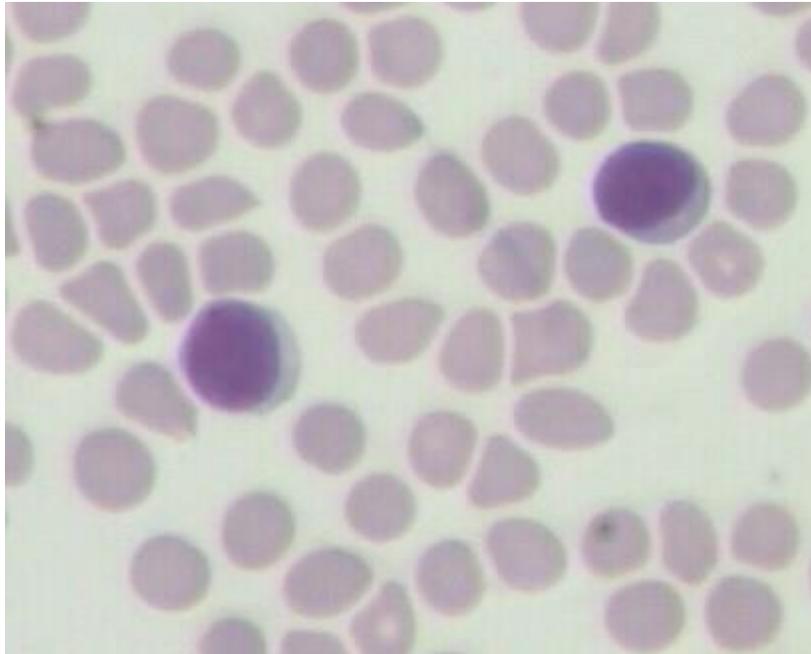


Figura 17 Imagen típica adquirida con el sistema implementado

En la figura 18 podemos observar el resultado del proceso de segmentación de la imagen anterior mediante el algoritmo *K-Means* usando un valor de $k = 2$. Como podemos observar en la imagen, dos grandes grupos aparecen resaltados, el primero que corresponde a todas las células que se encuentran en la imagen y el segunda que lo conforma la zona correspondiente al fondo, obviamente puesto que el valor inicial de k correspondió a 2, solamente se generarían el mismo número de grupos dentro de la imagen y todas las células se encuentran dentro de uno solo.

Aunque todas las células han sido segmentadas del fondo, este valor no es el más apropiado, ya que impide la correcta segmentación de los núcleos de los leucocitos, en otras palabras agrupa a toda la célula en un solo conjunto y la información correspondiente al núcleo celular, la cual es de valiosa importancia en etapas posteriores para realizar una excelente clasificación desaparece.

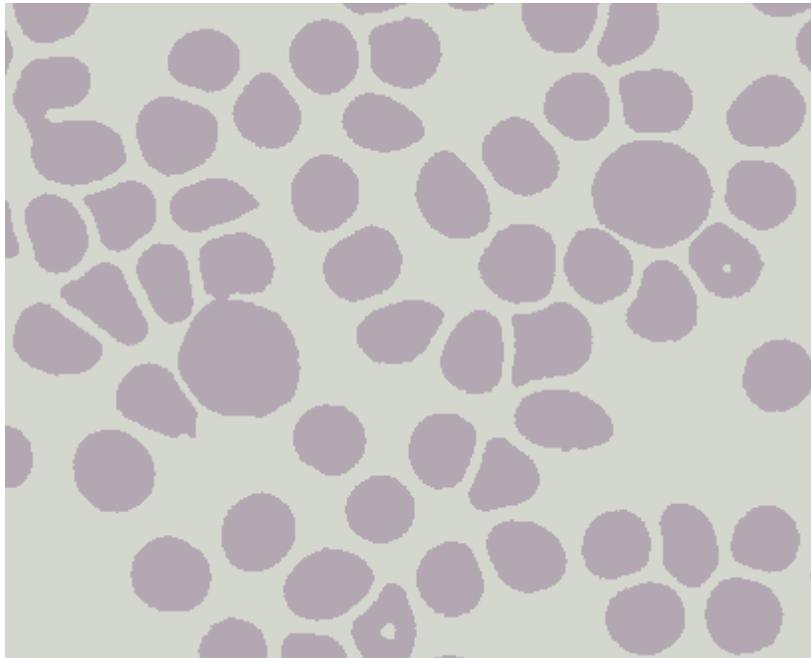


Figura 18. Resultado de la segmentación usando un valor de $K=2$.

En la imagen de la figura 19, se muestra el resultado de segmentar la imagen de la figura 17 empleando el mismo algoritmo, pero esta vez con un valor de $k = 3$.

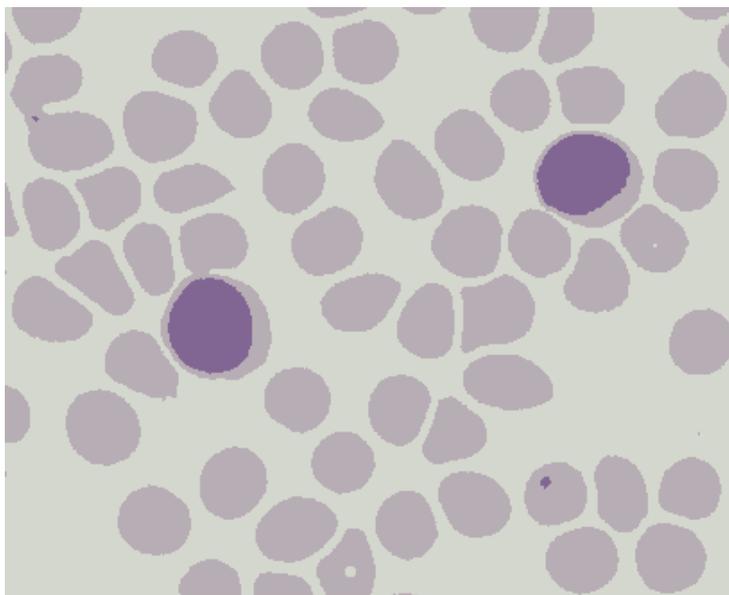


Figura 19. Resultado de la segmentación usando un valor de $k = 3$.

En la imagen anterior se puede notar que los núcleos celulares ya aparecen segmentados y se aprecian unos bordes lisos y bien definidos de las células.

Finalmente, en la figura 20 se muestra el caso de segmentación con un valor de $k=4$.

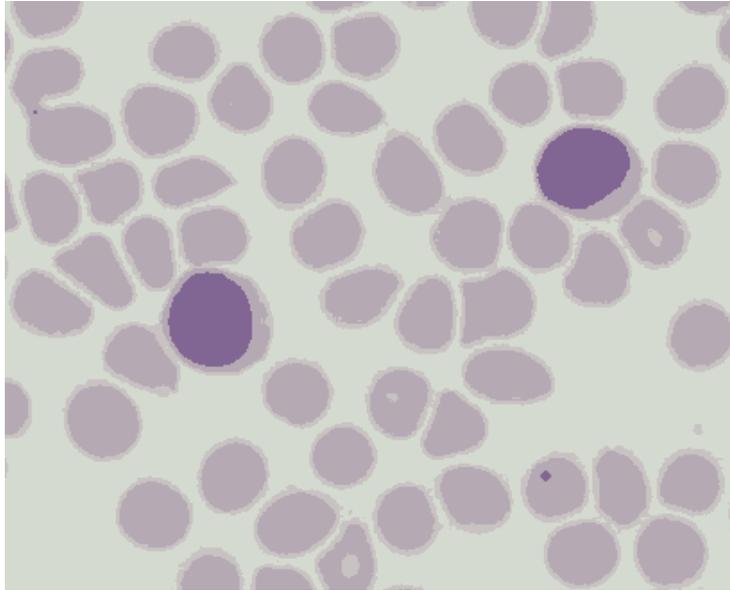


Figura 20. Resultado de la segmentación usando un valor de $k = 4$.

En esta última imagen, a diferencia de la anterior, los bordes no aparecen tan definidos y presentan una especie de halo que los rodea, distorsionando un poco la imagen, además el costo computacional de esta operación es más alta que el de la anterior. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se determina tomar un valor de $k = 3$ dentro del algoritmo y los resultados obtenidos son más que satisfactorios.

4.2.2. Operaciones Morfológicas. En ocasiones, cuando las células están muy próximas entre sí, sucede que a la hora de segmentarlas, se agrupan como si formaran una sola célula; en el ejemplo anterior, en la figura 17 se pueden observar dos casos, el primero sucede entre el leucocito del lado izquierdo y el eritrocito ubicado justo encima de el y el otro caso se puede observar en la parte

superior izquierda de la imagen donde aparecen dos eritrocitos pegados. No obstante, esto no representa mayor problema, ya que existen herramientas de morfología matemática que permiten separarlas sin ocasionar mayores daños o distorsiones a las células.

En primer lugar, la imagen segmentada debe ser umbralizada, posteriormente se aplica un operador para rellenar los pequeños agujeros que queden, este paso es necesario, ya que de lo contrario a la hora de separar las células, aquellas que posean huecos en su interior serán divididas a si mismas. En seguida, se aplica un operador apertura para suavizar los contornos y definir un poco los bordes. Finalmente, se aplica una transformada **watershed**, con el objetivo de poder separar las células.

El concepto de watershed procede del campo de la topografía, en un relieve topográfico, las líneas watershed son las fronteras de separación entre las cuencas de deyección de ríos y lagos. Además, cada cuenca está asociada a un mínimo local de relieve. Se puede dar una definición rigurosa de la transformación watershed utilizando los conceptos de **distancia topográfica** y la teoría de Grafos[58,59]. Este operador lo que busca son “cuellos” o entradas presentes en los aglomerados de manera que den indicación de que dos objetos se han unido mediante este cuello o puente que se ha formado. Para ampliar un poco más acerca de estos operadores se recomienda revisar Facon [60] y González [29].

Después de estos procedimientos se obtiene una imagen binaria, lisa, definida y con cada célula correctamente dividida. En la figura 21, se observa el resultado de realizar estas operaciones sobre la imagen de la figura 19 en ella se observan que las células que anteriormente estaban unidas ahora están completamente separadas. Las agrupaciones que se obtienen finalmente reciben el nombre de *blobs*, y serán estos los objetos a analizar posteriormente.

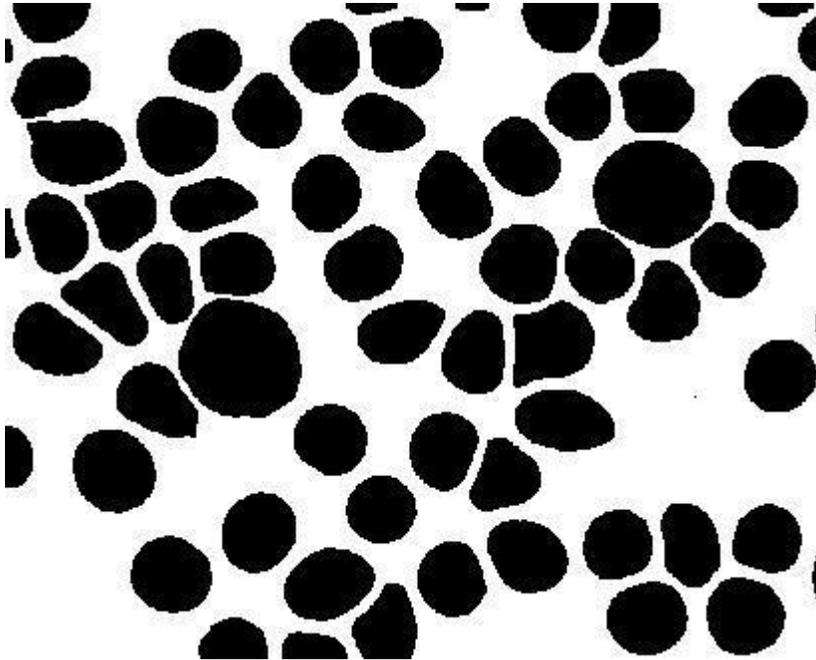


Figura 21. Separación de las células mediante operadores morfológicos

Una vez separados todos los *blobs*, la imagen binaria obtenida sirve como fuente para crear una máscara binaria, la cual será añadida a la imagen de la figura 19 y poder así crear una imagen a color, segmentada y con todas sus células debidamente separadas. La máscara binaria se adiciona a la imagen a color mediante operaciones binarias lógicas. En la figura 22, se presenta el resultado del enmascaramiento entre las imágenes 19 y 21.

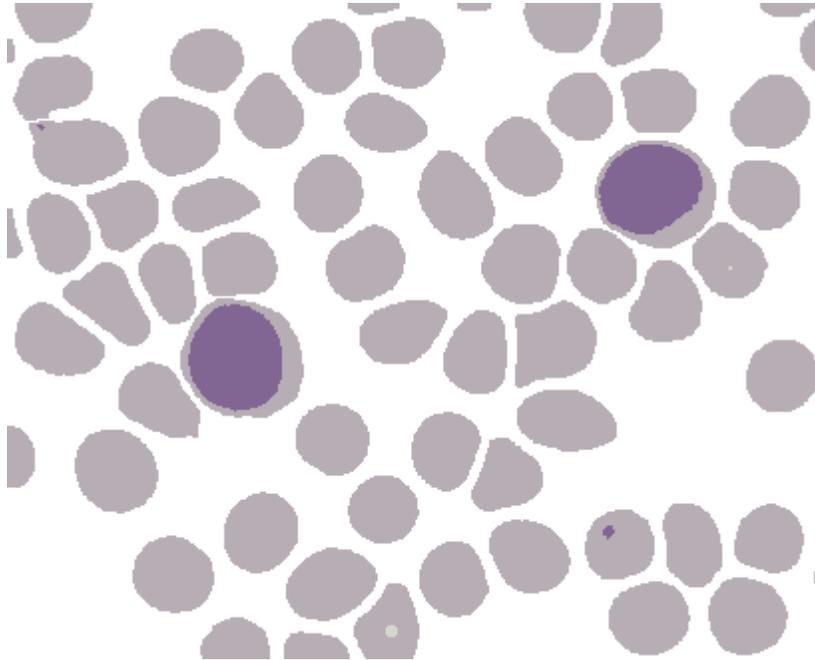


Figura 22. Imagen final segmentada.

4.2.3. Etiquetado. Una vez que los *blobs* han sido separados correctamente debe asignárseles un identificador o etiqueta para hacer referencia a ellos y poder analizarlos individualmente.

El procedimiento consiste en realizar el análisis de conectividad a las regiones segmentadas para encontrar las regiones que pertenecen a los mismos objetos. La conectividad de los píxeles de la imagen de grupos semejantes se analiza con un algoritmo de conectividad 8 el cual examina todas las direcciones alrededor de los píxeles vecinos del píxel que se encuentre bajo análisis.

Como resultado se genera una imagen etiquetada, donde todos y cada uno de los píxeles pertenecientes al mismo *blob* tomarán un mismo valor. Esta labor es desarrollada mediante un operador de morfología matemática denominada etiquetado [60].

4.2.4. Extracción de Características. Una vez los *blobs* hayan sido etiquetados debidamente se procede a realizar las medidas sobre cada uno de ellos y a extraer los descriptores característicos que servirán como datos de alimentación al clasificador automático. Es en esta parte donde se observan las formas propias de las células y se determinan que características son las más apropiadas para realizar la clasificación.

Entre las características más importantes a extraer se encuentran las que tienen que ver con la forma como el área y perímetros y otras que tienen que ver con el color. Sin embargo, en la escogencia de las características se debe tener mucho cuidado de no ir a tomar características redundantes que lo único que hacen es demorar el proceso y no ofrece nueva información.

A continuación se explicará brevemente los tipos de características a analizar y el proceso para elegir cual de ellas deben ser tomadas.

4.2.4.1. Características de forma. Posterior al proceso de etiquetado, se puede recoger y almacenar algún tipo de información concerniente a la forma que presentan los *blobs*. Así, se pueden obtener algunas características que incluyen por ejemplo, áreas, longitudes de los ejes principales, perímetros, ángulos, circularidad o redondez, distancia a los bordes, relaciones de aspecto y los momentos.

4.2.4.2. Características de color. Dado que la segmentación inicial se basa en los parámetros de color y de conectividad que presentan los píxeles de la imagen y puesto que las células presentes en la imagen poseen ciertas tonalidades específicas y propias, la información relativa al color es de vital importancia a la hora de realizar la clasificación.

Las características de color usadas dentro de este trabajo están basadas en los parámetros obtenidos de los histogramas unidimensionales de los canales de color de los sistemas RGB y HSI. Estos parámetros son simples de hallar. A pesar de que se usaron los espacios de color RGB y HSI, se podría haber probado con otros canales sin embargo, de acuerdo a como estos han sido concebidos, pueden ser más adecuados para la medición del color. Cada uno de los *clusters* o grupo presentes en la imagen segmentada presenta un tono único de color en los histogramas unidimensionales, el cual será almacenado dentro de las características y en conjunto con las propiedades de forma complementaran el proceso de clasificación.

En aplicaciones más sencillas o en aquellas donde se cuente con un control total sobre el sistema de iluminación, la información brindada por los histogramas de los sistemas de color RGB y HSI serán suficientes para realizar una segmentación adecuada.

4.2.4.3. Selección de las características. Posterior a la medición de propiedades sobre cada uno de los *blobs* y la respectiva extracción de características, se obtiene por lo general una cantidad enorme de datos de los cuales es muy difícil a simple vista determinar cuales de ellos son importantes y cuales redundantes. Cuando esto se presenta y la cantidad de variables a analizar son muy elevadas, el vector de características conformado tendrá tantas dimensiones que su manipulación se vuelve una tarea demasiado compleja y difícil. Lo que se busca siempre es que la dimensión del vector de características sea lo más pequeño posible, de lo contrario el tiempo y costo computacional serán demasiado altos.

El problema consiste entonces en seleccionar cuales de esas características serán suficientes para resolver el asunto de la clasificación. Lo mas aconsejable es mirar el grado de relación que existan entre las variables, de modo que se puedan hallar aquellas que presentan información redundante y aquellas que no[57].

Cuando dos variables presentan un valor alto de correlación significa que la información que estas presentan son prácticamente la misma y por lo tanto incluirlas en el clasificador no supondría ninguna ventaja. Por lo contrario cuando dos variables muestran un valor bajo de correlación, significa que estas dos variables son importantes y no serían redundantes dentro del clasificador[61].

Al tratar con células como es el caso de este trabajo, las cuales presentan algunas características morfológicas propias como color, tamaño y forma, deben considerarse parámetros como área, redondez, diámetro, perímetro e inclusive el color, pero existen variables que por razones obvias presentan un alto grado de correlación como el área y el perímetro y aún con el diámetro, ya que de una de estas variables se pueden obtener las otras.

Realizando pruebas para hallar el coeficiente de correlación entre las variables, se encontró que mientras el diámetro y el perímetro presentan un coeficiente de 0.907, variables como el área y la redondez apenas alcanzan un coeficiente de 0.018.

En la figura 23, se puede observar la correlación existente entre el diámetro y el perímetro, la casi linealidad de los puntos es prueba del alto grado de correlación.

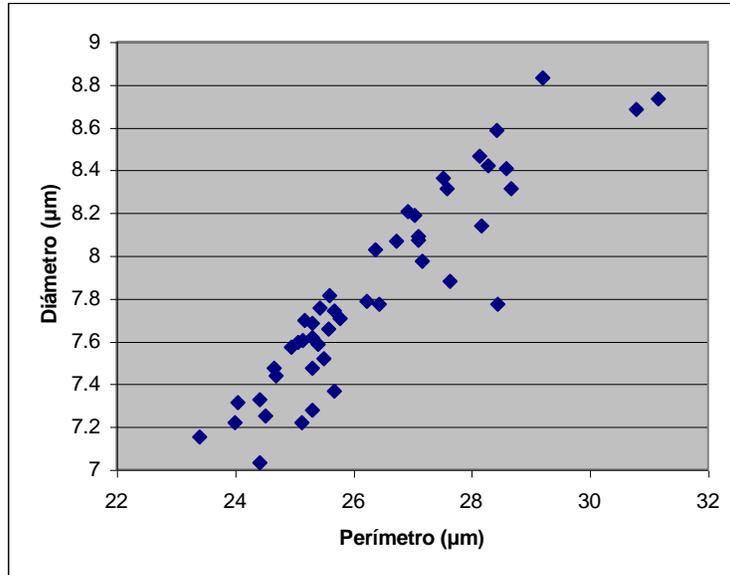


Figura 23. Correlación entre el diámetro y el perímetro.

En la figura 24 se observa la correlación existente entre el área y la redondez, la gran dispersión que presenta la nube de puntos es un gran indicador de que no presentan ningún tipo de patrón definido que pueda expresar a una variable en función de la otra.

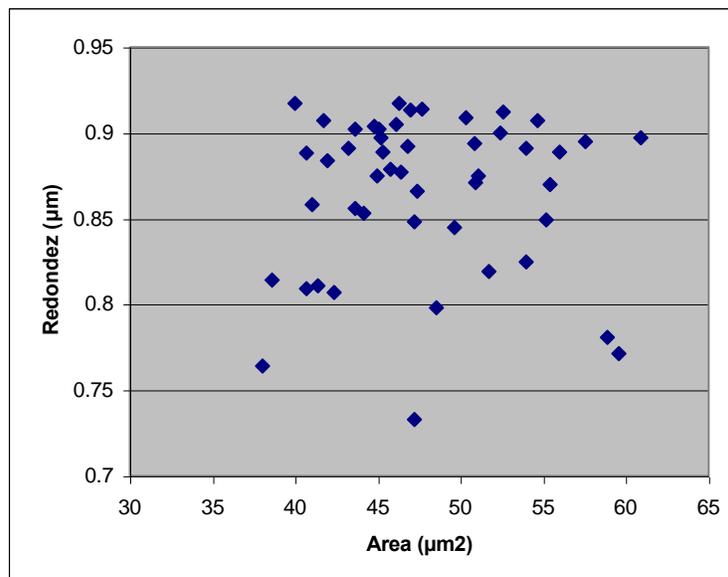


Figura 24. Correlación del área y la redondez.

Además de los parámetros anteriores que podrían considerarse como obligatorios a la hora de clasificar objetos con patrones morfológicos definidos, se han escogidos otros dos no tan obvios por así decirlo. El primero de ellos se denomina diámetro de Feret o longitud calibre, el cual puede ser definido como la distancia más larga entre dos puntos cualquiera a lo largo del borde del objeto seleccionado[47,48]. El segundo parámetro al que se la ha denominado nuclearidad, corresponde al cociente entre el área del núcleo celular y el área del citoplasma; este parámetro se ha diseñado para este trabajo y se ha comprobado que es de gran utilidad a la hora de realizar la clasificación de los leucocitos y para corroborar la presencia del halo característico de los eritrocitos. Ninguno de estos parámetros presentó correlación con los anteriores, por lo que se incluyeron en el clasificador.

Un grave problema que se presenta en ocasiones en la búsqueda adecuada de las características es que se puede especializar tanto el conjunto de características que solamente funcionen para el conjunto de entrenamiento y a la hora de probarlo con elementos desconocidos se presenten resultados mediocres o deficientes. Para evitar esto es recomendable manejar, durante el proceso de entrenamiento resultados encaminados hacia la generalización y no tanto hacia la especialización; es decir no buscar el resultado perfecto y mas bien empezar a trabajar con resultados mas aceptables pero generales.

4.3 VISION DE ALTO NIVEL. RECONOCIMIENTO DE PATRONES Y CLASIFICACION

El reconocimiento de patrones es una habilidad extremadamente desarrollada por los seres humanos y por algunos animales. Dentro de las capacidades del ser humano se encuentran el reconocimiento de rostros, voz, caligrafía e inclusive el estado de animo de las personas. El reconocimiento de patrones incluye unos determinados procedimientos que permiten la debida identificación y clasificación de los objetos en una clase específica. La clasificación es el paso final dentro del

sistema de inspección visual automatizada de células. Es aquí donde se analizan las características medidas y se decide a que clase de célula pertenece el objeto bajo estudio.

4.3.1. Generalidades del clasificador. Una vez que las características han sido seleccionadas y medidas sobre cada uno de los objetos en la imagen, se genera el vector de características $X = [x_1, x_2, x_3, \dots, x_n]$ cuyos elementos corresponden a cada una de las características seleccionadas.

Este vector es el que servirá de alimentación al clasificador el cual debe ser escogido de acuerdo a la información y a los recursos disponibles. Durante esta etapa el clasificador “aprende” a distinguir de entre todas las clases a que clase pertenece el objeto.

Si el entrenamiento del clasificador exige algún tipo de conocimiento *a priori* acerca de la estructura estadística de los patrones a analizar el clasificador será llamado paramétrico. Por otro lado, si el clasificador utiliza un determinado modelo estadístico, ajustándose mediante procesos adaptativos y la asociación entre los patrones se fija en base a similitudes entonces, el clasificador se denomina no paramétrico y la clasificación se realizará de una manera no supervisada, dentro de estos clasificadores encontramos las redes neuronales[62].

Justamente la escogencia del tipo de clasificador a utilizar constituye el problema más importante en el desarrollo del reconocimiento de patrones. Para realizar las funciones de la clasificación en este trabajo se ha determinado que las redes neuronales son las más apropiadas para esta labor, teniendo en cuenta la naturaleza del problema y los requisitos establecidos, además de que presenta la posibilidad de ser ajustada por el usuario.

La superioridad de las redes neuronales en algunos de los casos clásicos de métodos estadísticos, incluyendo el problema de la clasificación, el entrenamiento y la exactitud ha sido demostrada en estudios anteriores. Dentro de las ventajas de las redes neuronales encontramos la no linealidad, la adaptabilidad, la generación de respuestas evidentes, la tolerancia a fallos, la implementabilidad entre otras[42, 63, 64].

4.3.2. Redes Neuronales Artificiales. Las redes neuronales artificiales (ANNs, por sus siglas en inglés) son modelos matemáticos computacionales que emulan algunas de las propiedades observadas en los sistemas neuronales biológicos, están conformadas por un número interconectado de elementos procesantes denominados neuronas.

Estos elementos procesantes se unen mediante conexiones cargadas o “pesadas” análogas a la sinapsis en el cerebro humano.

En la figura 25, se presenta el diagrama en bloques del modelo básico de una neurona, el cual forma las bases para diseñar redes neuronales artificiales. En la imagen se pueden distinguir los tres elementos básicos en el modelo neuronal: Los pesos sinápticos, el sumador y la función de activación.

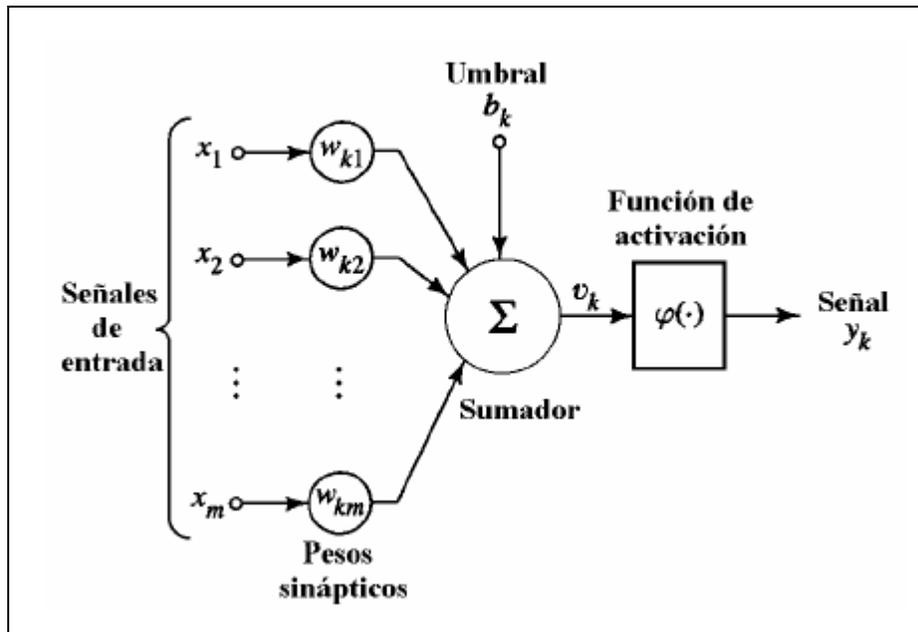


Figura 25. Modelo básico de una neurona artificial. Fuente: [64]

En la imagen anterior se puede observar un conjunto de **conexiones** o **sinapsis**, cada una caracterizada por su propio peso sináptico. Específicamente una señal x_j a la entrada de la sinapsis j conectada a la neurona k se multiplica por el peso sináptico w_{kj} . Es importante notar la manera en que se escriben los subíndices del peso sináptico w_{kj} . El primer subíndice se refiere a la neurona en cuestión y el segundo subíndice se refiere a la neurona de donde proviene la sinapsis correspondiente. A diferencia de una sinapsis en el cerebro, el peso sináptico de una red neuronal puede caer en un rango que incluye valores tanto positivos como negativos.

Dentro del modelo de la neurona, se encuentra un elemento **sumador** para sumar las señales de entrada, ponderadas con los pesos respectivos de las sinapsis de la neurona. Las operaciones descritas aquí constituyen un **combinador lineal**.

La **función de activación**, limita la amplitud de la salida de la neurona. Generalmente, el rango de amplitud de salida de una neurona se normaliza a un

intervalo cerrado unitario [0, 1] o alternativamente [-1, 1]. Usualmente la función de activación es no lineal, tal como una función escalón, sigmoïdal o gaussiana.

El modelo neuronal de la figura 25, también incluye un **umbral** aplicado externamente, denotado por b_k . El umbral b_k tiene el efecto de subir o bajar la entrada neta de la función de activación, dependiendo de si es positivo o negativo, respectivamente. En términos matemáticos, podemos describir a una neurona k al escribir las siguientes ecuaciones:

$$u_k = \sum_{j=1}^m w_{kj} x_j \quad (5)$$

$$y_k = \varphi(u_k + b_k) \quad (6)$$

donde x_1, x_2, \dots, x_m son las señales de entrada; $w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{km}$ son los pesos sinápticos de la neurona k ; u_k es la salida del combinador lineal debido a las señales de entrada; b_k es el umbral; $\varphi(\cdot)$ es la función de activación; y por último y_k es la señal de salida de la neurona[64-66].

Las ANNS pueden exhibir algunos comportamiento similares al comportamiento del cerebro humano tales como: aprendizaje, asociación, categorización, generalización y optimización. Pueden ser implementadas tanto en simulaciones software en computadores convencionales como en hardware.

De acuerdo a la forma en como se encuentren las neuronas interconectadas se define la topología o la arquitectura de la red. Las topologías pueden incluir redes de una sola capa, bicapa o monocapa; y de acuerdo al sentido en el que van las capas, pueden ser alimentadas hacia delante (*feedforward*) o retroalimentadas (*feedback*). Algunas de las topologías más empleadas son el perceptron multicapa, red recurrente, red competitiva, red Hopfield, Kohonen, Adaline, entre otras[64,65]. Diferentes arquitecturas de redes neuronales requieren diferentes

algoritmos de aprendizaje. A continuación se mostraran algunas generalidades acerca del proceso de entrenamiento de las redes.

4.3.3. Entrenamiento del clasificador. La capacidad de aprender es un rasgo fundamental de la inteligencia. Podemos definir el aprendizaje de una red como el proceso por el cual la red se adapta a los estímulos externos de tal manera que eventualmente sea capaz de producir las respuestas deseadas. Típicamente el aprendizaje de una red se lleva a cabo empleando los ejemplos y es precisamente esta habilidad la que las hace tan atractivas e interesantes, en lugar de tener que especificar un conjunto de normas, las redes parecen aprender de un conjunto de ejemplos representativos.

Esta es una de las mayores ventajas que presentan las ANNs sobre los sistemas expertos tradicionales. El algoritmo de entrenamiento hace referencia al procedimiento en el cual las reglas de entrenamiento se usan para ajustar los pesos de la red. El entrenamiento se logra justo cuando los pesos de las conexiones han sido ajustados iterativamente de manera tal que las redes entrenadas puedan desarrollar las tareas para las que fueron diseñadas. El aprendizaje en redes neuronales se puede dividir a grandes rasgos en supervisado y no supervisado[64-67].

El aprendizaje **supervisado** se basa en la comparación directa entre la salida actual de una red neuronal y la salida deseada correcta, también conocida como la salida o dato objetivo. Para poder realizarlo es necesario la presencia de un “maestro” o profesor que se encargue de minimizar la diferencia entre la salida de la red y la salida deseada. Durante cada iteración, la magnitud del error entre la respuesta de la red y la deseada es calculada y usada para realizar los ajustes necesarios al interior de la red, específicamente a los pesos, de esta manera el error cada vez va siendo mas pequeño hasta que se alcanza un valor mínimo o al menos uno aceptable.

El cálculo de las diferencias de las salidas se formula a menudo como la minimización de una función de error tal como el error cuadrático medio total entre la salida actual y la salida deseada sumada sobre todos los datos disponibles[64,65]. El aprendizaje por **refuerzo** es un caso especial del aprendizaje no supervisado donde la salida deseada exacta es desconocida y por lo tanto se basa solo en si la salida actual es o no correcta, no se necesita realizar un cálculo de error entre las salidas, sino simplemente la presencia del maestro que apruebe o desaprobe la salida actual, si una salida es desaprobada, entonces la red seguirá trabajando hasta que encuentre una salida correcta.

En el aprendizaje **no supervisado**, no se requiere conocer tanto las categorías como la presencia del maestro, este proceso de aprendizaje se basa únicamente en las correlaciones entre los datos de entrada organizando automáticamente las categorías de acuerdo a las correlaciones presentadas. En este tipo de aprendizaje, también conocido como auto organizativo, la red puede considerarse autónoma, determinando características generales de los datos presentados y aprendiendo a reflejar esas propiedades en las salidas correspondientes. Lo que en realidad son estas propiedades, y lo que la red pueda aprender a reconocer, dependerá del modelo neuronal concreto así como del método de aprendizaje utilizado[65].

Existen dos fases en toda aplicación de las redes neuronales, la fase de entrenamiento o aprendizaje y la fase de prueba. Para ello se debe dividir en dos las muestras que van a ser analizadas, dejando la primera mitad para el proceso de entrenamiento y conservando la otra mitad para la parte final o prueba del clasificador.

En la fase de entrenamiento, se usa el conjunto de datos provenientes de las imágenes de entrenamiento o patrones de entrenamiento para determinar los pesos que definen el modelo neuronal, durante esta etapa se realizan todas las correcciones posibles al clasificador hasta que las salidas obtenidas sean lo

suficientemente aceptables y nunca se le deben mostrar los datos o patrones correspondientes al conjunto de prueba.

En la fase de prueba o funcionamiento directo, una vez entrenada la red, se procesan los patrones de prueba que constituyen la entrada habitual de la red, analizándose de esta manera las prestaciones definitivas de la red y analizando el grado de generalización que posea[64,67].

Diremos que una red neuronal es capaz de **generalizar** cuando existe una estrecha relación entre la salida deseada y la salida calculada por la red para muestras o ejemplos que nunca han sido usados para entrenarla. La generalización será la cualidad que poseen las redes para extraer información de los datos presentados en su entrenamiento y extender ese conocimiento más allá de esas situaciones conocidas.

En el proceso de aprendizaje o entrenamiento podemos cometer el error de entrenar en exceso la red o sobreentrenarla de modo que ésta **memorice** y se comporte como una tabla inerte sin ninguna capacidad para extraer información de los datos de prueba presentados. De esta manera, la generalización no siempre es posible a pesar de las afirmaciones de algunos autores [65].

A pesar de esto, existen algunas condiciones necesarias pero no suficientes para alcanzar una buena generalización. La primera de ellas es que las entradas de la red contengan la información suficiente perteneciente a la salida, de modo que sea posible encontrar una función matemática que las relacione. Esto implica que el número de casos de entrenamiento sea suficientemente grande y representativo de todos los casos que queramos generalizar, especialmente de aquellos que consideramos casos extraños o raros, los cuales deben estar mejor representados que los demás, esto con el fin de asegurar que el sistema contenga información suficiente acerca de estos, de modo que cuando se presenten no ocurran confusiones o se generen indecisiones.

La siguiente condición es asegurarse que la función que intentamos aprender sea suave, esto es, que un pequeño cambio en las entradas debería, la mayoría de las veces, producir un pequeño cambio en las salidas. Finalmente, debemos emplear información adicional para optimizar nuestro modelo, haciendo uso de funciones correctoras, eligiendo las muestras idóneas para el entrenamiento de manera tal que el aprendizaje sea óptimo[64].

El clasificador que se implementó para el reconocimiento de patrones en este trabajo es una red neuronal tipo perceptrón multicapa de tres capas alimentada hacia adelante y entrenada mediante el vector de características extraído de las imágenes de muestra después de la segmentación, usando el algoritmo de retropropagación. Inicialmente la red fue implementada y entrenada en Matlab, mediante las rutinas generadas en Qwin, se extraían las características de los objetos medidos y estas eran entregadas a la red, la cual las analizaba y devolvía a Qwin el resultado de la clasificación.

Sin embargo, para poder usar el sistema en el laboratorio de hematología, fue necesario realizar un procedimiento de mapeo de la red, en el cual se extraen los valores de los pesos de las interconexiones y se genera una especie de matriz que emula el funcionamiento de la red neuronal, finalmente la red mapeada se implementa en Java junto con todo el sistema de inspección de células.

4.4. RESULTADOS Y EVALUACION.

Una vez diseñado, elaborado y entrenado todo el sistema se procede a probarlo y a evaluar su rendimiento. En la figura 26 se observa una imagen adquirida con el sistema, en ella se puede observar que están representadas las cinco clases de leucocitos maduros que se deben observar en la sangre periférica, junto con los eritrocitos y en la parte inferior hacia la derecha se puede observar un punto pequeño de color morado que corresponde a una plaqueta.

La imagen fue tomada con un aumento de 40x, valor que se tendrá en cuenta para la calibración a la hora de realizar las medidas sobre los objetos. Como se puede observar el nivel de la iluminación no es lo suficientemente homogéneo sin embargo, el algoritmo de segmentación elegido puede superar estos inconvenientes.

En la imagen también se puede notar que algunas células están muy próximas entre sí, y lo más seguro es que durante la segmentación estos elementos se van a acomodar como uno solo y habrá que separarlos.

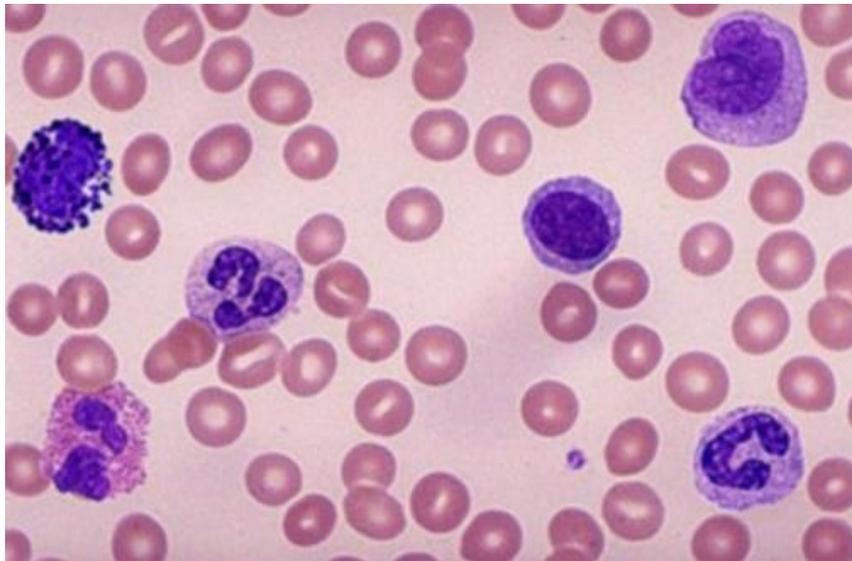


Figura 26. Imagen digital de un frotis de sangre periférica. Imagen adquirida por el sistema implementado

En la figura 27 se presenta la descomposición de la imagen de la figura 26 en sus componentes RGB (rojo, verde y azul), respectivamente. En cada canal unidimensional se representa la intensidad que presentan los píxeles para cada uno de los componentes cromáticos.

Como el fondo de la imagen originalmente presenta una tonalidad clara su contenido cromático de cada uno de los canales es muy similar, siendo mayor en

el rojo, donde se aprecia de una forma más brillante. En el caso de las eritrocitos, se observa que el contenido del canal R (rojo) es el dominante obviamente por la tonalidad pardo rojiza que ellos presentan.

Para los leucocitos podemos observar que su núcleo aparece fuertemente representado en los canales R (rojo) y G (verde), el contenido citoplásmico también está bien representado en estos canales, sin embargo en el canal B (azul) prácticamente se confunde con el fondo de la imagen.

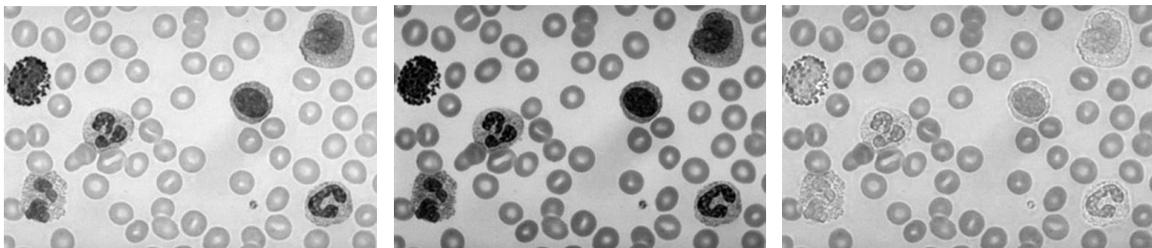


Figura 27. Descomposición cromática en los canales R,G, y B

Del mismo modo, en la figura 28 se muestra la descomposición de la imagen 26 en sus componentes HSI. Las componentes de estos espacios representan los atributos perceptuales con los que los seres humanos especifican el color percibido, la matiz o tono, la saturación y la luminancia o intensidad.

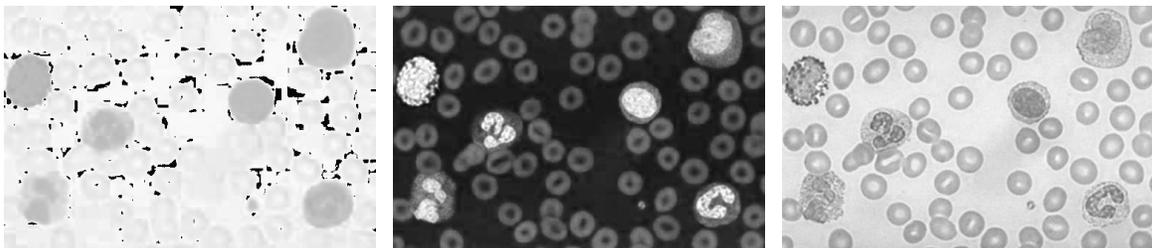


Figura 28. Descomposición cromática en los canales H, S e I

Para el caso del canal H (tono), podemos observar que las zonas más oscuras corresponden a los leucocitos, lo que permite una buena segmentación de ellos. En el canal S (saturación), vemos que las zonas más brillantes corresponden a aquellas zonas con tonalidades más puras o saturadas, donde se presenta una gran variedad de tonos, mientras que el fondo y los eritrocitos son resultado de una combinación inferior de tonos por eso su valor de saturación disminuye y se presentan como zonas oscuras.

Finalmente para el canal de brillo o luminancia I, se observa una semejanza con la imagen de los canales R y B, ya que precisamente es este canal el que absorbe la cantidad de luz que recibe la cámara directamente sin ningún filtro de color, si la cámara con que se adquirió la imagen fuera monocromática su imagen sería semejante a la de este canal.

Para comprobar un poco mejor la información brindada por los canales unidimensionales es necesario observar el histograma de intensidades que cada uno presenta. En la figura 29 se observa el histograma correspondiente al canal R.

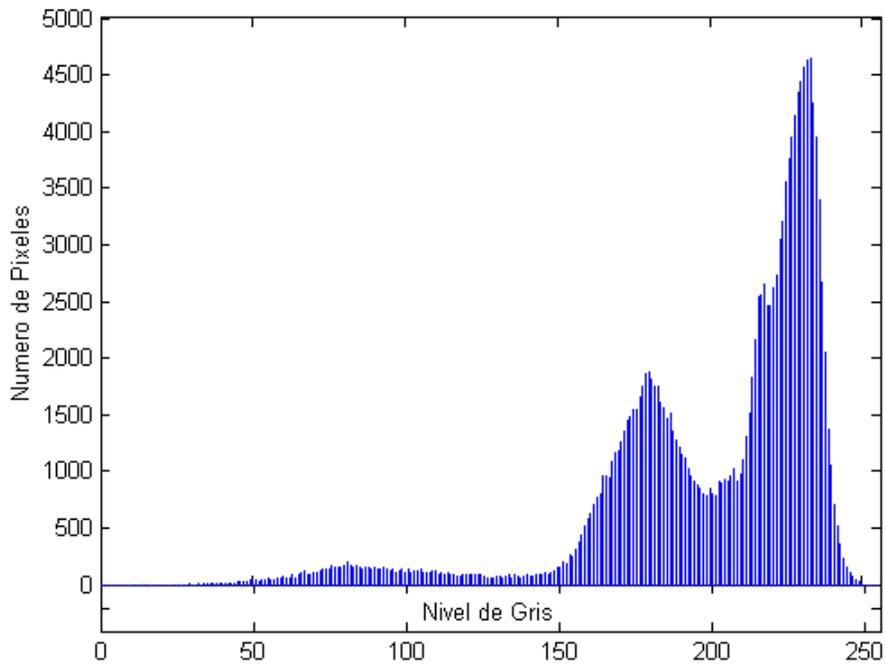


Figura 29. Histograma del canal rojo de la imagen.

En este histograma se pueden observar tres picos, dos de ellos bien pronunciados y agudos hacia el lado derecho y uno mas pequeño hacia la parte izquierda. Este último pico hace referencia a los píxeles ubicados en los núcleos celulares. El pico del medio un poco más estrecho y pronunciado representa las zonas ocupadas por los eritrocitos y el citoplasma de los leucocitos, mientras que el fondo de la imagen aparece representado por el pico más alto y delgado del histograma.

Esta misma información es brindada por el histograma del canal G, presentado en la figura 30, pero a diferencia del anterior, en este los picos se encuentran más anchos y el pico representativo del fondo es más pronunciado. El ensanchamiento de cada uno de los picos sucede hasta prácticamente tocarse uno con el otro, de

este modo el histograma ocupa casi toda la zona de intensidades y no existen zonas intermedias entre pico y pico.

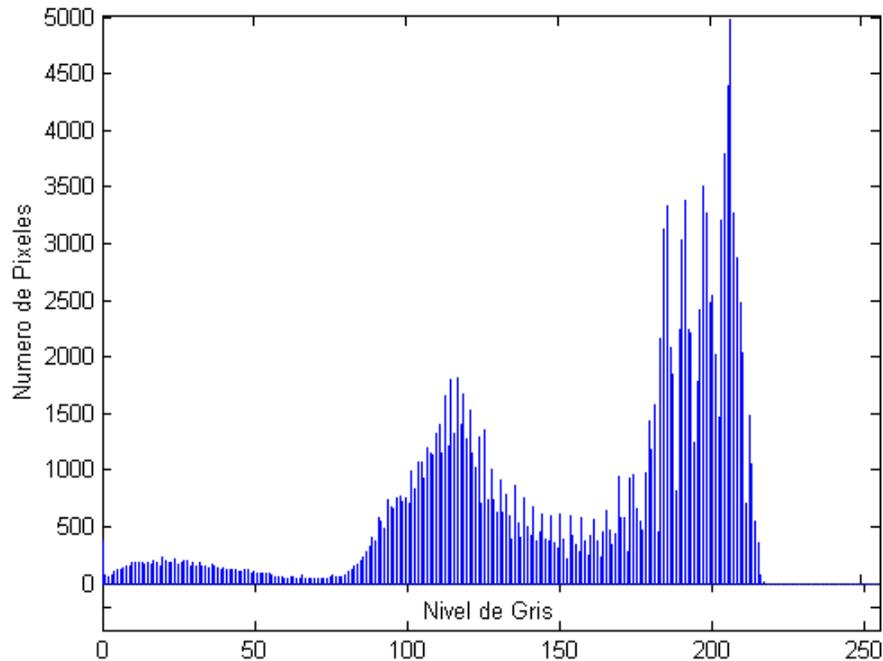


Figura 30. Histograma del canal verde de la imagen.

En la figura 31 se presenta el histograma representativo para el canal B, este histograma a diferencia de los dos anteriores solo presenta dos picos, el tercer pico correspondiente a las zonas ocupadas por los núcleos celulares se ha desplazado a la derecha y se ha solapado con el pico que representa el fondo, corroborando el análisis anterior que se había hecho acerca de lo difícil que era distinguir los núcleos del fondo.

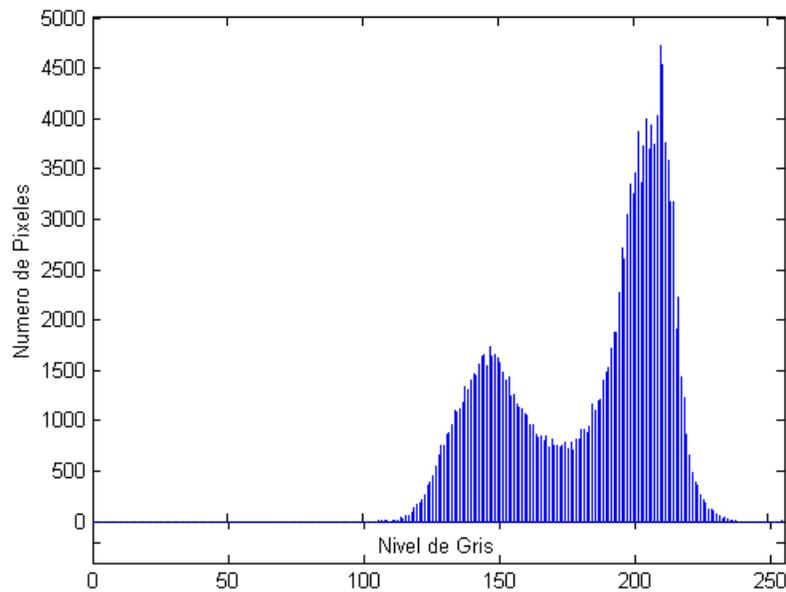


Figura 31. Histograma para el canal azul de la imagen.

Del mismo modo que se realizó el análisis de los histogramas para los canales R, G, y B se hace para el sistema HSI. En la figura 32, se muestra el histograma correspondiente al canal H, este histograma presenta tres picos uno en cada extremo y otro central.

El pico más pronunciado y ubicado a la derecha corresponde al fondo y a los eritrocitos. El alto valor que tiene el pico principal corresponde a la gran cantidad de píxeles que ocupan esta zona, casi la mitad de la imagen entra en esta región. El pico central corresponde a los leucocitos y el pico pequeño desplazado totalmente a la izquierda hace referencia a las zonas claras ubicadas en el fondo entre algunos eritrocitos contiguos.

Este histograma presenta una peculiaridad muy importante y es la gran distancia que existe entre los dos primeros picos, lo que nos indica que en este canal la información se encuentra ubicada en los dos extremos del canal y casi ninguna

información esta representada por las zonas medias, pero principalmente la información se encuentra en la parte más alta del canal.

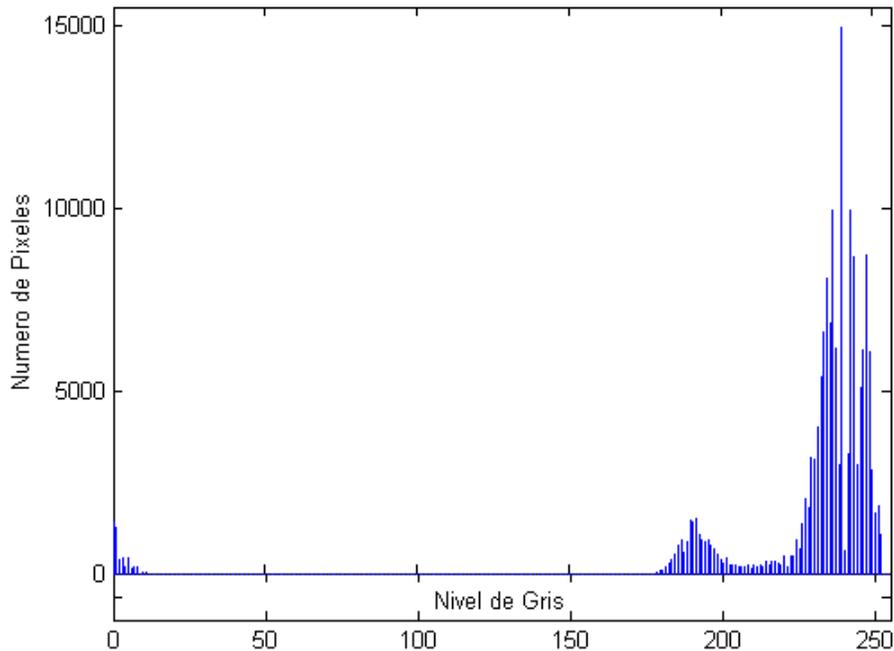


Figura 32. Histograma del canal tono de la imagen

La figura 33 nos muestra el histograma correspondiente al canal S, fácilmente se puede observar los dos picos predominantes y un tercer pico más discreto ubicado en la zona más alta del histograma que precisamente corresponde a los colores puros que presentan los núcleos celulares de los leucocitos.

El pico más predominante corresponde al fondo de la imagen y el del medio a los eritrocitos y el citoplasma de los leucocitos.

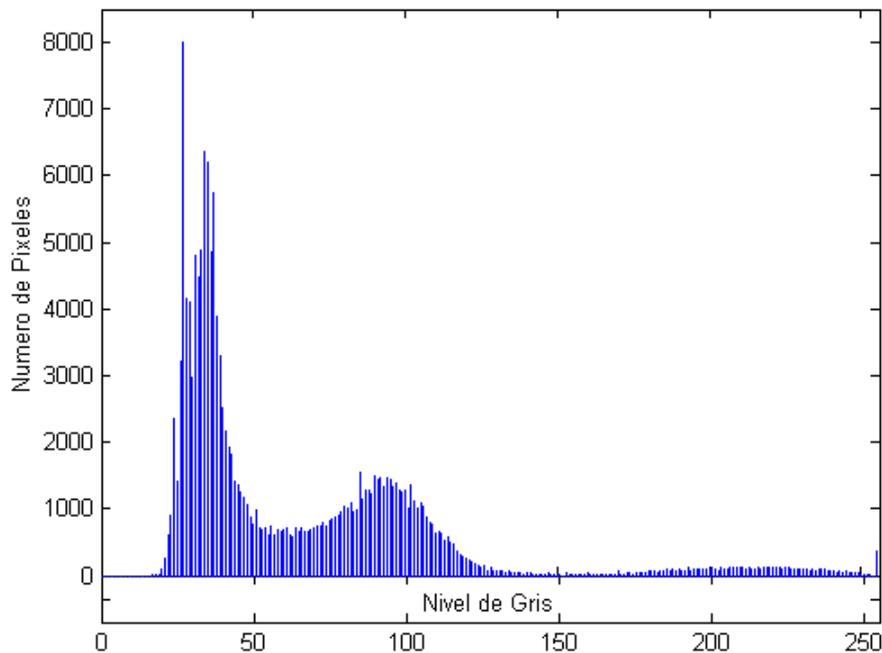


Figura 33. Histograma del canal de saturación de la imagen

Finalmente, la figura 34 nos muestra el histograma del canal I, como ya habíamos aclarado este canal no brinda mayor información que la brindada por los demás canales. Tal vez lo único que podríamos decir es que la distribución de los niveles de gris se encuentra en la mitad superior del histograma, lo que indica que no se tiene un control total sobre el sistema de iluminación a la hora de adquirir la imagen. Lo mas recomendable es obtener un histograma en el canal de iluminación distribuido lo más uniformemente posible.

De la información anteriormente obtenida se puede observar que la segmentación usando los canales unidimensionales de los sistemas de color RGB y HSI es válida para realizar una segmentación, sin embargo también nos dimos cuenta de que esta información es altamente dependiente del sistema de iluminación a la

hora de adquirir las imágenes y puesto que era prácticamente imposible controlarla como se había explicado anteriormente se decide emplear otro método de segmentación que igualmente emplee la información cromática de la imagen pero que a la vez sea independiente del sistema de iluminación.

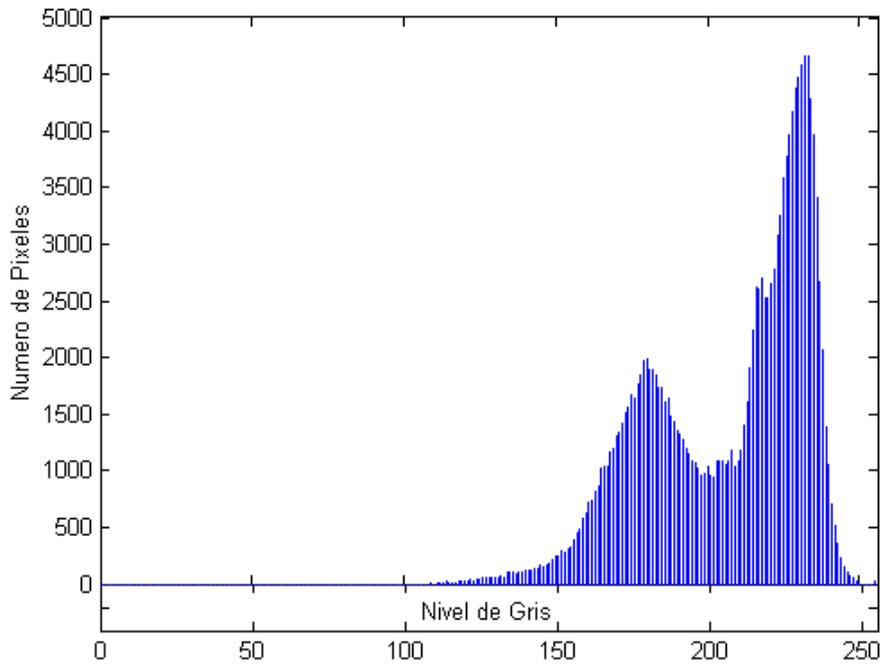


Figura 34. Histograma para el canal de iluminación de la imagen

Por lo tanto la siguiente operación es la segmentación de la imagen empleando el algoritmo de K-Means.

En la figura 35 se observa el resultado del proceso de segmentación sobre la imagen de la figura 26, en la imagen se puede observar que algunas células se han unido tal y como se esperaba; aplicando los procedimientos de morfología matemática explicados anteriormente separamos las células y obtenemos la imagen presentada en la figura 36.

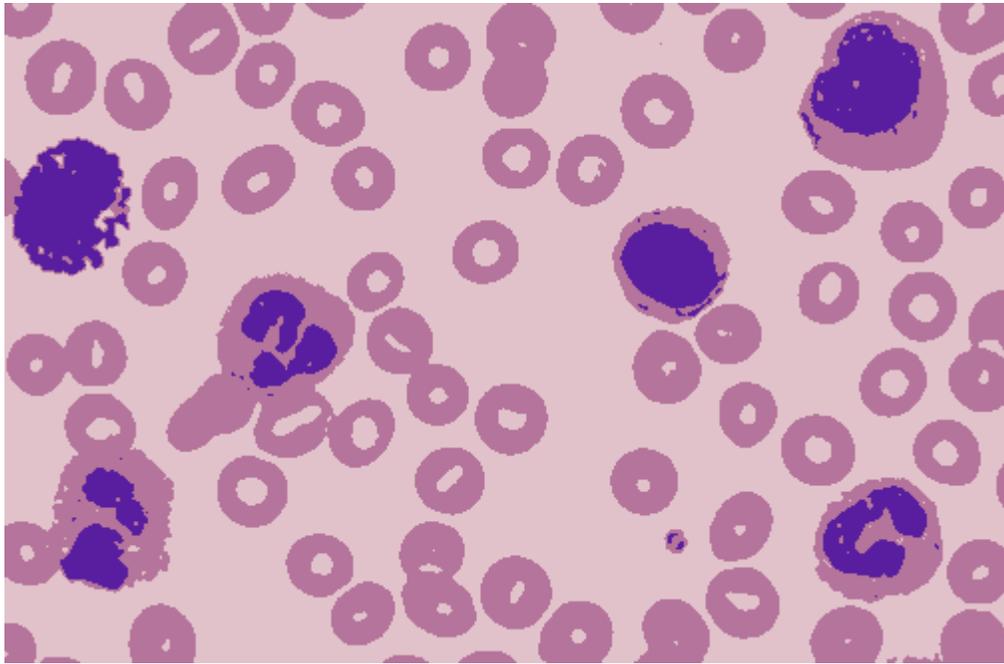


Figura 35. Resultado de segmentar la imagen 26 usando el algoritmo K-Means

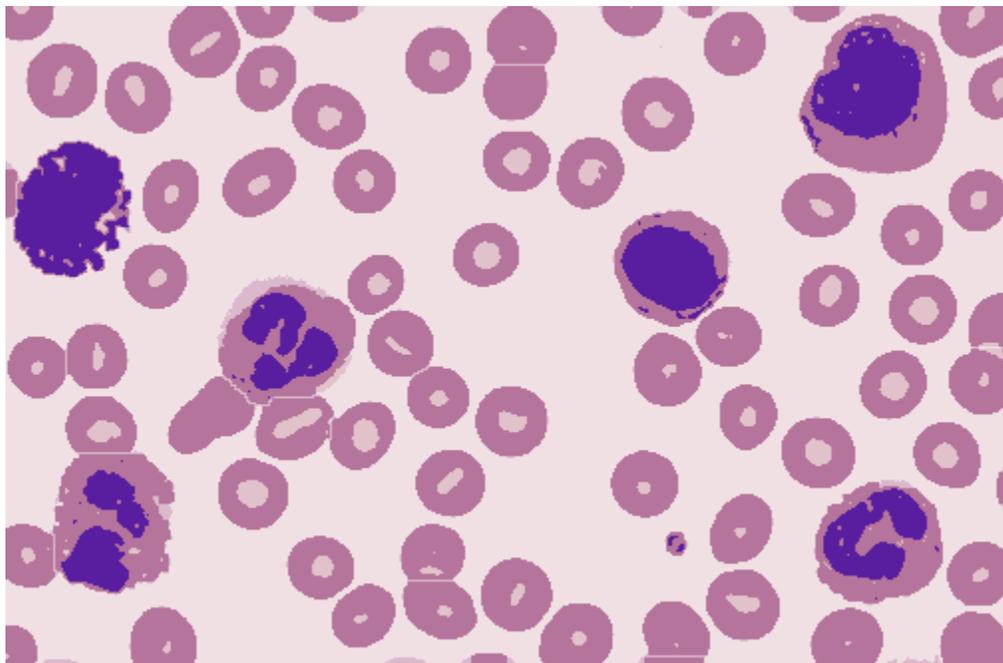


Figura 36. Células completamente separadas

Una vez que hemos logrado separar las células completamente, procedemos a realizar las mediciones correspondientes para una correcta extracción de características que nos ayudaran a clasificar las células. Pero, si observamos la imagen anterior nos damos cuenta que esta no presenta ninguna información relativa al núcleo celular de las células. Sin embargo, dado que el canal S de la imagen brinda información completa acerca de los núcleos usamos esta información para poder segmentarlos, así obtenemos la imagen mostrada en la figura 37.

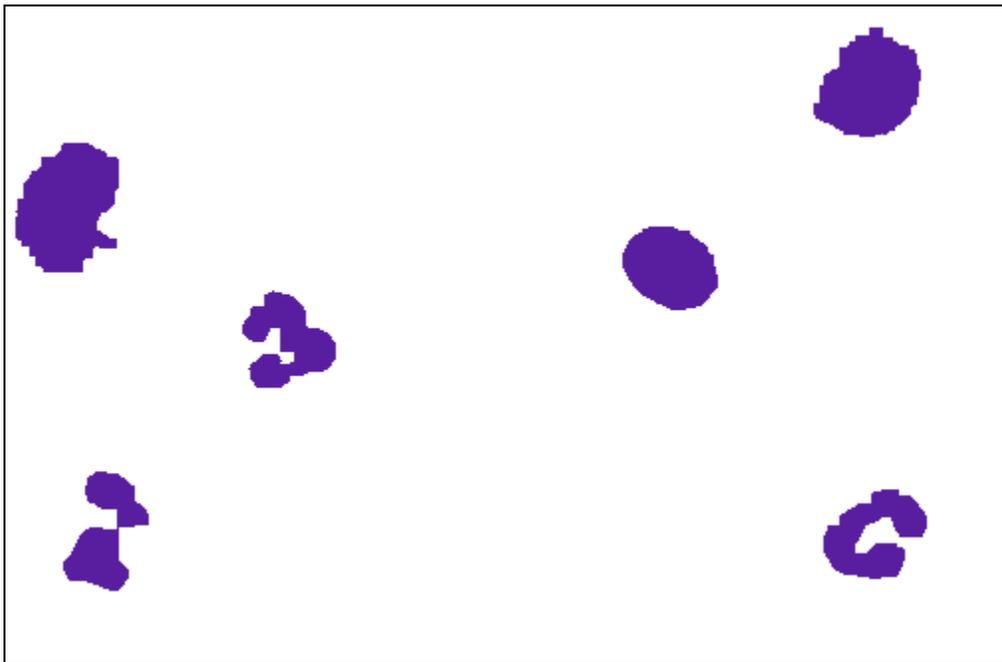


Figura 37. Segmentación de los núcleos celulares.

A partir de este momento se debe definir cuales son los parámetros que van a definir la clasificación de las células. Como ya lo habíamos analizado en la sección 4.2.4. las características elegidas para realizar la clasificación fueron el área celular, la circularidad o redondez, el diámetro de Feret y la nuclearidad que en

combinación con la información de color brindaran la información suficiente para elaborar la clasificación.

Sobre la imagen de la figura 36 medimos los valores de área, redondez y diámetro de Feret. Durante este mismo proceso de medición de características se lleva un conteo de las células analizadas, o proceso de etiquetado como se le conoce. El mismo procedimiento se realiza sobre la imagen de la figura 37, pero para esta imagen solo se miden los valores del área.

Para poder ilustrar mejor el funcionamiento del sistema a la hora de detectar las células se presenta en la figura 38 la imagen original y sobre ella la máscara generadas por la detección de las células. En la figura se puede observar claramente la delineación total de la célula en color negro y la de los núcleos celulares en un tono rojo.

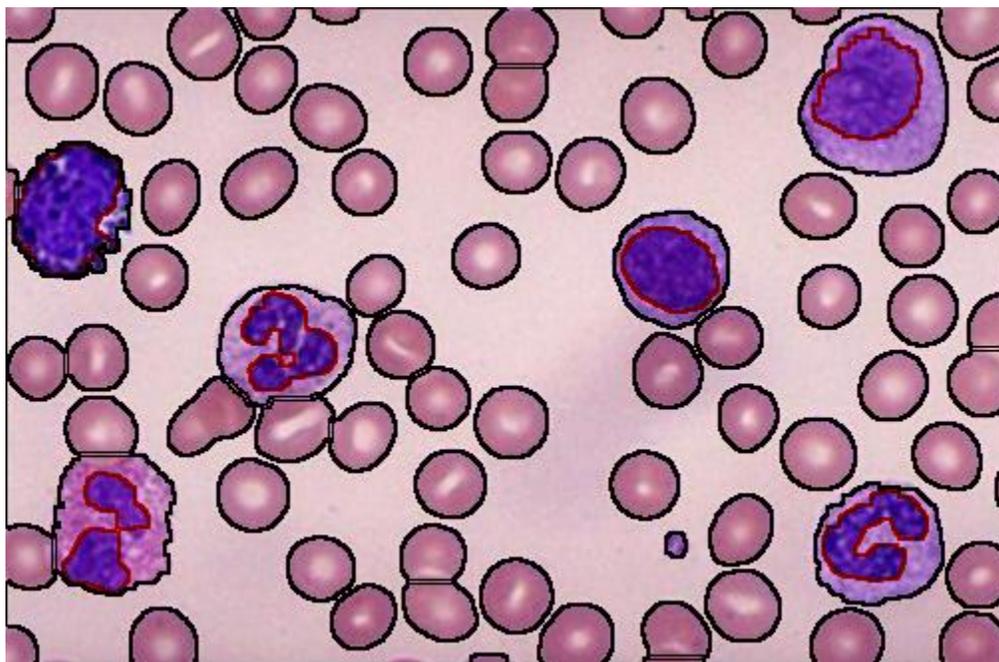


Figura 38. Ilustración del proceso de detección de las células y de sus núcleos

Otros ejemplos que ilustran el proceso de detección de las células y de sus núcleos celulares se presentan en las figuras 39 a 42.

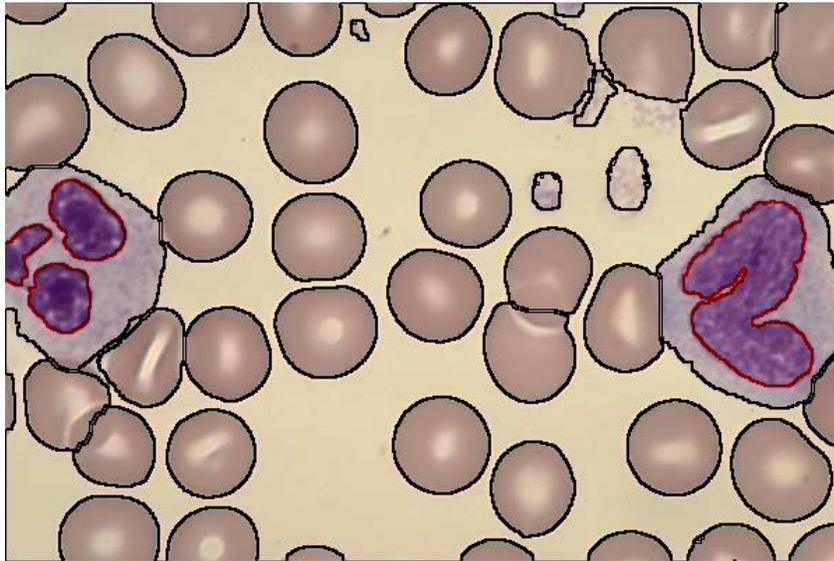


Figura 39. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares

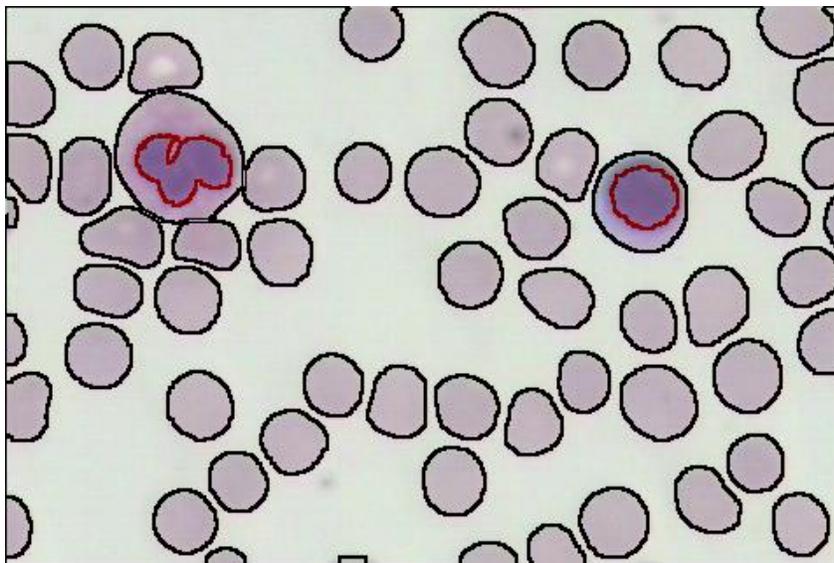


Figura 40. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares

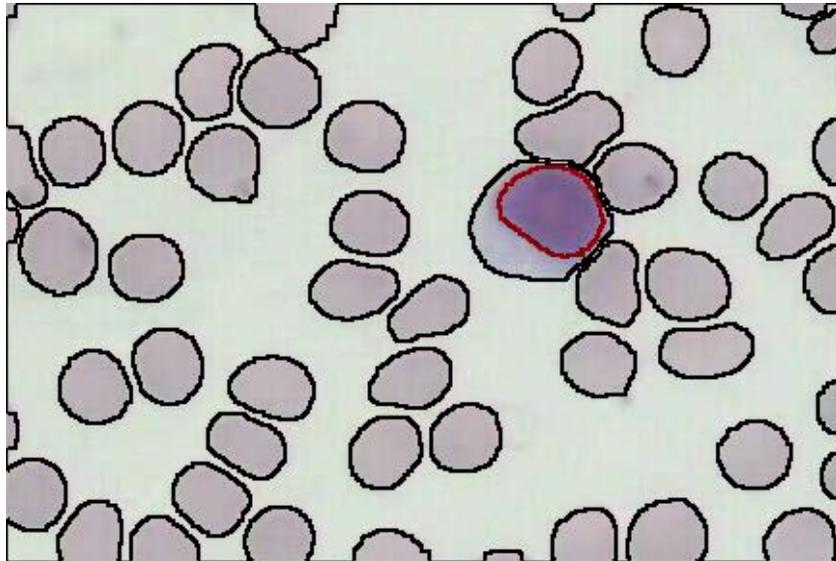


Figura 41. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares

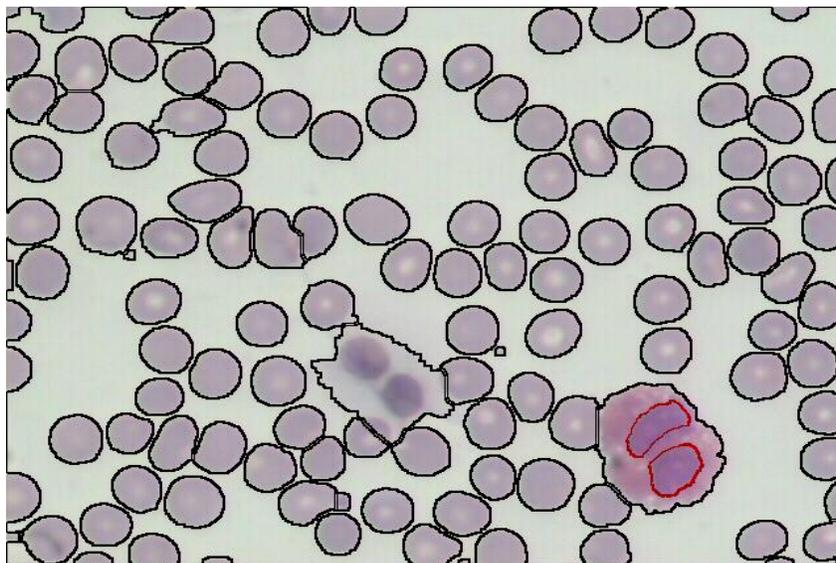


Figura 42. Otros ejemplos de detección de células y núcleos celulares

Como se puede observar en los ejemplos anteriores, en la gran mayoría de los casos, tanto las células como los núcleos celulares aparecen bien seleccionados, sin embargo cuando se presentan algunos inconvenientes o artefactos extraños

en el frotis, estos aparecen reflejados en el proceso de detección celular. En la figura 42, observamos un ejemplo de un defecto producido en el frotis ocurrido durante el proceso de preparación de la muestra, el efecto producido es la generación de una mancha oscura entre dos eritrocitos la cual interfiere durante el proceso de segmentación y ocasiona el efecto observado en la figura 42, donde el sistema supone que todo el artefacto es una sola célula, claro está que esto es un problema ajeno al clasificador y solo se presentó en una ocasión.

Las características obtenidas son entregadas tal y como se explicó anteriormente a la red neuronal cuya topología corresponde a un perceptrón multicapa, que opera como clasificador estadístico no paramétrico entrenado mediante un algoritmo supervisado, esta se encarga de analizarlas y de entregar los resultados finales. El conjunto total de pruebas consistió de 192 imágenes, de las cuales 96 se usaron para el proceso de entrenamiento, tratando de conseguir una buena representación de todas las clases de células y las 96 restantes se utilizaron en el proceso de prueba, con el fin de establecer la eficacia y la calidad del entrenamiento de la red neuronal en el proceso de clasificar células.

Las clases o grupos que se establecieron corresponden claro está a cada una de las distintas clases de células que se encuentran en la sangre periférica, estas son:

- **Clase 1:** Eritrocitos
- **Clase 2:** Plaquetas
- **Clase 3:** Monocitos
- **Clase 4:** Linocitos
- **Clase 5:** Neutrófilos
- **Clase 6:** Eosinófilos
- **Clase 7:** Basófilos

Para realizarla evaluación final del clasificador se hace uso de una matriz de confusión, la cual representa los porcentajes de acierto o desaciertos del clasificador. Los falsos positivos y falsos negativos también se pueden incluir dentro de esta matriz. Dentro de esta matriz, cada una de las filas representa las clases reales en las que deben ser incluidas los elementos a clasificar y las columnas representan el reconocimiento o la clasificación que realizó el sistema.

Si el sistema se desempeña idóneamente, entonces todos los valores deben encontrarse a lo largo de la diagonal principal, por supuesto como ningún sistema es totalmente confiable algunos valores se encontrarán desplazados de esta diagonal y darán la indicación de el error que se comete y a que clase corresponde si es un falso positivo o negativo. De todos modos debe esperarse que la gran mayoría de los datos se ubiquen sobre esta diagonal. En la tabla 2, se presenta la matriz de confusión para el sistema de clasificación usando las imágenes correspondientes al conjunto de prueba.

Tabla 2. Matriz de Confusión del clasificador usando el conjunto de prueba

		Resultado del clasificador							% Acierto
		Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5	Clase 6	Clase 7	
Clase de la célula	Clase 1	2956	15	0	0	0	0	0	99.49
	Clase 2	5	86	0	0	0	0	0	94.50
	Clase 3	0	0	176	8	0	0	1	95.13
	Clase 4	0	0	7	116	0	0	0	94.31
	Clase 5	0	0	0	0	384	5	3	97.96
	Clase 6	0	0	0	0	3	26	0	93.10
	Clase 7	0	0	2	0	1	0	19	86.36
% Acierto total del clasificador									98.68

Fuente: Datos y resultados obtenidos en el estudio de este trabajo.

Como se puede ver en la tabla, el porcentaje de aciertos total del clasificador es muy alto, con más del 98% de aciertos sin embargo este valor tan elevado se debe a la gran cantidad de eritrocitos que logra clasificar muy bien el clasificador. Por lo tanto es mejor realizar un análisis a cada una de las clases individualmente. Para las clases 1 y 2, es decir para los eritrocitos y las plaquetas, vemos que se obtienen porcentajes muy altos, principalmente para la clase 1, donde el reconocimiento fue casi perfecto, esto se debe en gran parte a la información brindada por el color y la no presencia de núcleo tanto de los eritrocitos como de las plaquetas.

Para el caso de las clases 6 y 7 las cuales representan a los eosinófilos y basófilos respectivamente, se obtuvieron los porcentajes de aciertos mas bajos, sobretodo en la última clase, ya que estas células son muy similares a los neutrófilos y tal vez su diferencia más relevante corresponda al color, por lo cual, en ocasiones cuando el proceso de tinción de la muestra no es el adecuado su coloración rojiza no se manifiesta correctamente y el clasificador lo puede confundir con un neutrófilo.

Finalmente, ya con todos los pasos elaborados y probados se procede a elaborar el conteo diferencial, el cual constituye la razón fundamental para el desarrollo de este trabajo. Para ello se evalúan las imágenes adquiridas de un solo frotis de sangre periférica y se usa la información entregada por el clasificador.

En la tabla 3 se muestra un ejemplo de un conteo diferencial elaborado por el sistema de inspección automatizada de células.

La información relativa a los leucocitos se hace de modo cuantitativo, mientras que la de los eritrocitos y las plaquetas se realiza de un modo cualitativo, debido a la imposibilidad de medir mediante el sistema implementado algunos parámetros de uso clínico como la cantidad de hemoglobina presente y el número de células por μl de sangre.

Tabla 3. Recuento diferencial de células elaborado por el sistema implementado

CÉLULA	VALOR
Neutrófilos	53.1 %
Linfocitos	36.9%
Monocitos	7.4 %
Eosinófilos	2.1 %
Basófilos	0.5 %
Eritrocitos	Normales
Plaquetas	Disminuidas

Fuente: Datos y resultados obtenidos en el estudio de este trabajo.

Si comparamos el recuento anterior con un entregado por un clasificador eléctrico como por ejemplo el *Coulter* con el que cuenta el laboratorio de Hematología, el cual se muestra en la figura 43, notamos algunas diferencias bien pronunciadas

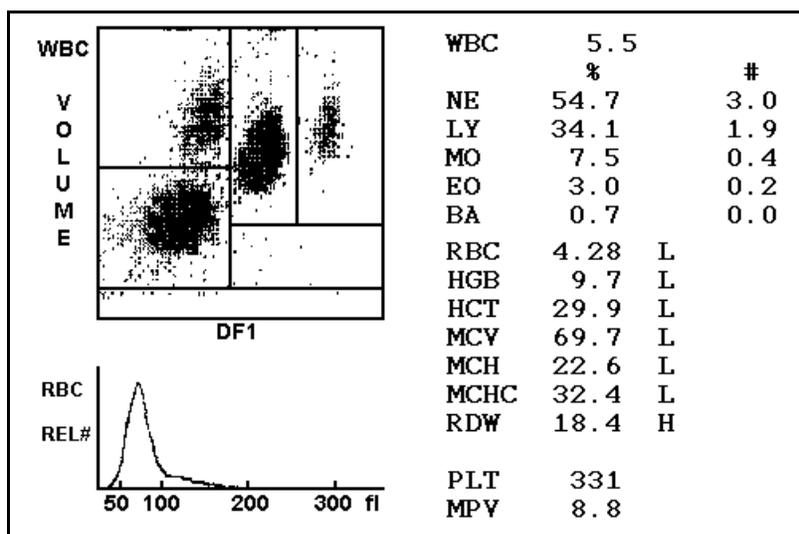


Figura 43. Recuento celular obtenido mediante un *Coulter*

En la figura anterior se pueden observar dos gráficos, el gráfico inferior corresponde al recuento de eritrocitos y el de la parte superior, hace referencia al modo en el que el clasificador electrónico separa las distintas clases de leucocitos que existen, donde cada uno de los recuadros representa a una clase distinta de estos, las clases siempre serán ubicadas en la misma posición, el cuadro superior izquierdo corresponde a los monocitos, a su lado se encuentran los linfocitos, seguido por los eosinófilos, más abajo se encuentra el de los neutrófilos, que también corresponde al más poblado de todos, a su lado se encuentra el correspondiente a los basófilos, que son las células maduras con menor representación en la sangre y por último se encuentra el cuadro inferior, en el cual el clasificador acomoda a todas aquellas células inmaduras que detecta pero no está en la capacidad de decir a que clase precisamente corresponden.

Además de los valores numéricos de cada una de las células por unidad de sangre, se muestran también valores como la hemoglobina (HGB), el hematocrito (HTC), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y el recuento de plaquetas. La gran mayoría de estos valores son imposibles de medir mediante la técnica empleada en el sistema, sin embargo el sistema ofrece otras ventajas que los clasificadores electrónicos no presentan.

5. LOGROS ADICIONALES ALCANZADOS

De los análisis anteriores surgió la idea de llevar las posibilidades desarrolladas por el sistema de inspección mas allá de las ya elaboradas y proporcionar **nuevas alternativas** que no se habían contemplado durante las primeras etapas de desarrollo del proyecto. Tal vez la más importante de estas posibilidades sea la de brindar al sistema de inspección la capacidad de **diagnosticar** anomalías presentes en las células sanguíneas.

Los clasificadores automáticos comerciales que se consiguen en la actualidad ya sean electrónicos como el Coulter u optoelectrónicos como los citómetros, avisan cuando sucede una anomalía en la sangre, pero no están en la capacidad de predecir cual es. Por ejemplo, cuando se presenta alguna leucemia, aparecen células precursoras en la sangre periférica, las cuales normalmente no deberían aparecer, solo se deben encontrar en la médula ósea, cada una de las clases de leucocitos tiene sus células precursoras como los monoblastos, linfoblastos, eritroblastos, etc, pero los clasificadores automáticos no las diferencia únicamente avisan la presencia de blastos en sangre periférica, razón por la cual es necesario que la muestra sea observada al microscopio por los especialistas, para que estos puedan decir con exactitud de que blastos se trata.

Dado que cada una de estas células presenta sus propias características físicas y morfológicas, es posible detectarlas con el sistema implementado y catalogarlas. Con lo cual se estaría dando un avance enorme en cuanto al análisis automatizado de las células y se ayuda a desarrollar nuevas herramientas que permitan el diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades hematológicas.

Además de estas posibilidades, surgen otra gran cantidad de nuevas alternativas para el estudio de las células y de sus enfermedades, no sólo para los leucocitos sino también para los eritrocitos y las plaquetas, e inclusive en la detección de invasión de parásitos a las células como en el caso de la malaria y otras enfermedades.

No obstante dada la gran cantidad de opciones de ir ampliando la utilidad del sistema, se vio la necesidad de ir acotando el trabajo y dejar algunas cosas para un trabajo posterior. Además, dadas las características del sistema, este cuenta con la posibilidad de aprender a reconocer nuevos patrones y nuevas formas celulares, con lo cual las limitaciones estarían dadas en encontrar las características principales de las nuevas formas a estudiar y enseñárselas al sistema, es decir si se desea que aprenda a reconocer una nueva célula o una variación de una célula anteriormente conocida, lo que se debe hacer es mirar cuales son las características más relevantes o estudiar su comportamiento ante las características ya establecidas y entrenar la red para que reconozca la nueva célula.

En esta sección se presentan los avances y logros adicionales que se pudieron obtener, los cuales no se encontraban contemplados inicialmente dentro de las posibilidades del sistema. En primer lugar se menciona las anomalías de los eritrocitos y que son posibles detectarlas con el sistema desarrollado. Finalmente se muestran las anomalías que sufren los leucocitos y que de igual manera pueden ser detectadas e identificadas por el sistema descrito en este trabajo.

5.1 ANOMALÍAS DE LOS ERITROCITOS

Los eritrocitos presentan algunas variaciones tanto en su forma como en el tamaño y en la concentración y la distribución de la hemoglobina. Cuando las variaciones corresponden al tamaño se puede presentar **macrocitosis** la cual ocurre cuando el diámetro de los eritrocitos es mayor a $9\ \mu\text{m}$ y por el contrario la

microcitos sucede cuando el diámetro de los eritrocitos es menor a 6 μm . Cuando se presentan variaciones en cuanto a la forma del eritrocito se emplea el término **poiquilocitosis**[4-7].

Algunas de las variaciones que pueden presentar los eritrocitos y que el sistema está en la capacidad de detectarlas son las siguientes:

Eliptocitos: Se visualizan células elípticas u ovaladas en la sangre normal. Cuando se presenta la anemia producida por la eliptocitosis hereditaria, los eliptocitos llegan a constituir entre el 25 y el 90 % de los eritrocitos. También aparecen en trastornos como las talasemias y en las anemias mielotísicas, los macroeliptocitos son comunes en las anemias megaloblásticas.

Esferocitos: pequeñas células intensamente teñidas observadas en la esferocitosis hereditaria y en la anemia hemolítica adquirida.

Dacriocito: célula en forma de lágrima que se encuentran en cantidades enormes en la mielofibrosis.

Depranocito: también conocidas como células falciformes, adoptan una gran variedad de formas, sobre todo de semilunas alargadas aparecen en la anemia depranocítica.

Acantocitos: células que presentan diversas salientes espinosas irregulares en su superficie. Características del síndrome de acantocitosis

Dianocitos: también conocidos como células *target*, presentan una forma de diana o de blanco en la cual se observa un doble anillo de hemoglobina. Estas células son características de anomalías como las talasemias, ferropenia, hepatopatía obstructiva y hemoglobinopatías.

También se pueden presentar algunas inclusiones dentro de los eritrocitos, algunas inclusiones que se pueden detectar con este sistema son:

Cuerpos de Howell-Jolly: cuerpos pequeños, bien definidos y redondos, basófilos, densamente teñidos, de 1 μm de diámetro por lo general solitarios. Se visualizan en casos de esplenectomía y en anemias graves de diversas etiologías.

Punteado basófilo: Presencia de pequeños puntos basófilos gruesos o finos que varían en forma y tamaño, se visualizan en una gran variedad de anemias. Una forma especial de este punteado son los cuerpos de Pappenheimer el cual presentan puntos de hierro teñidos de azul.

Nucleados: corresponden a eritrocitos con núcleo por lo general eritroblastos ortocromáticos, la presencia de estas células en la sangre periférica se debe considerar como una expresión de una grave enfermedad excepto en los individuos anesplésicos.

Malaria: El parásito de la malaria, se introduce en el eritrocito junto con pequeña inclusiones rojas dentro del hematíe pero separado del parásito[4-8].

En las figuras 44 a la 50 se presentan ejemplos de imágenes correspondientes a estas anomalías y las cuales el sistema está en la capacidad de detectarlas y diagnosticarlas.

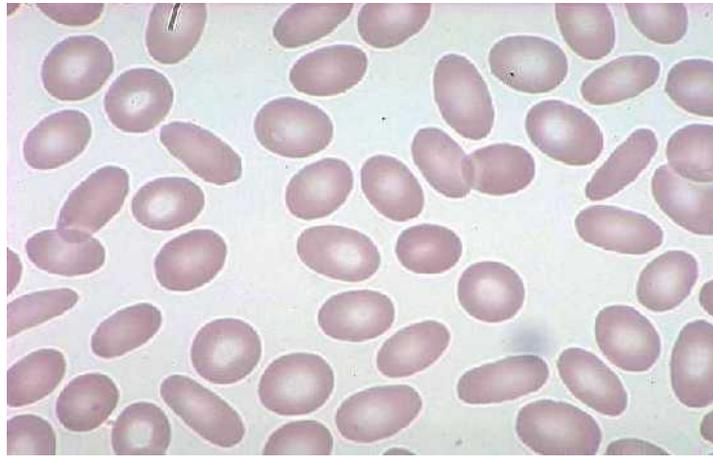


Figura 44. Eliptocitos

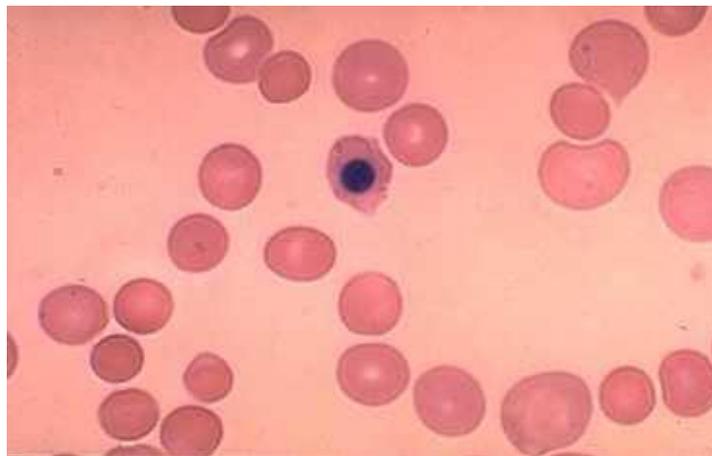


Figura 45. Esferocitos y un eritrocito nucleado

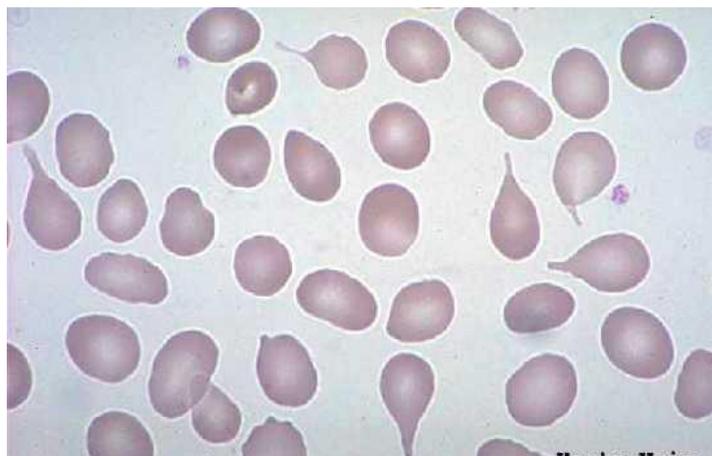


Figura 46. Dacriocitos



Figura 47. Células Diana, acantocitos y un eritrocito nucleado

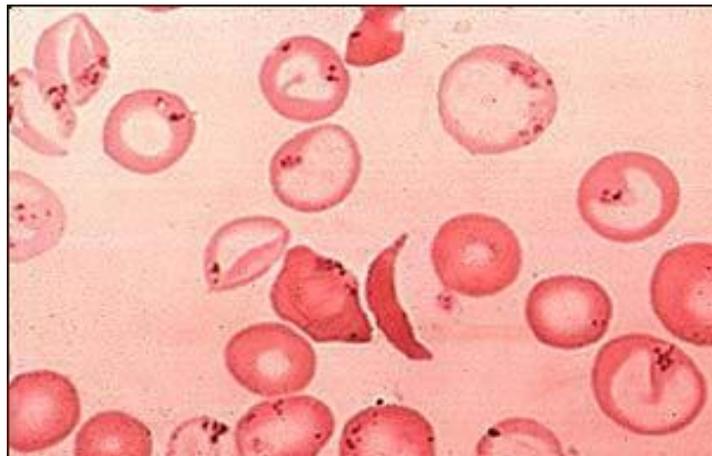


Figura 48. Célula falciforme y eritrocitos con punteado basófilo

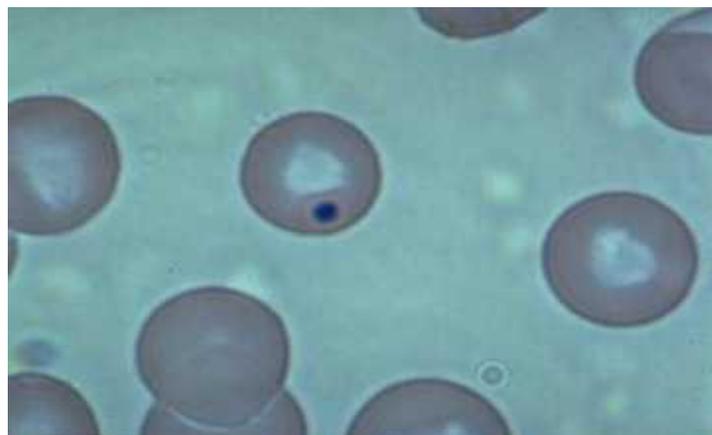


Figura 49. Cuerpo de Howell-Jolly

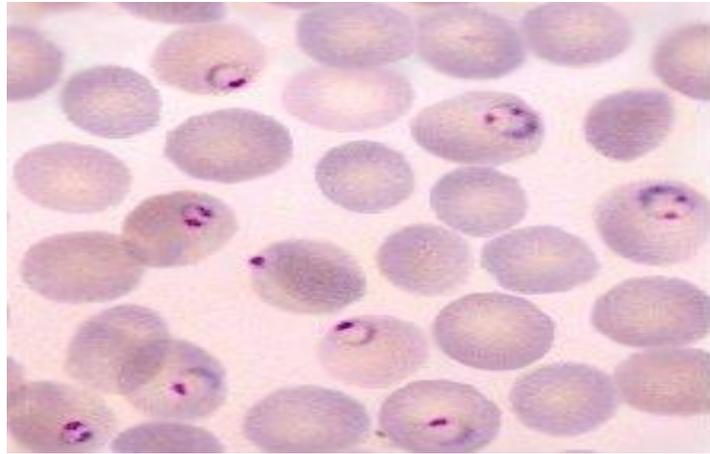


Figura 50. Eritrocitos infectados por malaria (Falciparum Vivax)

Además de estas anomalías anteriores existen otra gran variedad, pero por razones de tiempo y de complejidad no se incluyeron dentro de las nuevas posibilidades alcanzadas por el sistema implementado.

5.2 ANOMALÍAS DE LOS LEUCOCITOS.

Análogamente a los eritrocitos, los leucocitos también presentan alteraciones las cuales se pueden dar por aumento ó disminución de los leucocitos, presentándose una leucocitosis o leucopenia respectivamente, y así para cada una de las distintas clases de leucocitos que hay, es decir se puede presentar neutrofilias o netropenias, basofilopenia o basofilia, linfocitosis o linfopenias, etc [4-7].

Sin embargo, las alteraciones más comunes o de mayor importancia presentadas por los leucocitos corresponden a las leucemias, el sistema fué entrenado para detectar y reconocer algunas de estas leucemias. Entre ellas tenemos la leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia monocítica y la leucemia granulocítica crónica[4-7].

La función principal para determinar cada una de estas leucemias, es poder detectar y distinguir cada uno de las células precursoras o anormales presentes en

la sangre periférica, ya que cada una de ellas cuenta con sus propias características físico morfológicas únicas que las hacen diferenciables entre sí. Sin embargo, para una mayor seguridad es necesario realizar un examen con muestra de médula ósea.

La leucemia linfocítica aguda LLA, es una enfermedad que aparece predominantemente en los niños y resulta del crecimiento de una célula anormal de linfocito, no granular, con poco citoplasma y un núcleo redondo y homogéneo parecido al linfoblasto. El recuento leucocitario está generalmente aumentado en la LLA, a menudo hasta $100.000/\text{mm}^3$ o más, pero en un tercio de los enfermos aproximadamente el recuento es normal o bajo. En cualquier caso, el número absoluto de granulocitos y plaquetas en la sangre circulante está casi siempre disminuido y, por lo general, en mayor extensión que en la leucemia mielógena aguda (LMA). Los linfoblastos de la sangre periférica en la LLA son, por lo general, células pequeñas que se tiñen intensamente de azul, tienen escaso citoplasma visible, el cual no contiene gránulos identificables, y un núcleo redondo u oval, con cromatina indistinta y nucléolos mal perfilados[4-7]. En la imagen de la figura 51 se puede observar un ejemplo de una LLA.

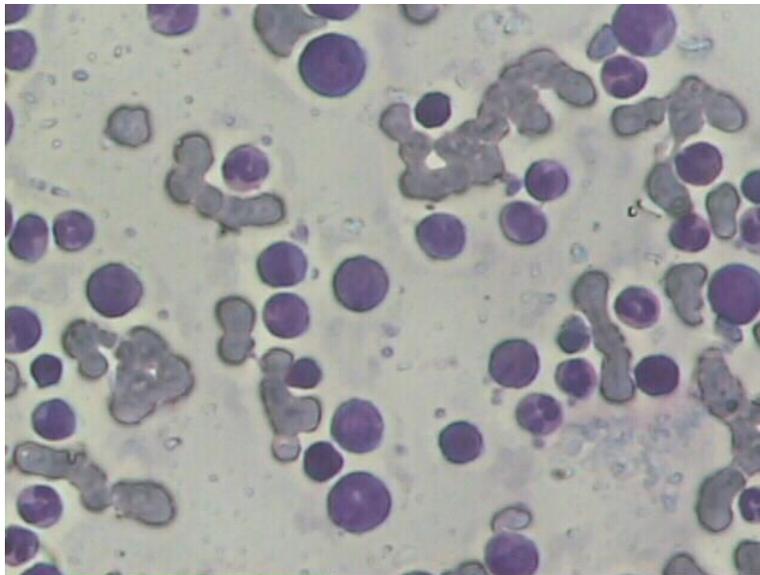


Figura 51. Ejemplo de una imagen obtenida de una muestra de LLA

La leucemia linfocítica crónica LLC, es el tipo de leucemia más común de los países occidentales. Afecta a los pacientes de más edad, produce muy pocos síntomas, tiene la duración mas larga y es la más fácil de diagnosticar y de tratar. En el enfermo promedio de LLC, los linfocitos son ligeramente más grandes que los normales, más frágiles y en ocasiones presentan rupturas a causa del extendido, los nucléolos suelen ser prominentes y la cromatina nuclear está aterronada y aparentemente en mayor concentración. Los linfocitos anormales suelen tener un citoplasma moderadamente basófilo, no granular y abundante.

La cifra linfocitaria absoluta en la LLC suele oscilar entre 10.000 y 150.000/mm³, pero cifras de hasta 500.000/mm³ o superiores no son raras en los pacientes con enfermedad subaguda o avanzada. Hay relativamente poca fluctuación de un día a otro en la cifra total de leucocitos. Los linfocitos anormales de la LLC son casi siempre más pequeños que los granulocitos o los linfoblastos o mieloblastos de la leucemia aguda. El tanto por ciento de granulocitos en la LLC a menudo está reducido, pero su cifra absoluta puede estar ligeramente aumentada en los estados iniciales de la enfermedad[4-7]. En la imagen de la figura 52 se puede observar un ejemplo de una muestra de LLC.

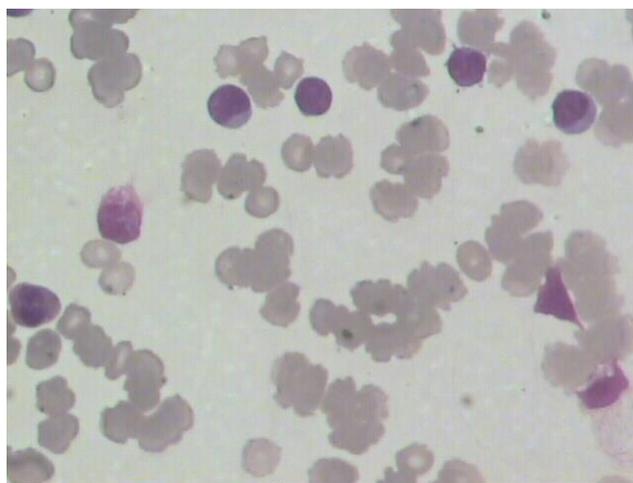


Figura 52. Ejemplo de una muestra con LLC

La leucemia monocítica, es una enfermedad aguda y su anomalía básica es la proliferación generalizada y progresiva de los elementos reticuloendoteliales con la liberación de monocitos anormales que invaden la médula y posteriormente la sangre periférica. Sin evidencia de una anomalía primaria que afecte a los precursores mieloides. En la leucemia monocítica, la anemia aparece precozmente, existe una leucopenia con un tanto por ciento variable de monocitos anormales en casi un tercio de todos los pacientes inicialmente, pero la mayoría tienen una leucocitosis moderada o notable con un 50 a 70% de los leucocitos que son monocitos, promonocitos y monoblastos. Las células anormales pueden parecer grandes histiocitos que tienen un abundante citoplasma de coloración azul, un núcleo de forma irregular, a menudo plegado y de aspecto esponjoso[4-7].

La leucemia granulocítica crónica LGC o leucemia mielocítica LMC es quizá la más definida, uniforme y típica en el grupo de las enfermedades mieloides. Fue el primer tipo de leucemia que se descubrió y durante muchos años se conoció como leucemia “esplénica”. Puede definirse como una enfermedad neoplásica, en la cual las principales manifestaciones clínicas se asocian a una superproducción excesiva, anormal y aparentemente incontrolada de granulocitos en la médula ósea que invaden la sangre periférica donde se pueden observar células mielodes maduras e inmaduras. Se caracteriza porque los estadios tardíos de los granulocitos se encuentran en abundancia en la sangre periférica y en su mayor parte parecen ser normales.

Cuando la LGC es notable, la sangre periférica se parece a la médula ósea, donde los granulocitos han desplazado ampliamente a la grasa, a los precursores eritroides y a los megacariocitos. Algunos pacientes pueden mostrar un aumento evidente en el número de eosinófilos y basófilos en la sangre periférica y pueden encontrarse ocasionalmente fragmentos de núcleos de megacariocitos en la sangre periférica. No es raro hallar un escaso número de eritrocitos inmaduros y casi megaloblásticos[4-7]. En la figura 53, se puede observar una muestra correspondiente a una LGC.

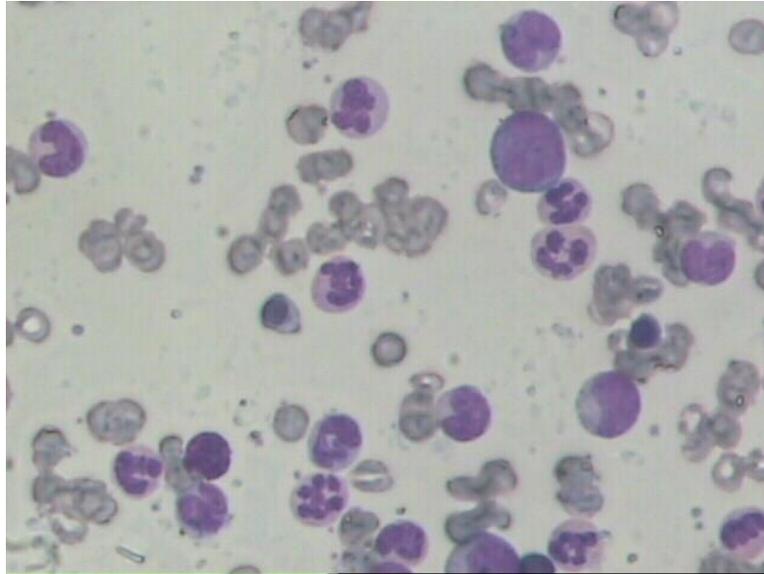


Figura 53. Ejemplo de una leucemia LGC.

5.3 NECESIDAD DEL EXAMEN DE LA EXTENSIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

Las determinaciones cuantitativas expuestas anteriormente (recuento de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, hemoglobina, hematocrito, etc.) permiten la descripción de la sangre con un grado suficiente de detalle para que el médico pueda reconocer a menudo la necesidad de un posterior examen si verdaderamente fuese éste conveniente. Es posible que muchas de las enfermedades que afectan tanto a los eritrocitos como a los leucocitos, no se detecten mediante pruebas o estudios realizados por equipos automáticos electrónicos, optoelectrónicos o de flujo; sin embargo, se descubren si se practica una extensión de sangre periférica.

Numerosas enfermedades que presentan recuentos sanguíneos normales, pero que en la extensión evidencian el trastorno, se citan en la tabla 4, la gran mayoría de estas enfermedades son detectables por el sistema implementado en este trabajo, y evidencian una vez más la gran capacidad desarrollada por el mismo, junto con ventajas adicionales en comparación con otros métodos automáticos de análisis sanguíneo.

Tabla 4. Enfermedades que pueden presentar un recuento total normal pero que son reveladas en el examen de extendido de sangre periférica.

ENFERMEDAD	HALLAZGOS EN EL EXTENDIDO
Anemia hemolítica adquirida compensada	Esferocitosis, policromatofilia, aglutinación de eritrocitos
Esferocitosis hereditaria	Esferocitosis, policromatofilia
Hemoglobina C	Dianocitos
Rasgos de talasemia	Hipocromía, dianocitos
Eliptocitosis	Eliptocitos
Saturnismo	Punteado basófilo
Anemia perniciosa incipiente	Macrocitosis, neutrófilos hipersegmentados
Mieloma múltiple	Formaciones en pilas de monedas
Malaria	Parásitos en los eritrocitos
Coagulopatía por excesivo consumo	Esquistocitos
Hemólisis mecánica	Esquistocitos
Mononucleosis infecciosa	Linfocitos atípicos
Leucemia linfática crónica	Linfocitosis relativa
Leucemia aguda	Formas blásticas

Como podemos observar las ventajas brindadas por el sistema son muchísimas, su eficacia y confiabilidad para detectar y clasificar células, no solo fue probada, sino que también se probó como herramienta médica práctica en el proceso de diagnóstico patológico.

6. OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES

- Las técnicas de procesamiento digital de imágenes, y de reconocimiento de patrones son idóneas para el desarrollo de un sistema de visión automatizada de células sanguíneas.
- A pesar de que los sistemas de visión automatizada son herramientas poderosas para extraer información acerca de las células, no todos los parámetros necesarios para un buen examen hematológico como los contenidos de hemoglobina y los valores hematocrito, pueden ser extraídos mediante esta técnica.
- La descripción cuantificable de los parámetros físico morfológicos de las células se ha podido lograr gracias a la implementación de sistemas de visión de máquina robustos y confiables. Factores como área, diámetro, redondez y nuclearidad fueron cuantificados con una absoluta precisión gracias a la eficacia en los procedimientos de segmentación.
- Los pocos sistemas que se han desarrollado para el análisis de células sanguíneas funcionan únicamente en células sanas o algunos para distinguir ciertas anomalías que se presentan. Sistemas un poco más completos como el que se presenta en este trabajo, obteniendo buenos resultados, con un rendimiento superior al 98 %, no habían sido aún desarrollados.
- La detección de las células se desarrolló con una muy buena precisión, al igual que la de los núcleos celulares. No obstante cuando ocurren algún tipo de error

durante la preparación de los extendidos, estos aparecen reflejados en el resultado final del clasificador.

- Las redes neuronales operan como unos excelentes clasificadores, dada su alta capacidad para reconocer patrones y para aprender de los ejemplos que se le muestran.
- La escogencia del algoritmo de segmentación fue apropiada ya que se obtienen muy buenos resultados y lo mejor es que es independiente del sistema de iluminación.
- Los coeficientes de correlación brindan información valiosa a la hora de realizar una selección adecuada de las variables características que permiten una estupenda clasificación.
- Dada la forma en como se implementó el sistema, se tiene la posibilidad de ir ampliando las capacidades que presenta el clasificador o lo que es lo mismo el sistema presenta un cierto grado de escalabilidad.
- Las técnicas de microscopía óptica son excelentes a la hora de realizar análisis cuantitativos y cualitativos sobre las células sanguíneas.
- Los operadores de la morfología matemática son herramientas valiosas para realizar el correcto análisis de partículas o *blobs*.
- Con este trabajo queda demostrado que el ingeniero físico puede desempeñar un rol importante a la hora de realizar estudios interdisciplinarios, y que está en la absoluta capacidad de desenvolverse adecuadamente en una gran variedad de áreas del conocimiento humano.

APORTES DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

- Quizá el aporte más importante brindado por este trabajo sea el gran impacto que obtuvo no solo a nivel local sino también en el ámbito internacional, ya que el trabajo de investigación titulado “análisis digital de imágenes microscópicas de células sanguíneas para diagnóstico patológico” y que se presentó en la V Reunión Iberoamericana de Óptica (RIO) y en el VIII Encuentro Latinoamericano de Óptica, Láseres y sus Aplicaciones (OPTILAS) fue reconocido como el mejor trabajo de todos entre más de 590 trabajos presentados de los países de toda Latinoamérica y de otras partes del mundo. Entre los criterios establecidos por los jurados para la selección de los mejores trabajos se encontraron la originalidad, la aplicabilidad y la sustentación del trabajo
- Igualmente en la Sexta Feria Empresarial de la Universidad del Cauca se le otorgó el premio como Mejor Proyecto en el Sector Comunicaciones y Tecnología, confirmando una vez más la gran calidad y efectividad del sistema que se implementó.
- Otro factor importante fue que se despertó en la comunidad estudiantil el deseo de trabajar con proyectos orientados hacia las imágenes médicas o hacia otras ramas de la medicina.
- Para el desarrollo de este trabajo, se lograron abrir las puertas para desarrollar proyectos futuros entre dos áreas distintas del saber humano como la física y la medicina.
- La metodología desarrollada en este trabajo ayudará en la implementación de sistemas cada vez más sofisticados y complejos, con lo que se podrá continuar

trabajando en el progreso de tecnología de punta en esta área del conocimiento.

PERSPECTIVAS Y TRABAJO FUTURO

Pese a que los resultados obtenidos en este trabajo fueron muy satisfactorios, todavía quedan algunos aspectos importantes por tratar y lograr así un sistema mucho más completo, mejorando mucho más su desempeño y ampliando sus posibilidades de operar. Algunos de los aspectos que quedan por tratar son los siguientes:

- Optimización de los algoritmos para mejorar el tiempo de procesamiento y análisis de las imágenes digitales.
- Diseño y construcción de una platina rodante, con el fin de automatizar también la toma de las imágenes de los extendidos.
- Diseño e implementación de un algoritmo de autoenfoco para completar la labor de toma de imágenes.
- Mejorar el sistema de adquisición de las imágenes para poder obtener una mayor resolución de las características internas de las células.
- Ampliar el número de anomalías o casos extraños que se puedan presentar en las células sanguíneas para que puedan ser analizados por el sistema de inspección visual automatizada.
- Trabajar con otras técnicas de la microscopía óptica como la fluorescencia o la microscopía confocal.

- Ampliar la capacidad del sistema y probarlo en otro tipo de examen, como en el de médula ósea.
- Establecimiento de algoritmos de entrenamiento no supervisados para evitar un etiquetado subjetivo y propenso a errores.
- Mejoramiento del algoritmo de segmentación para evitar el aglutinamiento de las células y poder disminuir el costo computacional.
- Realizar aplicaciones en otras ramas de la imagenología médica como las resonancias magnéticas nucleares, rayos X, angiografías o tomografías.

GLOSARIO DE TÉRMINOS MÉDICOS

Anemia: disminución del número de glóbulos rojos en la sangre o de su contenido en hemoglobina.

Blastos: denominación dada a las distintas células precursoras en el proceso de formación o maduración celular y que no se pueden reconocer.

Células madres: células especiales o primitivas, que presentan la capacidad de producir una amplia gama de células maduras distintas.

Citoplasma: conjunto constituido por los orgánulos celulares internos.

Coagulación: proceso fisiológico de la sangre que impide el derramamiento excesivo de sangre o hemorragia.

Concentración de hemoglobina corpuscular media: es la medida de la concentración de hemoglobina en los eritrocitos en g/100 ml.

Eritrocito: glóbulo rojo de la sangre.

Frotis: extendido o preparación de la muestra lista para ser observada al microscopio.

Hematócrito: porcentaje de los volúmenes de los glóbulos rojos, respecto al volumen sanguíneo total.

Hematología: rama de la medicina que estudia la sangre.

Hemoglobina: proteína sintetizada por los eritroblastos, la cual produce la coloración de la sangre.

Hemoglobina corpuscular media: es la relación entre la cantidad de hemoglobina presente en la célula y el número de eritrocitos total.

Leucemia: anomalía de la sangre caracterizada por la proliferación de glóbulos blancos (hasta 1 millón por mm^3) y por la presencia de células anormales que indican una afección grave de los órganos hematopoyéticos. Es el “cáncer” de la sangre.

Leucocito: glóbulo blanco de la sangre, encargado de la defensa del organismo.

Leucocitosis: aumento patológico del número de leucocitos en la sangre.

Leucopenia: disminución patológica del número de leucocitos en la sangre.

Medula ósea: tejido blando presente en el interior de los huesos y que produce las células de la sangre.

Núcleo celular: parte central de la célula, la cual contiene el código genético de la célula.

Patología: rama de la medicina que trata el estudio de las enfermedades.

Reticulocitos: eritrocito joven, de estructura granulosa y filamentosa.

Sangre periférica: es la sangre circundante por las venas y arterias.

Trombocitopenia: disminución patológica de los trombocitos o plaquetas

Valor hematocrito: proporción del volumen sanguíneo que ocupan los eritrocitos

Volumen corpuscular medio: es la relación entre el valor hematocrito y el número de eritrocitos presentes.

REFERENCIAS

1. Restrepo, A. Procesamiento de imágenes médicas. Universidad EAFIT. Medellín. 1999.
2. Flores Miguel; Ramirez José. Aplicación de redes neuronales y técnicas de procesamiento digital de señales para la caracterización de imágenes histológicas. Centro nacional de investigación y desarrollo tecnológico. México. 2002
3. Desco, Manuel. Técnicas avanzadas de imagen en medicina. Medicina Experimental. Hospital General Universitario 'G. Marañón'. Madrid. España.
4. Williams,W; Beutler, E; y otros. Hematología. Salvat Editores. Barcelona, España. 1983.
5. Braunwald, E; Fauci, A; Kasper, D; Hause, S; Longo, D Y Jameson, J. Harrison Principios de Medicina Interna. Mc Graw Hill. 15ª Ed. Madrid. 2002
6. Cotran, R.; Kumar, V.; Robbins, S. Patología Estructural y Funcional Robbins. Mc Graw Hill, 5ª Ed. Madrid, España. 1998
7. Shivdasani, R y Orkin, S. The transcriptional control of Hematopoiesis. 1996
8. Osorio, G. Hematología, técnicas y procedimientos de laboratorio. Santiago de Chile. publicaciones técnicas mediterráneo. 1996

9. Pagani, A; Ramonet, G; y otros. Clasificador de Leucocitos mediante procesamiento digital de imágenes. Universidad Nacional de San Juan, Argentina, 1999.
10. Pinkerton, P; Spence, I; Ogilvie, J; Ronald, W. An assessment of the Coulter Counter Model S.
11. Guclu Ongun, Ugur Halici, Kemal Leblebicioglu, Volkan Atalay, Meral Beksac, Sinan Beksac, "Feature Extraction and Classification of Blood Cells for an automated Differential Blood Count System", IEEE Publication, pp. 2461-2466, 2001.
12. Bensebaa, K., Suzim, A. Image Analysis in Histological Sections. Segmentation and Quantification of Tumor Angiogenesis Areas. Laboratório de Processamento de Sinais e Imagens, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Elétrica Av. Osvaldo Aranha, 103 - sala 208 - Porto Alegre - RS - BRASIL - CEP: 90035-190.
13. Soto, E. La microscopía confocal. Elementos Vol 17. Centro de Ciencias Fisiológicas. Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla. México. 1993.
14. Karo, Gerald. Biología celular. McGraw-Hill 2ª Ed. Madrid. 1992
15. Nikon Microscopy Microphot-FX, Reference manual. Texas. 1984
16. Wilson T., y Sheppard, C.J.R., Theory and practice of Scanning Optical Microscopy, Academic Press, London, England 1984.
17. De la Escalera, A. Visión por Computador: Fundamentos y métodos. Prentice Hall. Madrid, España. 2001

18. Molina, R. Del procesamiento a la visión artificial. Departamento Ciencias de la Computación e I.A. Universidad de Granada. España. 1999
19. Nalwa, V. A guided tour to computer vision . Addison-Wesley 1993
20. Domingo, M. Inspección Visual Automática. Departamento de Ingeniería Automática. Universidad de Santiago de Chile. 2002
21. Pencue, L. Implementación de un sistema de visión artificial para la clasificación y el control de calidad de frutas. Grupo Óptica y Láser. Departamento de Física, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia. 2002.
22. Cardona, J.; Restrepo, F.; Salazar, D. Visión por Computador en sistemas de Calidad. 2000
23. Rapid application development for machine Vision – A new approach. Application Note. National Instruments Corporation. Austin, TX, USA. 1998.
24. Cuebas, F. Técnicas de inteligencia artificial en procesamiento de imágenes. Cuarta conferencia internacional control, instrumentación virtual y sistemas digitales. México. 2002.
25. Aguilera, C. Visión artificial. Laboratorio de sistemas automatizados de producción. CIMUBB. 2002
- 26 Newman, T., Jain, A. A survey of automated visual inspection. Computer Vision and Understanding, Vol. 61.1995.
27. Malamas, E., Petrakis, E., Zervakis, M., Petit, L., Legat J. (2002) A survey on industrial vision systems, applications and tools. Image and Vision Computing.

28. Castleman, K. Digital image processing. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. 1996
29. González, R., Woods, R. Tratamiento digital de imágenes. Addison-Wesley/Días de Santos. Delaware. 1996
30. Janesic, J., Elliot, S., Collins, A., Marsh, H.; Blouke, M. y Freeman, J. Scientific Charge-Couple Devices. Opt. Eng., vol. 26. 1987.
31. Esqueda, J. Fundamentos de procesamiento de imágenes. CONATEC. Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Tijuana, México. 2002.
32. Izaguirre, A. Visión artificial dinámica. Determinación de movimiento a partir de secuencias de imágenes. Universidad del País Vasco, Bilbao, España. 1998.
33. Wu. Y. Segmentation: Clustering, Graph Cut and EM. Advance Computer Vision Notes Series 5. Universidad de North western.
34. Sucar, L.; Gómez, G. Procesamiento de Imágenes y Visión Computacional. Departamento de Computación. Tecnológico de Monterrey. Campus Cuenavaca, México.
35. Forsyth, D., Ponce, J. Computer Vision. A Modern Approach. Prentice Hall. 2002.
36. Barni, M. Cappellini, V., Mecocci, A. Colour-based detection of defects on chicken meat. Image and Vision Computing, Vol. 15. 1997.
37. Sabino, D.; Costa, L.; Martins, S.; Calado, R. y Zago, M. Automatic Leukemia Diagnosis. Acta Microscópica, Vol 12. No 1. Brasil. 2003.

38. Ma, Y.; Dai, R.; Lian, L. y Zhang, Z. An Counting and Segmentation method of Blood Cell Image with Logical and morphological Feature of Cell. Universidad de Lanzhou, Lanzhou, Gansu China.
39. Comaniuci, D.; Meer, P. y Foran, D. Image guided decision support system for pathology. Machine Visions ND Applications. Vol 11:213-224.1999
40. Ongun, G.; Halici, U.; Leblebicioglu, K.; Atalay, V.; Beksac, M. y Sinan Beksac, Feature Extraction and Classification of Blood Cells for an Automated Differential Blood Count System. IEEE Publication, pp. 2461-2466. 2001.
41. Sinha, N. y Ramakrishnan, A. Blood Cell Sementation using EM algorithm. Bio Lab. Departmenf of EE. Instituto Indio de Ciencia, Bangalore, India.
42. Katz, A. Image Analysis and Supervised Learning in the Automated Differentiation of White Blood Cells from Microscopic Images. Department of Computer Science. RMIT. 2000.
43. Markiewicz, T.; Osowski, S.; Moszczyński, L. y Sałat, R, Myelogenous Leukemia Cell Image Preprocessing for Feature Generation. V International Workshop, Computational Problems of Electrical Engineering. 2003.
44. Foran ,D.; Comaniciu, D.; Meer, P. Y Goodell, L. Computer-Assisted Discrimination Among Malignant Lymphomas and Leukemia Using Immunophenotyping, Intelligent Image Repositories, and Telemicroscopy. IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine. Vol. 4. No 4. 2000.
45. Pinzón, R.; Garavito, G.; Hata, Y.; Arteaga, L. y García, J. Desarrollo de un Sistema de Análisis Automático de Imágenes de Extendidos Sanguíneos. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

46. Javelin JE3362. Reference Manual.
47. Leica QWin User Guide. Leica Imaging Systems Ltd. Cambridge. England. 1999
48. Leica QWin Reference Guide. Leica Imaging Systems Ltd. Cambridge. England. 1999
49. Leica QUIPS User Guide. Leica Imaging Systems Ltd. Cambridge. England. 1999
50. Leica QUIPS Reference Guide. Leica Imaging Systems Ltd. Cambridge. England. 1999.
51. Vargas, H. Algoritmo de segmentación topológico para imágenes adquiridas de la tomografía computada y la resonancia magnética. Revista Cubana de Informática Médica. Artículos Originales No 1. 2000.
52. Martín, M. Técnicas Clásicas de Segmentación de Imágenes. 2002
53. Faber. V. Clustering and the Continuous k-Means Algorithm.
54. Pajares, G. y De la Cruz, J. Clasificación de texturas naturales mediante k-means. Revista Electrónica de Visión por Computador. Departamento de Arquitectura de Computadores y Automática. Facultad de Ciencias Físicas. Universidad Complutense. Número 6. 2002.
55. Han, J.; Kamber, M. y Tung, H. Spatial Clustering Methods in Data Mining. A survey. 2001

56. Bradley, P. y Fallad, U. Refining initial points for k-means clustering. Proceedings of the Fifteenth International Conference on Machine Learning. 1998.
57. Yolis, E.; Britos, P.; Sicre, J.; Servetto, A.; García, R. y Perichinsky, G. Algoritmos genéticos aplicados a la categorización automática de documentos.
58. Roerdink, J. y Meijster, A. The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies. Fundamenta Informaticae. 2000.
59. Ortuño, J.; Malpica, N.; Reig, S.; Martínez, R.; Desco, M. y Santos, A. Algoritmo Morfológico de Segmentación de Imágenes de Resonancia Magnética Normales ponderadas en T1. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España. 2001.
60. Facon, J. Morfología matemática: Teoria e Exemplos. Curitiba, Brasil. 1996.
61. Marques, J. Reconhecimento de Padrões. Métodos Estatísticos e Neurais. IST Press, Portugal 1999.
62. Monteiro, A. y Leite, P. Algoritmos Para Reconhecimento De Padrões. Departamento de Engenharia Elétrica. Universidade de Taubate. Brasil. 2002.
63. Ashísh, D. Land-Use Classification of Aerial Images Using Artificial Neural Networks. Universidad de Georgia, Georgia. 2002.
64. Zaknich, A. artificial Neural Networks. An introductory course. 1998.
65. Fizelew, A. generación Automática de Redes Neuronales con Ajustes de parámetros Basado en Algoritmos Genéticos. Facultad de Ingeniería. Universidad de buenos Aires. 2002.

66. Hertz J.; Krogh, A. y Palmer, R. Introduction to the Theory of Neural Computation. Addison-Wesley. 1991.

67. Jain, A.; Jianchanh, M. y Mohiuddin, K. Artificial Neural Networks: a Tutorial. IEEE Computer Special Issue on Neural Computing. 1996.

ANEXOS

1. Artículo presentado en la V RIAO y en el VIII OPTILAS.
 - Análisis digital de imágenes microscópicas de células sanguíneas para diagnóstico patológico
2. Certificado de los ganadores en el V RIAO y el VIII OPTILAS
3. Certificado del sistema como Mejor Proyecto del Sector Comunicaciones y Tecnología en la Sexta Feria Empresarial de la Universidad del Cauca.