

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ADQUISICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE
IMÁGENES DE CROMOSOMAS HUMANOS BANDEADOS MEDIANTE UN
SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL, EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

NILTON ANDRES PÉREZ URBANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYAN**

2008

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ADQUISICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE
IMÁGENES DE CROMOSOMAS HUMANOS BANDEADOS MEDIANTE UN
SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL, EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

NILTON ANDRES PÉREZ URBANO

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

Director:

MSc. Luis Fernando Echeverri

Asesora

MSc. Sulma Muñoz Benítez

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYAN**

2008

2

Nota de aceptación:

Director: Luis Fernando Echeverri. Mg. Sc

Jurado: Rosa Elvira Álvarez. Esp.

Jurado: Sandra Milena Roa Martínez. Ing.

Fecha de sustentación: Popayán, 19 de noviembre del 2008

Dedicado a mis padres y a mí hermana

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a:

- A los integrantes del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca por abrirme sus puertas y permitirme desarrollar este estudio bajo su orientación y colaboración, principalmente a la MSc. Sulma Muñoz Benítez, directora de la Unidad de Genética, por sus enseñanzas, por su esmero en la consecución de los nuevos equipos, por permitirme utilizarlos y facilitarme las muestras de los pacientes para la realización de la clasificación de cromosomas humanos.
- Al Ingeniero Miguel Latorre, jefe del Área de Equipos de la Universidad del Cauca, por las diligencias realizadas en la adquisición de los nuevos equipos, así como también por sus consejos y sugerencias.
- Al Ingeniero Luís Ernesto Garreta, profesor de la Facultad de Ingeniería Electrónica, por colaborarme al inicio de este proyecto con la obtención tanto de textos relacionados con el procesamiento digital de imágenes como de artículos concernientes a la clasificación de cromosomas humanos mediante el empleo de técnicas de tratamiento digital de imágenes.
- A los profesores del Departamento de Física por su esfuerzo y dedicación en la impartición de sus enseñanzas a lo largo de la carrera.
- A mi Director Luís Fernando Echeverri, al Ing. Leonairo Pencue, y al Ing. Mario Patiño por sus sugerencias y consejos brindados durante el desarrollo de este

trabajo que me permitieron analizar y resolver los problemas que se presentaron desde diferentes puntos de vista.

- A la MSc Sonia Gonzáles, del Departamento de Morfología, por las sugerencias realizadas para la toma de las fotografías y por permitirme utilizar su cámara digital y tubo de acople para la realización de las pruebas.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION.....	22
OBJETIVOS	25
1. MARCO TEÓRICO.....	26
1.1 ASPECTOS CITOGENETICOS	26
<i>1.1.1 EL CICLO CELULAR.....</i>	<i>27</i>
1.1.1.1 La interfase.	27
1.1.1.2 La mitosis.....	27
1.1.1.2.1 Profase.	28
1.1.1.2.1 Metafase.	28
1.1.1.2.2 Anafase.....	28
1.1.1.2.3 Telofase.	28
<i>1.1.2 LOS CROMOSOMAS.</i>	<i>29</i>
<i>1.1.3 TECNICAS DE ANALISIS DE CAMBIOS GENETICOS.....</i>	<i>30</i>
1.1.3.1 Citogenética convencional.	30
1.1.3.1.1 Bandeado de resolución estándar.....	32
1.1.3.1.2 Bando de alta resolución	32
1.1.3.1.3 Preparación de las células para obtener el material cromosómico.	34
1.1.3.2 Citogenética molecular.	35
<i>1.1.4 ANÁLISIS CROMOSOMICO.....</i>	<i>36</i>
1.1.4.1 La posición del centrómero.	37
1.1.4.1.1 Metacéntricos	37
1.1.4.1.2 Submetacéntricos	37
1.1.4.1.3 Acrocéntricos	37
1.1.4.2 Organización.....	38
1.1.4.3 Idiograma.....	38
1.1.4.4 Realización del cariotipo.....	40
1.2. PARAMETROS FUNDAMENTALES DE UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL	41

<i>1.2.1 PARAMETROS ÓPTICOS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA IMAGEN</i>	42
1.2.1.1 Resolución.	42
1.2.1.1.1 Campo de visión (FOV).....	44
1.2.1.1.2 Tamaño del sensor y número de píxeles en el sensor.....	44
1.2.1.1.3 Distancia focal de la lente.	44
1.2.1.2 Contraste.	45
1.2.1.3 Profundidad de campo o zona de enfoque (PDC)	45
1.2.1.4 Errores de Perspectiva.....	45
1.2.1.5 Distorsión.....	46
1.2.1.6 Iluminación.	46
<i>1.2.2 PARAMENTROS ELECTRONICOS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE UN IMAGEN DIGITAL.</i>	
.....	48
1.2.2.1 Resolución espacial de la imagen (píxeles / área o Puntos por pulgada).....	50
1.2.2.2 Resolución cromática (profundidad de bits o de color).....	52
1.2.2.3 Rango dinámico (niveles de grises)	53
<i>1.2.3 CRITERIOS A CONSIDERAR EN LA ELECCION DE UNA CAMARA DIGITAL.</i>	54
1.2.3.1 Sensor.	54
1.2.3.2 Sensores CCD vs. CMOS.	55
1.2.3.3 Entrelazado vs. Exploración continúa.	58
1.2.3.4 Exploración de área o superficie vs. Exploración lineal.....	58
1.2.3.5 Cámaras Análogas vs. Digitales.....	59
1.2.3.6 Cámaras Monocromáticas vs. Color.	61
1.2.3.7 Velocidad de cuadro vs. Velocidad de obturación.	63
1.2.3.8 Especificación de resolución / contraste del CCD.....	63
1.2.3.9 Relación señal-ruido (RSR)	64
1.2.3.10 Tiempo de integración o de exposición.....	65
1.2.3.11 Ganancia o sensibilidad (velocidad ISO)	65
1.2.3.12 Parámetro Gamma.	66
<i>1.2.4 ADAPTACIÓN DE LA CÁMARA AL MICROSCOPIO.</i>	66
<i>1.2.5 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.</i>	67
1.2.5.1 Operaciones individuales o Procesamiento de punto.	68
1.2.5.2 Operaciones de vecindad o procesamiento por mascarar o filtrado.	68
1.2.5.3 Preprocesado de la imagen.....	70
1.2.5.3.1 Técnicas de mejora por procesamiento de punto.	70
Operadores aritméticos.	71
Manipulación del histograma de la imagen	71
1.2.5.3.2 Técnicas de mejora por operaciones de vecindad.	74
Operaciones de suavizado.....	74
1.2.5.4 Segmentación de la imagen.....	75

1.2.5.4.1 Extracción de bordes, esquinas y puntos de interés.	76
1.2.5.4.2 Extracción de regiones.....	76
1.2.5.5 Representación y descripción de la imagen.....	77
1.2.5.5.1 Descripción de líneas y contornos.	78
1.2.5.5.2 Descripción de regiones.....	78
Propiedades topológicas.....	78
Propiedades métricas.....	79
Descripciones basadas en irregularidades.....	79
Textura.....	79
1.2.5.5.3 Operadores morfológicos.....	80
1.2.5.5.4 Operadores lógicos.....	81
1.2.5.6 Reconocimiento de patrones: Estimación, agrupación y clasificación.....	82

3. METODOLOGÍA E IMPLEMENTACIÓN85

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	85
3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS UTILIZADOS.....	85
3.3 DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE.....	87
3.4 ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES.....	89
3.5 DESCRIPCIÓN DEL SOFTWARE.....	92
3.6 CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO DE IMÁGENES DE CROMOSOMAS, ANÁLISIS Y PROBLEMA DE CLASIFICACIÓN.....	93
3.6.1 <i>Mejoramiento de la imagen.</i>	96
3.6.2 <i>Segmentación de la imagen.</i>	98
3.6.2.1 Umbralización óptima o método de Otsu.....	98
3.6.3 <i>Separación de cromosomas unidos y solapados.</i>	101
3.6.4 <i>Eliminación de objetos extraños.</i>	102
3.6.5 <i>Orientación del cromosoma.</i>	104
3.6.6. <i>Determinación o ubicación del centrómero.</i>	106
3.6.6.1 Transformada de la distancia.....	106
3.6.6.2 Adelgazamiento (también llamado esqueletización).....	109
3.6.6.2.1 Adelgazamiento por operaciones morfológicas.....	111
3.6.6.2.2 Transformación del eje intermedio (TEI).....	112
3.6.6.3 Transformada watershed.....	113
3.6.6.3.1 Transformada watershed controlada con el uso de marcadores.....	115
3.6.7 <i>Extracción de las características de cada cromosoma (longitud, índice centromérico y perfil de densidad.</i>	119
3.6.8. <i>Procedimiento de clasificación.</i>	121
3.6.8.1 Agrupamiento K-medias.....	122

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	128
5. CONCLUSIONES.....	142
6. RECOMENDACIONES	144
BIBLIOGRAFIA.....	145

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los cromosomas humanos.	38
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los distintos tipos de Iluminación.	47
Tabla 3. Profundidad de color.	53
Tabla 4. Características de los sensores CCD y CMOS.	57
Tabla 5. Tipos de exploración usadas en la exposición.	58
Tabla 6. Formas de distribución de los píxeles.	59
Tabla 7. Cámaras análogas vs. Digitales.	60
Tabla 8. Monocromático vs. Color.	62
Tabla 9. . Cámaras digitales convencionales utilizadas en el proyecto.	86
Tabla 10. Porcentaje de acierto de la clasificación de cada cromosoma en varias metafases.	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema del ciclo celular.	27
Figura 2. Esquema general de un cromosoma.	29
Figura 3. Evaluación de la resolución de una metafase. a) Cromosomas 7 con resolución inferior a las 400 bandas, b) cromosomas 7 con resolución aproximadamente igual a las 400 bandas, c) cromosomas 10 con resolución inferior a las 550 bandas, d) cromosomas 10 con resolución aproximadamente igual 550 bandas.	31
Figura 4. Cariotipo con bandeo G de resolución estándar.	32
Figura 5. Cariotipo con bandeo de alta resolución.	33
Figura 6. Cariotipo obtenido con técnicas de hibridación “in situ”	36
Figura 7. Clasificación de cromosomas según posición del centrómero.	37
Figura 8. Juego completo de cromosomas en el hombre.	38
Figura 9. Idiograma.	39
Figura 10. Idiogramas de los cromosomas 1, 9 y 14.	40
Figura 11. Cariotipo.	40
Figura 12. Componentes de un sistema de visión artificial.	42
Figura 13. Parámetros que afectan la calidad de una imagen.	43
Figura 14. Representación geométrica de la variación de la abertura.	45
Figura 15. Ilustración de distorsión negativa (barril) y positiva (acerico)	46
Figura 16. Descomposición de la imagen en una matriz de m x n puntos. El píxel en la fila i y la columna j tiene una intensidad igual $f(i, j)$	49
Figura 17. Relación Calidad de la imagen vs. Resolución.	49
Figura 18. Variación de la calidad de la imagen al cambiar el tamaño.	51
Figura 19. Variación de la calidad de la imagen a distintas resoluciones de pantalla.	51

Figura 20. Variación de la profundidad del color según el número de bits.....	52
Figura 21. Rango dinámico de una imagen.....	54
Figura 22. Sensor.....	55
Figura 23. a) Esquema de funcionamiento de un CCD. b) Esquema de funcionamiento de un CMOS	56
Figura 24. Métodos de filtración de cámaras CCD de color. a) Mascara de Bayer. B) luz separada mediante un prisma.	62
Figura 25. Esquema de acople entre una cámara fotográfica y el microscopio.	67
Figura 26. Aplicando la mascara a la imagen.	69
Figura 27. Etapas del procesamiento digital de imágenes.....	70
Figura 28. Montaje del sistema de visión artificial.	87
Figura 29. Cámara digital Canon PowerShot A460 y tubos de acople entre la cámara y el microscopio.	88
Figura 30. Tarjeta importadora de video empleada.....	89
Figura 31. Fotografías con a) Sin filtro violeta, b) Filtro violeta, c) Filtro verde.....	90
Figura 32. Fotografías a) Aumento 100x, b) Aumento 400X.	91
Figura 33. Fotografías a) tomada en modo automático, b) tomada en modo manual.	92
Figura 34. Diagrama de flujo del algoritmo de clasificación.....	94
Figura 35. Imagen separada en los tres planos (rojo, verde y azul) con sus histogramas asociados.....	95
Figura 36. a) Plano verde, b) Contraste aumentado, c) Imagen mejorada.	97
Figura 37. Diagrama de flujo de las técnicas para realzado de la imagen.	98
Figura 38. Imagen umbralizada utilizando el método de Otsu.	101
Figura 39. Cromosomas separados por el usuario.....	102
Figura 40. Separación de cromosomas solapados.	103
Figura 41. Cromosomas rotados por el programa según posición del centrómero.	105
Figura 42. Orientación de los cromosomas corregida por el usuario.	106

Figura 43. Transformada de la distancia de una forma simple usando la distancia métrica 'chessboard'.....	107
Figura 44. Distancias métricas empleadas para hallar la transformada de la distancia.....	108
Figura 45. Transformada de la distancia de una forma simple con una protuberancia.....	109
Figura 46. Esqueleto de un rectángulo.....	110
Figura 47. Transformada watershed. a) Imagen en niveles de gris, b) imagen en 3-D, en c) y d) formación de líneas watershed.....	114
Figura 48. Segmentación watershed controlada por gradiente y marcadores. ...	116
Figura 49. Ubicación del centrómero. a) Transformada de la distancia de la imagen binaria, b) resultado de aplicar la transformada watershed, c) centrómero ubicado, d) brazos adelgazados del cromosoma.....	119
Figura 50. Determinación del perfil de densidad. a) Imagen en escala de grises, b) ejes longitudinales a partir de los cuales se obtiene el perfil, c) perfil de densidad, e) imagen 3-D del cromosoma.....	120
Figura 51. a) Clasificación realizada por el programa con los números asignados a la metafase. b) Clasificación del programa con números azules y la clasificación correcta con números en verde. c) Cariotipo realizado por el citogenetista.....	126
Figura 52. Fotografías donde se aprecia coloración muy tenue en las muestras y escasez de contraste.....	128
Figura 53. Parejas de cromosomas que presentan el centrómero difuso y distinto longitud entre cromosomas homólogos.....	137
Figura 54. Pares de cromosomas que presentan diferente grado de palidez entre cromosomas homólogos.....	137
Figura 55. Metafases que presentan cromosomas pegados, solapados y desechos celulares.....	139
Figura 56. Cromosomas torcidos.....	140

GLOSARIO

ACERICO O ACERILLO: Almohadilla para clavar alfileres y agujas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico: Material genético del núcleo de las células vivas de estructura y moléculas gigantes, constituido por muchos segmentos de información llamados genes.

ARN: Ácido ribonucleico Polímero componente de las células vivas, que desempeña importante papel en la síntesis proteínica

ANEUPLOIDÍAS: Hace referencia a cambios en el número de cromosomas, que pueden dar lugar a enfermedades genéticas. La aneuploidía se puede observar frecuentemente en células cancerosas.

ASTERES: Es un órgano de la célula formado por filamentos que parten de la centrosfera y forman la envoltura más exterior del centrosoma.

AUTOSOMAS: Son los 22 pares de cromosomas, excluidos los sexuales (X e Y)

BANDEO CROMOSOMICO: Proceso específico de tinción cromosómica que produce patrones de bandas característicos (p. ej. bandas G)

BANDEO DE ALTA RESOLUCION: Bando cromosómico que emplea cromosomas en profase o en prometafase, más alargados que los cromosomas en metafase y que por ello proporcionan más bandas y mayor resolución.

BLOOMING: Efecto por el cual si un fotodiodo de un CCD se satura demasiado puede afectar a otros fotodiodos próximos a él creando efectos indeseados. Esto no se produce en el sensor CMOS ya que en él no hay transferencia de carga entre los diferentes fotodiodos.

CARIOTIPO: Es una tabla patrón que presenta fotografías de los 46 cromosomas humanos obtenidos de una sola célula, ordenados de acuerdo con su tamaño y forma, el cual es utilizado para analizar su aspecto y características morfológicas para propósitos de diagnóstico.

CARIOTIPO ESPECTRAL: Visualización de cromosomas (cariotipo) en la cual se emplean combinaciones de sondas fluorescentes, con cámaras especiales y programas de procesamiento de imagen, de modo que cada cromosoma presente un único color.

CÉLULAS SOMÁTICAS: Son aquellas que forman el conjunto de tejidos y órganos de un ser vivo, procedentes de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que sufren un proceso de proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis.

CENTRIOLO: Estructura celular que facilita la separación de los cromosomas durante la meiosis y la mitosis.

CITOCINESIS: Es la separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular. Se produce después de la cariocinesis, y al final de la telofase, en la división celular mitótica. Su mecanismo es distinto en la célula animal (por estrangulación) o vegetal (por tabicación)

COLCHICINA: Es un fármaco antimitótico que detiene o inhibe la división celular en metafase o en anafase.

CONVEXIDAD: Curvatura en la parte central de una superficie o de una línea, que es mas prominente hacia el lado del que mira.

CROMATINA: Material del núcleo celular que constituye los cromosomas.

CROMATIDA: Es una de las unidades longitudinales de un cromosoma duplicado, unida a su cromátida hermana por el centrómero.

DEFICIENCIA CONVEXA: Una vez hallada la envoltura H mas pequeña que contenga a un objeto S , la deficiencia convexa es la diferencia entre H y S .

DELECCIONES: Eliminación de una porción del genoma.

ENVENTANADO: Es sabido que los CCD funcionan a su máxima resolución en la gran mayoría de dispositivos, en cambio los CMOS dado su carácter individualizado de cada píxel, permiten seleccionar más fácilmente porciones de la imagen, esto permite mas refresco en modos de video o bien tomar imágenes a menor resolución sin interpolación.

ENVOLTURA CONVEXA: Se define la envoltura convexa de un conjunto de puntos X de dimensión n como la intersección de todos los conjuntos convexos que contienen a X .

FLUOROCROMO: Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente.

FLUIDO AMNIÓTICO: Es un fluido acuoso que rodea y amortigua al feto en desarrollo en el interior del saco amniótico.

GAMETO: Nombre que se asigna a las células sexuales.

HETEROMORFISMO: Variantes ocasionales de la morfología (en forma o tamaño) o diferencias en la tinción de un cromosoma morfológicamente normal.

HEURÍSTICA: Se denomina heurística a la capacidad de un sistema para realizar de forma inmediata innovaciones positivas para sus fines. La capacidad heurística es un rasgo característico de los humanos, desde cuyo punto de vista puede describirse como el arte y la ciencia del descubrimiento y de la invención o de resolver problemas mediante la creatividad y el pensamiento lateral o pensamiento divergente.

HIBRIDACION IN SITU: Mapeo de un gen por hibridación molecular de una secuencia de ADN clonado marcada con radiactividad o fluorescencia en una extensión cromosómica o un núcleo celular colocados en un porta.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (CGH): Técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) utilizada para comparar dos muestras diferentes de ADN en términos de dosis génica, especialmente útil en el estudio de los cambios cromosómicos en células cancerosas.

HISTONAS: Proteínas asociadas con el ADN en los cromosomas.

HUSO ACROMATICO: Es el conjunto de microtúbulos que fijan los cromosomas durante la mitosis.

INVERSIONES: Una parte del cromosoma se rompe y se reorienta en dirección opuesta (180°) antes de reasociarse, con lo que dicha secuencia aparece invertida.

ISOCOROS: Fragmentos largos de ADN que muestran una composición de base uniforme.

MITOCONDRIAS: Son orgánulos, presentes en prácticamente todas las células eucariotas, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular; actúan por tanto, como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Realizan, además, muchas otras reacciones del metabolismo intermediario, como la síntesis de algunos coenzimas.

NUCLEOLOS: Gránulos constituidos por ácido ribonucleico ubicados hacia la región central del núcleo. Son cuerpos densos de forma redondeada que carecen de membrana.

NÚMERO DIPLOIDE: Numero constante de cromosomas característicos, que posee cada célula somática de una especie animal o vegetal.

NUMERO HAPLOIDE: Numero de cromosomas de un gameto normal, que tiene un solo miembro de cada par cromosómico. El número haploide en humanos es 23.

POLISACARIDOS: Son biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reserva energética y estructural.

REPLICACIÓN: Proceso por el cual las moléculas de ADN forman duplicados exactos de si mismas.

TRANSLOCACIONES: Cuando una porción de un cromosoma se transfiere a otro cromosoma. Hay dos tipos principales de translocaciones: la translocación recíproca, en la que se intercambian segmentos de dos cromosomas distintos, y la translocación Robertsoniana, en la que dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, 22) se fusionan por sus centrómeros (fusión céntrica).

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA: Es aquella que tiene menor concentración de soluto en el medio externo en relación al medio citoplasmático de la célula número modal (número cromosómico observado con mayor frecuencia)

REFLEXION ESPECULAR: la reflexión especular es la reflexión de la luz de una superficie donde la reflexión incidente se refleja (solamente) en un ángulo igual al ángulo de incidencia (ambos tomados con respecto a la perpendicular en ese punto). Tal comportamiento es descrito por la ley de Snell.

REGLAS HEURÍSTICAS: actúan como impulsos generales dentro del proceso de búsqueda y ayudan a encontrar, especialmente, los medios para resolver los problemas.

SPLINES: es una curva definida a trozos mediante polinomios.

RESUMEN.

En este trabajo se describe un sistema de visión artificial que fue diseñado y desarrollado con el fin de suministrar mayor agilidad al proceso de obtención de cariotipos a partir de metafases extendidas. Con este sistema, compuesto de una cámara fotográfica digital se obtienen las imágenes de metafases de cromosomas que son procesadas en el computador mediante una aplicación software desarrollada bajo el entorno de Matlab, con la cual se realiza de manera interactiva la identificación y clasificación de cromosomas humanos bandeados. Para el diseño del algoritmo se aprovecho al máximo el conocimiento y experiencia del citogenetista en el análisis visual y clasificación del cromosoma, tratando de incorporar mediante procedimientos apropiados (algoritmos), las reglas heurísticas utilizadas por el citogenetista para la clasificación de los cromosomas.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha observado el gran auge, desarrollo y aplicabilidad que han tenido las cámaras fotográficas digitales y los programas de procesamiento de imágenes en diferentes ámbitos como la astronomía, la industria, la medicina, la biología, etc. convirtiéndose en herramientas versátiles y económicas para el desarrollo de sistemas de visión artificial que han permitido dar soluciones a diversos problemas. Aprovechando la capacidad que poseen las máquinas para procesar información de manera rápida y con mayor exactitud, estas se adaptan bien para la realización de tareas que son laboriosas, repetitivas, aburridas y de mucho consumo de tiempo para una persona, evitándose que los resultados de dichas tareas se vean afectadas por la eficiencia, destreza y estado de ánimo del ser humano. Además, el desarrollo de nuevas técnicas de procesamiento de imágenes y el avance en el campo de la inteligencia artificial, han permitido que un mayor número de problemas que antes parecían imposibles de resolver, ahora sean cosa del pasado.

Para las personas que trabajan en el dominio de la genética, biología, medicina y afines, el análisis de los cromosomas es de gran utilidad, pues permite no solo diagnosticar alteraciones y enfermedades en los individuos tratados, sino también llevar a cabo investigaciones tendientes a determinar sus posibles orígenes y métodos de prevención o cura. Dicho análisis requiere de imágenes de buena calidad, para el reconocimiento y organización de los cromosomas en una imagen, con el fin de establecer el cariotipo de un individuo de tal forma que características como el tamaño, la ubicación del centrómero y patrón de bandas sean fácilmente visibles. Pero la tarea de clasificación de los cromosomas para obtener el cariotipo, es pesada, difícil y de considerable consumo de tiempo para el

citogenetista. La naturaleza tediosa de su obtención de forma manual ha motivado a muchos investigadores de procesamiento de imágenes y visión por computador a buscar técnicas semiautomáticas o automáticas de procesamiento de imágenes para elaborar el cariotipo. Por más de 25 años médicos, físicos, matemáticos, ingenieros y científicos en ciencias de la computación han tratado dicho problema. En un importante sentido el cariotipo automático fue uno de los primeros problemas de análisis de imagen digital y reconocimiento de patrones gráficos. En todos estos años se ha realizado un considerable esfuerzo de investigación en este campo por tratarse de un problema complejo y a la vez importante. En estos estudios, las estrategias utilizadas por los citogenetistas han sido incorporadas mediante algoritmos, para realizar la clasificación de los cromosomas. Aunque los resultados reportados son alentadores, el cariotipo automático es considerado todavía una tarea difícil debido principalmente a la alteración de la forma, originada por la naturaleza no rígida de los cromosomas que les da apariencias imprevisibles dentro de las fotografías, haciendo que las aplicaciones software requieran la intervención humana para lograr obtener un buen cariotipo.

El objetivo principal de este trabajo fue la incorporación de nueva tecnología en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca, para efectuar de una manera más rápida, sencilla y económica la adquisición de las imágenes, evitándose la cantidad de tiempo y el costo que conllevaba el proceso de revelado de la fotografía adquirida con la cámara de rollo. Además, con los microscopios con que cuenta el laboratorio y aprovechando la variedad de prestaciones de las cámaras fotográficas digitales convencionales actuales, se pueden realizar fotomicrografías de una calidad razonable. Igualmente, mediante la aplicación software desarrollada bajo el entorno de Matlab, se evita al citogenetista tener que hacer tareas agobiantes y demoradas como el recorte y ordenado de los cromosomas permitiéndole enfocarse más en el análisis de alteraciones cromosómicas y realizar de una manera más rápida y segura un diagnóstico de

posibles anomalías. Por último, el sistema incorporado ofrece la ventaja de ser mejorado de acuerdo a los avances tecnológicos.

Aunque si bien es cierto que en la actualidad se cuenta con sistemas comerciales que realizan este trabajo, su alto costo hace que solo instituciones con grandes recursos económicos puedan adquirirlos. Además, su complejidad ofrece un margen estrecho de posibilidades para su mejoramiento, teniendo que ser reemplazado por completo ante una posible falla. Por otra parte, el usuario que lo manipule debe tener conocimientos básicos acerca de técnicas de procesamiento de imágenes, para darle un uso adecuado a las herramientas que brinda la aplicación software para garantizar un buen resultado y desempeño del sistema.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar el proceso de adquisición y clasificación de imágenes de cromosomas humanos bandeados mediante la implementación de un sistema de visión artificial, en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Salud

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar las características y criterios básicos de identificación y clasificación de cromosomas en los que se basa el citogenetista para la elaboración de cariotipos.
- Investigar los diferentes dispositivos para la adquisición de imágenes de cromosomas que permitan obtener imágenes de buena calidad, en menos tiempo y que sean económicos.
- Desarrollar una herramienta software de identificación y clasificación de cromosomas humanos mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ASPECTOS CITOGENÉTICOS

Todas las células tienen cromosomas, los cuales se encuentran en el núcleo en número constante para cada especie. Cada célula somática normal en la especie humana tiene 46 cromosomas, lo que constituye su número diploide o par de cromosomas $2n$. Los gametos solo tienen 23 cromosomas, que es el número haploide o simple n en el humano. Los 46 cromosomas se distribuyen por pares y los dos que forman cada par se denominan homólogos. De los 23 pares, 22 se encuentran tanto en las células masculinas como femeninas y se llaman autosomas y el otro par, denominados cromosomas sexuales o gonosomas, son dos cromosomas X en la Mujer (46,XX) y un Y en el varón(46, XY).

El número de cromosomas se mantiene constante en las células somáticas por el fenómeno de la división llamado mitosis y se reduce a la mitad en los gametos por la división conocida como meiosis. Fallas en cualquier de estos dos procesos ocasionan las alteraciones en el número de los cromosomas. También agentes de diversa índole puede alterar la morfología de los cromosomas dando por resultado aberraciones de tipo estructural. Por lo tanto, la citogenética es el estudio de los cromosomas y sus alteraciones (estructurales o numéricas) y las enfermedades relacionadas con estas alteraciones.

1.1.1 EL CICLO CELULAR

Desde que una célula 'nace' hasta que se divide en dos células hijas transcurre un periodo de tiempo, llamado ciclo celular (ver Figura 1) En cada ciclo celular hay dos etapas: la interfase y la mitosis.

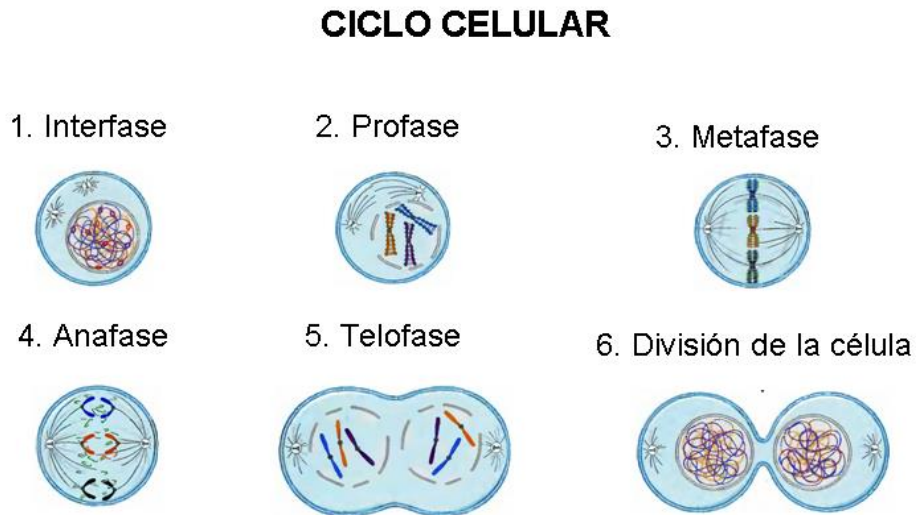


Figura 1 Esquema del ciclo celular.

1.1.1.1 La interfase. Es el periodo de reposo que experimenta una célula entre división y división. Los cromosomas aparecen como filamentos delgados y extendidos. Durante la interfase, la célula crece y copia las estructuras que la forman, como las mitocondrias o los cloroplastos, y cuando esta a punto de terminar, las moléculas de ADN (genes) se duplican mediante un proceso llamado replicación y los cromosomas se reproducen, es decir, cada cromosoma origina un cromosoma hijo o cromátida. Las dos cromátidas de un cromosoma se mantienen unidas por el centrómero. Cada uno de los dos centríolos se aparea con un centríolo hijo de tamaño menor.

1.1.1.2 La mitosis. Una vez que la célula ha realizado durante la interfase una copia de su ADN, entra en un proceso de división celular, que recibe el nombre de mitosis. Durante la mitosis, la célula se divide y da lugar a dos células hijas, cuyo

número de cromosomas es igual al de la célula madre. La mitosis se divide en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase.

1.1.1.2.1 Profase. Al principio de la profase los cromosomas llegan a ser diferentes por primera vez. Ellos se vuelven poco a poco más cortos a través de un proceso de contracción o condensación (la cromatina se condensa y aparecen los cromosomas) La membrana del núcleo se rompe y empieza a desaparecer junto con los nucleolos. Aparecen los asteres y los centríolos se separan aun más. Entre los centríolos aparecen filamentos que le dan mayor forma al huso acromático. Cada cromosoma reaparece constituido de dos cromátidas adheridas a un centrómero. Mientras están juntos, es común llamar a cada parte del cromosoma duplicado, cromátida hermana. Esto no debe confundirnos, cada una de las "cromátidas hermanas" es un cromosoma completo.

1.1.1.2.1 Metafase. La membrana nuclear ha desaparecido y el huso se extiende entre los polos de la célula. Es el periodo en el que los cromosomas se colocan a la misma distancia de los polos, en un plano perpendicular al huso acromático, y se doblan en forma de horquilla.

1.1.1.2.2 Anafase. Cada cromosoma se divide en dos, permitiendo que las cromátidas hermanas (cromosomas hijos) se separen y se aparten en dos grupos atraídos hacia los polos opuestos de la célula.

1.1.1.2.3 Telofase. Los cromosomas se alargan y desarrollan formando la cromatina. Desaparecen los asteres y el huso. Se produce un estrangulamiento en la parte central de la célula que termina dividiéndola en dos; el proceso se llama citocinesis. Reaparecen los nucleolos y se forma una membrana nuclear alrededor de los cromosomas agrupados en cada polo celular. En la última fase de la mitosis, el citoplasma se divide en dos y se forman dos células hijas. Terminado el

proceso, las células entran nuevamente en interfase o periodo de reposo. Ahora, cada célula hija entra en un nuevo ciclo celular.

La mitosis asegura que cada una de las células de un organismo pluricelular tenga el mismo número de cromosomas que las demás y, de esa manera, se conserve la información genética que determina las características del organismo [10], [26].

1.1.2 LOS CROMOSOMAS. Los cromosomas son los portadores de la mayor parte del material genético y condicionan la organización de la vida y las características hereditarias de cada especie. Son estructuras complejas localizadas en el núcleo de las células, compuestas por ADN, histonas y otras proteínas, ARN y polisacáridos. Son básicamente los "paquetes" que contienen el ADN. La función de los cromosomas es conservar, transmitir y expresar la información genética que contienen. Las alteraciones en la forma, tamaño y distribución de los mismos influyen en la aparición de células anormales y consecuentemente en la aparición de individuos con características genéticas alteradas.

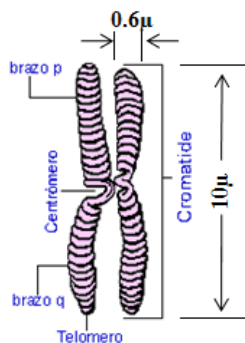


Figura 2. Esquema general de un cromosoma.

Normalmente los cromosomas no se pueden ver con un microscopio óptico, pero durante la división celular se condensan lo suficiente como para poder ser fácilmente analizados a 100X. Bajo el microscopio, los cromosomas se ven como estructuras delgadas y alargadas, constituidos por dos cromátidas hermanas

idénticas en grosor, longitud y con igual información genética, dichas cromátidas presentan un estrechamiento o constricción primaria, menos teñido que el resto del cromosoma, llamada centrómero (ver Figura 2), el cual determina el largo de los brazos del cromosoma. El brazo corto se designa como p y el brazo largo como q. Cada brazo se nombra por el número del cromosoma al que pertenece, seguido de la letra p o q. Por ejemplo, 6p es el brazo corto del cromosoma 6, 8q el brazo largo del cromosoma 8, etc. Por convención, en los diagramas se colocan los cromosomas alineados por el centrómero y con el brazo p siempre hacia arriba [40].

1.1.3 TECNICAS DE ANALISIS DE CAMBIOS GENETICOS. Cuando no existían las técnicas de bandeo cromosómico era muy difícil diferenciar unas parejas cromosómicas de otras en algunas especies, ya que el único criterio para ordenarlos era el tamaño y la posición relativa del centrómero (longitudes relativas de cada brazo) Hoy en día, existen varios métodos desarrollados para el análisis de cariotipo.

- Citogenética convencional: Técnicas de bandeo de resolución estándar y de alta resolución (AR)
- Citogenética molecular: Hibridación in situ fluorescente (FISH), hibridación in situ fluorescente multicolor (M-FISH o SKY) y la hibridación genómica comparada (CGH)

Estas últimas metodologías representan una auténtica revolución en el área de la genética, dado que han permitido mejorar la sensibilidad y la precisión de los diagnósticos citogenéticos. Estas son utilizadas como complemento de las primeras.

1.1.3.1 Citogenética convencional. La tinción de las muestras puede realizarse por diversas técnicas de bandeo cromosómico y en diferentes tejidos. Utilizando estas técnicas de forma rutinaria en laboratorios de citogenética, se puede

observar en los cromosomas bandas pálidas y oscuras alternativamente, que definen grandes regiones cromosómicas llamadas isocoros (ver Figura 3) Este bandeo o bandeo de cromosomas no es consecuencia de agrupamientos fortuitos, sino que esta relacionado con la organización estructural del genoma, reflejando variaciones tales como la composición de bases, grado de condensación cromosómica, conformación de la cromatina, secuencias repetitivas y no transcritas, etc. Como menciona Cabrera, los patrones de bandas de cada cromosoma son prácticamente idénticos en células diferentes, y en casi todos los tejidos, pero pueden diferir entre individuos, por ejemplo, al menos 12 cromosomas muestran variaciones en la longitud de ciertos segmentos en distintas personas¹

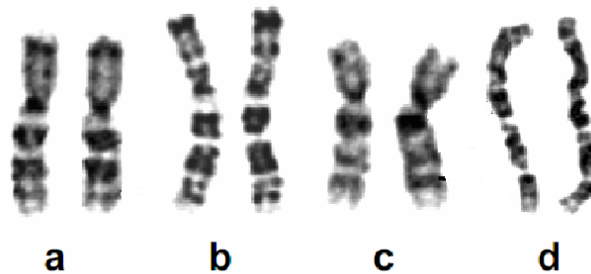


Figura 3. Evaluación de la resolución de una metafase. a) Cromosomas 7 con resolución inferior a las 400 bandas, b) cromosomas 7 con resolución aproximadamente igual a las 400 bandas, c) cromosomas 10 con resolución inferior a las 550 bandas, d) cromosomas 10 con resolución aproximadamente igual 550 bandas.

A la menor resolución ya se pueden distinguir zonas claras y oscuras en posiciones constantes y características para cada cromosoma (ver Figura 3 y Figura 4) Esas bandas se enumeran partiendo desde el centrómero para ambos brazos. Empleando técnicas de mayor resolución se pueden observar zonas claras y oscuras dentro de cada banda principal. En función de la resolución cromosómica alcanzada, las bandas principales se subdividen sucesivamente en mas bandas (ver Figura 10). A todas ellas se les asigna un nombre, que incluye el

¹ CABRERA, José; SANCHEZ, Ángel; HERRÁEZ, Miguel. Biología molecular e ingeniería genética. Ciudad: Elsevier España, 2001. 467 p. ISBN 8481745057

cromosoma, el brazo y un número correlativo desde el centrómero hacia los extremos.

1.1.3.1.1 Bandedo de resolución estándar. Esta metodología de bajo costo, permite el análisis detallado de todos los cromosomas, la detección anomalías numéricas y estructurales. Las anomalías numéricas (aneuploidías) implican la pérdida y/o ganancia de uno o varios cromosomas completos y puede incluir tanto a autosomas como a cromosomas sexuales. Las anomalías estructurales implican cambios en la estructura de uno o varios cromosomas, las más comunes son: deleciones, inversiones, translocaciones. Con estas técnicas pueden detectarse alrededor de 300 a 500 bandas por grupo haploide.

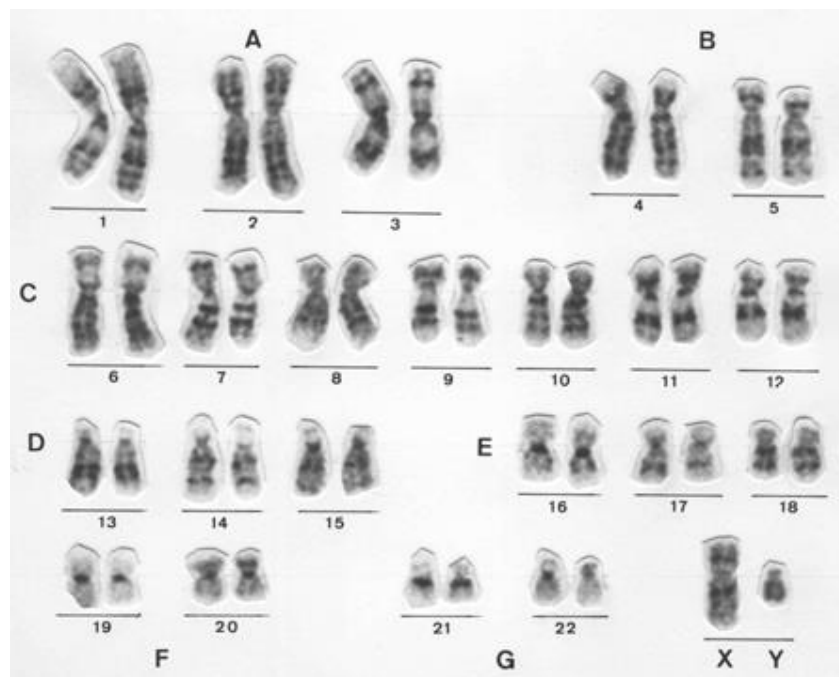


Figura 4. Cariotipo con bandedo G de resolución estándar.

1.1.3.1.2 Bandedo de alta resolución. La técnica de bandedo de alta resolución consiste en el análisis de los cromosomas en profase y pro metafase, incrementando así el número de bandas visibles al microscopio. Los cromosomas en profase y pro metafase pueden alcanzar una resolución superior a las 800

bandas (ver Figura 5) De esta manera, al producirse una elongación de los cromosomas es posible la detección de alteraciones estructurales más pequeñas como microdeleciones, duplicaciones y sutiles translocaciones. También se utiliza para la confirmación de resultados obtenidos en un cariotipo de resolución estándar, y para definir en forma precisa los puntos de ruptura de los cromosomas involucrados en alteraciones estructurales.

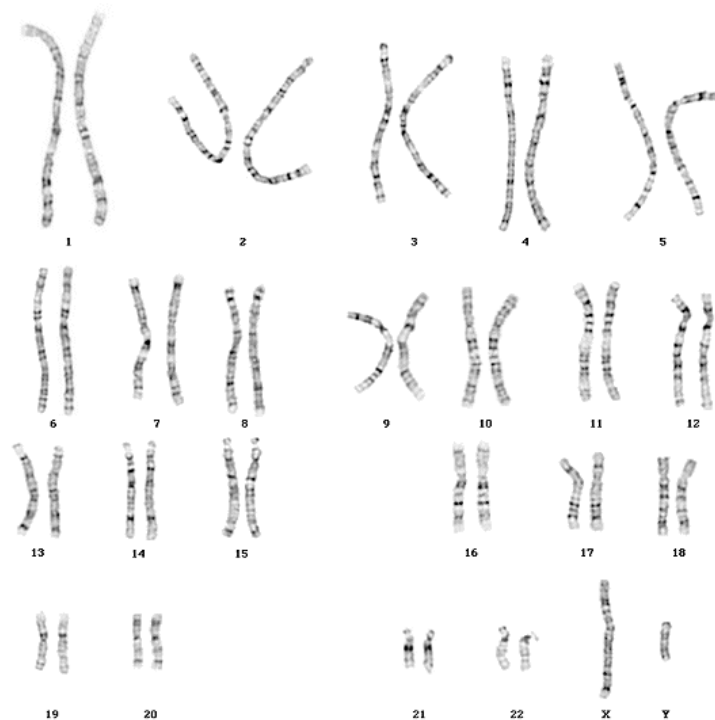


Figura 5. Cariotipo con bandeado de alta resolución.

La técnica de bandeado de alta resolución debe reservarse para casos donde un síndrome puede ser producto de una microdelección o microduplicación. Por lo cual su análisis requiere de cromosomas con una resolución superior a 650 bandas. Debido a la dificultad que requiere el análisis de cromosomas de alta resolución, él bandeado con un numero mayor de bandas sólo debe ser indicado para mapear regiones cromosómicas específicas. Para el bandeado de cromosomas se emplean diferentes métodos de tinción del ADN con colorantes específicos como: Bandeo G (él mas utilizado), bandeado R, bandeado Q, bandeado T y bandeado C [19], [64].

La ventaja de la citogenética convencional radica en el estudio de todos los cromosomas, pero presenta varias limitaciones como la necesidad de que existan células en división y en ocasiones se pueden valorar pocas metafases (menos de 20) Por otra parte, los cromosomas pueden presentar unas bandas cromosómicas poco definidas siendo imposible determinar el cariotipo. En este caso, no será factible la detección de alteraciones cromosómicas que afecten a regiones genéticas muy pequeñas.

1.1.3.1.3 Preparación de las células para obtener el material cromosómico. Es posible visualizar los cromosomas por medio de la microscopía de luz y de tinciones especiales, el proceso para obtener el material cromosómico se realiza en diversos pasos:

- **Recolección de la muestra y preparación inicial.** Prácticamente, cualquier tejido que tenga células que se dividen puede utilizarse, por ejemplo, sangre periférica, médula ósea, fluido amniótico y productos de la concepción.
- **Cultivo celular.** En esta fase se estimulará el crecimiento y división de las células.
- **Incubación.** La muestra es puesta en incubación por un tiempo entre 48 a 72 horas.
- **Cosecha.** Este paso es muy importante para obtener preparaciones de alta calidad. Se adiciona colchicina para detener la división de las células en la etapa de metafase de la mitosis. Se aplica una solución hipotónica para romper las membranas celulares (las células se hinchan), y para finalizar el paso de la cosecha, se realizan 3 lavados.
- **Goteo.** Posterior a los lavados, por medio de centrifugación, se obtiene un botón celular blanco, el cual se suspende en la misma solución fijadora y se

procede a gotear en un portaobjetos a unos cuantos centímetros, esto es con el objetivo de "reventar" las células y obtener los cromosomas.

- **Envejecimiento.** En este paso se espera a que los cromosomas pierdan humedad. Se puede aplicar calor al portaobjetos para deshidratar la muestra.
- **Tinción.** Existen muchos tipos de tinciones para observar los cromosomas. La más utilizada es la tinción con colorante Giemsa. Por medio de estas bandas podemos distinguir las características de un cromosoma y determinar si es normal o presenta alguna anomalía estructural.
- **Análisis de las muestras (Lectura)** Mediante el microscopio se selecciona las metafases más extendidas (es decir, células reventadas) y mejor teñidas. Se determina el número modal (número cromosómico observado con mayor frecuencia) en un mínimo de 30 metafases. Se determina el sexo cromosómico del individuo. Por último, se seleccionan las mejores metafases para fotografiar y hacer posteriormente el montaje del cariotipo o cariograma [10], [40], [64].

Para complementar las técnicas citogenéticas convencionales, actualmente se dispone de las técnicas citogenéticas moleculares. Estas técnicas son muy útiles para determinar de forma inequívoca cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeo (cromosomas marcadores) Sin embargo, hoy en día a pesar de existir técnicas muy novedosas para la caracterización genética de las células tumorales, se debe seguir realizando la citogenética convencional porque permite conocer todos los cromosomas implicados en un solo experimento. A su vez, aún quedan muchas patologías por caracterizar y en las cuales la citogenética seguirá siendo clave para definir nuevos marcadores.

1.1.3.2 Citogenética molecular. Normalmente, este estudio se realiza sobre cromosomas en el estado de pro metafase o metafase. La utilización citogenética de los fluorocromos constituye un eficaz instrumento para la caracterización de las

diferentes regiones cromosómicas basándose en su contenido en ADN. Estas sustancias son capaces de interactuar específicamente con fragmentos de ADN. Las diferencias cualitativas y cuantitativas del ADN a lo largo del cromosoma, se traducen en diferencias de emisión fluorescente bajo diferentes longitudes de onda (ver Figura 6) Las técnicas de hibridación “in situ” se utilizan para localizar secuencias determinadas de ácidos nucleicos en los cromosomas y en los núcleos celulares interfásicos. Actualmente se disponen de sondas específicas para cada cromosoma humano, e incluso sondas específicas para cada uno de los brazos cromosómicos de estos, lo que permite analizar diferentes anomalías cromosómicas [19], [40].

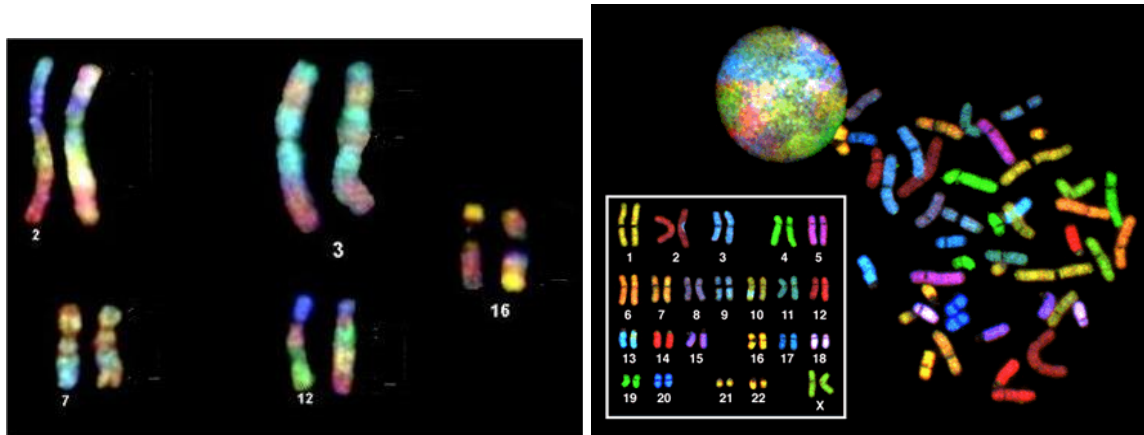


Figura 6. Cariotipo obtenido con técnicas de hibridación “in situ”.

1.1.4 ANÁLISIS CROMOSOMICO. Las células somáticas humanas normales tienen 46 cromosomas: 22 pares homólogos comunes a hombres y mujeres llamados autosomas, el otro par es dimórfico y es el par de cromosomas sexuales, XX en mujeres y XY en hombres. En humanos debido a nuestra condición de ser diploides, los cromosomas son enumerados por pares de manera decreciente comenzando por el par de mayor tamaño. El par 23 corresponde a los cromosomas sexuales. Es de notar que un miembro de cada par de cromosomas es heredado del padre y el otro se recibe de la madre.

1.1.4.1 La posición del centrómero. Cada uno de los cromosomas tiene un estrechamiento o constricción primaria llamado centrómero situado en una posición constante en cada par de cromosomas. Los cromosomas humanos presentan tres formas básicas (ver Figura 7) y se pueden clasificar de acuerdo con la posición del centrómero en:

1.1.4.1.1 Metacéntricos. El centrómero está ubicado más o menos en el centro, es decir los brazos p y q son aproximadamente de la misma longitud.

1.1.4.1.2 Submetacéntricos. El centrómero se encuentra desplazado claramente del centro. Tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos.

1.1.4.1.3 Acrocéntricos. El centrómero está ubicado cerca a un extremo. (Un brazo considerablemente grande comparado con el otro.) Tienen el centrómero muy cerca de un extremo, con un brazo corto muy pequeño. Con frecuencia tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, conectando trozos muy pequeños del ADN al centrómero, llamados tallos y satélites. Los tallos contienen genes que codifican el ARN ribosómico. Los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) presentan pequeñas masas de cromatina llamadas satélites, unidas a los brazos cortos por medio de tallos muy delgados llamados constricciones secundarias.



Metacéntrico



Submetacéntrico



Acrocéntrico

Figura 7. Clasificación de cromosomas según posición del centrómero.

Los cromosomas metacéntricos, submetacéntrico y acrocéntricos, se observan principalmente en humanos en proporciones definidas logrando un número normal de 46 cromosomas.

1.1.4.2 Organización. De acuerdo a su longitud, los cromosomas se clasifican en siete grupos A, B; C; D; E; F; G (ver Tabla 1)

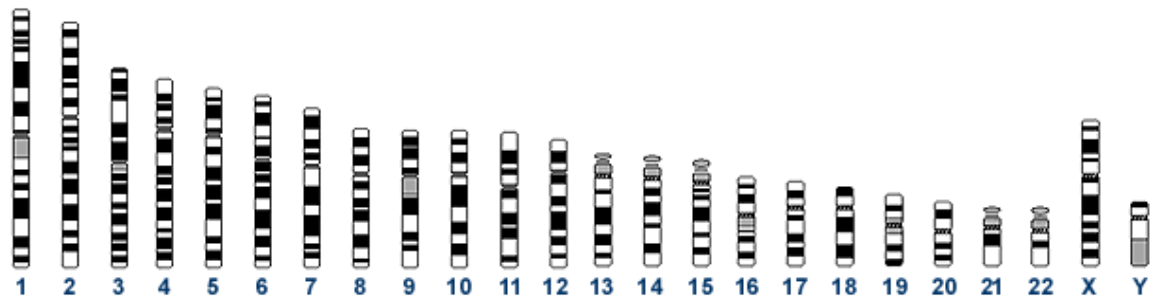


Figura 8. Juego completo de cromosomas en el hombre.

Tabla 1. Clasificación de los cromosomas humanos.

TAMAÑO	GRUPO	CROMOSOMAS	CLASIFICACIÓN
Grandes	A	1, 2, 3	Submetacéntrico (2), metacéntricos (1, 3)
	B	4, 5	Submetacéntricos
Medianos	C	6, 7, 8, 9,10, 11, 12, X	Submetacéntricos
	D	13, 14, 15	Acrocéntricos
Pequeños	E	16, 17, 18	Submetacéntricos
	F	19, 20	Metacéntricos
	G	21, 22, Y	Acrocéntricos

1.1.4.3 Idiograma. Un idiograma es una representación esquemática del tamaño, forma y patrón de bandas de todo el complemento cromosómico utilizando tinciones, donde los cromosomas se sitúan alineados por el centrómero, y con el brazo largo siempre hacia abajo; en este mapa se muestra la relación entre los brazos corto y largo, el centrómero y, en el caso de cromosomas acrocéntricos, los tallos y satélites (ver Figura 8 y Figura 9) También se ilustran los patrones de bandas específicos. Cada banda se numera para ayudar en la descripción de

reorganizaciones. Las bandas son enumeradas, iniciando a partir del centrómero hacia fuera desde 1 hasta 3 o 4, según sea el caso. Estas regiones se subdividen poniendo números de menor a mayor desde el centrómero al igual que las regiones grandes del cromosoma que ya se han dividido creando estas subregiones (ver Figura 10) Estas mediciones se han propuesto para referenciar los puntos citogenéticos exactos de alguna patología o hallazgo genético. El ideograma permite hacer un reconocimiento más fácil de los cromosomas bandeados. Para cada tipo de bandeo (Bandas Q, G, C, R, N y T) existe un ideograma específico.

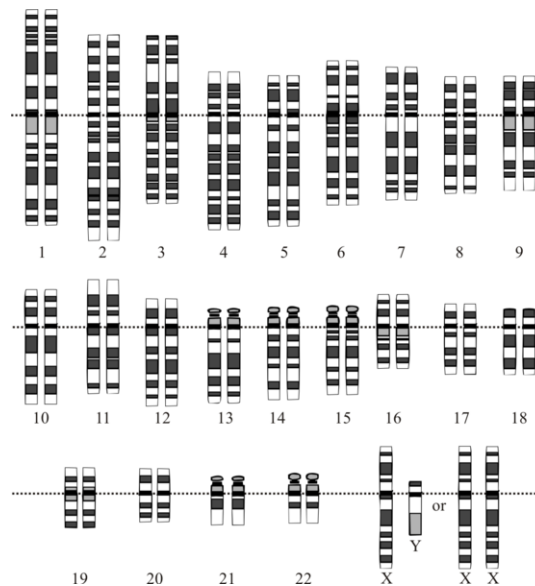
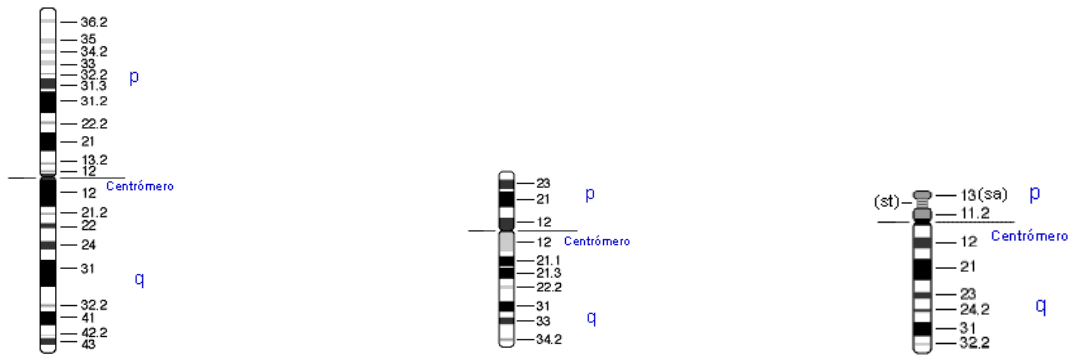


Figura 9. Idiograma.

Los ideogramas, de los cromosomas 1, 9 y 14 con bandas G (ver Figura 10), son ejemplos típicos, respectivamente, de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos.



Metacéntrico (Cromosoma 1) **Submetacéntrico (Cromosoma 9)** **Acrocéntrico (Cromosoma 14)**

Figura 10. Idiogramas de los cromosomas 1, 9 y 14.

1.1.4.4 Realización del cariotipo. Para desarrollar un cariotipo, se toman imágenes de las células en metafase que tengan la mejor calidad, bien mediante fotografía tradicional o por digitalización de imagen. Primero se observan y cuentan los cromosomas para confirmar que coincide con el número diploide normal (la presencia de 46 cromosomas) Como se dijo anteriormente, en una dotación cromosómica normal, el grupo G consta de cuatro cromosomas muy pequeños y acrocéntricos y el único cromosoma que también es pequeño y acrocéntrico es el Y. Por lo tanto, una primera aproximación al sexo del individuo es contar el número de cromosomas pequeños y acrocéntricos.

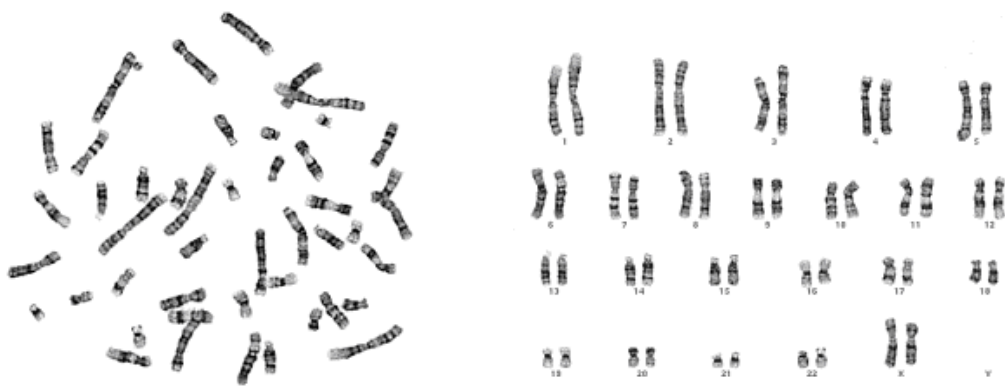


Figura 11. Cariotipo. Luego los cromosomas son organizados de manera decreciente según su longitud y son dispuestos en los siete grupos mencionados (ver tabla1), observando la forma y posición del centrómero. Por último, con la ayuda del ideograma se

analiza cada uno de los grupos para formar las parejas de cromosomas, haciendo una comparación crítica banda por banda con su homólogo, observando el número, posición y ancho de bandas presentes en cada uno. Los pares de cromosomas iguales, denominados homólogos, se ordenan por tamaños decrecientes desde el par 1 hasta el par 22, con el brazo largo siempre hacia abajo (ver Figura 11) El par 23 corresponde a los cromosomas sexuales. A esta organización se le denomina cariotipo o ideograma de cromosomas. El cariotipo permite al citogenetista examinar aún más en detalle cada cromosoma en busca de cambios estructurales.

No existe un método o técnica determinado para la realización del cariotipo, depende de determinados criterios que a juicio del citogenetista son los más sencillos, pero teniendo en cuenta que puede haber otros métodos u otras formas de realizar el cariotipo. Otro factor a tener en cuenta es que en cada célula la tinción y condensación de los cromosomas puede variar algo, por ello las bandas o el aspecto de los mismos puede observarse de alguna forma ligeramente distinta [10], [26], [40], [64], [77].

1.2. PARAMETROS FUNDAMENTALES DE UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL

La manera en que se prepare el sistema de visión depende del tipo de análisis y tratamiento que se necesita realizar. El sistema de visión debe producir suficiente calidad de imagen para permitir extraer la información deseada acerca del objeto de la imagen. Hay que notar que la calidad de imagen establecida para una aplicación, puede resultar inadecuada para otra aplicación.

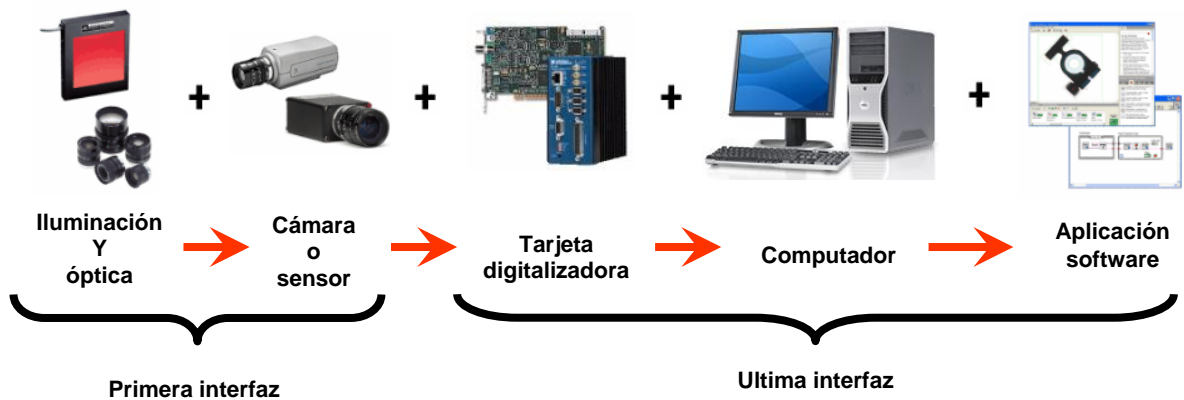


Figura 12. Componentes de un sistema de visión artificial.

Como recomienda Edmund Optics, es importante integrar componentes con el mismo nivel de desempeño. La integración apropiada de todos los componentes (incluyendo cámara, tarjeta de captura, monitor, PC, software y cables), resultará en un desempeño óptimo del sistema².

1.2.1 PARAMETROS ÓPTICOS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA IMAGEN

1.2.1.1 Resolución. Hay dos tipos de resolución a considerar en la preparación de un sistema de visión: resolución de píxel y poder de resolución. La resolución de píxel se refiere al mínimo número de píxeles que se necesita para representar el objeto bajo inspección. Hay que intentar tener al menos dos píxeles para representar el rasgo más pequeño (ver Figura 13)

² EDMUND OPTICS. Edmund Optics Technical Library: Imaging, Illumination and Optical Instruments. Disponible en la página web: <http://www.edmundoptics.com/techSupport/>.



Figura 13. Parámetros que afectan la calidad de una imagen.

El poder de resolución indica la cantidad de detalle del objeto que el sistema de visión puede reproducir. El poder de resolución del sistema depende de la falta de definición causada por la difracción, errores ópticos (aberraciones), tolerancias de fabricación, el espaciamiento de punto, y de la capacidad del sistema para detectar contraste. El fenómeno de difracción consiste en que gran parte de la luz que atraviesa un objeto es dispersada por este en múltiples direcciones y ángulos, por lo que un punto iluminado en el plano objeto aparece en el plano imagen como un círculo de luz rodeado de una serie de anillos brillantes y oscuros producidos por interferencias constructivas y destructivas. Este fenómeno restringe la capacidad de las lentes de mostrar puntos o bordes perfectamente. A partir de lo enunciado, se define el límite de resolución (d) de una lente como la distancia mínima a la que pueden estar situados dos puntos para su perfecta discriminación.

$$d = \frac{0.61 * \lambda}{A.N} = \frac{0.61 * \lambda}{n * \text{sen}\alpha} \quad \text{Ec. 1}$$

De la ecuación 1 se define el poder de resolución como $Pr = 1/d$, el cual es la propiedad del sistema óptico de discriminar detalles finos y depende de tres factores:

- La longitud de onda (λ) de la fuente de luz empleada para iluminar el objeto.
- La apertura angular de la lente (α).

- El índice de refracción (n) del medio que usa el objetivo a través del cual pasa la luz desde la placa de la muestra al objetivo.

Los efectos de difracción determinan el tamaño mínimo del foco, y junto con la sensibilidad del sensor y el flujo de luz establecen la apertura requerida. Por ejemplo, el cierre de la apertura de la lente puede ayudar a aumentar la profundidad de campo (nitidez) y disminuir los efectos de esas aberraciones, y mejorar el desempeño de la lente, sin embargo, a medida que la apertura de la lente se cierra el límite de difracción llega a ser cada vez más perjudicial. Teniendo en cuenta lo dicho, tres factores contribuyen a la resolución de su sistema de visión: campo de visión, el tamaño del sensor de la cámara y el número de píxeles en el sensor.

1.2.1.1.1 Campo de visión (FOV) El campo de visión es el área del objeto bajo inspección que la cámara puede adquirir. En otras palabras, es la porción del objeto que llena el sensor de la cámara (ver Figura 13)

1.2.1.1.2 Tamaño del sensor y número de píxeles en el sensor. El tamaño del sensor de la cámara es importante en la determinación del campo de visión, y la determinación de la resolución mínima. La longitud diagonal del sensor especifica el tamaño del área activa del sensor. El número de píxeles en el sensor debe ser mayor o igual a la resolución de píxel. Este parámetro es importante en la determinación del aumento apropiado de los lentes, requerido para obtener un campo de visión deseado

1.2.1.1.3 Distancia focal de la lente. Cuando se determina el campo de visión y el tamaño del sensor apropiado, se puede decidir qué tipo de lente de la cámara satisface el sistema de visión. Una lente se define por su distancia focal, la cual si es la apropiada puede minimizar la distorsión.

1.2.1.2 Contraste. La resolución y contraste son factores estrechamente relacionados que contribuyen a la calidad de la imagen. El contraste define las diferencias en los valores de intensidad entre el objeto bajo inspección y el fondo. El sistema de visión debe suministrar bastante contraste para distinguir los objetos del fondo. Utilizando técnicas apropiadas de iluminación se puede mejorar el contraste del sistema. El contraste de la lente se define típicamente en términos del porcentaje de contraste del objeto reproducido. La habilidad del sensor para reproducir contraste es usualmente especificado en términos de decibeles (dB) en cámaras analógicas y bits en cámaras digitales.

1.2.1.3 Profundidad de campo o zona de enfoque (PDC) Es la distancia entre el punto más cercano y más lejano del sujeto que aparecen nítidos en una posición determinada del enfoque. Al disminuir la abertura, la profundidad de campo crece y al aumentarla disminuye (ver Figura 14). En general, el PDC puede aumentarse, cerrando la abertura de la lente (es decir, aumentando la relación $f/\#$ = distancia focal / diámetro abertura), sin embargo, la iluminación debe ser aumentada.

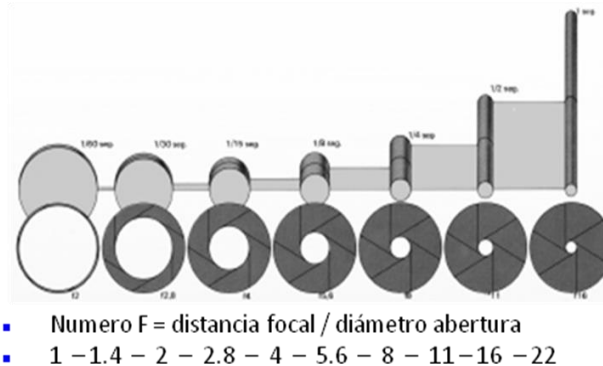


Figura 14. Representación geométrica de la variación de la abertura.

1.2.1.4 Errores de Perspectiva. Los errores de perspectiva ocurren a menudo cuando el eje de la cámara no es perpendicular al objeto que se está inspeccionando. Los errores de perspectiva aparecen como cambios en la amplificación del objeto dependiendo de la distancia del objeto a la lente. Para

tomar mediciones precisas de la imagen, el error de perspectiva se corrige aplicando técnicas de calibración a la imagen.

1.2.1.5 Distorsión. La distorsión es una aberración geométrica causada por errores ópticos en la lente de la cámara, que causa una diferencia en el aumento en diversos puntos de la imagen. La lente de una cámara típica introduce distorsión radial. Esto causa que los puntos que están lejos del centro óptico de la lente aparezcan aun más allá de este. Cuando la distorsión ocurre, la información en la imagen está mal colocada respecto al centro del campo de visión, pero la información no está perdida realmente (ver Figura 15) Por consiguiente, se puede corregir la imagen a través de la calibración espacial.

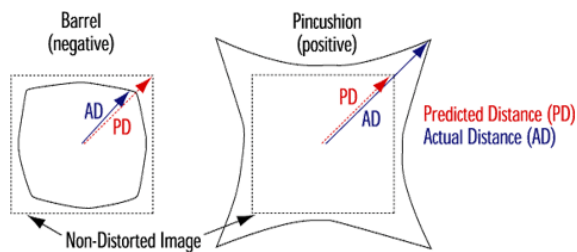


Figura 15. Ilustración de distorsión negativa (barril) y positiva (acérico)

1.2.1.6. Iluminación. No es raro luchar con problemas de resolución y contraste dentro de un sistema de imagen, mientras se menosprecie el poder de la iluminación apropiada. De hecho, la calidad de imagen deseada puede típicamente ser encontrada mejorando el esquema de iluminación, en lugar de investigar en detectores de la más alta resolución, lentes de imagen y software. Se debe tener presente que la intensidad de luz apropiada en la imagen final es directamente dependiente de la selección del componente.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los distintos tipos de Iluminación.

Tipo de iluminación.	Ventajas	Desventajas	Tipo
Frente difuso.	Minimiza sombras y reflexiones especulares.	Rasgos de superficie menos diferentes.	Líneas fluorescentes, anillos fluorescentes.
Direccional (solo y bilateral)	Iluminación fuerte, relativamente igual.	Sombras, resplandor.	Solo (mostrado) y guías de luz de fibras ópticas dobles.
Solo direccional, vista incidente.	Muestra defectos superficiales / topología.	Puntos calientes, sombreado fuerte.	Guías de luz de fibra óptica.
Luz estructurada (generación de líneas)	Extracción de rasgos superficiales.	Fuente extremadamente intensa, absorbida por algunos colores.	Diodos láser generando líneas, guías de luz de fibra óptica lineal.
Anillos guía	Reduce las sombras, iluminación relativamente uniforme.	Patrón circular resplandeciente de superficies altamente reflexivas, algunas veces difíciles para montar.	Fibra óptica o guías de luz de anillos LED.
Luz polarizada.	Iluminación uniforme, elimina especularidades.	Intensidad más baja a través del polarizador.	Filtros agregados para muchos lentes existentes y fuentes de luz.
Axial difuso.	Libre de sombras, iluminación uniforme, poco resplandor.	Intensidad más baja a través del divisor de rayo interno, afecta FOV y WD.	Iluminaciones axiales con LED, adaptadores fibra óptica- axiales guiados.

La abertura de la lente, el sistema de aumento, la sensibilidad mínima del sensor, los ajustes de la cámara (velocidad de obturación, ganancia, etc.), filtración y otros parámetros de iluminación (por ejemplo, iluminación constante), cada componente afecta la cantidad de luz incidente sobre el sensor y, por lo tanto afecta la calidad de la imagen del sistema. Estos factores necesitan ser ajustados para acomodar objetos con diferentes características (perfil, reflexividad, etc) Por ejemplo, la iluminación debe ser aumentada a medida que la abertura de la lente es cerrada (es decir, un f/# mas alto) Las lentes de alto poder, generalmente requerirán más

iluminación dado que las áreas más pequeñas vistas reflejan menos luz nuevamente dentro de los lentes. La intensidad de la luz para los productos de iluminación se especifica en términos de foto candelas (unidad inglesa) El lux, la unidad equivalente del SI, puede ser convertida a foto candelas como sigue: 1 lux = 0.0929 foto candelas. La tabla 2 ilustra las situaciones más frecuentes de iluminación, que pueden refinar significativamente el desempeño de un sistema de imagen [2], [20], [53].

1.2.2 PARAMENTROS ELECTRONICOS QUE AFECTAN LA CALIDAD DE UN IMAGEN DIGITAL. Desde un punto de vista físico, una imagen puede considerarse como un objeto plano cuya intensidad luminosa y color puede variar de un punto a otro. Si se trata de imágenes monocromas (blanco y negro), se pueden representar como una función continua $f(i, j)$ donde (i, j) son sus coordenadas y el valor de f es proporcional a la intensidad luminosa (nivel de gris) en ese punto. Para obtener una imagen que pueda ser tratada por el ordenador es preciso someter la función $f(i, j)$ a un proceso de discretización tanto en las coordenadas como en la intensidad, a este proceso se le denomina digitalización. La digitalización consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de $m \times n$ puntos, donde cada punto tiene un valor proporcional a su nivel de gris $f(i, j)$ (ver Figura 16) Dado que este valor puede ser cualquiera dentro de un rango continuo, es preciso dividir dicho rango en una serie de k intervalos, de forma que el nivel de gris de cada punto sea asignado a uno de los valores que representa dicho intervalo.

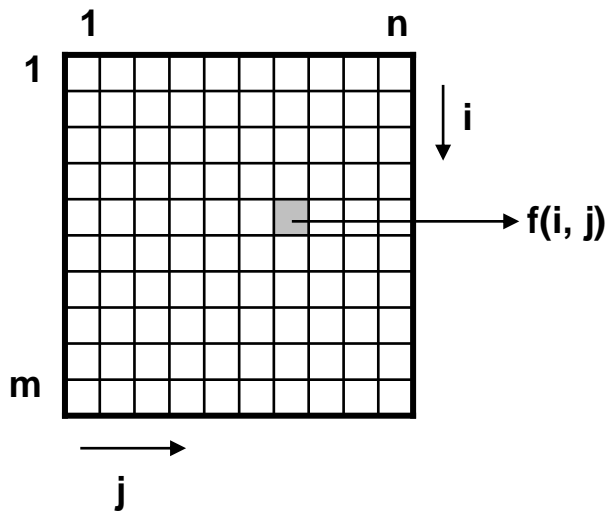


Figura 16. Descomposición de la imagen en una matriz de $m \times n$ puntos. El píxel en la fila i y la columna j tiene una intensidad igual $f(i, j)$

La profundidad de bits, la representación del color, y el rango dinámico, se combinan con la resolución para determinar la calidad. El aumento de la resolución permite capturar detalles más precisos. Sin embargo, como es indicado en la página web de la Universidad de Cornell,³ en algún punto, una mayor resolución no tendrá como resultado una ganancia evidente en la calidad de la imagen, sino un mayor tamaño de archivo (ver Figura 17) La clave es determinar la resolución necesaria para capturar todos los detalles importantes que están presentes.

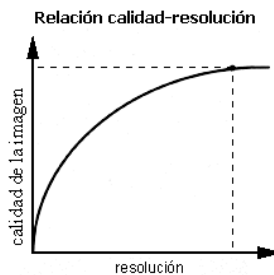


Figura 17. Relación Calidad de la imagen vs. Resolución.

Por lo tanto, los criterios de calidad de la imagen digital son:

³ UNIVERSIDAD DE CORNELL. Llevando la teoría a la práctica: Tutorial de digitalización de imágenes. Biblioteca de la Universidad de Cornell. Departamento de Investigación 2000 - 2003. Disponible en la página Web: <http://www.library.cornell.edu>.

- La resolución espacial de la imagen (píxeles / área)
- Profundidad o resolución de intensidad de la imagen (número de colores)
- Rango dinámico de la imagen (histograma, niveles de grises)
- Fidelidad en la reproducción de color (ruido) [75].

1.2.2.1 Resolución espacial de la imagen (píxeles / área o Puntos por pulgada) El tamaño físico de un píxel en una imagen se define por la resolución espacial. Cada elemento en que se divide la imagen recibe el nombre de "píxel" (Picture element) Un píxel es pues una unidad de información, pero no una unidad de medida, ya que no se corresponde con un tamaño concreto. Un píxel puede ser muy pequeño (0.1 milímetros) o muy grande (1 metro) La separación entre cada píxel o el tamaño real de cada píxel de una imagen digital depende, fundamentalmente del dispositivo de captura.

La resolución espacial se mide en puntos (o píxeles) por pulgada (ppp), también llamado «dots per inch» (dpi) o en micrómetros por píxel. El número de píxeles en la dirección horizontal y vertical, da las dimensiones de la imagen (nº de filas x nº de columnas) La resolución espacial debe contemplar las dos dimensiones de la imagen digital y por ello se expresa como ppp x ppp, pero cuando ambos valores son idénticos, a menudo se utiliza sólo un valor (ppp) para referirse a ellos. Una imagen de alta resolución contendrá una gran cantidad de píxeles y más detalles, mientras que una imagen de poca resolución incluirá poca cantidad de píxeles y menos detalles.

Las imágenes dependen de la resolución a la que han sido creadas, por lo que al modificar su tamaño pierden calidad visual (ver Figura 18 y Figura 19) Si lo disminuimos, los trazos finos perderán definición, desapareciendo partes de los mismos, mientras que si lo aumentamos, la imagen se pixelizará, al tener que cubrirse de forma aproximada píxeles que inicialmente no existían, dicho de otra

forma, separa la información original en un número mayor de píxeles, produciendo el conocido efecto de dientes de sierra.



Figura 18. Variación de la calidad de la imagen al cambiar el tamaño.

La imagen debe ser digitalizada al nivel de resolución máxima que den los dispositivos para que la definición final sea correcta, ya que el límite de trabajo lo va a marcar el medio en el que vayamos a exhibir. Por ejemplo, imágenes con resolución menor que la del medio se van a ver pequeñas y si se modifica su tamaño se produce una mala visualización o impresión, presentándose el conocido efecto de pixelización o dientes de sierra. Por otro lado, imágenes con resolución mayor que la del medio, no se observaran de forma completa sino una parte de la misma que tenga similar resolución que el medio es capaz de brindar, desaprovechándose el resto de información de la imagen.



Figura 19. Variación de la calidad de la imagen a distintas resoluciones de pantalla.

Dos imágenes con distinta resolución espacial, una de 50 ppp, y otra de 600 ppp, se verán de forma distinta según el medio empleado para visualizarlas. En un monitor la primera imagen se visualizará a 96 ppp en la pantalla del monitor, aunque su calidad será escasa, al no contener los píxeles suficiente información gráfica. La última imagen también se percibirá con la resolución de 96 ppp que da el monitor por defecto, desperdiciándose el resto de información.

1.2.2.2 Resolución cromática (profundidad de bits o de color) La profundidad de color de una imagen se refiere al número de colores diferentes que puede contener cada uno de los puntos o píxeles que la forman, y depende de la cantidad de información (número de bits) que puede almacenar un píxel. El aumentar la profundidad de bits afectará los requisitos de resolución, tamaño de archivo y método de compresión utilizado (ver Figura 20)



Figura 20. Variación de la profundidad del color según el número de bits.

En la tabla 3 se puede observar que cuanto mayor sea la profundidad de bits, tanto mayor será la cantidad de tonos (escala de grises o colores) que puedan ser representados. La cantidad de colores utilizados en la imagen influye mucho en el tamaño del archivo que la contiene. Cuantos más colores se utilicen, más grande será el tamaño del fichero gráfico necesario.

Tabla 3. Profundidad de color.

Profundidad de color	Colores posibles	Comentarios
1 bit por píxel	$2^1 = 2$	Blanco y negro
4 bits por píxel	$2^4 = 16$	Modo Escala de grises
8 bits por píxel	$2^8 = 256$	Modo Escala de grises Modo Color indexado
16 bits por píxel	$2^{16} = 65.536$	Alto color
24 bits por píxel	$2^{24} \approx 16.8$ millones	Color real: La información de color de la imagen se divide en tres imágenes correspondientes a cada una de las bandas del espectro visible (RGB): 8 bits para el rojo (R), 8 bits para el verde (G), y 8 bits para el azul (B) = 24 bits (16,7 millones de valores de color) Modo RGB y Modo Lab.
32 bits por píxel	$2^{32} \approx 4295$ millones	Además de los 24 bits para el color se usa otro canal adicional (canal alfa) de 8 bits para definir el grado de transparencia de cada punto de la imagen. Un valor 0 indica que el punto es totalmente transparente, mientras que un valor de 255 indica que será totalmente visible (opaco) Modo CMYK

1.2.2.3 Rango dinámico (niveles de grises) Es el rango de diferencia tonal entre la parte más clara y más oscura de una imagen. Es decir, es la gama de luminancia desde el negro hasta el blanco. Cuanto más alto sea el rango dinámico, se pueden potencialmente representar más matices, a pesar de que el rango dinámico no se correlaciona en forma automática con la cantidad de tonos reproducidos. El rango dinámico también describe la capacidad de un sistema digital de reproducir información tonal. Esta capacidad es más importante en los documentos de tono continuo que exhiben tonos que varían ligeramente, y en el caso de las fotografías puede ser el aspecto más importante de la calidad de imagen.

La imagen izquierda de la Figura 21 posee un rango dinámico más amplio, pero una cantidad limitada de tonos representados. La imagen derecha posee un rango dinámico más estrecho, pero una mayor cantidad de tonos representados. Observe la falta de detalle en las sombras y los toques de luz en la imagen izquierda [20], [53], [75].



Figura 21. Rango dinámico de una imagen.

1.2.3 CRITERIOS A CONSIDERAR EN LA ELECCION DE UNA CAMARA DIGITAL. La calidad de la imagen digital no es solo una cuestión de resolución. Por encima de un determinado nivel, la resolución sólo juega un papel limitado en la obtención del resultado final. Es igual de importante el tipo de sensor, la sensibilidad del sensor, la calidad de la óptica, el ajuste de color, el balance de blancos, el ruido, etc. La selección de una cámara se debe basar no solo en los números que presenten las hojas de especificaciones, sino fundamentalmente en probar y comparar las cámaras en el contexto que se vaya a trabajar. Comprendiendo los términos usados con los componentes ayudara al proceso de selección [2], [16].

1.2.3.1 Sensor. Cuando la luz cae en un chip, esta es recogida por una matriz de pequeños potenciales llamados píxeles. Cada píxel es capaz de generar una señal eléctrica proporcional al número de fotones (intensidad luminosa) que ha recibido. La imagen se divide dentro de esos pequeños píxeles discretos (ver Figura 23)

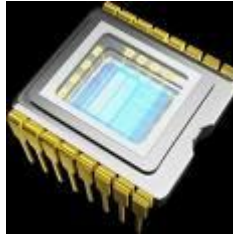


Figura 22. Sensor.

La calidad del sensor viene determinada fundamentalmente por el número de pocillos o píxeles que tenga, por el tamaño de estos píxeles, por el tamaño total del chip, por la forma, por el número de bits de los píxeles y por el llamado “ruido” del sensor. Los píxeles mayores tienden a generar una mejor calidad de imagen y una mayor sensibilidad. La forma del sensor suele ser rectangular y la proporción entre alto y ancho del sensor también es importante ya que las fotografías finalmente obtenidas con la cámara suelen ser con formato 4:3.

Un chip con el píxel más pequeño posible, es bueno desde el punto de vista de la resolución (más pequeños serán los detalles de la imagen), pero, como sabemos, un píxel pequeño implica una pequeña capacidad de almacenar fotones, y eso es malo porque un píxel pequeño puede saturarse fácilmente. Cuando un píxel se satura, ya no puede recoger más fotones, y los que sigan cayendo sobre él, simplemente se pierden. El mapa de luz que estamos haciendo al tomar una imagen está falseado, en realidad, en ese píxel ha caído más carga de la que aparece almacenada. Como siempre en estos casos se ha de optar por una solución intermedia, un compromiso entre píxel pequeño y capacidad de almacenar fotones.

1.2.3.2 Sensores CCD vs. CMOS. Los CCD (Dispositivos de carga (eléctrica) interconectada o acoplada) y los CMOS (Semiconductor de Oxido de Metal Complementario) son sensores de diferentes tecnologías para la conversión de luz en señales electrónicas. Ambos se basan en el silicio. Acumulan carga en cada píxel proporcional a la intensidad luminosa. La gran diferencia entre ambos

dispositivos es su construcción y la forma como se lleva cabo el procesado de la señal eléctrica.

En un CCD la carga que posee uno de estos fotodiodos va pasando de éste al adyacente y así sucesivamente hasta llegar a un registro también formado por dispositivos de carga acoplada que es el encargado de ir suministrando, por orden secuencial, las diferentes cargas que poseen los distintos fotodiodos que forman el sensor. Estas cargas electrónicas se convierten en potencial eléctrico, luego en voltaje, y entregan una señal analógica que se amplifica y se recoge en el circuito integrado de la cámara, encargado de procesar estos datos y proporcionar una señal digital que se graba en memoria (ver Figura 23)

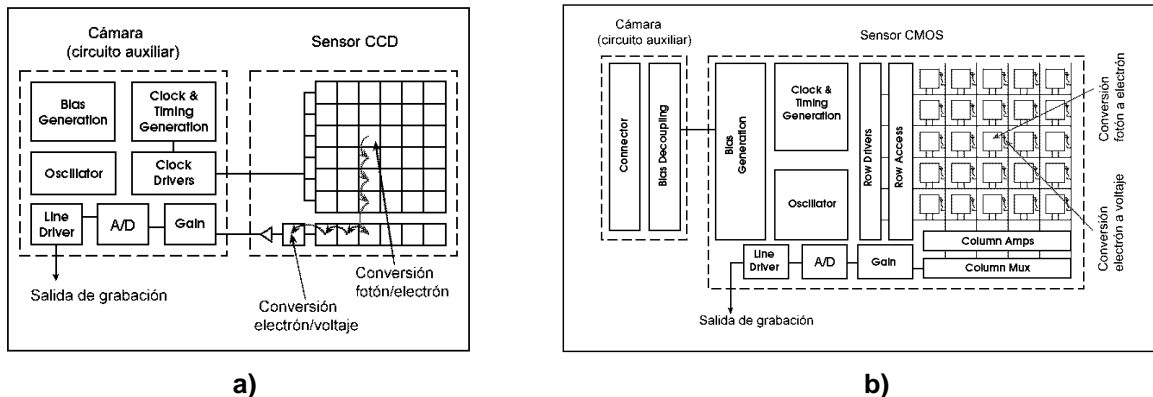


Figura 23. a) Esquema de funcionamiento de un CCD. b) Esquema de funcionamiento de un CMOS

En un sensor CMOS, los fotones que recibe cada celda son convertidos en carga eléctrica, después en voltaje, y a continuación es amplificado en la misma celda receptora. La digitalización se realiza píxel a píxel (ver Figura 23) Ello conlleva que el resultado que entrega a la circuitería de la cámara este ya digitalizado. En un CMOS, al contrario que en los CCD, las celdas son totalmente independientes de sus vecinas [1], [8], [9], [25].

Tabla 4. Características de los sensores CCD y CMOS.

CARACTERÍSTICA	CCD	CMOS
Electrónica de control	Todo el procesado de señal (amplificación, conversión A / D) se da fuera del chip	Todo el procesado de señal se da dentro del chip (amplificación, conversión A/D)
Sensibilidad	Menor en cada celda pero posee mayor superficie receptora de luz por píxel.	Mayor en cada celda al amplificarse directamente la señal que incide en el fotodiodo, pero posee menor superficie receptora de luz por píxel.
Rango dinámico	Mayor (El doble que el del CMOS)	Menor
Ruido	Menor, ya que integra menos electrónica en el sensor.	Elevado debido a que los amplificadores no serán uniformes en todo el chip.
Velocidad de obturación	Mayor, ya que integra menos electrónica en el sensor.	Menor
Blooming	Una gran intensidad lumínica en un punto influye en los píxeles adyacentes.	Escaso o inexistente, ya que no hay transferencia de carga entre los diferentes fotodiodos.
Consumo eléctrico	Alto	Bajo
Enventanado	Funcionan a su máxima resolución.	Dado su carácter individualizado de cada píxel, permiten seleccionar mas fácilmente porciones de la imagen
Calidad de imagen	Mayor	Menor, sobre todo en situaciones de poca luz.
Señal del chip.	Análoga	Digital
Costo	Mayor	Menor
Tamaño	Mayor	Menor
Usos	En cámaras profesionales y semiprofesionales.	En cámaras de aficionados, webcams y en cámaras de teléfonos móviles.

1.2.3.3 Entrelazado vs. Exploración continúa.

Tabla 5. Tipos de exploración usadas en la exposición.

Exploración entrelazada	Exploración continúa.
<ul style="list-style-type: none">▪ Chip dividido en dos campos (par e impar) Explora filas impares (1, 3, 5,...) y luego filas pares (2, 4, 6,...) que después se integran para producir una zona completa▪ Campos integrados de exploración para producir cuadros completos.▪ Ideal para aplicaciones de baja-media velocidad.▪ Puede ocurrir difuminación, desdoblamiento o efectos borrosos a altas velocidades.▪ Usada en chips convencionales. Ejemplo TV	<ul style="list-style-type: none">▪ Exploración consecutiva (1, 2, 3,...)▪ Todos los datos de la imagen registrados en una sola exposición.▪ Ideal para aplicaciones de alta velocidad.

1.2.3.4 Exploración de área o superficie vs. Exploración lineal. Existen dos tipos de CCD según la disposición de los elementos fotosensibles: lineales y de superficie. Para la mayoría de aplicaciones, la exploración entrelazada no causa problema. Por ejemplo, con una velocidad de 30 cuadros por segundo, explorar cada campo toma 1/60 segundos. Pero algunas dificultades pueden desarrollarse en aplicaciones de alta velocidad porque para el momento en que se explore la segunda zona, el objeto ya se ha movido.

La salida de la exploración progresiva no ha sido estandarizada, así que hay que tener cuidado al elegir el hardware. Algunas cámaras de exploración continua ofrecen una salida de señal análoga, pero pocos monitores son capaces de visualizar la imagen. Por esta razón, las tarjetas de captura son recomendadas para digitalizar la imagen y exhibirla [20], [51].

Tabla 6. Formas de distribución de los píxeles.

Exploración de área.	Exploración lineal.
<p>Relación 4:3 (H : V) (típica)</p> <p>Píxeles dispuestos en forma de matriz. Suministra menor resolución.</p> <p>Menor tiempo de digitalización. Ideal para aplicaciones de alta velocidad.</p> <p>Permiten capturar toda la imagen al mismo tiempo.</p> <p>Tiempos de obturación rápidos.</p> <p>Menos costoso que el de exploración lineal.</p> <p>Rango más amplio de aplicaciones (Muy usado en cámaras de video o de fotografía digital.)</p> <p>Más fácil para montar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensor lineal. Píxeles dispuestos de manera lineal. Permiten mayor resolución. ▪ Mayor tiempo de digitalización. Para aplicaciones de baja velocidad. ▪ Construcción de una línea de imagen a la vez. ▪ Solo se puede digitalizar imágenes planas. Se desplaza el CCD sobre la superficie de la imagen. Ideal para la captura de objetos anchos. ▪ Requiere alineación especial y regulación de tiempo. ▪ Integración compleja/Iluminación simple. ▪ Se usa en escáneres.

1.2.3.5 Cámaras Análogas vs. Digitales. El chip de silicio CCD es un componente análogo, que significa que los valores del píxel son recogidos por medio del muestreo (entrelazado o continuo) El procesador y codificador de la señal convierte esta información en una señal análoga, la cual puede ser transferida a un monitor. En la tabla 7 se hace una comparación entre las características más sobresalientes de las cámaras.

Tabla 7. Cámaras análogas vs. Digitales.

Digital	Análogo
<p>Cámaras típicamente grandes.</p> <p>Son complicadas y más costosas.</p> <p>La resolución vertical no esta limitada por el ancho de banda, así, ofrecen mayor número de píxeles y sensores CCD más grandes, ofreciendo una mayor resolución.</p> <p>Velocidad de fotogramas más alta.</p> <p>La señal de salida es digital (se interpreta solo en una forma), por lo tanto hay poca perdida de señal durante el procesamiento de la señal.</p> <p>No se requiere tarjeta de captura para visualizar la señal en un PC.</p> <p>Salida de exploración continúa.</p> <p>Variedad de sensores para alta velocidad o más resolución.</p> <p>La señal puede ser comprimida, así, un usuario puede transmitir en banda ancha más baja sin perdida.</p> <p>Se limitan a longitudes de cable más cortas en la mayoría de los casos</p>	<p>El tamaño es típicamente más pequeño.</p> <p>Son simples y menos costosas</p> <p>Poseen píxeles rectangulares (resolución horizontal más alta que la vertical) La resolución vertical esta limitada por el ancho de banda de la señal análoga: Número de líneas TV de exploración en las señales estándares (525 líneas para NTSC, 625 líneas para PAL)</p> <p>Limitada velocidad de fotogramas (30 cuadros por seg.)</p> <p>Las señales análogas son propensas al ruido e interferencia, las cuales causan perdida de la señal. Algunos factores que los originan son longitud del cable o el tipo de conector.</p> <p>Tarjetas de captura / computador pueden ser usadas para la digitalización pero no son necesarias para visualizar (por ejemplo en TV.), además hay pérdida de señal.</p> <p>Salida típicamente entrelazada.</p> <p>La grabación e impresión análoga puede fácilmente incorporarse dentro del sistema.</p> <p>Formato de señal NTSC/EIA.</p>

Las cámaras análogas transmiten continuamente una señal electrónica variable en tiempo real. La frecuencia y amplitud de esta señal son luego interpretadas por un dispositivo de salida análoga como información de video. Tanto la calidad de la señal de video análoga y la manera como es interpretada, afectará las imágenes de video resultantes. La resolución, que al ser analógica se mide en líneas de televisión y debería ser de al menos de 460 líneas [24].

En las cámaras digitales, la digitalización ocurre dentro de la misma cámara a medida que la señal es recogida desde el chip. Transmiten los datos binarios (una corriente de 1 y 0) en forma de una señal electrónica. Un dispositivo a la salida convierte después los datos binarios en información de video. Una vez digitalizada, el procesamiento y realce de la imagen se pueden hacer con pequeña pérdida de señal. Muchas cámaras CCD digitales facilitan características incluyendo gamma y ganancia para ser controladas digitalmente a través del puerto RS-232 complicado [20], [51].

1.2.3.6 Cámaras Monocromáticas vs. Color. Aunque esta distinción puede parecer insignificante, es en realidad uno de los puntos fundamentales a considerar cuando se escoge una cámara de video. Según plantea Edmund Optics,⁴ al elegir una cámara para una aplicación industrial, muchos eligen el color por instinto porque creen que una imagen monocromática es inferior, sin embargo esto es incorrecto, debido a que el ojo humano es más sensible a las variaciones de luz (luminancia) que a las variaciones de color (crominancia)

El chip de silicio se basa en el efecto fotoeléctrico y como resultado no puede distinguir entre los colores. Cada píxel en el sensor es asignado a un valor numérico basado en la cantidad de luz incidente. El número más pequeño representa el negro (cero), y el número más grande representa el blanco (uno), y todo entre estos es un tono de gris. Por lo tanto, cada píxel genera información solo acerca de la intensidad y no del color [20], [51].

⁴ EDMUND OPTICS, Op. cit., Disponible en la página web:
<http://www.edmundoptics.com/techSupport/DisplayCategory.cfm?categoryid=18>.

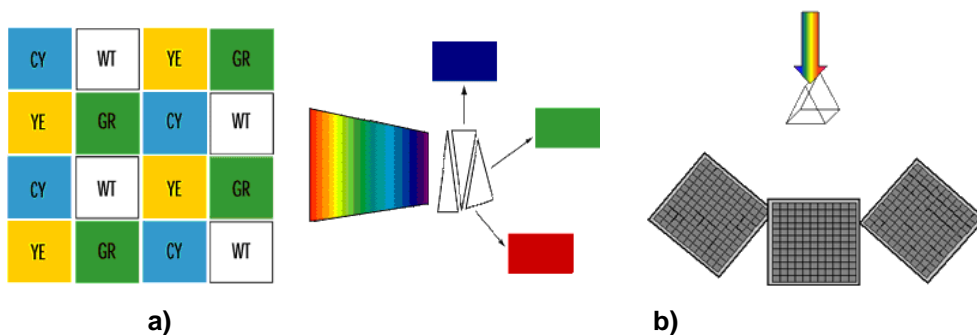


Figura 24. Métodos de filtración de cámaras CCD de color. a) Mascara de Bayer. B) luz separada mediante un prisma.

Tabla 8. Monocromático vs. Color.

Monocromático.	Color (un solo chip)	Color (tres chips)
<p>Un solo sensor produce imágenes en escala de grises.</p> <p>Ofrece un 10% más de resolución que cámaras similares de color de un solo chip.</p> <p>Mejor relación señal-ruido, mayor contraste, mayor rango dinámico</p> <p>Mayor sensibilidad a la luz tenue.</p> <p>El ojo percibe mejor las diferencias espaciales en gradientes de blanco y negro.</p> <p>Son mejores para medición y aplicaciones donde la resolución es más importante que el color.</p>	<p>En una mascara de Bayer, un píxel de color se forma con 4 celdas adyacentes que reciben distintos colores: Uno recoge luz roja, otro luz azul y otros dos se reservan para la luz verde (el ojo humano es más sensible a la luz verde que a los colores rojo o azul) y que luego se interpolan.</p> <p>Información sobre la luminosidad en cada píxel pero con una resolución en color menor que la resolución de iluminación. Se requieren más píxeles para reconocer el color.</p> <p>Las imágenes a color requieren más tiempo de procesamiento y no producen significativamente más información acerca del objeto.</p> <p>Cableado normal, fácil de integrar en sistemas.</p> <p>Bajo costo.</p>	<p>Un prisma separa la luz blanca en tres colores básicos (rojo, verde y azul) Cada color es dirigido a un chip, lográndose más resolución espacial y rango dinámico que cámaras de color de un chip (ver Figura 24)</p> <p>Sensibilidad más baja a la luz.</p> <p>Selección de lentes más pequeños.</p> <p>La información de color esta separada en tres señales (RGB), la cual es superior a los formatos estándares NTSC/PAL y Y-C.</p> <p>Más costoso.</p>

1.2.3.7 Velocidad de cuadro vs. Velocidad de obturación. La velocidad de cuadro se refiere al número de cuadros completos (los cuales pueden constar de dos campos) dispuestos en un segundo. Por ejemplo, la cámara de tres chips de color tiene una velocidad de cuadro de 30 cuadros / segundo (compuesto de dos campos de 1/60 segundos) En aplicaciones de alta velocidad, puede ser ventajoso elegir una velocidad de cuadro más rápida para adquirir más “imágenes” de los objetos a medida que estos se mueven.

La velocidad de obturación corresponde al “tiempo de exposición” del chip de CCD. El tiempo de exposición controla la cantidad de luz que incide en el chip. La sobre exposición puede ser controlada disminuyendo la iluminación o ganancia de la cámara o aumentando la velocidad del obturador. El aumento de la velocidad del obturador puede ayudar en la creación de “disparo instantáneo” de un objeto dinámico, que se pueda muestrear 30 veces por segundo (video en vivo) [2], [16], [20].

1.2.3.8 Especificación de resolución / contraste del CCD. La resolución de una cámara CCD se puede ser especificar en una variedad de formas, incluyendo contar píxeles, líneas de TV.

- *Contar píxeles.* Cantidad de píxeles en que se ha dividido la imagen.
- *Líneas de TV.* En CCD análogas, la especificación “líneas de TV” es de uso frecuente para valorar la resolución. Las “líneas de TV” o la especificación “TVL” es una unidad de resolución basada en un blanco de barras con líneas igualmente espaciadas. Si el blanco es extendido a fin de que cubra el campo de visión, el número de líneas de TV es calculado sumando todos los espacios y líneas resultantes. Hay también un factor de normalización usado en el cálculo del valor de la línea de TV horizontal basado en la relación de aspecto 4:3 del chip [20], [24].

1.2.3.9 Relación señal-ruido (RSR) Cuando la cantidad de señal recibida es muy grande esta se eleva por encima de nivel de ruido y es fácil de distinguir. En el caso de la fotografía digital con la luz de día la señal es muy alta por lo que el ruido queda muy atenuado en términos relativos y resulta difícil de percibir, se dice entonces que la relación señal / ruido (SNR, signal to noise ratio) es alta. En caso contrario, la señal es débil y por tanto la relación señal / ruido es baja. Esto ocurre porque durante la detección, la señal y el ruido tienen exactamente la misma naturaleza y ambos producen electrones, que si se generan en cantidades parecidas se entremezclan y son difíciles de distinguir entre sí. Además el ruido crea incertidumbre en la medida de la señal, cada lectura es diferente y no se sabe cuál es la “verdadera” Las tres fuentes de ruido más importantes son: ruido fotónico, ruido de corriente oscura y ruido de lectura [34], [25], [83].

La relación señal-ruido esta aproximadamente relacionada al rango dinámico de la cámara. Una alta relación señal-ruido produce mayor número de valores en la escala de grises (mas contraste) mostrado por la cámara. La relación señal-ruido se expresa en términos de decibeles (dB.) en sistemas análogos y bits en sistemas digitales.

En una cámara digital convencional sus características de diseño como la eficiencia cuántica, el ruido de lectura, la ganancia son parámetros fijos y no se pueden modificar, por lo que no se puede hacer mucho para reducir el ruido. Por lo tanto, para optimizar la señal y reducir el ruido sólo se puede actuar sobre el tiempo de exposición, eficiencia de la óptica, precisión de la montura o adquirir un número mayor de subexposiciones [2], [16].

Para aprovechar al máximo el intervalo dinámico de la cámara y alcanzar tiempos de exposición óptimos, hay que observar si el sensor de la cámara cuenta con alta o escasa refrigeración. Si dispone de alta refrigeración, la manera de reducir el ruido es utilizar tiempos de exposición mayores, pero si se dispone de escasa

refrigeración, las exposiciones prolongadas incrementan la temperatura del sensor aumentando el ruido de corriente de oscuridad [25]. La forma de reducir el ruido es hacer la adquisición de un número mayor de subexposiciones de menor duración que la deseable, especialmente cuando la temperatura ambiente es alta, siendo la mejor alternativa disponible para acumular señal y reducir el ruido de forma eficaz, aunque no sea la elección óptima. Como las muestras son independientes, la señal aumenta en la misma proporción que el número de imágenes que se combinan, mientras que el ruido por seguir la distribución de Poisson, aumenta de forma proporcional a la raíz cuadrada del número de las imágenes. De esta forma al combinar múltiples imágenes se incrementa la relación señal ruido. Este es, por tanto, un método muy eficaz para reducir el ruido [23].

Hay que tener cuidado con un parámetro ajustable, la sensibilidad ISO o ganancia, que afecta de forma notable el ruido de lectura y la ganancia [16]. Es decir, pasar de ISO400 a ISO1600 reduce el intervalo dinámico de la cámara (contraste) en más de la mitad. En estas cámaras lo mejor que se puede hacer para reducir este tipo de ruido es evitar sensibilidades ISO altas (p.e. ISO1600, 3200) y, como regla general, no pasar de ISO800.

1.2.3.10 Tiempo de integración o de exposición. Es el tiempo durante el cual los píxeles están acumulando luz. Es el factor opuesto a la velocidad de obturación y se utiliza normalmente en aplicaciones donde hay muy poca iluminación para incrementar la sensibilidad de la cámara. El máximo tiempo de integración está limitado por el ruido térmico del sensor, que puede mejorarse si se refrigera [83].

1.2.3.11 Ganancia o sensibilidad (velocidad ISO) El ajuste de ganancia controla la amplificación de la señal proveniente desde el chip CCD. Debe observarse que este amplifica toda la señal, incluyendo cualquier ruido de fondo asociado. La mayoría de las cámaras tienen ganancia automática (auto ganancia

o AGC) y algunas facilitan al usuario apagarla y fijarla manualmente [2], [16], [83].

1.2.3.12 Parámetro Gamma. El parámetro gamma se puede considerar como la capacidad de extender un lado (negro o blanco) del rango dinámico del píxel. Ese control es muchas veces usado en procesamiento de señales para aumentar la relación señal-ruido. También es utilizado para corregir distorsión en los colores presentados en el monitor.

Las CCD tienen una respuesta lineal mientras el valor gamma este colocado en uno. El ajuste del parámetro gamma controla la escala de grises reproducida en la imagen. Un valor gamma de la imagen de unidad ($\xi = 1$) indicara que el CCD esta reproduciendo precisamente la escala de grises del objeto (respuesta lineal) Colocando un valor gamma mucho más grande que la unidad resulta en una imagen perfilada en blanco y negro, mientras que colocando un valor gamma mucho menor que la unidad crea una imagen de gris suave [75].

1.2.4 ADAPTACIÓN DE LA CÁMARA AL MICROSCOPIO. Las cámaras fotográficas digitales se acoplan al microscopio mediante un adaptador óptico mecánico que en general debe ser de la misma marca del microscopio y se debe elegir en función del tamaño del sensor CCD utilizado. A este elemento intermedio se le conoce como "rosca C". La rosca C puede ser de imagen directa (1x) o incluir ópticas intermedias que aumentan el campo y disminuyen el desenfoque periférico. Estas roscas son suministradas por las marcas comerciales de los microscopios y de las cámaras. Existen también compañías que fabrican adaptadores a la medida para los casos en los que la marca del microscopio o de cualquier otro elemento no sean los estándares.



Figura 25. Esquema de acople entre una cámara fotográfica y el microscopio.

La conexión al microscopio se realiza de forma sencilla en microscopios triloculares. La cámara de video o de fotografía se adapta a la salida superior, la misma que se usa para microfotografía convencional (ver Figura 25). Es especialmente importante que la conexión mecánica sea firme, pues cualquier movimiento mínimo, es decir, vibraciones de la cámara, reduciría la calidad de la imagen notablemente [20].

1.2.5 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES. Muchas de las técnicas de procesamiento digital de imágenes que se describirán se pueden enfocar desde dos perspectivas distintas a saber:

- Dominio espacial. El procesamiento se lleva a cabo mediante operaciones que consideran los píxeles en sus posiciones espaciales dentro del plano de la imagen y los niveles de intensidad asociados.
- Dominio de la frecuencia. Es preciso realizar algún tipo de transformación de forma que se trabaje con las componentes de frecuencia. Entre las transformaciones mas útiles se destacan la transformada de Fourier, la transformada del coseno, la transformada wavelets, etc.[29], [30], [56].

Dentro de lo que se denomina procesamiento digital de imágenes se engloban una serie de técnicas que comprenden operaciones donde $f(x, y)$ es la imagen de entrada y $g(x, y)$ es la imagen procesada y T es un operador que actúa sobre f , definido en algún entorno de (x, y)

$$g(x, y) = T[f(x, y)] \text{ Ec. (2)}$$

El valor del píxel en la imagen de salida puede ser función del valor que tenía en la imagen de entrada, de los valores de sus vecinos o del valor de todos los puntos de la imagen de entrada. De acuerdo a esto, existen dos categorías de procesamiento.

1.2.5.1 Operaciones individuales o Procesamiento de punto. Es la forma más simple del operador T que corresponde a un entorno 1×1 , el cual puede ser lineal o no lineal. El operador T se aplica a cada píxel en la imagen o sección en la imagen y la salida depende únicamente de la magnitud del correspondiente píxel de entrada; independientemente de los píxeles adyacentes. En este caso g depende solo del valor de f en el punto (x, y) Es decir, cada punto de una imagen depende solo del nivel de gris en ese punto [5], [29], [56], [83].

1.2.5.2 Operaciones de vecindad o procesamiento por mascarar o filtrado. En este caso el operador T es una mascara (también llamadas plantillas, ventanas o filtros), la cual es un área de subimagen cuadrada o rectangular centrada en (x, y) en la que el nuevo valor del píxel en la imagen de salida depende de una combinación de los valores de los píxeles en la vecindad del píxel de la imagen original que esta siendo transformada (ver Figura 26) La idea subyacente detrás de las operaciones con mascarar consiste en permitir que el valor asignado a un determinado píxel sea una función de su propio nivel de gris y de los niveles de gris de sus vecinos. El centro de la subimagen se mueve píxel a píxel comenzando, por ejemplo, en la esquina superior izquierda y aplicando el

operador en cada posición (x, y) Por lo tanto, la idea general consiste en determinar g en un punto (x, y) a partir de los valores de f en un entorno predefinido (vecinos) de (x, y)

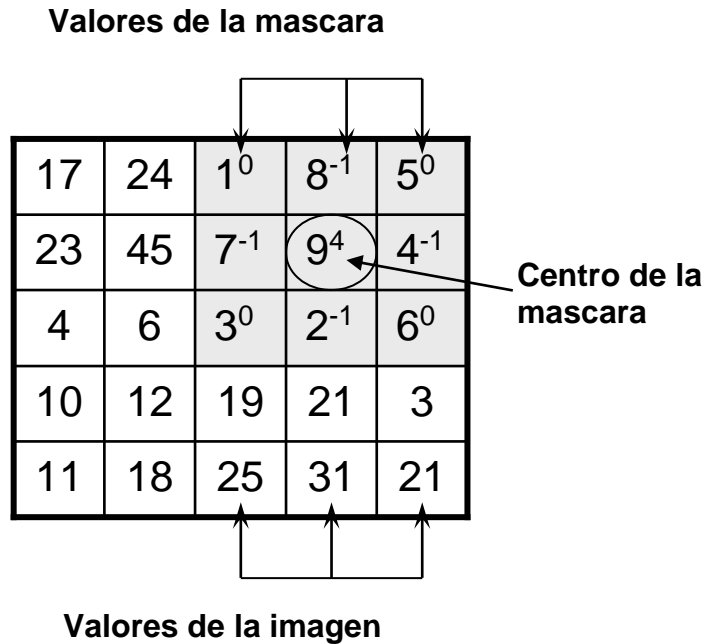


Figura 26. Aplicando la mascara a la imagen.

Estas mascaras o filtros permiten una variedad de técnicas o funciones de tratamiento. El objetivo de estas técnicas es procesar una imagen de tal modo que la resultante sea más adecuada que la imagen original para una aplicación específica [5], [83]. El término "específico" es importante porque establece que el valor de la imagen resultante esté en función del problema que se trata. Por lo tanto, dos propósitos principales del procesamiento de imágenes son:

- Mejorar o transformar en una forma conveniente la apariencia visual de las imágenes para el observador humano.

- Preparar las imágenes para la medición de las características de los objetos y estructuras presentes, tal como se requiere para el análisis de imágenes.⁵

Las técnicas que son apropiadas para cada uno de estos propósitos no son siempre las mismas, pero si hay un considerable solapamiento. La distinción entre el procesamiento y el análisis estriba en la extracción de la información desde la imagen. Las técnicas de visualización avanzadas, conjuntamente con el procesamiento y el análisis de imágenes, sirven para extraer y cuantificar los parámetros relevantes en las imágenes [17], [29], [30], [56], [69].

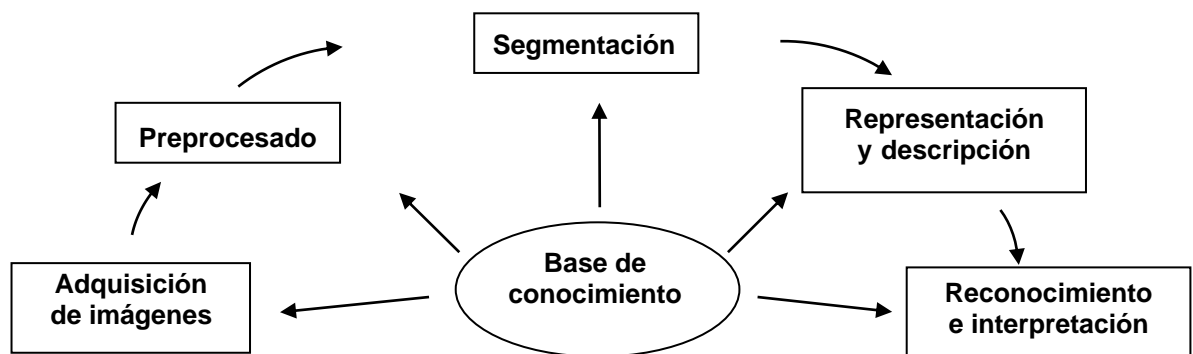


Figura 27. Etapas del procesamiento digital de imágenes.

1.2.5.3 Preprocesado de la imagen. En esta etapa se trata de modificar las imágenes para mejorar su calidad o resaltar aspectos de las mismas que nos interesan, de modo que aumenten las posibilidades de éxito en los procesos posteriores. El preprocesamiento puede tratar típicamente de técnicas de mejora de contraste, eliminación de ruido o aislar regiones de interés.

1.2.5.3.1 Técnicas de mejora por procesamiento de punto. Dentro de las técnicas de mejora por procesamiento de punto están: Negativo de imagen, sustracción de imágenes, multiplicación o división por un escalar, binarización, promediado de

⁵ PAJARES, Gonzalo y DE LA CRUZ, Jesús. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. Madrid: RA-MA Editorial, 2002, p. 1.

varias imágenes de la misma escena, transformaciones de histograma como son: el realce, la linearización y los ajustes de brillo y contraste.

Operadores aritméticos. Vistas las imágenes como matrices de valores numéricos, cabe la posibilidad de llevar a cabo sobre ellas diferentes y diversas operaciones de naturaleza aritmética. Estas operaciones aritméticas pueden considerarse como un determinado tipo de transformación que se realiza píxel a píxel sobre imágenes completas. Las operaciones aritméticas entre dos píxeles p y q son las siguientes:

- Adición: $p+q$
- Sustracción: $p-q$
- Multiplicación: $p*q$
- División: $p\div q$

El principal empleo de la adición de imágenes es la reducción de ruido mediante el promediado de imágenes. La sustracción de imágenes es una herramienta básica en el procesamiento de imágenes médicas, donde se emplea para eliminar la información estática de fondo. Uno de los principales empleos de la multiplicación (o división) de imágenes consiste en corregir las variaciones de los niveles de gris que se deben a una iluminación no uniforme o a la respuesta desigual del sensor empleado para captar la imagen. Las operaciones aritméticas implican solamente la localización espacial de un píxel cada vez, de forma que puedan realizarse in situ, es decir, que una operación aritmética en el punto (x, y) pueda almacenarse en este mismo lugar en una de las imágenes existentes, puesto que esa posición ya no volverá a visitarse [11], [56], [69], [83].

Manipulación del histograma de la imagen. El histograma de una imagen es una función discreta que representa el número de píxeles en la imagen en función de

los niveles de intensidad, g . La probabilidad $P(g)$ de ocurrencia de un determinado nivel g se define como:

$$P(g) = \frac{N(g)}{M} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde M es el número de píxeles en la imagen y $N(g)$ es el número de píxeles en el nivel de intensidad g . Como con cualquier distribución de probabilidad, todos los valores de $P(g)$ son menores que 1 y la suma de todos los valores de $P(g)$ da como resultado 1.

Existe un conjunto de propiedades que nos informan sobre la distribución de los niveles de gris en la imagen basándonos en el histograma las cuales son: la media, la varianza, la asimetría, la energía y la entropía. La modificación del histograma permite variar la distribución de los niveles de intensidad mediante una serie de funciones que expandan, compriman o desplacen los niveles de gris. Algunas de estas manipulaciones se orientan hacia la mejora de la calidad de la imagen, pero también sirve para fijar umbrales en procesos de binarización. Dichas técnicas tratan de eliminar efectos no deseados tales como sombras, reflejos, etc., a la vez que aumentan el contraste.

Un histograma con una distribución de los niveles de gris concentrada en una determinada zona presenta un contraste muy bajo, mientras que un histograma con una amplia distribución de los niveles de gris tiene un alto contraste. Un histograma con los niveles de gris concentrados en la parte baja del rango corresponde a una imagen oscura, Un histograma con los valores concentrados en su parte alta corresponde a una imagen brillante [4], [17], [22].

Existen otras funciones que permiten modificar el brillo y contraste de una imagen y, como consecuencia de ello, el propio histograma. Una de las más utilizadas toma la forma:

$$q = L^{1-m} p^m \quad \text{Ec. 4}$$

Donde p es el nivel de gris de la imagen original, q es el nivel de gris de la imagen resultante y L es el valor máximo que pueden tomar los niveles de gris. Naturalmente L dependerá del número de bits con los que se representen los niveles de gris de la imagen. Dependiendo del valor m , la función recibe un nombre específico, a saber: cuadrada ($m = 2$), cúbica ($m = 3$), raíz cuadrada ($m = 1/2$), raíz cúbica ($m = 1/3$) Cuando en la expresión (3) se toma $L = 1$ y $m = \gamma$, con $\gamma \geq 0$, dicha transformación se conoce como Corrección Gamma. Finalmente, otra función también muy usada resulta ser la logarítmica dada por:

$$q = \frac{L \ln(1 + p)}{\ln(1 + L)} \quad \text{Ec. 5}$$

Los parámetros de la transformación tienen el mismo significado que en (3) Existe otro tipo de manipulaciones del histograma que se pueden llevar a cabo conocidas como técnicas de realzado. Una de las más utilizadas para la mejora del contraste de la imagen es la ecualización o igualación del histograma, la cual busca distribuir los niveles de intensidad de una manera uniforme a lo largo del todo el rango de valores de niveles de gris. Hay dos tipos de ecualización:

- *Ecualización uniforme.* Se pretende que ante cualquier histograma, este se modifique de tal forma que en la imagen resultante los niveles de gris se repartan de forma equitativa en todo el rango de valores establecidos, es decir, de 0 a 255 en imágenes de 8 bits por píxel.
- *Ecualización exponencial.* Se trata de distribuir el histograma según una función exponencial.

En lugar de usar histogramas, se podría haber basado el realzado probablemente en otras propiedades de los píxeles incluidos en el entorno de vecindad. De estas

propiedades, que se usan frecuentemente por su importancia sobre el aspecto de la imagen, son la media de intensidad y la varianza (o alternativamente desviación estándar) La media nos proporciona una medida del brillo medio y la varianza una medida del contraste [56].

1.2.5.3.2 Técnicas de mejora por operaciones de vecindad. Dentro de las técnicas de mejora por operaciones de vecindad distinguiremos entre operaciones de suavizado y extracción de bordes.

Operaciones de suavizado. Dentro de las operaciones de vecindad destacan por su interés en el tratamiento de señales y, por tanto, en las imágenes (un tipo concreto de señales) las operaciones de filtrado, que basan su operatividad en la convolución de la imagen utilizando el denominado núcleo de convolución. Cabe distinguir dos tipos de filtros: paso alto y paso bajo, que en el contexto de la teoría de señales supone que los primeros dejan pasar las altas frecuencias de la señal y los segundos, las bajas. De esta forma, las altas frecuencias se asocian a cambios bruscos de intensidad en pequeños intervalos espaciales, es decir, bordes, mientras que las bajas frecuencias se refieren a cambios lentos de intensidad. Por lo tanto, un filtro pasa bajos, al no dejar pasar las altas frecuencias (bordes), atenuará estas, produciendo como resultado un desenfoque o desdibujado de los bordes; mientras los denominados paso alto, al dejar pasar las altas frecuencias (bordes), producen un realzado de los bordes de la imagen atenuando las zonas donde no hay cambios bruscos de intensidad [17], [29], [56].

Existen otras operaciones de suavizado de imágenes, pero que se llevan a cabo mediante operaciones de naturaleza estadística cuyas operaciones más comunes son: filtrado de la media (promediado del entorno de vecindad), filtrado de máximos y mínimos, filtrado de la mediana y filtrado de la moda [11], [17], [29], [56].

1.2.5.4 Segmentación de la imagen. La segmentación es el proceso por el cual se extrae de la imagen cierta información subyacente para su posterior uso. La segmentación subdivide una imagen en sus partes constituyentes u objetos. En general, como expresa Gonzáles, la segmentación autónoma es una de las tareas más difíciles del procesamiento de imágenes. No existe un algoritmo aplicable con carácter general para extraer objetos de las imágenes. Por el contrario, hay una variedad de técnicas que son útiles en situaciones particulares. Esta etapa determina el eventual éxito o fracaso del análisis. De hecho, la segmentación rara vez llega a alcanzar una solución satisfactoria. Por esta razón, se debe poner un considerable cuidado en aumentar la probabilidad de tener una segmentación robusta. En algunas situaciones, tales como las aplicaciones de inspección industrial, es posible que a veces se tome alguna medida de control sobre el entorno. Aquí se debe prestar invariablemente una considerable atención a oportunidades de este tipo. En otras aplicaciones, como la adquisición de objetivos, no se tiene control sobre el entorno. Por consiguiente, el método habitual se orienta a la selección del tipo de sensor mas apropiado para realzar los objetos de interés, mientras se disminuye la contribución de los componentes irrelevantes de la imagen⁶.

Los algoritmos de segmentación de imágenes monocromáticas generalmente se basan en una de las dos propiedades básicas de los valores del nivel de gris: discontinuidad y similitud. En la primera categoría (segmentación orientada a bordes), el método consiste en dividir una imagen basándose en los cambios bruscos de nivel de gris. Las principales áreas de interés de esta categoría son la detección de puntos aislados, la detección de líneas y bordes de una imagen.

Los principales métodos de la segunda categoría (segmentación orientada a regiones) están basados en la umbralización, crecimiento de región, división y

⁶ GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard. Tratamiento digital de imágenes. Delaware: Addison-Wesley / Dias de Santos, 1996, p .447 y 448.

fusión de regiones. Una región es un área de la imagen en la que sus píxeles poseen propiedades similares (de intensidad, color, etc), mientras que un borde es una línea que separa dos regiones de diferentes propiedades.

Tanto la detección de bordes como la de regiones implican una manipulación de la imagen original, de forma que los valores de los píxeles originales son modificados mediante ciertas funciones de transformación u operadores [4], [5], [11], [17], [29], [30], [31], [56], [69], [73], [74], [80], [83].

1.2.5.4.1 Extracción de bordes, esquinas y puntos de interés. Para la detección de bordes, basándonos en el hecho de la discontinuidad, se tienen los siguientes tipos de operadores:

- Operadores primera derivada: Operadores de Sobel, Prewitt, Roberts, etc.
- Operadores segunda derivada: Operador Laplaciano, Laplaciana de la Gaussiana, etc.
- Operadores morfológicos.

Existen varias técnicas para la detección de los tres tipos básicos de discontinuidades de una imagen digital: puntos, líneas y bordes. En la practica, la forma más común de ver las discontinuidades es pasar una mascara a través de la imagen como se describió anteriormente [5], [17], [22], [83].

1.2.5.4.2 Extracción de regiones. En las imágenes aparecen ciertas áreas o zonas caracterizadas por el hecho de que constituyen agrupaciones de píxeles conectados entre sí, pero además de la conexión, dichos píxeles presentan propiedades o características comunes, por ejemplo, tienen el mismo color. Estas agrupaciones son las regiones. Para la detección de regiones se tiene algunas técnicas basadas en el hecho de la similitud [11], [17], [29], [56], [83].

- Binarización basada en el uso de umbrales.
- Umbralización adaptativa.
- Crecimiento de regiones mediante la adición de píxeles.
- División de regiones.
- Similitud de textura, color o nivel de gris.

1.2.5.5 Representación y descripción de la imagen. El problema de la descripción en la visión consiste en extraer características de un objeto para reconocerlo. Para tal propósito hay que suponer que ciertas partes de las imágenes han sido aisladas por medio de la segmentación como entidades significativas. Después de segmentar una imagen en regiones, el conjunto resultante de píxeles segmentados se representa y describe normalmente en una forma adecuada para su posterior procesamiento por computadora. Como expone Gonzales, la elección del tipo de mediciones utilizadas para los patrones de una determinada aplicación tiene una profunda influencia en el grado de separación entre clases y en el rendimiento final del sistema de análisis de imágenes⁷. Básicamente, el representar una región implica dos posibilidades:

- Hacerlo en términos de sus características externas (su contorno)
- Hacerlo en términos de sus características internas (los píxeles que comprenden la región)

La elección de un esquema de representación es, sin embargo, solamente una parte de la tarea de hacer los datos útiles para una computadora. El siguiente paso consiste en describir la zona en la representación elegida. Generalmente, se elige una representación externa cuando el objetivo principal se centra en las características de forma y una representación interna cuando el principal interés se centra en las propiedades de reflectividad, tales como el color y la textura. En

⁷ GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard, Op. Cit., p. 620

cualquier caso, las características seleccionadas como descriptoras deberían ser tan insensibles como fuera posible a variaciones tales como cambios de tamaño, de traslación y rotación [11], [29], [30], [56].

1.2.5.5 1 Descripción de líneas y contornos. Existe un conjunto de métodos para la descripción de líneas y contornos. La aproximación general será ajustar el objeto por una o más líneas rectas o curvas. El problema queda reducido al ajuste de una línea a un conjunto de puntos discretos en el plano XY que constituye el punto de partida [4], [29], [56]. De entre las técnicas mas utilizadas para descripción de líneas y contornos son:

- Segmentos rectos mediante códigos de cadena.
- Ajuste de líneas mediante mínimos cuadrados.
- Ajuste de líneas mediante autovector.
- La transformada de Hough.
- Signaturas, la cual es una representación funcional unidimensional de una frontera.
- Descriptores de Fourier.
- Momentos
- Ajuste de contornos deformables.
- Funciones splines.

1.2.5.5 2 Descripción de regiones. Según el criterio a utilizar o la forma de ver la región podemos obtener diferentes tipos de propiedades para su descripción.

Propiedades topológicas. Las propiedades topológicas son útiles para descripciones globales de regiones del plano imagen. La topología es el estudio de las propiedades de una figura a las que no afecta ninguna deformación (estiramiento o rotación), en tanto no haya división horizontal o uniones en la figura.

La región puede ser vista como un conjunto de puntos conectados entre sí, es decir, partiendo de un punto de la región se puede llegar a otro punto de la misma sin abandonar la región, o puede ser descrita por el número de huecos que presenta, son en ambos casos propiedades topológicas [29], [56].

Propiedades métricas. Las métricas son generalizaciones de la distancia Euclídea, así una propiedad métrica cambiara si el plano de la figura se distorsiona. Entre las propiedades métricas más simples de los objetos destacan el área, el perímetro, el centro de gravedad, la excentricidad, la redondez, la compacidad, la compatibilidad, etc. [4], [29], [56].

Descripciones basadas en irregularidades. También es posible fijarnos en las irregularidades de las regiones para su diferenciación. Un método es analizar las desviaciones de la convexidad como envoltura y deficiencia convexa. A partir de estas propiedades podemos hallar la convexidad y solidez de una región [29], [56].

Textura. Un método importante para la descripción de regiones consiste en cuantificar su contenido de textura. Aunque no existe una definición formal de la textura, este descriptor proporciona intuitivamente medidas de propiedades tales como suavizado, rugosidad y regularidad. Los tres métodos principales más utilizados en el procesamiento de imágenes para describir la textura de una región son los estadísticos, estructurales y espectrales. Las soluciones estadísticas proporcionan características de texturas tales como suavidad, rugosidad, granulosidad, y otras similares. Las técnicas estructurales y espectrales tratan de la composición de imágenes simples, tales como la descripción de texturas basadas en líneas paralelas regularmente espaciadas. Estas técnicas se basan en las propiedades del espectro de Fourier y se utilizan para detectar la periodicidad global de una imagen mediante la identificación de picos estrechos de alta energía del espectro [4], [5], [29], [56].

1.2.5.5.3 Operadores morfológicos. La morfología matemática se usa como una herramienta para extraer componentes de una imagen que sean útiles en la representación y descripción de la forma de una región, tales como contornos, esqueletos y cerco convexo. También son de interés las técnicas morfológicas para el pre o postprocesado, tales como el filtrado morfológico, la reducción y el recortado.

La morfología matemática esta basada en la geometría y la forma. Las operaciones morfológicas simplifican las imágenes y preservan las formas principales de los objetos. En visión artificial se utiliza la morfología para el tratamiento de regiones en el sentido de determinar como se pueden cambiar, contar o evaluar. La morfología matemática aprovecha las propiedades de los conjuntos de puntos, los resultados de la geometría integral y la topología, ya que los fundamentos matemáticos fueron concebidos desde el punto de vista de la posición de cada píxel binario en la imagen en lugar de hacerlo desde el punto de vista de la intensidad. La morfología tiene su principal aplicación en imágenes binarias. Pero existe también tratamiento morfológico para imágenes en grises [5], [22]. La morfología se puede utilizar para las siguientes tareas:

- Suavizar los bordes de una región. Esto es útil cuando los bordes se presentan ruidosos.
- Separar determinadas regiones que el proceso de segmentación las presenta unidas.
- Unir regiones que han sido separadas durante la segmentación.
- Como consecuencia de los dos puntos anteriores, facilitar el cómputo de regiones de una imagen.

Una imagen binaria es aquella que posee dos únicos valores: 0 y 255. Si esta normalizada toma los valores: 0 y 1. Esta imagen puede tratarse como un conjunto de puntos, en la cual los puntos que pertenecen a los objetos en la imagen

representan un conjunto X . En imágenes binarias esos puntos son píxeles con valor binario uno. Los puntos del conjunto complementario X^c corresponden al fondo con valores binarios iguales a cero.

Una transformación morfológica ϕ viene dada por la relación de la imagen (conjunto de puntos X) con otro pequeño conjunto de puntos B , llamado elemento estructural. Este elemento B se expresa con respecto a un origen local O (llamado punto representativo o director) La transformación morfológica $\phi(X)$ aplicada a la imagen X significa que el elemento estructurante B se desplaza por toda la imagen. Suponiendo que B se posiciona sobre algún punto de la imagen, el píxel de la imagen correspondiente al punto representativo O de B se denomina píxel actual. El resultado de la relación (que puede ser cero o uno) entre la imagen X y el elemento estructural B en la posición actual, se almacena en el píxel actual de la imagen [5], [11], [17], [30], [56], [60], [83].

1.2.5.5.4 Operadores lógicos. Si nos trasladamos al dominio de la lógica matemática binaria podemos ver este tipo de imágenes como formadas por valores lógicos de 0 y 1, donde el 0 lógico es el nivel de cero de valores de intensidad y el 1 lógico es el nivel de intensidad 255. Dado que la representación de los datos en un computador finalmente llega a ser una representación binaria, siempre es posible realizar cualquier tipo de operación lógica binaria sobre ellos. Las operaciones lógicas entre dos píxeles p y q son las siguientes:

- Y: $p \text{ and } q$ (o también $p \cdot q$)
- O: $p \text{ or } q$ (o también $p + q$)
- Complemento: $\text{not}(q)$ (o también \bar{q})

Estas operaciones son funcionalmente completas en el sentido que pueden ser combinadas para formar cualquier otra operación lógica. Las operaciones lógicas

se emplean en tareas como el enmascaramiento, la detección de caracteres y el análisis de formas. Las operaciones lógicas sobre imágenes enteras se realizan píxel a píxel. Además, las operaciones lógicas pueden emplearse en operaciones orientadas a los vecinos mediante el empleo de mascarar [17], [29], [56], [83].

1.2.5.6 Reconocimiento de patrones: Estimación, agrupación y clasificación.

El reconocimiento es el proceso por el cual se asigna una etiqueta a un objeto, basándose en la información proporcionada por sus descriptores. La interpretación implica asignar significado a un conjunto de objetos reconocidos.

Según Gonzáles, las técnicas mas avanzadas de análisis de imágenes por computadora se basan en su mayor parte en fórmulas heurísticas, adaptadas para la resolución de problemas específicos. Los sistemas de este tipo son sumamente especializados y tienen poca o ninguna aplicación en otras tareas. Esto es, la teoría actual y las limitaciones de implementación en el campo del análisis de imágenes implican soluciones que, en gran medida, dependen del problema. Nuestro conocimiento y comprensión de los principios fundamentales del reconocimiento y la interpretación llega a ser mucho menos preciso y mucho más especulativo. Esa relativa falta de comprensión se traduce la final en una formulación de restricciones e idealizaciones cuyo propósito es reducir la complejidad de las tareas, hasta llegar a un nivel razonable. El producto final es un sistema con capacidades operativas sumamente especializadas⁸.

El reconocimiento de patrones es la disciplina científica cuyo objetivo es la clasificación de objetos en un cierto número de categorías o clases. Un patrón es una descripción estructural o cuantitativa de un objeto o de alguna otra entidad de interés en una imagen, el cual esta formado por uno o más descriptores. En otras palabras, un patrón es una disposición de descriptores. Una clase de patrones es

⁸ GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard, Op. Cit., p. 616, 618.

una familia de patrones que comparten algunas propiedades comunes. Las clases de patrones se representan por w_1, w_2, \dots, w_M , donde M es el número de clases. El reconocimiento de patrones mediante una máquina supone la utilización de técnicas que permitan asignar los patrones a sus respectivas clases, automáticamente y con la menor intervención humana posible.

Las tres representaciones de patrones principalmente utilizadas en la práctica son los vectores (para descripciones cuantitativas), las cadenas y los árboles (para descripciones estructurales). Históricamente los dos enfoques en el reconocimiento de patrones ha sido el estadístico (o teoría de la decisión) y el sintáctico (o estructural). Recientemente el desarrollo de las redes neuronales ha proporcionado un nuevo enfoque. Actualmente, el aumento de la capacidad de almacenamiento ha propiciado el reconocimiento basado en la apariencia.

Tanto el enfoque estadístico como el basado en redes neuronales utilizan patrones de los que se extraen de ellos propiedades de naturaleza cuantitativa, mientras que el enfoque sintáctico se fundamenta en las relaciones geométricas asociadas a la forma de los objetos y el enfoque basado en la apariencia considera distintas formas de vista de los mismos.

El reconocimiento de decisión teórica se basa en la representación de patrones en forma vectorial y en la búsqueda posterior de aproximaciones que permitan agrupar y asignar estos patrones vectoriales a las diferentes clases de patrones. Las principales técnicas de reconocimiento de decisión teórica son los clasificadores de mínima distancia, los correladores, los clasificadores de Bayes y las redes neuronales.

En el reconocimiento estructural los patrones se representan en forma simbólica (como cadenas y árboles), y los métodos de reconocimiento se basan en el

emparejamiento de símbolos o en modelos que tratan a los patrones de símbolos como sentencias de un lenguaje artificial.

La interpretación de una imagen consiste en asignar un significado a un conjunto de elementos reconocidos en dicha imagen. El principal concepto que subyace en las diversas metodologías de interpretación de imágenes es la organización efectiva y el empleo del conocimiento acerca del dominio específico de un problema. Las técnicas actuales para la interpretación de imágenes se basan en la lógica de predicados, en redes semánticas y en sistemas de producción (en concreto, en sistemas expertos) [11], [29], [30], [56], [81].

3. METODOLOGÍA E IMPLEMENTACIÓN

Se realizó una aplicación de los conceptos previamente presentados en el Laboratorio de Genética Humana el cual se halla ubicado en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca.

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este estudio se emplearon muestras de tejido sanguíneo (muestras de sangre periférica) obtenidas de los pacientes examinados en el Laboratorio de Genética Humana. Aunque existe varias técnicas de bandeo, la mas empleada en el laboratorio para la tinción de las muestras es la técnica de bandeo R (técnica de bandeo de resolución estándar), que permite detectar alrededor de 550 a 650 bandas.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS UTILIZADOS

Antes de la realización de este estudio, el Laboratorio de Genética Humana disponía de los siguientes equipos para el análisis de las muestras:

- Microscopio trilocular o multicabecal marca Leica de campo claro. Cuenta con un sistema de tres filtros (verde, morado claro y atenuador de brillos) para lograr un mejor realce de la imagen de la muestra. Cuenta con la capacidad para desarrollar microscopia de fluorescencia. Posee un tambor de objetivos variables: 10x, 20x, 40x y 100x y tiene un ocular adicional para acoplar una cámara de video o una cámara fotográfica para la toma de imágenes.

- Sistema de microfotografía compuesto por: Cámara de rollo marca Leica, modelo MP530, cable, lente de la cámara de 0.32x. exposímetro marca Leica, modelo MP530.
- Unidad de video que incluye: Cámara análoga modelo HCO5X con sensor CCD de tamaño 1/2", monitor marca Sony, teclado y cable adaptador de video.

Para el desarrollo de este estudio fueron adquiridos por el Laboratorio de Genética Humana los siguientes dispositivos:

- Tubos de acople entre la cámara fotográfica digital y el microscopio.
- Cámaras digitales, de las cuales se escogió una (ver tabla 9)

Tabla 9. . Cámaras digitales convencionales utilizadas en el proyecto.

Modelo de la cámara	Resolución máx. en megapíxeles	Zoom óptico	Salida de audio / video	Tamaño del sensor en formato óptico
Leica LEI-470 (análoga)	0.31 (640*480)	No tiene	NTSC o PAL	1/2"
Olympus C150 D390	2	No tiene	NTSC o PAL	1/3.2"
Samsung Digimax D53	5	3x	No tiene	1/2.5"
Canon PowerShot A530	5	4x	NTSC o PAL	1/2.5"
Canon PowerShot A560	7.1	4x	NTSC o PAL	1/2.5"
Canon PowerShot A410	3.2	3.2x	No tiene	1/3.2"
Canon PowerShot A460	5	4x	NTSC o PAL	1/3"

- CPU con tarjeta madre marca MSI, procesador AMD ATLHON 3000+, disco duro MAXTOR de 120 GB, memoria DDR 333 de 1gb.
- Monitor de LCD marca DELL de 19 pulgadas, modelo m783c, con resoluciones de 800x600, 1024x768, 1152x864, 1280x960 y 1280x1024.
- Tarjeta importadora de video marca ATI RADEON 2006 X1300. Posee una memoria RAM de 256 MB. Captura video análogo en formato MPEG-2 a resolución completa de 720x480 a 30 cuadros por segundo. Posee entradas para señal de video compuesto, S-video y cable coaxial

3.3 DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE

El montaje experimental es mostrado en la Figura 28, donde se puede apreciar en primera instancia que hubo la necesidad de colocar el microscopio sobre una base de poliestireno expandido (Icopor) que disminuyera en parte las vibraciones externas generadas por el tráfico vehicular que perjudicaban tanto la observación como la toma de fotografías de las muestras.



Figura 28. Montaje del sistema de visión artificial.

La cámara fotográfica digital fue acoplada al ocular adicional del microscopio mediante un elemento intermedio (tubo adaptador) de marca distinta a la cámara y al microscopio (ver Figura 29) Las cámaras digitales expuestas en la tabla 9 fueron puestas a prueba tanto con adaptador como sin él. Sin el adaptador el campo que interesaba fotografiar era muy reducido y se dificultaba conseguir el punto de enfoque óptimo ya que era muy difícil apuntarle. Con el adaptador se resolvió los problemas citados puesto que permitía mantener la cámara estable y fija al microscopio permitiendo hacer más fácilmente los ajustes tanto del microscopio como de la cámara.



Figura 29. Cámara digital Canon PowerShot A460 y tubos de acople entre la cámara y el microscopio.

Por otro lado, la salida de señal de video compuesto de la cámara fue enviada a una tarjeta importadora de video (ver Figura 30), que se encargaba de digitalizarla y visualizarla en el monitor del computador, esto con fin de poder observar casi en

tiempo real las muestras colocadas bajo el microscopio y lograr un mejor enfoque de las mismas, ya que el tamaño del visor de la cámara es muy pequeño y además, al ser montada en el microscopio se queda con este mirando o apuntando hacia arriba, lo que resulta muy incómodo a la hora de comprobar el campo y el enfoque.



Figura 30. Tarjeta importadora de video empleada.

Aunque si bien, era posible fotografiar las imágenes con el software de la tarjeta, la imagen en el monitor se percibía con poca resolución y con una velocidad de refresco baja, apreciándose el movimiento “a saltos” por lo que se prefirió realizar las fotografías directamente desde la cámara y transferirlas al PC mediante el puerto USB. Esto también motivó para que no se eligiera la cámara de video análoga porque además de lo citado anteriormente, había adición de ruido junto con cierta pérdida de señal al digitalizarla.

3.4 ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES

La muestra es colocada bajo el microscopio y observada con el objetivo de 40x para localizar la metafase que presente la mejor calidad. Una vez localizada se añadía aceite de inmersión el cual rellenaba el espacio entre la placa de la muestra y el objetivo para que el flujo de luz ingresara todo al objetivo y no se dispersara. Después se ajustaba el objetivo en 100x y se ubicaba la metafase en el centro del campo de visión. En esta etapa se experimento con cada uno de los

tres filtros que posee el microscopio (filtro verde, filtro morado claro y filtro atenuador de brillos) y la combinación de los mismos, produciéndose la mejor calidad de imagen con el filtro verde que permitía observar la imagen con un mejor contraste y diferenciación de matices (ver Figura 31) También se experimento con el diafragma de iris del microscopio, el cual ajustándolo a un valor de F4 y junto con una mayor iluminación, permitió un mayor contraste de la imagen y fotografías con un menor nivel de ruido.

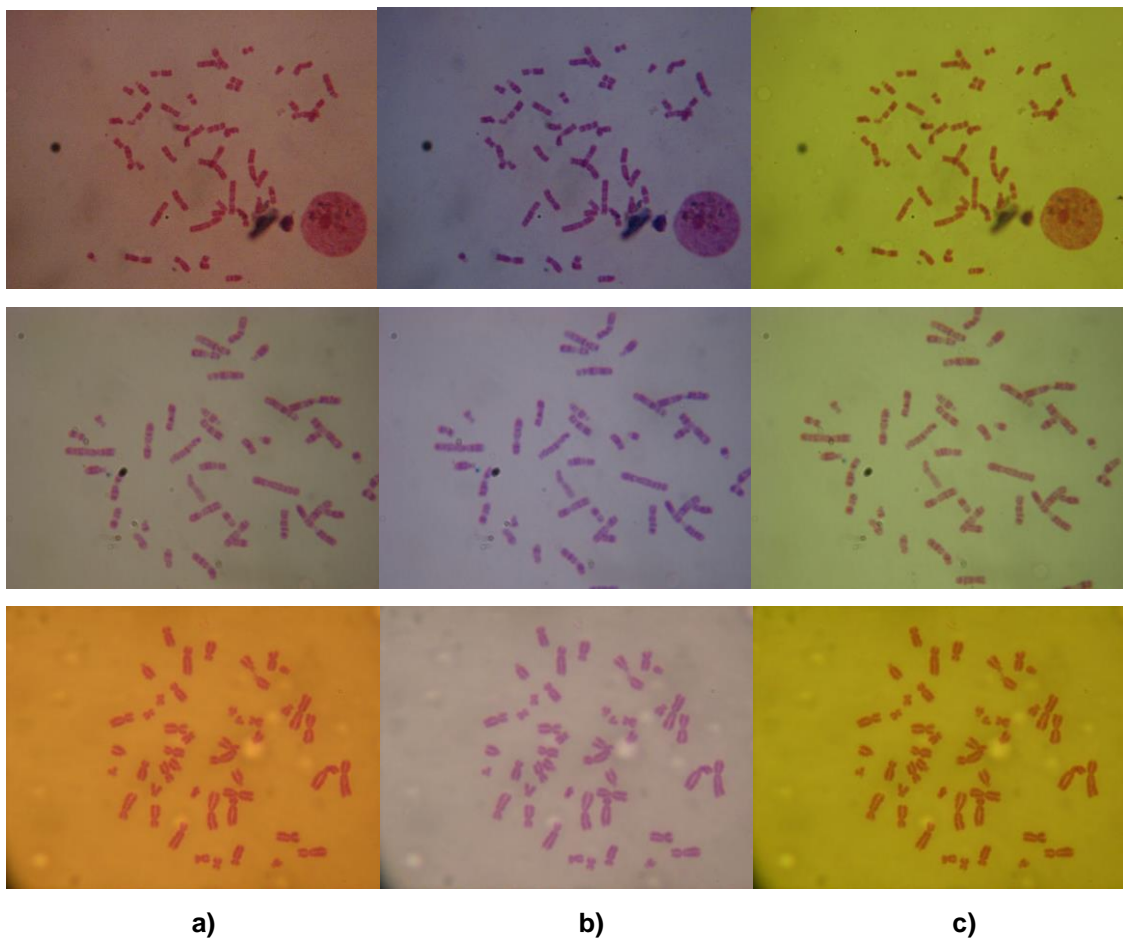


Figura 31. Fotografías con a) Sin filtro violeta, b) Filtro violeta, c) Filtro verde.

Después, la imagen de la muestra, producida por el objetivo de 100x, es proyectada dentro del sensor CCD de la cámara fotográfica digital. Con el zoom óptico situado en 4x se consiguió un aumento total de 400x, que permitió la observación de los cromosomas con un tamaño adecuado para la diferenciación

clara de sus bandas y se evito fotografiar el anillo negro periférico creado por el ocular (ver Figura 32). Para la toma de las fotografías, se experimento con la cámara tanto en modo automático como en modo manual. En el modo automático la cámara por lo general, seleccionaba parámetros erróneos de apertura del diafragma, tiempo de exposición y tendía a enfocar el sujeto más cercano o él más contrastado, ocasionado que los cromosomas quedaran borrosos dificultando la apreciación del centrómero, las bandas y sus bordes. Para el modo manual, se ensayo con cada uno de los parámetros de ajuste de la cámara como tiempo de integración o de exposición, apertura del diafragma y ganancia (velocidad ISO), con los que se experimentó hasta conseguir la combinación optima que permitiera adquirir fotografías de buena calidad, lográndose mejores fotografías en el modo manual que en el modo automático (ver Figura 33)

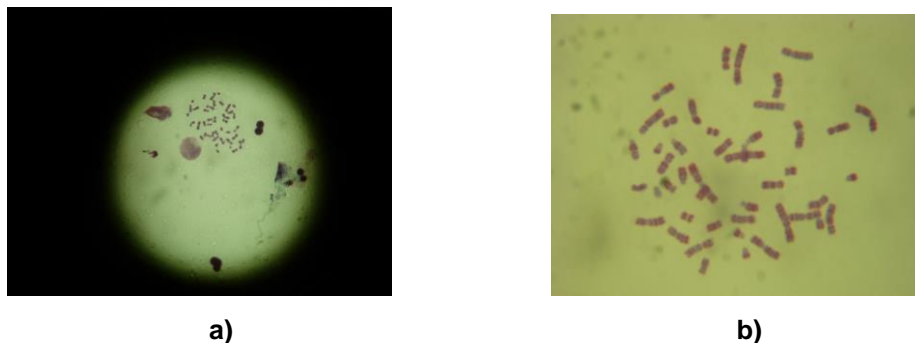


Figura 32. Fotografías a) Aumento 100x, b) Aumento 400X.

Todo este proceso fue realizado con cada una de las cámaras digitales convencionales enunciadas en la tabla 9, lográndose fotos más claras y contrastadas con la cámara Canon PowerShot A460 (ver Figura 29).

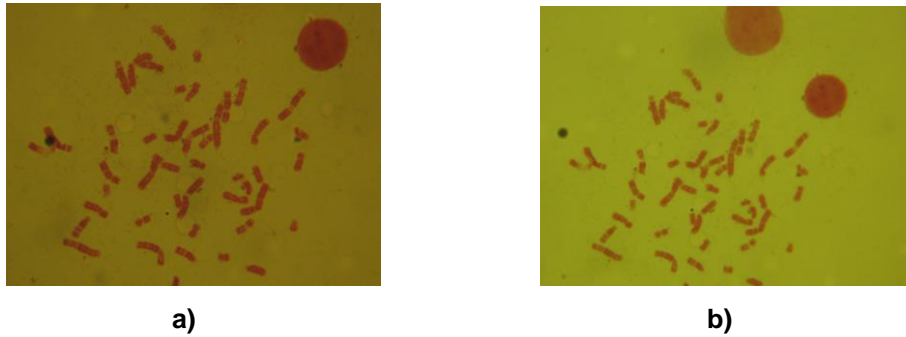


Figura 33. Fotografías a) tomada en modo automático, b) tomada en modo manual.

3.5 DESCRIPCIÓN DEL SOFTWARE

En este estudio, se empleó Matlab como lenguaje de programación, ya que cuenta con un conjunto de herramientas poderosas para el procesamiento de imágenes. Esto extiende las capacidades básicas de Matlab proporcionando un número de entradas y salidas especializadas, funciones de despliegue, adquisición y procesamiento de imágenes. Cuando se trabaja con imágenes en Matlab, hay muchas cosas para tener presente en mente como la elección adecuada del formato al momento de guardar las imágenes, el despliegue de una imagen, la conversión entre los distintos formatos de la imagen, mejora de imágenes, etc. Hay cuatro tipos básicos de imagen soportados por Matlab: imágenes indexadas, imágenes de intensidad (o en escala de grises), imágenes binarias e imágenes de RGB (o color verdadero). Los siguientes formatos de imagen son soportados por Matlab: TIFF, PNG, HDF, BMP, JPEG, GIF, PCX, XWD, etc. La imagen es guardada como matriz usando las convenciones estándar de Matlab.

Matlab también es usado ampliamente en todas las áreas de matemática aplicada, en la educación e investigación. Matlab simboliza Laboratorio de Matrices, cuyo software es elaborado en torno a vectores y matrices. Esto hace al software particularmente muy útil y versátil para resolver ecuaciones diferenciales y algebraicas y para la integración numérica. Matlab también posee herramientas definidas como funciones, para trabajar en otros campos como inteligencia artificial, procesamiento de señales, simulación de procesos industriales, etc.

3.6 CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO DE IMÁGENES DE CROMOSOMAS, ANÁLISIS Y PROBLEMA DE CLASIFICACIÓN

Actualmente la mayoría de los sistemas reduce el problema de clasificación de cromosomas a varias etapas específicas [76]. Para cada etapa se construyen los procedimientos apropiados en los que se incorporan diferentes técnicas de procesamiento de imágenes en forma de algoritmos. Para obtener una buena clasificación, los procedimientos correspondientes deben ser aplicados en una secuencia apropiada, es decir, un sistema de control es necesario, ya que algunas etapas se deben realizar de forma manual o semiautomática, para garantizar el éxito de la clasificación

- Mejoramiento de la imagen (eliminación de ruido, mejora de contraste, etc.)
- Segmentación de la imagen.
- Eliminación de objetos extraños.
- Separación de cromosomas unidos y solapados.
- Orientación adecuada del cromosoma.
- Determinación de la posición del centrómero.
- Extracción de las características de cada cromosoma (longitud, índice centromérico y perfil de densidad)
- Procedimiento de clasificación.

En la Figura 34 se muestra el diagrama de flujo que ilustra la forma como se incorporaron estas etapas en la construcción del algoritmo de clasificación de cromosomas, y luego se brinda una explicación mas detallada de cada una de las etapas.

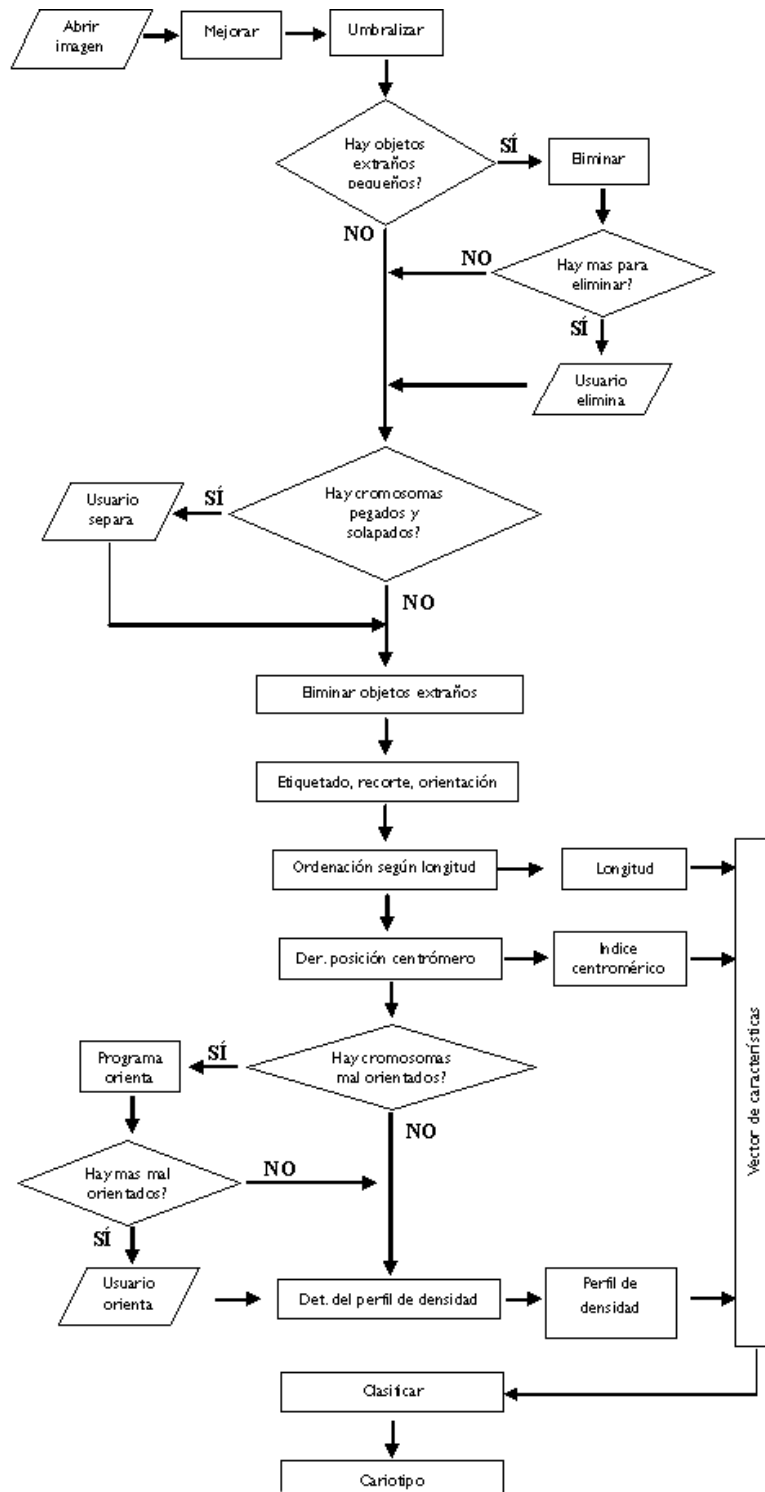


Figura 34. Diagrama de flujo del algoritmo de clasificación.

Debido a que el ojo humano es más sensible a las variaciones de luz (luminancia) que a las variaciones de color (crominancia) se decidió trabajar con fotografías en escala de grises, ya que permite una mejor percepción de las bandas y de anomalías estructurales. En estas imágenes las bandas se observan con mejor contraste permitiendo así tener un mejor discernimiento a la hora de formar las parejas de cromosomas. Además este tipo de imágenes tiene un menor peso de fichero que una a color ocupando menos espacio al almacenarla, y permite ser procesada más fácil y rápido por un algoritmo. Por consiguiente, la imagen se separó en sus tres planos (rojo, verde y azul), para analizar su calidad y elegir el plano que presentara mejor contraste y menor ruido. Para realizar esta comparación, se recurrió al análisis del histograma, el cual es una representación grafica de los niveles de gris versus número de píxeles en la imagen

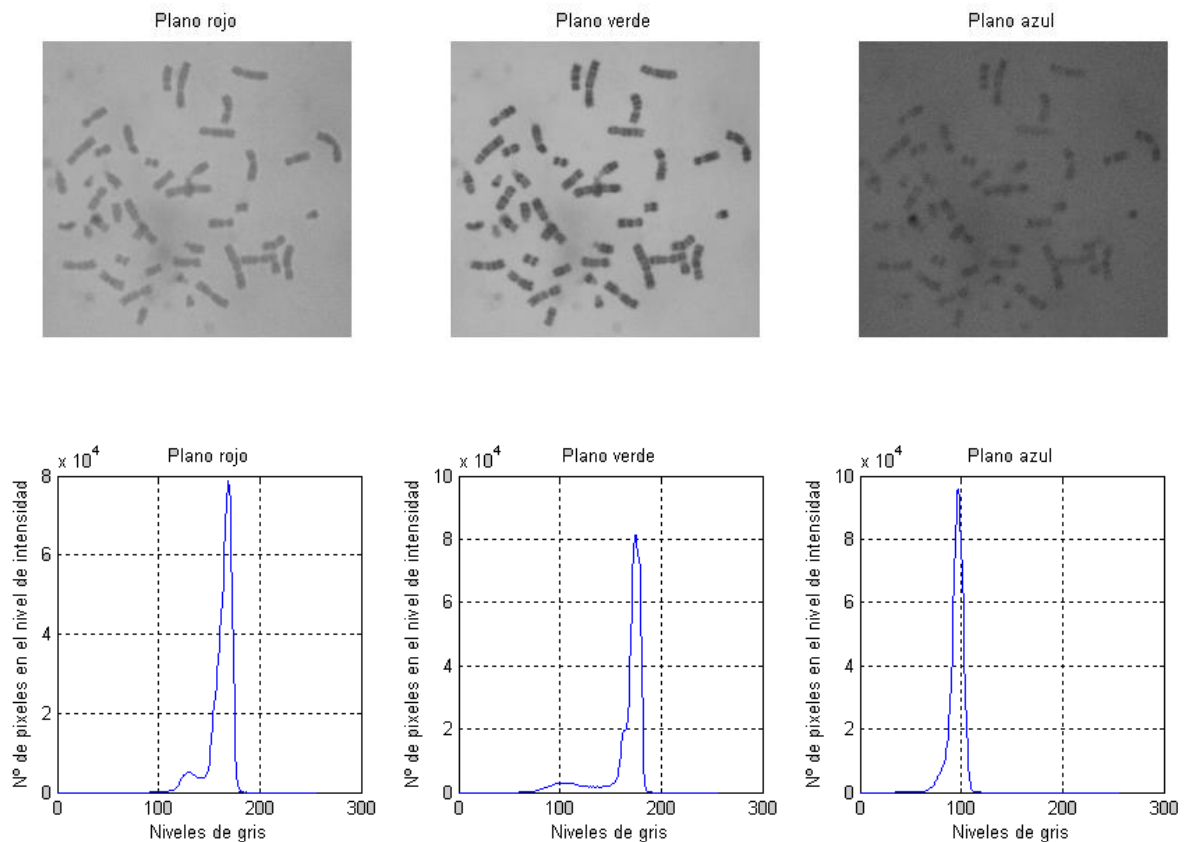


Figura 35. Imagen separada en los tres planos (rojo, verde y azul) con sus histogramas asociados.

Como se puede apreciar en los histogramas y las imágenes de la Figura 35, los niveles de gris en los planos rojo y verde aparecen contraídos y desplazados ligeramente hacia la derecha del mismo apareciendo las imágenes claras y poco contrastadas sobre todo en el plano rojo. Por otro lado, el histograma del plano azul aparece contraído y desplazado hacia la parte izquierda apareciendo la imagen muy oscura y poco contrastada. Esta escasez de contraste es ocasionada por la poca luz, ruido, presencia de desechos celulares, material citoplasmático y residuos del proceso de preparación de la muestra, que traen consigo variación de niveles de intensidad entre píxeles, falta de diferenciación adecuada de los cromosomas del fondo y menor apreciación de las bandas.

Aunque se redujo el ruido significativamente en la etapa de adquisición de las imágenes, realizando el ajuste óptimo de los parámetros de la cámara y el microscopio, no fue posible eliminarlo del todo. Esto se puede evidenciar en los tres planos, manifestando mayor cantidad de ruido el plano azul. Por lo tanto, se escogió la imagen del plano verde, la cual presenta en apariencia mejor contraste, menos ruido, y las bandas se observan mejor aunque con un poco de ruido.

3.6.1 Mejoramiento de la imagen. Para esta etapa fueron utilizadas algunas técnicas orientadas hacia la mejora de la calidad de la imagen. Con dichas técnicas se buscó eliminar efectos no deseados como ruido, escasez de contraste, etc., buscando alcanzar un óptimo realzado de las imágenes (ver Figura 36)

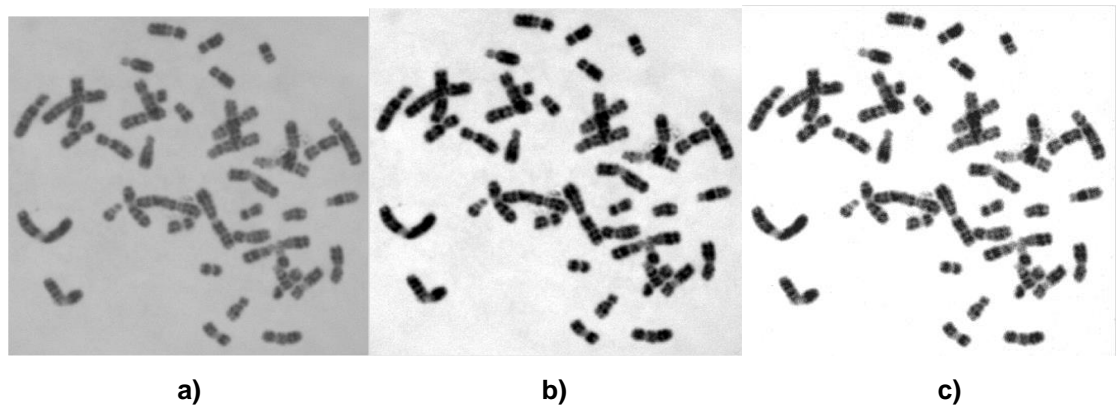


Figura 36. a) Plano verde, b) Contraste aumentado, c) Imagen mejorada.

En vista de que en la etapa de adquisición de imágenes se eliminó una parte del ruido, otra parte del ruido es eliminado por software mediante el filtrado la mediana. El filtrado de la mediana realiza el suavizado de las imágenes mediante operaciones de naturaleza estadística. A diferencia de otros filtros como por ejemplo la media, la moda, etc., los cuales difuminan los bordes y otros detalles de realce, el filtro de la mediana se centra más en la reducción de ruido que el difuminado, permitiendo preservar la agudeza de los bordes [29]. Estas características resultan ventajosas en el caso de las imágenes de los cromosomas, ya que evitan que se enmascaren características importantes de los cromosomas como el centrómero, su patrón de bandas y alteraciones estructurales. Por último, también facilita realizar una mejor segmentación de la imagen, al preservarse la agudeza de los bordes.

Puesto que la imagen presenta un bajo contraste debido a que los niveles de gris aparecen contraídos y desplazados ligeramente hacia la derecha, se tomó la imagen del plano verde y se expandió el histograma procurando abarcar en lo posible todo el rango de valores de gris. Esto tuvo el efecto de incrementar el contraste de la imagen. Para conseguir esto, se utilizó un algoritmo que combina algunas de las operaciones de manipulación del histograma junto con otras técnicas como filtrado y sustracción de imágenes [56]. Un diagrama de flujo para este proceso se ilustra en la Figura 37.

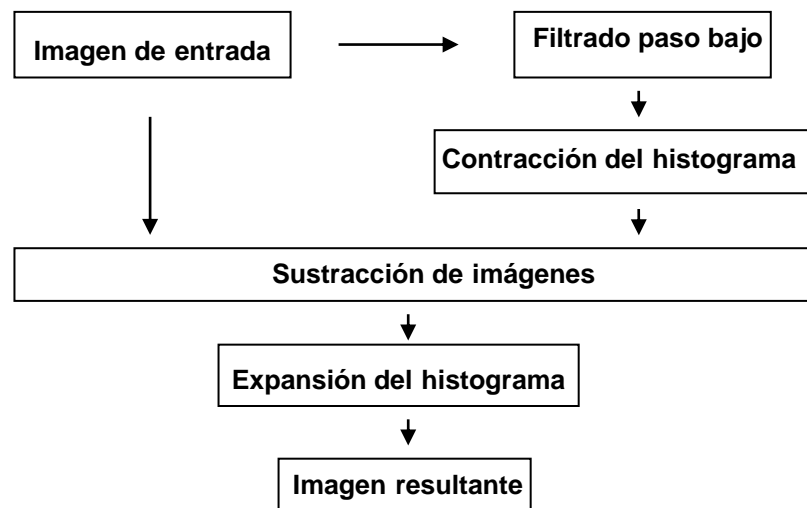


Figura 37. Diagrama de flujo de las técnicas para realzado de la imagen.

En este proceso la sustracción de una variación suave de los bordes (filtrado paso bajo de la imagen) a partir de unos bordes más abruptos (en la imagen original) tiene el efecto visual de causar una especie de realzado en los bordes apareciendo con mayor énfasis. Escalando la imagen filtrada con el filtro pasa bajo mediante una contracción del histograma se puede controlar la cantidad de realzado en los bordes.

3.6.2 Segmentación de la imagen. Para esta etapa se utilizó la segmentación orientada a regiones basándose en el hecho de que los píxeles de una determinada región presentan una distribución de intensidad similar. Por lo tanto, se puede a partir del histograma de niveles de gris, determinar cual es la zona de dicho histograma de la imagen que corresponde a una determinada región. Como es muy difícil determinar cual es el umbral óptimo mediante los métodos de umbralización simples, se recurrió a la técnica de umbralización óptima o método de Otsu.

3.6.2.1 Umbralización óptima o método de Otsu. En este trabajo se prefirió este método para la segmentación de la imagen por las diversas ventajas que ofrece. Si bien hay diferentes métodos para hallar un umbral, la mayoría de ellos

no dan buenos resultados cuando se trabaja con imágenes del mundo real debido a la presencia de ruido, histogramas planos o una iluminación inadecuada. Por el contrario, el método de Otsu es uno de los mejores métodos de selección de umbral para imágenes. La importancia del método de Otsu radica en que es automático, es decir, no necesita supervisión humana ni información previa de la imagen antes de su procesamiento. El método de Otsu es un procedimiento no paramétrico donde el umbral se obtiene de forma óptima de acuerdo a algún criterio. En este caso se elige el umbral óptimo maximizando la varianza entre clases mediante una búsqueda exhaustiva, es decir, se fija el nivel de gris que corresponde a la probabilidad mínima entre los máximos de dos o más distribuciones normales.

Una imagen es una función bidimensional de la intensidad del nivel de gris, y contiene N píxeles cuyos niveles de gris se encuentran entre 1 y L . El número de píxeles con nivel de gris i se denota como f_i , y la probabilidad de ocurrencia del nivel de gris i en la imagen esta dada por:

$$p_i = \frac{f_i}{N} \quad \text{Ec. (6)}$$

En el caso de la umbralización en dos niveles de una imagen (a veces llamada binarización), los píxeles son divididos en dos clases: C_1 , con niveles de gris $[1, \dots, t]$; y C_2 , con niveles de gris $[t+1, \dots, L]$. Entonces, la distribución de probabilidad de los niveles de gris para las dos clases es:

$$C_1 : \frac{p_1}{\omega_1(t)}, \dots, \frac{p_t}{\omega_1(t)} \quad \text{Ec. (7)}$$

$$C_2 : \frac{p_{(t+1)}}{\omega_2(t)}, \frac{p_{(t+2)}}{\omega_2(t)}, \dots, \frac{p_L}{\omega_2(t)}, \quad \text{Ec. (8)}$$

donde

$$\omega_1(t) = \sum_{i=1}^t p_i \quad \text{Ec. (9)}$$

$$\omega_2(t) = \sum_{i=t+1}^L p_i \quad \text{Ec. (10)}$$

También, la media para la clase C_1 y la clase C_2 es:

$$\mu_1 = \sum_{i=1}^t \frac{i \cdot p_i}{\omega_1(t)} \quad \text{Ec. (11)}$$

$$\mu_2 = \sum_{i=t+1}^L \frac{i \cdot p_i}{\omega_2(t)} \quad \text{Ec. (12)}$$

Sea μ_T la intensidad media de toda la imagen. Es fácil demostrar que

$$\omega_1 \cdot \mu_1 + \omega_2 \cdot \mu_2 = \mu_T \quad \text{Ec. (13)}$$

$$\omega_1 + \omega_2 = 1 \quad \text{Ec. (14)}$$

Usando análisis discriminante, Otsu definió la variancia entre clases de una imagen umbralizada como:

$$\sigma_B^2 = \omega_1 \cdot (\mu_1 - \mu_T)^2 + \omega_2 \cdot (\mu_2 - \mu_T)^2 \quad \text{Ec. (15)}$$

Para una umbralización de dos niveles, Otsu verificó que el umbral óptimo t^* se elige de manera que σ_B^2 sea máxima; esto es:

$$t^* = \underset{t}{\text{Max}} \{ \sigma_B^2(t) \} \quad 1 \leq t \leq L \quad \text{Ec. (16)}$$

Debido a la robustez o capacidad del método de Otsu, este es capaz de encontrar un umbral óptimo con el que se pueda binarizar correctamente una imagen contaminada con ruido gaussiano. Además de ofrecer esta ventaja, se puede

extender su utilidad para aquellos casos en que la iluminación no es uniforme o es en general inadecuada [29], [56].

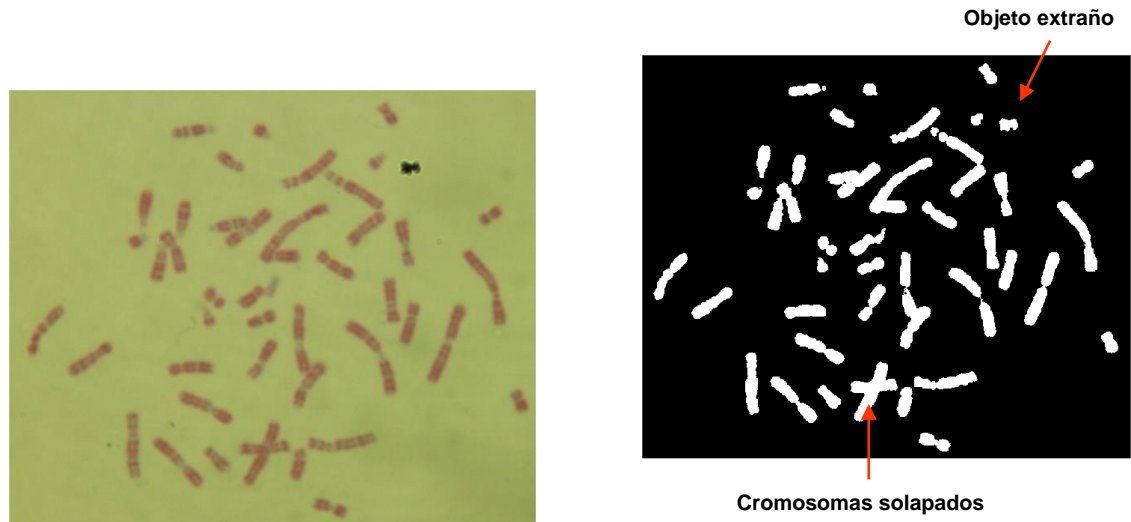


Figura 38. Imagen umbralizada utilizando el método de Otsu.

3.6.3 Separación de cromosomas unidos y solapados. Casi en la mayoría de las metafases se observan cromosomas pegados y en varias ocasiones cromosomas solapados (ver Figura 38) Al mismo tiempo, las fronteras de los centrómeros en las imágenes de microscopio no están bien definidas, sus límites son confusos, y presentan niveles de gris muy similares al fondo. Esta región del centrómero presentara el mismo nivel de gris de la zona en la cual los cromosomas se hallan unidos, por lo que sí se selecciona el umbral que permite separar dos o más cromosomas, se estará también dividiendo al mismo tiempo cada cromosoma a través del centrómero. Por lo tanto, las distintas técnicas de segmentación por muy robustas que sean no tienen éxito al aislar los cromosomas desde sus fondos, tal es el caso del método de Otsu utilizado, con el que no fue posible lograr que todos los cromosomas quedaran totalmente separados uno de otros, aun para fotografías de buena calidad, por lo que se hizo necesaria la intervención del usuario para completar esta tarea y lograr que el procesamiento posterior de clasificación sea valido (ver Figura 39) También es necesaria la intervención del usuario para eliminar objetos extraños cuya apariencia es muy

similar a los cromosomas en cuanto a tamaño y forma. En la siguiente etapa sé vera con mayor detalle en que momento se realiza lo citado anteriormente.

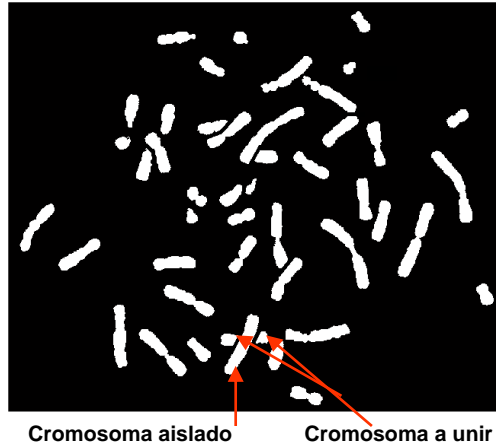


Figura 39. Cromosomas separados por el usuario.

3.6.4 Eliminación de objetos extraños. Dentro de esta etapa fue necesario realizar la extracción de características como área, y excentricidad para eliminar los objetos extraños dentro de la imagen umbralizada. La excentricidad es la relación entre las longitudes de los ejes mayor y menor de una región definida en términos de su frontera. El valor está comprendido entre 0 y 1, donde 0 y 1 son casos extremos. Una región cuya excentricidad es 0 es de hecho un círculo, mientras que una región cuya excentricidad es 1 es un segmento de línea [4], [29], [56], [69]. Estas características permiten identificar y diferenciar los cromosomas de los objetos extraños. Para la extracción de estas características, es necesario realizar primero un etiquetado de todos los objetos de la imagen, para luego proceder en un cierto orden a la determinación de su área y excentricidad. De esta forma se consigue que a cada objeto se le asigne una etiqueta y un vector donde son almacenados sus respectivos valores de área y excentricidad. Con él número de la etiqueta se puede acceder a los valores correspondientes de cada objeto.

Se realizaron varias pruebas con diferentes imágenes para la determinación de valores patrón de área y excentricidad, para ser utilizados como criterios de selección para la eliminación de los objetos que no son cromosomas. Primero son eliminados los objetos extraños cuya área fuese más reducida que el cromosoma más pequeño, en este caso el criterio usado es un valor de área menor o igual a 150 píxeles. Después el usuario mediante el uso del ratón separa de forma manual los cromosomas que aun se hallan pegados después de la umbralización de la imagen. De igual forma se eliminan objetos que presentan apariencia muy similar a los cromosomas y que resultan difíciles de eliminar automáticamente con estos criterios (ver Figura 38 y Figura 39) Para el caso de los cromosomas solapados, el usuario primero aísla un cromosoma de la imagen dejando los trozos del otro cromosoma para luego unirlos en otra imagen. Ahora, son eliminados los objetos extraños cuya área fuese más grande que el cromosoma más grande, cuyo criterio usado es un valor de área mayor o igual a 7000 píxeles, lográndose así, conseguir una imagen de solo cromosomas. Esta imagen es nuevamente etiquetada para hallar los valores de excentricidad de los cromosomas. Bajo esta característica se crean dos imágenes binarias, una con cromosomas alargados de tamaño grande y mediano, y otra con cromosomas alargados de tamaño pequeño, la cual incluye los trozos que quedaron después de aislar el primer cromosoma solapado.

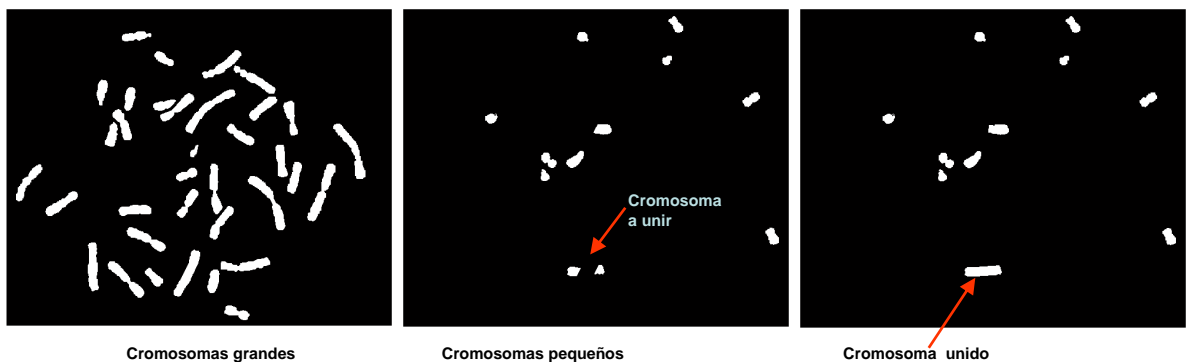


Figura 40. Separación de cromosomas solapados.

Para conseguir la primera imagen, se optó como criterio de selección valores de excentricidad comprendidos en el rango de 0.90 y 1; y para la segunda imagen se eligió valores de excentricidad comprendidos en el rango de 0 y 0.90. En esta última imagen se procede a unir los trozos que quedaron después de aislar el primer cromosoma solapado (ver Figura 40)

3.6.5 Orientación del cromosoma. Una vez que se han eliminado los objetos extraños, es necesario volver a realizar un etiquetado de todos los cromosomas de la imagen binaria, para hacer referencia a ellos y poder analizarlos individualmente, para llevar a cabo en un cierto orden, la determinación de su ángulo de inclinación con respecto a la vertical, las coordenadas del rectángulo más pequeño que encierra cada cromosoma, y las coordenadas de los píxeles de cada cromosoma, para la selección, extracción y recorte de cada cromosoma. Las coordenadas de los píxeles de cada cromosoma permiten extraerlo y colocarlo en una nueva imagen binaria, la cual después se multiplica por la imagen en escala de grises, obteniéndose otra imagen donde el cromosoma aparece aislado en escala de grises y con el fondo blanco. Con las coordenadas del rectángulo se encierra el cromosoma aislado, y se recorta.

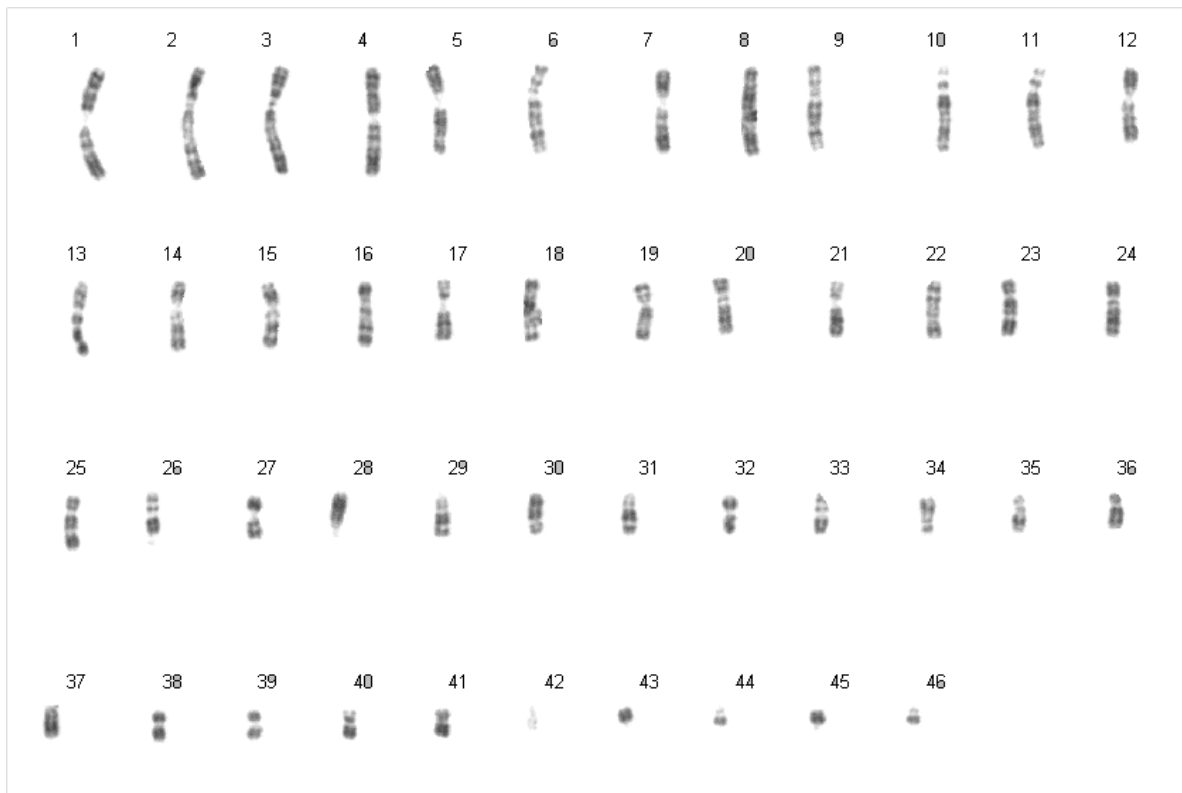


Figura 41. Cromosomas rotados por el programa según posición del centrómero.

Una vez recortadas estas imágenes, son almacenadas en un vector celda, para luego ser organizadas en orden decreciente según la longitud de cada cromosoma. Después con el valor del ángulo de inclinación de cada cromosoma, se procede a rotarlo en dicha medida para orientarlo verticalmente, pero no todos los cromosomas quedan orientados con el brazo corto apuntando hacia arriba, por lo que se hace necesario en esta parte, hallar la posición del centrómero para corregir automáticamente en parte este problema (ver Figura 41).

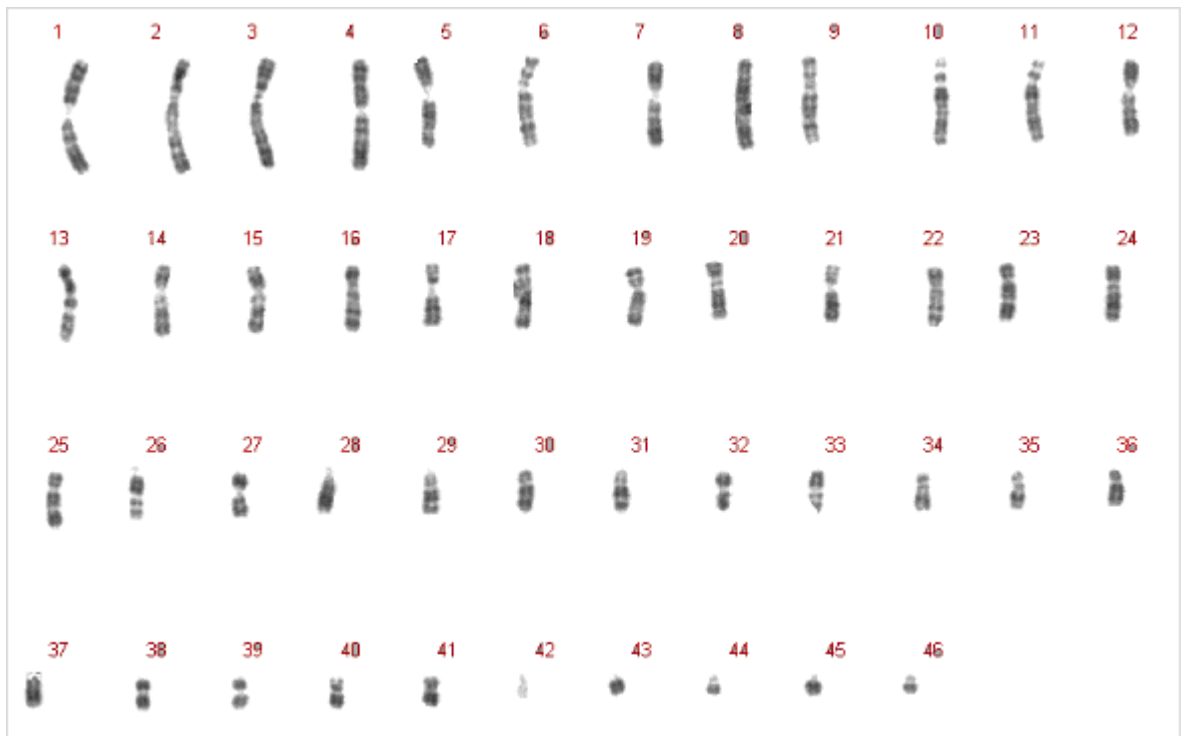


Figura 42. Orientación de los cromosomas corregida por el usuario.

3.6.6. Determinación o ubicación del centrómero. Primero que todo se dará una descripción de las técnicas de procesamiento de imágenes utilizadas para la determinación del centrómero, la manera como fueron utilizadas dentro del programa y los motivos por los cuales fueron seleccionadas para cumplir este propósito.

3.6.6.1 Transformada de la distancia. La transformada de la distancia es un operador que normalmente solo se aplica a imágenes binarias. El resultado de la transformación es una imagen en niveles de gris que es similar a la imagen entrada, sólo que los niveles de gris de los puntos dentro de las regiones del primer plano son cambiados para mostrar la distancia a la frontera más cercana de cada punto. La Figura 43 muestra la transformada de la distancia de una forma rectangular simple. Si la imagen procesada mediante la transformada de la distancia es graficada en el espacio tridimensional, ubicando las posiciones de los

píxeles en el plano (x, y) y el valor de nivel de gris en el eje z, se obtiene una vista tridimensional que se asemeja a unas montañas.

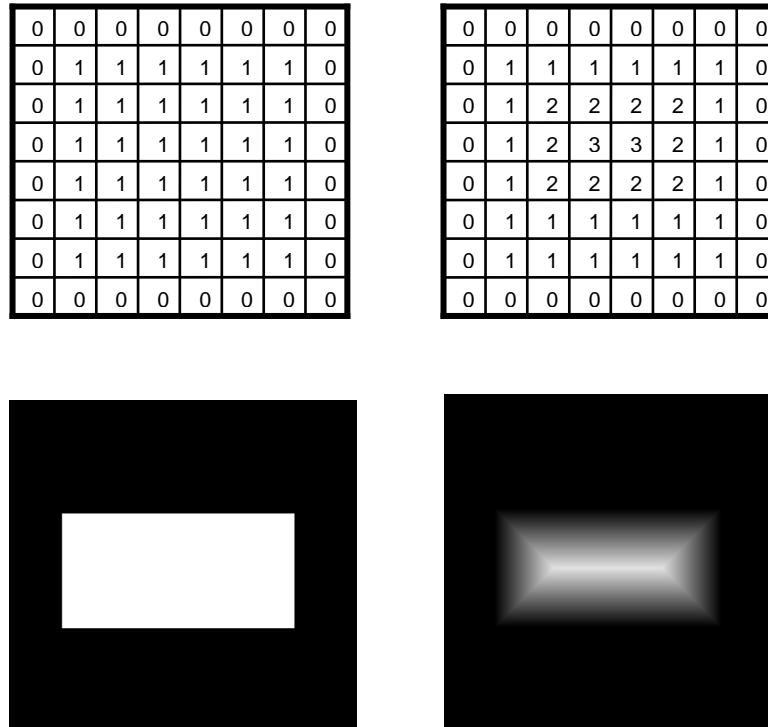


Figura 43. Transformada de la distancia de una forma simple usando la distancia métrica 'chessboard'.

Una manera aproximada de comprender la transformada de la distancia es primero imaginar que las regiones del primer plano en la imagen binaria de entrada están hechas de algún material homogéneo inflamable que va quemándose lentamente. Luego se considera al fuego iniciando simultáneamente en todos los puntos de la frontera de una región del primer plano y permitiéndole quemar uniformemente hacia el interior. Si se etiqueta cada punto del interior con la cantidad de tiempo que le tomó al fuego alcanzar aquel punto, entonces se habrá computado efectivamente la transformada de la distancia de esa región.

Hay muchas maneras de computar la transformada de la distancia de una imagen binaria. El elemento de estructuración que debe ser usado depende de cuál

distancia métrica ha sido escogida (ver Figura 44) La distancia entre los puntos (x_1, y_1) y (x_2, y_2) para las diferentes distancias es:

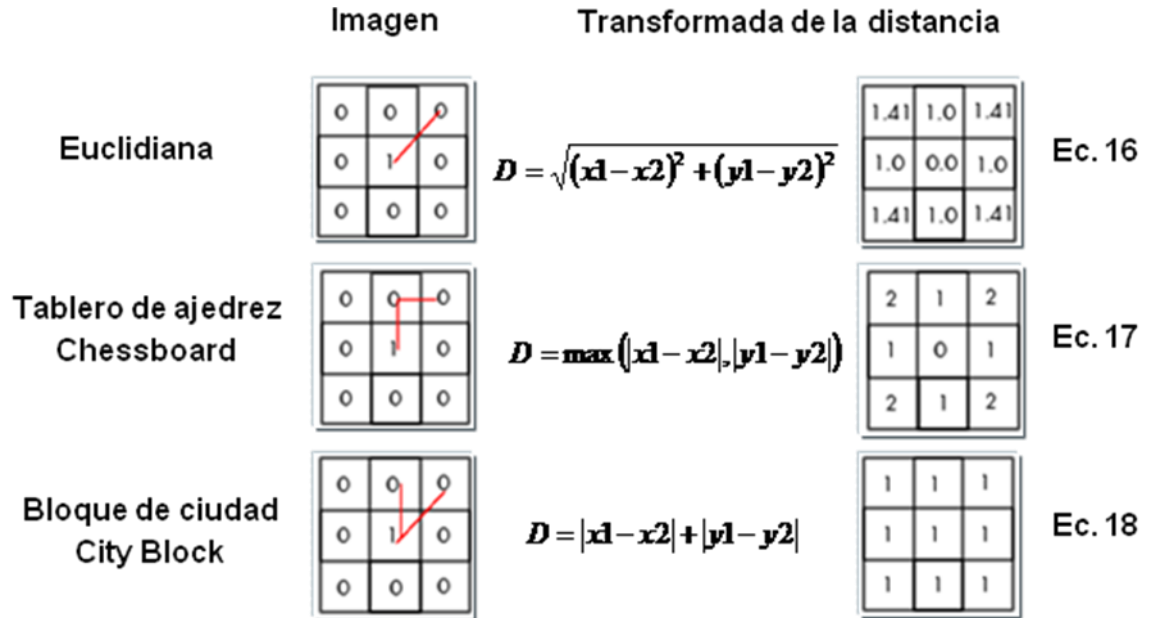


Figura 44. Distancias métricas empleadas para hallar la transformada de la distancia.

Un elemento cuadrado de 3x3 (vecindad o conectividad 8) da la transformada de la distancia Tablero de ajedrez (Chessboard) En este caso, los píxeles cuyos bordes o esquinas se tocan son marcados como 1 unidad. Un elemento en forma de cruz (vecindad o conectividad 4) da la transformada de la distancia Bloque de ciudad (City block) Aquí, los píxeles cuyos bordes se tocan son marcados como 1 unidad y píxeles cuyos bordes se tocan diagonalmente son marcados como 2 unidades. Por ultimo, un elemento en forma de disco da la transformada de la distancia Euclidiana. Esta es la distancia de la línea recta entre dos píxeles Por supuesto, no es de hecho posible generar un buen elemento en forma de disco en una cuadrícula discreta en una escala pequeña, pero hay algoritmos que varían el elemento de estructuración en cada erosión para aproximarse a un elemento circular [4], [11], [29], [69].

La transformada de la distancia es algunas veces muy sensible a pequeños cambios en el objeto (ver Figura 45) Esto puede ser ventajoso cuando nosotros queremos distinguir entre objetos similares como los rectángulos de la Figura 43 y Figura 45. Sin embargo, esto también puede causar problemas cuando se intenta clasificar objetos en grupos que presentan formas ligeramente aproximadas.

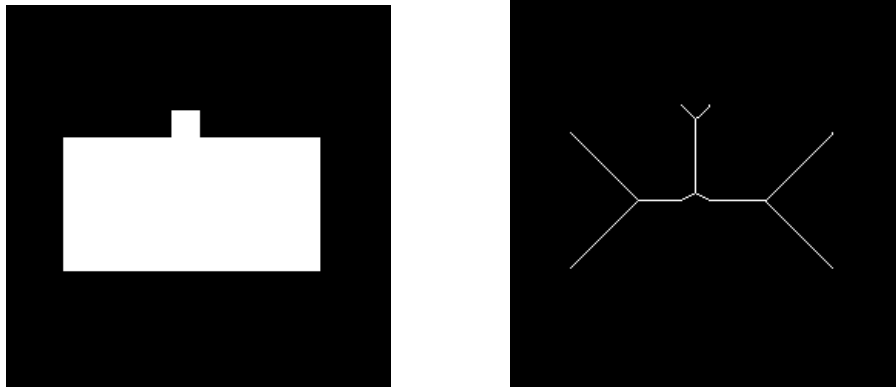


Figura 45. Transformada de la distancia de una forma simple con una protuberancia.

La transformada de la distancia también es muy sensible al ruido. Es importante que la imagen binaria de entrada sea una buena representación del objeto que nosotros queremos procesar. La simple umbralización no es muchas veces suficiente, siendo necesario procesar la imagen antes de aplicar la transformada de la distancia. La transformada de la distancia está muy estrechamente vinculada a la transformación del eje intermedio y a la esqueletización [29], [30].

3.6.6.2 Adelgazamiento (también llamado esqueletización) El adelgazamiento es un proceso necesario en la mayoría de problemas de reconocimiento de patrones porque ofrece una manera de simplificar la forma para el análisis de patrones. En esencia se trata de obtener un conjunto de líneas que corresponden al adelgazamiento completo de la región sin pérdida de la forma esencial. Es un proceso de reducción de datos que erosiona un objeto, hasta que este es un píxel de ancho, produciendo el esqueleto del objeto. El esqueleto es útil porque proporciona una representación simple y compacta de una forma que conserva

muchas de las características topológicas y tamaño de la forma original. Así es más fácil reconocer objetos tales como letras o siluetas mirando sus esqueletos al descubierto. Por ejemplo, nosotros podemos obtener una idea tosca de la longitud de una forma considerando simplemente los puntos extremos del esqueleto y encontrar el par de puntos extremos separados enormemente en el esqueleto. Similarmente, nosotros podemos distinguir muchas formas cualitativamente diferentes entre sí basándose en cuántos puntos triples hay, es decir los puntos dónde por lo menos tres ramas del esqueleto se localizan.

Normalmente, estos algoritmos de adelgazamiento, que borran íntegramente puntos de borde de la región, están sujetos a las siguientes limitaciones en el borrado de estos puntos: 1) el borrado no debe eliminar puntos finales, 2) no debe romper la conexión y 3) no debe causar excesiva erosión a la región.

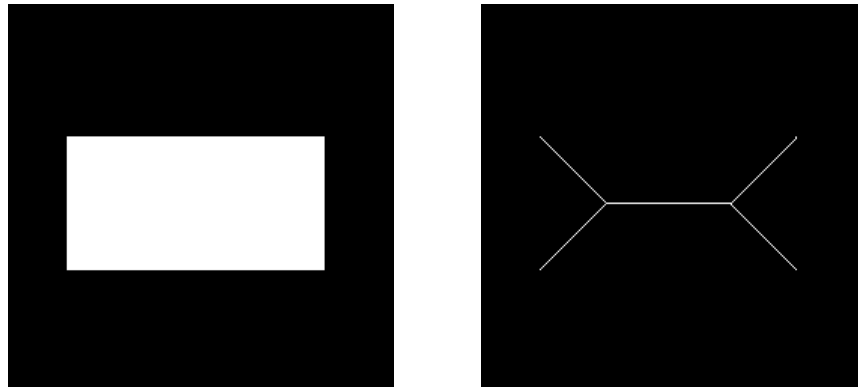


Figura 46. Esqueleto de un rectángulo.

La Figura 46 muestra como el adelgazamiento de un rectángulo produce una línea de píxeles. Hay dos técnicas básicas para la producción del esqueleto de un objeto: adelgazamiento básico y transformada del eje intermedio (TEI) El adelgazamiento básico es una imagen binaria erosionada que muestra el simple esqueleto. La TEI es por otro lado una imagen en niveles de gris dónde cada punto en el esqueleto tiene una intensidad que representa su distancia a una frontera en el objeto original (ver Figura 43) Los términos transformación del eje

intermedio (TEI) y adelgazamiento básico son muchas veces usadas indistintamente pero se distinguirá entre ellas un poco.

3.6.6.2.1 Adelgazamiento por operaciones morfológicas. El adelgazamiento erosiona un objeto una y otra vez, sin rompimiento de este y manteniendo la conectividad de las regiones, hasta que sea un píxel de ancho. El adelgazamiento puede ser realizado como dos pasos aproximados: con el primer paso siendo una erosión que marca todos los candidatos para la eliminación sin descartarlos realmente, y en el segundo paso los candidatos que no destruyen conectividad son eliminados. El esqueleto de un conjunto (región) A se puede expresar en función de las erosiones y aperturas. Esto es, si S(A) representa el esqueleto de A, se puede mostrar que:

$$S(A) = \bigcup_{k=0}^K S_k(A) \quad \text{Ec. (19)}$$

con

$$S_k(A) = \bigcup \{(A \otimes kB) - [(A \otimes kB) \circ B]\} \quad \text{Ec. (20)}$$

donde B es un elemento de estructura, $(A \otimes kB)$ indica k erosiones sucesivas de A; esto es:

$$(A \otimes kB) = ((\dots(A \otimes B) \otimes B) \otimes \dots) \otimes B \quad \text{Ec. (21)}$$

k veces, y K es el último paso interactivo antes que A se erosione hasta un conjunto vacío. En otras palabras:

$$K = \max \{k \mid (A \otimes kB) \neq \Phi\} \quad \text{Ec. (22)}$$

La formulación dada en las ecuaciones (19) y (20) establece que S(A), el esqueleto de A, se puede obtener como la unión de los subconjuntos esqueletos

$S_k(A)$ Esta técnica de adelgazamiento trabaja bien, pero es imposible reconstruir el objeto original desde el resultado del adelgazamiento [17], [29], [56], [69].

3.6.6.2.2 Transformación del eje intermedio (TEI) El esqueleto de una región se puede definir usando la transformación del eje intermedio (TEI) La TEI de una región R con borde B se calcula de la siguiente forma. Para cada punto p de R , se busca su vecino más cercano en B , se calcula la distancia desde cada punto interior a cada punto del contorno de una región. Si p tiene más de un vecino a la misma distancia mínima, se dice que pertenece al eje intermedio (esqueleto) de R . El esqueleto es definido en términos de la distancia de un punto x a un conjunto R :

$$d_s(x, R) = \inf \{d(x, y) \mid y \text{ en } R\} \quad \text{Ec. (23)}$$

El esqueleto es el conjunto de parejas $(x, d_s(x, B))$ donde $d_s(x, B)$ es la distancia desde x a la frontera como se definió antes. El concepto cercano depende de la definición de una distancia, y por tanto los resultados de una operación TEI están influidos por la elección de una medida de distancia, de las cuales las más usadas son distancia euclídea, distancia city block, y distancia chessboard. Dado que cada pixel en el esqueleto retiene la información sobre la mínima distancia a la frontera, la región original puede ser recuperada (idealmente) como la unión de discos centrados en los puntos del esqueleto.

Igual que con el adelgazamiento por operaciones morfológicas, las pequeñas irregularidades en una frontera conducirán a falsas estribaciones en la imagen final, lo cuál puede interferir con procesos de reconocimiento basados en las propiedades topológicas del esqueleto. Un proceso de suavizado puede llevarse a cabo para eliminar puntas menores de una cierta longitud pero esto no siempre es eficaz dado que las pequeñas perturbaciones en la frontera de una imagen pueden conducir a grandes puntas en el esqueleto.

Además, algunas aplicaciones de los algoritmos de adelgazamiento producen esqueletos que no garantizan ser continuos, aun si la forma de ellos es derivada desde este. Esto es debido al hecho de que los algoritmos deben recorrer una reja discreta por necesidad.

En general, el adelgazamiento básico y la TEI son muchas veces muy sensibles a cambios pequeños en el objeto. A veces esta sensibilidad podría ser útil. Sin embargo, muchas veces nosotros necesitamos extraer la imagen binaria de una imagen en escala de grises. En estos casos, es a menudo difícil obtener la forma ideal del objeto, así que el esqueleto llega a ser más complejo. El esqueleto también es muy sensible al ruido. La simple umbralización no es muchas veces suficiente para producir una imagen binaria útil, por lo que algún procesamiento podría ser necesario antes de la esqueletización de la imagen [4], [17], [29], [30], [56], [69].

Para este trabajo se optó por el adelgazamiento obtenido mediante operaciones morfológicas, ya que tienen un menor costo computacional, generando el esqueleto del cromosoma en un menor tiempo en comparación con el otro método. Dicho esqueleto se empleó en la determinación de la longitud del cromosoma.

3.6.6.3 Transformada watershed. La transformación watershed es una técnica morfológica de segmentación de imágenes de niveles de gris. Es un método de segmentación basado en regiones, que divide todo el dominio de la imagen en conjuntos conexos, produciendo resultados de segmentación más estables. Se aplica a imágenes 2D y 3D. El concepto de watershed procede del campo de la topografía, donde la imagen es vista y analizada como un relieve topográfico (tres dimensiones) donde las coordenadas espaciales de los píxeles de la imagen forman el plano 2-D y la tercera dimensión esta representada por los valores de nivel de gris de los píxeles. Las líneas watershed son las fronteras de separación

entre las cuencas de deposición de ríos y lagos. Además, cada cuenca está asociada a un mínimo local del relieve.

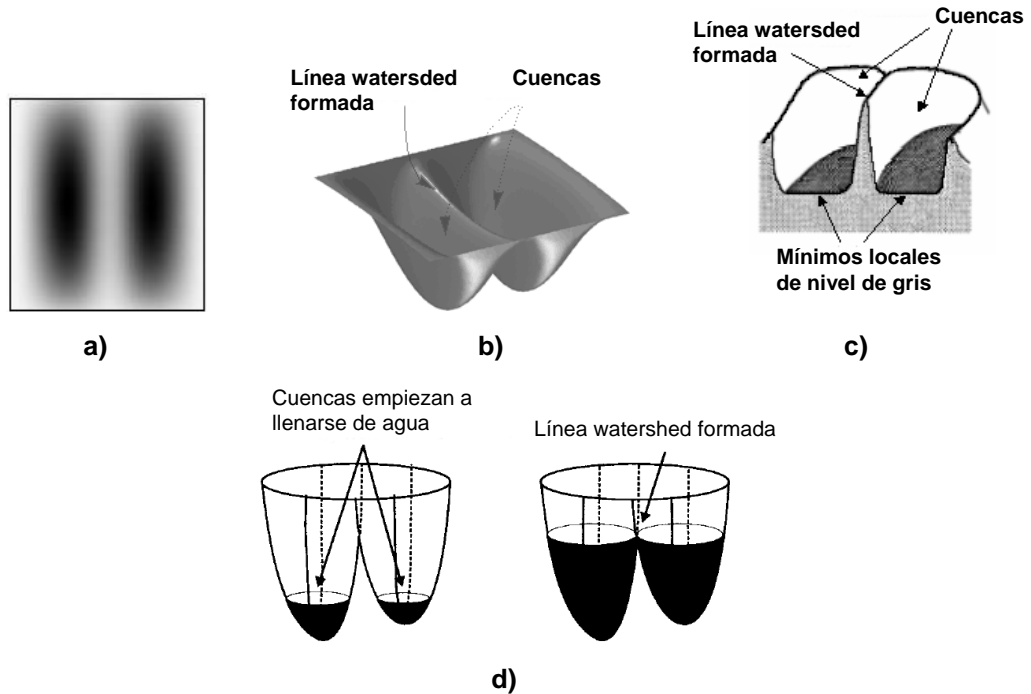


Figura 47. Transformada watershed. a) Imagen en niveles de gris, b) imagen en 3-D, en c) y d) formación de líneas watershed.

En el proceso realizado por esta transformada se supone que un hueco es perforado en cada región mínima y que la topografía entera es inundada desde abajo, permitiendo que el agua ascienda a través de los huecos a una taza uniforme. Cuando el agua, elevándose en los diferentes estanques de recolección está a punto de unirse, un dique se construye para prevenir la unión (ver Figura 47) Este proceso de inundación es continuado hasta que el máximo nivel de inundación, correspondiente al valor más alto de nivel de gris, es alcanzado. Finalmente la inundación alcanzará una etapa en la que sólo las cumbres de los diques serán visibles sobre el nivel del agua. Estos límites del dique corresponden a las líneas de corte del agua derramada. Estos no deben ser confundidos con los valores de nivel de gris, ya que su valor (altura) es más grande que el valor más alto (montaña más alta) de nivel de gris posible en la imagen de entrada. Por lo tanto, ellos son los límites (continuos) extraídos por el algoritmo de segmentación

watershed. Una importante propiedad es que las líneas watershed forman una trayectoria conectada, dando así fronteras continuas entre regiones. La transformación watershed también se puede aplicar a imágenes en escala de grises multinivel.

Las regiones caracterizadas por pequeñas variaciones en los niveles grises tienen valores pequeños de gradiente. Así, en la práctica, se ve a menudo segmentación watershed aplicada al gradiente de una imagen, en lugar de la propia imagen. En esta formulación, los mínimos regionales de estanques de recolección tienen una muy buena correlación con el pequeño valor del gradiente que corresponde a los objetos de interés.

3.6.6.3.1 Transformada watershed controlada con el uso de marcadores. La aplicación directa del algoritmo de segmentación watershed en la forma discutida anteriormente, generalmente conduce a sobre segmentación, debido al ruido y a otras irregularidades locales del gradiente. La sobre segmentación puede ser lo bastante seria para entregar un resultado inútil. Este caso significa un gran número de regiones segmentadas debido al gran número de mínimos potenciales. Debido a sus tamaños, muchos de estos mínimos realmente son detalles irrelevantes. Una solución práctica a este problema es limitar el número de regiones mínimas permitidas, incorporando una etapa de preprocesamiento diseñada para producir conocimiento adicional en el procedimiento de segmentación. Una aproximación usada para controlar la sobre segmentación esta basada en el concepto de marcadores. Un marcador es un componente conectado perteneciente a una imagen.

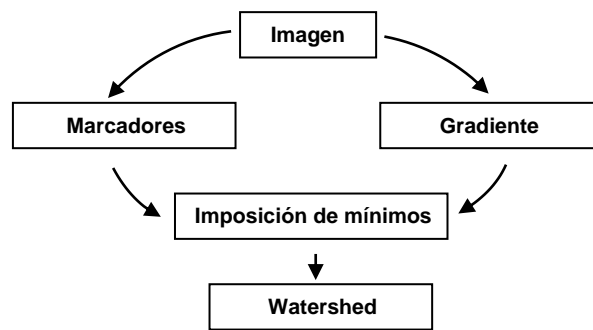


Figura 48. Segmentación watershed controlada por gradiente y marcadores.

Para trabajar con este método alternativo se considera nuevamente la superficie topográfica de la imagen de gradiente y el proceso de inundación, pero en lugar de perforar los mínimos de esta superficie, únicamente haremos huecos en los componentes del conjunto marcador M . La inundación invadirá la superficie y producirá tantas cuencas como marcadores haya en el conjunto. Usando este método, las líneas divisoras aparecerán en la superficie topográfica las cuales corresponden a los contornos de los objetos.

La selección de un marcador puede extenderse desde un simple procedimiento basado en valores de nivel de gris y conectividad hasta descripciones más complejas implicando tamaño, forma, localización, distancias relativas, contenido de textura, etc. Se tienen marcadores internos asociados con objetos de interés y marcadores externos asociados con el fondo. Un procedimiento para la selección de marcadores consiste en dos pasos:

- Preprocesamiento. Por lo general, un método seguro para la minimización de efectos de pequeños detalles espaciales, es filtrar la imagen con un filtro suavizante, el cual elimina un gran número de mínimos potenciales que corresponden a detalles irrelevantes.
- El otro paso es la definición de un conjunto de criterios que los marcadores deben satisfacer.

El procedimiento general llevado a cabo para lograr un buen resultado es el siguiente:

Primero se toma el gradiente de la imagen, luego se suaviza con un filtro, y después se aplica el algoritmo de watershed. Esta aplicación se puede realizar de dos maneras: Una es aplicando el algoritmo a toda la imagen en general, produciendo líneas watershed conocidas como marcadores externos. Los marcadores externos separan la imagen en regiones, con cada región conteniendo un solo marcador y parte del fondo. El problema es así reducido a la separación de cada una de estas regiones en dos, el objeto y su fondo.

La otra forma es aplicar el algoritmo de segmentación watershed a cada región individual, es decir, limitamos al algoritmo a operar solo en aquella región que contiene el marcador, lográndose un mejor resultado que en la forma anterior **[30]**, **[32]**, **[69]**, **[82]**.

Aunque la técnica de la transformada watershed es utilizada generalmente para la segmentación de imágenes, en este estudio no se utilizó para dicho propósito, ya que su efectividad sobre una imagen se ve afectada enormemente por la presencia de ruido, por iluminación inadecuada y por detalles mínimos irrelevantes, los cuales generan una imagen sobre segmentada de la cual no es posible la extracción de patrones. En vez de ello, esta técnica se utilizó junto con la transformada de la distancia para la localización del centrómero, ya que otras técnicas como las operaciones morfológicas no permitían hacer una determinación del centrómero. Estas por lo general, se desempeñaban bien con los cromosomas grandes pero fracasaban con los cromosomas pequeños metacéntricos. También fracasaban cuando la constricción del centrómero no aparecía bien definida, dando lugar a líneas de contorno discontinuas, mientras que con la transformada

de la distancia y watershed era posible ubicar el centrómero en la gran mayoría de los casos.

La manera como se utilizaron estas técnicas fue de la siguiente forma. Primero a la imagen binaria del cromosoma se le aplicó la operación morfológica llamada cierre, con la que se buscó suavizar los bordes y eliminar protuberancias del cromosoma. Luego a esta imagen se le aplicó la transformada de la distancia con el propósito de que sirviera de marcador y se previniera el problema de sobre segmentación, obteniéndose así un mejor desempeño y resultado de la transformada watershed (ver Figura 49). A pesar del uso de este marcador aun se da una ligera sobre segmentación la cual genera no solo la línea referente a la constricción centromérica, sino también líneas correspondientes a constricciones secundarias situadas en diferentes lugares del cromosoma, por lo que se tuvo que calcular para cada cromosoma la longitud de estas líneas y elegir la más corta perteneciente a la constricción centromérica, lográndose la imagen de esta línea. Luego se procedió a hallar las coordenadas de esta línea correspondiente a la posición del centrómero, para utilizarla tanto para el cálculo del Índice centromérico, como para reorientar los cromosomas que no se pudieron alinear adecuadamente en la etapa de orientación.

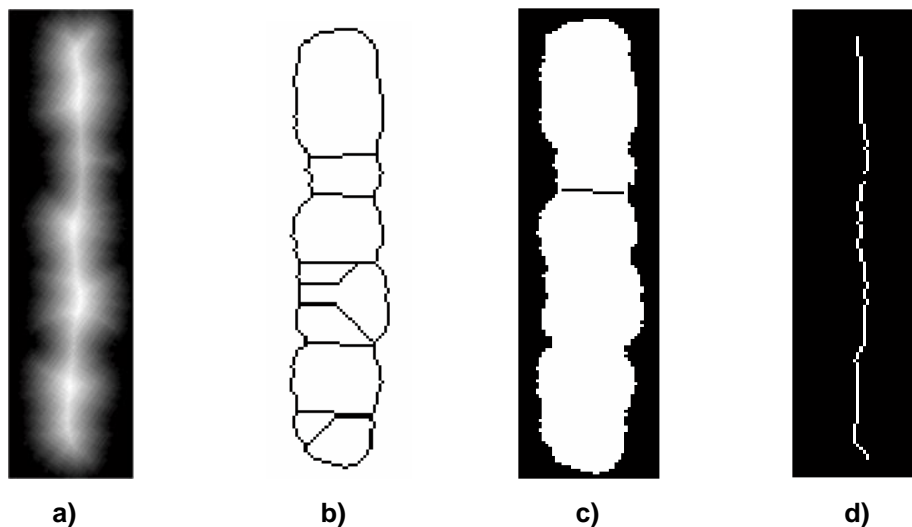


Figura 49. Ubicación del centrómero. a) Transformada de la distancia de la imagen binaria, b) resultado de aplicar la transformada watershed, c) centrómero ubicado, d) brazos adelgazados del cromosoma.

3.6.7 Extracción de las características de cada cromosoma (longitud, índice centromérico y perfil de densidad. Para él calculo del índice centromérico, la imagen binaria del cromosoma fue sometida a la operación morfológica de adelgazamiento, para obtener el eje central del cromosoma y su longitud. Se hizo un XOR lógico entre la imagen binaria del eje central del cromosoma y la imagen binaria de la línea perteneciente a la constricción centromérica, para obtener de este modo los brazos adelgazados del cromosoma. Se procedió a medir la longitud del esqueleto de los brazos del cromosoma para determinar el índice centromérico (I_c) con la siguiente formula:

$$I_c = \frac{\textit{Longitud_brazo_corto}}{\textit{Longitud_total}} \quad \text{Ec. (24)}$$

Para la reorientación de los cromosomas, se tuvo en cuenta si la posición del centrómero se hallaba a una distancia mayor o menor que el punto intermedio de la longitud de la imagen del cromosoma. Si era mayor, el cromosoma se rotaba, sino se dejaba invariante.

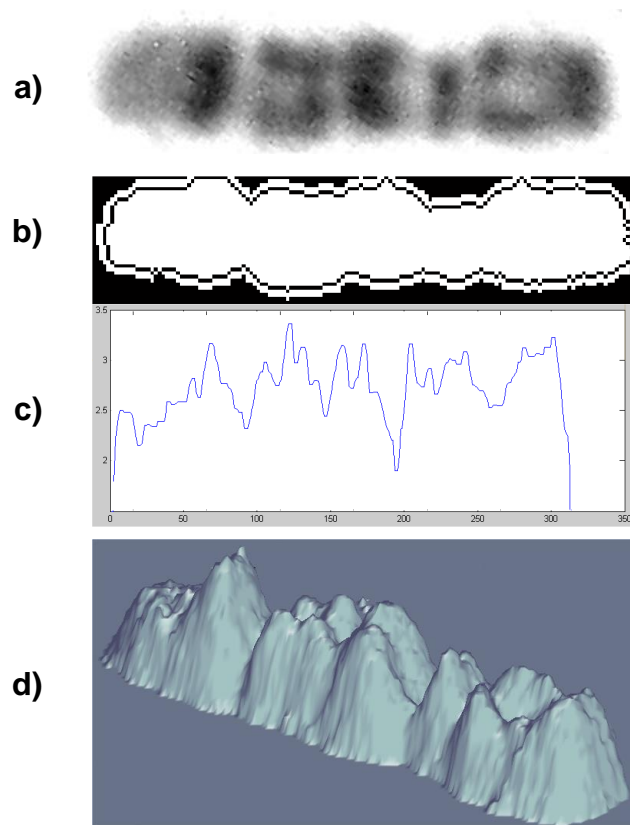


Figura 50. Determinación del perfil de densidad. a) Imagen en escala de grises, b) ejes longitudinales a partir de los cuales se obtiene el perfil, c) perfil de densidad, d) imagen 3-D del cromosoma.

El cálculo del perfil sobre un eje determinado consiste en proyectar todos los píxeles sobre el eje en cuestión [78]. Para la extracción del perfil de densidad, a la imagen binaria del cromosoma se le aplicó la transformada de la distancia, de la cual se seleccionó un determinado valor de nivel de gris que corresponde a un contorno interno menor del cromosoma. Luego se determinaron las coordenadas espaciales de este contorno, descartándose aquellas coordenadas correspondientes a los extremos superior e inferior del cromosoma, obteniéndose así dos ejes longitudinales, cada uno perteneciente a un borde del cromosoma (ver Figura 50b) Estas coordenadas fueron almacenadas en una matriz.

Con estas coordenadas se va recorriendo la imagen del cromosoma en escala de grises a lo largo de estos ejes longitudinales, haciéndose un muestreo del valor de

nivel de gris en cada coordenada, obteniéndose el perfil de densidad, el cual es almacenado en un vector unidimensional de longitud variable, dependiente del tamaño del cromosoma y contiene la información referente a la disposición de las bandas. Estos perfiles de densidad son normalizados (con valores entre cero y uno)

Cada perfil al ser graficado como Posición vs. Escala de grises, se muestra como una señal, la cual varía para cada cromosoma, pero la información que contiene esta acompañada de ruido, el cual no permite hacer una clara identificación de las bandas y mucho menos hacer la discriminación entre los perfiles de los cromosomas. Este ruido se eliminó mediante un filtro de suavizado basado en el vector de convolución [1 2 2 1], que disminuía en parte esta presencia de ruido. Para eliminar un poco más el ruido residual, la señal obtenida del proceso anterior fue depurada con el filtro de la mediana, lográndose eliminar casi por completo el ruido. Cada perfil era almacenado en un vector celda para su respectiva comparación y clasificación. En la Figura 50 se puede observar la correspondencia del perfil de densidad con la imagen en 3-D del cromosoma.

3.6.8. Procedimiento de clasificación. Una vez que las características de cada uno de los cromosomas han sido obtenidas de la imagen mediante las etapas enunciadas anteriormente, estas son almacenadas en una matriz donde cada fila contiene el conjunto de datos pertenecientes a cada cromosoma cuyas medidas son: longitud, índice centromérico y perfil de densidad del cromosoma. Esta matriz es dada al clasificador, el cual formará 24 clases de objetos correspondientes a cada uno de los 22 pares de cromosomas homólogos y a los cromosomas sexuales X, Y, rotulando cada cromosoma con el número de la clase al que pertenece. Es decir, el clasificador solo busca el homólogo de cada cromosoma dentro de la metafase, etiquetando los cromosomas con el número del grupo al que pertenecen, sin corresponder este número con el que aparece en el idiograma del par correspondiente.

A continuación se da una breve descripción acerca del clasificador empleado en este trabajo.

3.6.8.1 Agrupamiento K-medias. El agrupamiento de k-medias puede mejor ser descrito como un método de separación. Es decir, la función k-medias separa las observaciones en sus datos en k grupos mutuamente exclusivos y devuelve un vector de índices indicando a cual de los k grupos ha asignado cada observación. K-medias crea un solo nivel de grupos y utiliza las observaciones verdaderas de objetos o individuos en sus datos, y no sus proximidades. Estas diferencias muchas veces significan que k-medias es más adecuado para el agrupamiento de gran cantidad de datos. K-medias trata cada observación en sus datos como un objeto teniendo una localización en el espacio. Para la similitud entre dos objetos x_i y x_j se usa una función distancia denotada por $d(x_i, x_j)$, siendo la distancia euclidiana la mas usada. La distancia entre dos elementos diferentes $x_i = (x_{i1}, \dots, x_{iD})$ y $x_j = (x_{j1}, \dots, x_{jD})$ es:

$$d(x_i, x_j) = \sqrt{\sum_{l=1}^D (x_{il} - x_{jl})^2} \quad \text{Ec. (25)}$$

Los objetos de una clase o grupo son similares, cuando la distancia entre ellos es mínima. Se puede seleccionar diferentes medidas de distancia, dependiendo de la clase de datos que sé este agrupando. Para este estudio se eligió la distancia euclidiana, ya que permitía una mejor agrupación de los datos. K-medias calcula los centroides o medias de los grupos de manera diferente para cada medida de distancia, cuando minimiza la suma con respecto a la medida que se especifique.

La idea básica del algoritmo es obtener los k centros iniciales y formar grupos, asociando todos los objetos del conjunto X a los centros más cercanos, luego sé recalculan los centros. Si esos centros no difieren de los centros anteriores, entonces el algoritmo termina, sino se repite el proceso de asociación con los

nuevos centros hasta que no haya variación en los centros, o se cumpla algún otro criterio de parada como por ejemplo, poco numero de reasignaciones de los objetos. Los pasos del algoritmo de k-medias son:

Dado un conjunto $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ de n muestra o objetos o datos y k clases o grupos se realiza:

1. Seleccionar aleatoriamente de X, k centros iniciales con medias μ_i , con $i = 1, 2, \dots, k$

2. Clasificar las n muestras (cada $x_i \in X$) asignándolas a una de las clases o grupos de acuerdo a

$$x_i \in C_j \text{ si } d(x_i, \mu_j) < d(x_i, \mu_p) \text{ para todo } j, p = 1, \dots, k \text{ con } j \neq p \quad \text{Ec. (26)}$$

3. Recalcular las medias de los elementos del grupo

$$\mu_j' = \frac{1}{N_j} \sum_{x_i \in C_j} x_i \quad \text{Ec. (27)}$$

donde N_j es el numero de muestras en la clase C_j

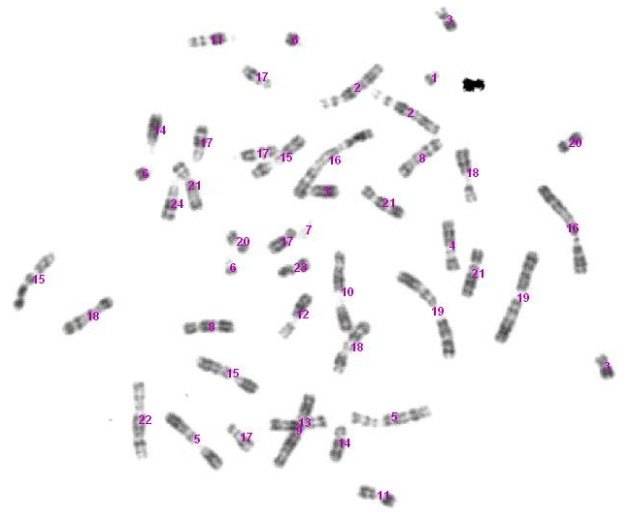
4. Si las medias calculadas no difieren de las medias anteriores el algoritmo termina ($\mu_j' = \mu_j$ para todo j) En caso contrario considerar μ_j' como nueva media μ_j e ir al paso 2

Las ventajas principales de este algoritmo son su simplicidad y velocidad que le permiten ejecutarse sobre conjuntos grandes de datos. No necesita supervisión, ni necesita ser entrenado.

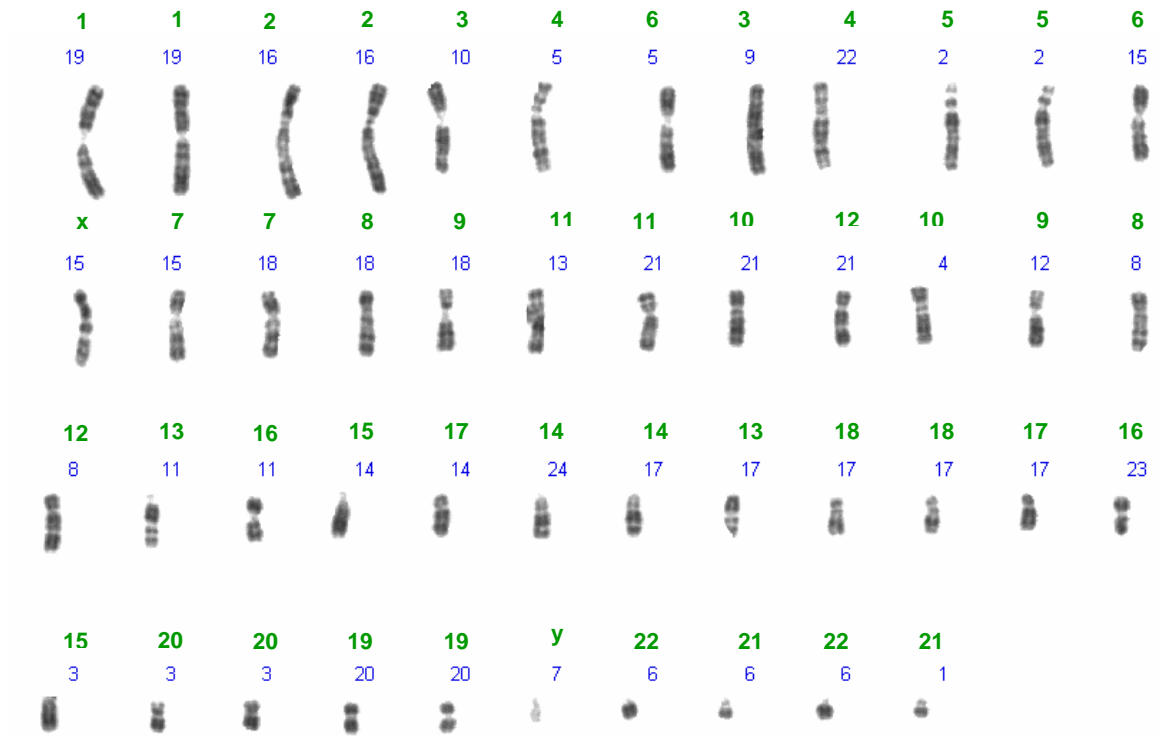
Pero este algoritmo tiene sus debilidades:

- La manera de inicializar no se especifica. Una forma común es comenzar seleccionando al azar k medias de los ejemplos.

- Los resultados dependerán del valor inicial de las medias y frecuentemente pasa que particiones subóptimas son encontradas. La solución estándar es calculada utilizando diferentes puntos de arranque.
- Puede pasar que un conjunto cercano a una media este vacío, por lo que no puede ser modificada. Esto es un inconveniente del método y debe ser manejado en la implementación, pero puede ser ignorado.
- Los resultados dependen de la métrica utilizada para medir. Una solución popular es normalizar cada variable por la desviación estándar, aunque no siempre es deseable.
- La solución depende del número de cúmulos seleccionados. Este último problema es particularmente pesado, normalmente en algunos casos no tenemos manera de saber cuantos cúmulos existen.
- Puede conducir a una partición con un cierto valor de error de suma cuadrado, el cual se puede reducir aun más si se mueve un individuo desde un grupo a otro. Así la partición de los datos por k-medias no es necesariamente única para la cual la suma de cuadrados dentro del grupo es un mínimo **[6]**, **[56]**, **[81]**.



a)



b)

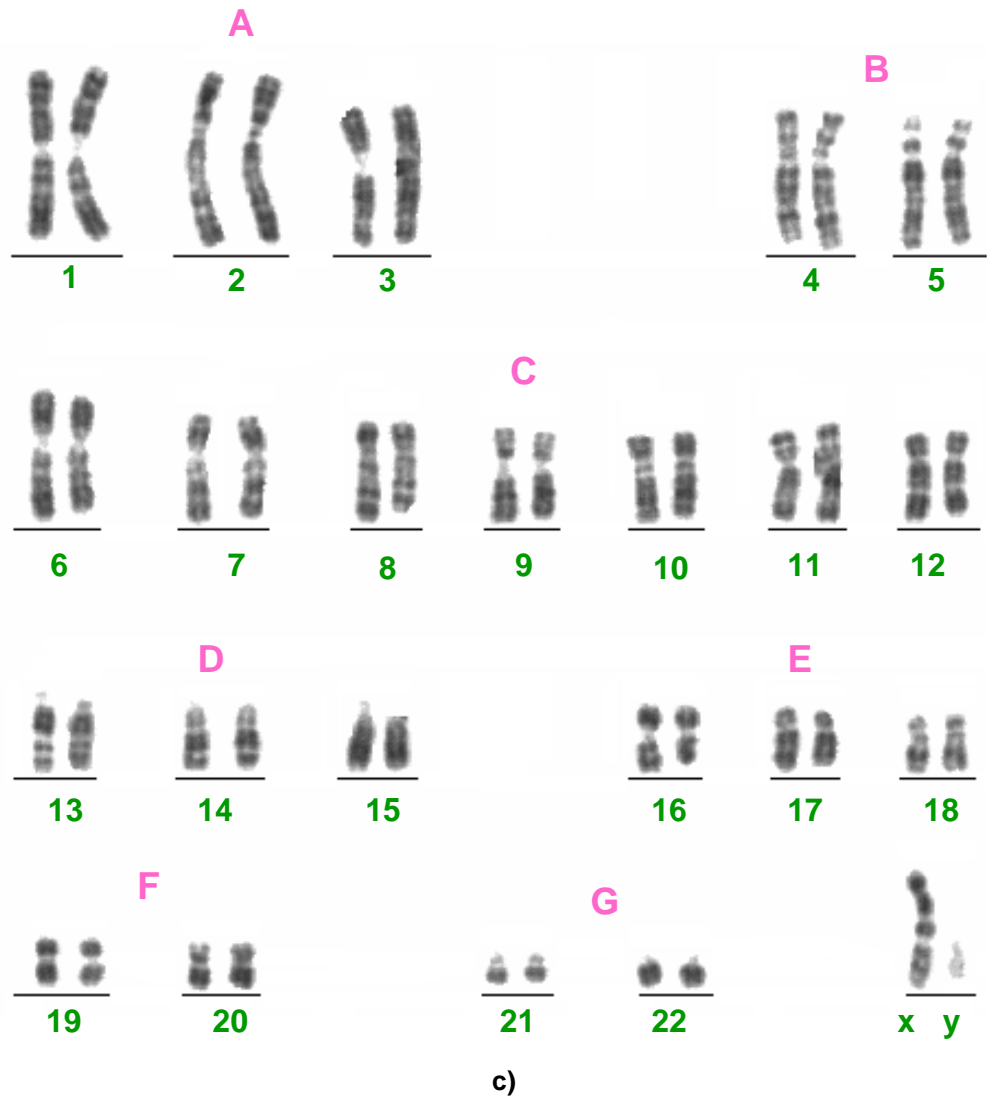


Figura 51. a) Clasificación realizada por el programa con los números asignados a la metafase. b) Clasificación del programa con números azules y la clasificación correcta con números en verde. c) Cariotipo realizado por el citogenetista.

Las razones por las cuales se escogió este clasificador radica en que no ha sido empleado en otros trabajos relacionados con este, no requiere de entrenamiento ni supervisión para su desempeño y su velocidad permite manipular una gran cantidad de datos como sucede en este caso, en el cual se requieren clasificar 46 cromosomas, donde a cada cromosoma se le extrajeron tres características, una de las cuales (perfil de densidad) posee muchos datos de información. Además, se aprovecho el hecho de que se conocía de antemano el número de grupos que

debía formar el clasificador, evitándosele que tuviera que realizar una mayor cantidad de procesamiento computacional en determinar el número de grupos a formar, permitiéndole generar un resultado en un menor tiempo.

En la Figura 51b se puede mirar la clasificación conseguida con el clasificador K-medias (números en azul) y la clasificación correcta de los cromosomas (números en verde). Se observa un notable acierto en el agrupamiento de aquellos cromosomas cuya calidad de imagen es buena y que no presentan grandes variaciones morfológicas entre cromosomas homólogos, lo cual permite la medición exacta de las características de los cromosomas, y por tanto, una mejor clasificación

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el proceso de adquisición de imágenes, existe una variedad de elementos que afectan de manera directa la calidad de la imagen. Uno de ellos se relacionaba con la cantidad de aumento, la cual reducía considerablemente la cantidad de luz que le llegaba al sensor CCD de la cámara ocasionando que las imágenes adquiridas fuesen muy oscuras, tuvieran una notable cantidad de ruido, y escasez de contraste, sobretodo si este proceso era realizado con la cámara en modo automático. Si bien una solución a esto hubiera sido aumentar la iluminación, dado que las lentes de alto poder generalmente requieren más iluminación, puesto que las pequeñas áreas observadas reflejan menos luz nuevamente dentro de los lentes, lo único que se conseguía era atenuar la imagen haciendo que los cromosomas fuesen difíciles de distinguir del fondo ya que las muestras son observadas a contraluz (ver Figura 52) Por lo general, no se trabaja con la máxima iluminación que permite la apertura numérica (AN), ya que cuando la AN. de iluminación es casi igual a la A.N. máxima del objetivo, se disminuye el contraste.

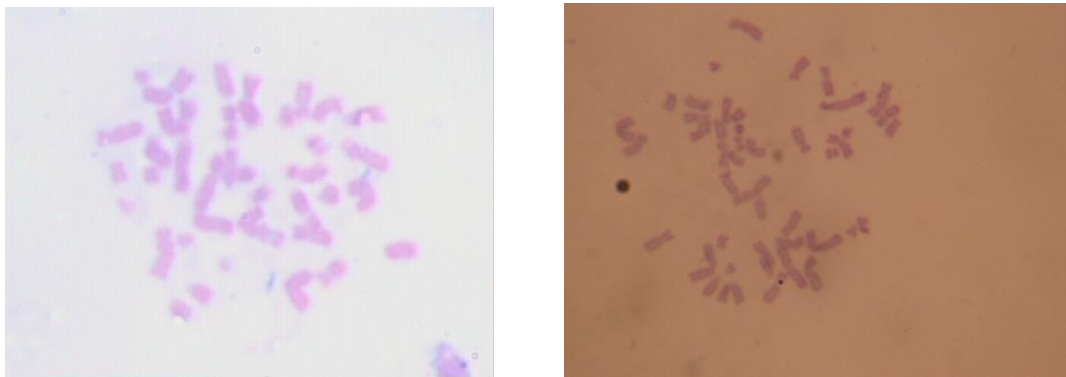


Figura 52. Fotografías donde se aprecia coloración muy tenue en las muestras y escasez de contraste.

Para la observación en el microscopio, cada muestra tiene sus propios valores de AN con que deben ser iluminados, los cuales se consiguen variando el cono de luz que ilumina la AN por medio del diafragma de iris ubicado debajo de la platina del microscopio, el cual se abre lo suficiente para obtener buenos resultados. En muestras de alto contraste con detalles diminutos se debería iluminar la A.N. por completo, pero si la muestra tiene poco contraste se debe disminuir el cono de iluminación de la A.N. para impedir que la imagen quede borrosa debido al poco contraste [20]. Otro parámetro que permite mejorar el contraste de la imagen es uso de los filtros selectivos del microscopio, los cuales permiten seleccionar la longitud de onda emitida. Para este trabajo se uso el filtro verde ya que brindaba un mejor contraste de la muestra y porque el ojo humano es mas sensible a este color. Por ultimo, otro factor con el que se puede mejorar la imagen, es el empleo de “objetivos de inmersión” los cuales son líquidos que se aplican entre el porta muestras y la lente frontal del objetivo que disminuyen la distancia resoluble incrementando el índice de refracción N dentro del espacio objeto y la A.N. Por lo tanto, los valores óptimos para el microscopio con los que se logro el mejor compromiso entre poder de resolución y contraste fueron los siguientes:

Diafragma de iris (apertura numérica): F4

Filtro: Verde

Con estos valores ajustados en el microscopio se logro adquirir fotografías mas contrastadas, con buen brillo y con la iluminación suficiente para que los cromosomas no aparecieran atenuados y sus bandas se observaran claramente.

En cuanto al tipo de cámara usada, se hubiera podido recurrir a una cámara monocromática que tuviese un sensor CCD de mejor calidad con una relación señal ruido y eficiencia cuántica altas que permitieran una mayor sensibilidad a la luz sin la adición de ruido. Sin embargo, el costo de esta clase de cámaras es elevado, no siendo posible contar con una de ellas. Ante esta situación, se recurrió

a los parámetros de ajuste manual de la cámara como tiempo de integración o de exposición, apertura del diafragma y ganancia (velocidad ISO), con los que se experimentó hasta conseguir la combinación óptima que permitiera adquirir fotografías de buena calidad. A continuación se listan los ajustes óptimos realizados a la cámara digital, con los que se logro buenas fotografías:

Tamaño del sensor: 1/3"

Resolución 1200x1600 pixeles

Velocidad de obturación: 1/60 seg.

Abertura del diafragma: F2.8

Ganancia (Velocidad ISO): las mas baja que posee la cámara: ISO80

El motivo por el que se seleccionó una cámara con un sensor de tamaño de 1/3" radica en que este captaba de mejor manera la luz que incidía sobre la superficie del sensor, ya que cuando se utilizaba cámaras con sensores de mayor tamaño, se necesitaba mas aumento para lograr el mismo campo de visión, trayendo consigo una reducción de la cantidad de luz que incidía sobre el sensor y mayor cantidad de ruido, situación que no se presenta con sensores de menor tamaño.

Aunque la cámara seleccionada permitía la toma de fotografías a una mayor resolución, se escogió una resolución de 1200x1600 pixeles, ya que por encima de este nivel no se lograba una mejora significativa de la imagen, sino un mayor peso de archivo ocupando mucha memoria al almacenarla, tanto en el computador como en la cámara y no era posible observarla en el monitor de forma completa, sino solo una parte de la misma que tuviera la misma resolución máxima que el monitor era capaz de brindar (1280x1024 pixeles), desaprovechándose el resto de información de la imagen. Esto no permitía tener una visión completa de la metafase para hacer un análisis preliminar de la misma, y determinar el número de cromosomas. Asimismo, estas imágenes de alta resolución exigían un mayor

costo computacional al realizar el proceso de clasificación de los cromosomas llegando incluso a bloquearse el computador.

La exposición correcta para una fotografía se obtiene a partir de la combinación de una escala de valores de abertura del diafragma y velocidad de obturación. Partiendo de unos parámetros determinados podemos hacer que llegue mayor o menor cantidad de luz al sensor de la cámara, bien sea abriendo o cerrando el diafragma o haciendo exposiciones más largas o más cortas. No existe la combinación perfecta de velocidad de obturación y abertura del diafragma, pues hay muchas que son equivalentes. Todo depende de las condiciones de luz y sobre todo, de que queremos lograr. Las circunstancias que indujeron a elegir los valores de apertura del diafragma y velocidad de obturación mencionados fueron los siguientes:

- Las vibraciones externas generadas por el tráfico vehicular en el Laboratorio de Genética.
- Las vibraciones a las que es sometida la cámara durante la toma de la fotografía.
- La cantidad de aumento que reducía considerablemente la cantidad de luz que le llegaba al sensor CCD de la cámara, ocasionando que las imágenes adquiridas fuesen de poco contraste, muy oscuras y tuvieran una notable cantidad de ruido.
- Las características de los sensores CCD que hacen que el ruido de la imagen grabada aumente con velocidades de obturación lenta.

Para contrarrestar estos inconvenientes se escogió una abertura del diafragma de F2.8 para permitir el paso de mayor cantidad de luz hacia al sensor, mejorando la relación señal - ruido y reduciendo la cantidad de ruido en la imagen. Para lograr la exposición adecuada, aumentar la nitidez de la escena y evitar que las fotos salieran movidas, se seleccionó una velocidad de obturación de 1/60 seg.

También, se adoptó el valor de ganancia (Velocidad ISO) mas bajo que brindaba la cámara, que para este caso fue de ISO80. Este ajuste permitió mejorar aun más la relación señal - ruido.

Tabla 10. Porcentaje de acierto de la clasificación de cada cromosoma en varias metafases.

Pares de cromosomas	% de acierto
1	28.6
2	20
3	37.1
4	20
5	30
6	12.8
7	25.7
8	14.3
9	18.6
10	12.9
11	21.4
12	18.6
13	10
14	17.1
15	15.7
16	15.7
17	14.3
18	18.6
19	17.1
20	25.7
21	25.7
22	30
23	17.1
24	25.7

Se tomaron 133 fotos de las cuales se seleccionaron 70 para ser organizadas con el programa elaborado, evaluando la eficiencia en la correcta clasificación de los diferentes tipos de cromosomas. La clasificación promedio de parejas dentro de

cada metafase fue de 5 pares, mientras los porcentajes de acierto para cada pareja de cromosomas dentro del conjunto de metafases seleccionado se ilustran en la tabla 10.

En este trabajo se pretendió incorporar el conocimiento y la experiencia del citogenetista en el análisis visual y clasificación de los cromosomas, mediante el uso de algoritmos los cuales realizan procedimientos basados en las reglas heurísticas empleadas por los citogenetistas. Pero desgraciadamente los resultados no fueron muy alentadores, los cuales no alcanzan siquiera el 50%. La verdad es que los resultados son dependientes de la calidad de la muestra y de la fotografía, ya que en algunas el algoritmo alcanzaba a clasificar 12 parejas correctamente dentro de la metafase, lo cual representa la mitad de las 24 clases, esto debido a que las metafases no presentaban cromosomas unidos ni solapados, no había muchas variaciones morfológicas entre cromosomas homólogos y la coloración de las bandas era relativamente buena.

Según la literatura (ver [46], [49], [61], [79]), los sistemas de análisis de cromosomas basados en el tratamiento digital de la imagen y reconocimiento de patrones son difíciles de describir, poner a punto o modificar. La mayoría de estos clasificadores tienen dos defectos importantes:

- Desempeño insuficiente comparado al experto humano (70 - 80% comparado con 99.7%)
- La necesidad por una interacción del usuario para desempeñarse satisfactoriamente ⁹.

Existe una gran variedad de factores que afectan considerablemente el desempeño de los algoritmos, los cuales se originan en las distintas etapas que

⁹ MORADI, Mehdí y SETAREHDAN, Kamaledin. New features for automatic classification of human chromosomes: A feasibility study. En: Pattern Recognition Letters. Vol. 27, N° 1 (enero 2006): p. 19-28.

componen el proceso de obtención de cariotipos, las cuales van desde la preparación de la muestra, hasta la extracción de las características empleadas por el sistema como las expuestas en [46], [49], [61], [79]. Por estas razones mencionadas, la clasificación de cromosomas humanos ha sido y es uno de los escenarios mas ampliamente investigados del proceso de cariotipado. Es una tarea que se ha venido desarrollando desde hace aproximadamente 25 años, en el que han participado numerosos científicos de diferentes ramas como biólogos, médicos, físicos, matemáticos, ingenieros, etc., que han tratado el análisis de metafases. En los últimos años, varios algoritmos y métodos de clasificación han sido desarrollados y probados para lograr este propósito, pero sin alcanzar igualar el grado de acierto de los citogenetistas expertos. Como señala Moradi, el cariotipo automático es considerado todavía una tarea difícil debido principalmente a la variabilidad de la forma, causada por la naturaleza no rígida de los cromosomas que les da apariencias imprevisibles dentro de las fotografías ¹⁰. Esto significa que las características que se extraigan para la identificación de los cromosomas, no serán lo suficientemente confiables, mientras esas variaciones no permitan determinarlas con exactitud como para lograr un buen porcentaje de acierto en la clasificación.

Además, hoy en día todavía no hay una teoría de la visión. No se conoce los mecanismos que el cerebro utiliza para obtener la información de la percepción. El cerebro es capaz, de manera inconsciente, de determinar la distancia a los objetos, de reconocerlos en diferentes posiciones, aunque se encuentren rotados y con información parcialmente oculta. El observador humano usa un amplio rango de señales, obtenidas a partir del color, la perspectiva, el sombreado, y una vasta librería de experiencias individuales. La percepción visual depende únicamente de la capacidad humana de realizar juicios. Sin embargo, un sistema de visión artificial no tiene una experiencia de base de la cual tomar decisiones mediante

¹⁰ MORADI, Op. Cit., p. 20

una comparación. Todo debe estar específicamente definido. Problemas simples como encontrar un orificio o juzgar puntos finos, se vuelven una tarea complicada de definiciones en la visión artificial. Como asegura Gonzáles, las técnicas mas avanzadas de análisis de imágenes por computadora se basan en su mayor parte en fórmulas heurísticas, adaptadas para la resolución de problemas específicos¹¹ . Los sistemas de este tipo son sumamente especializados y tienen poca o ninguna aplicación en otras tareas. El problema fundamental de estas técnicas, es que cada una de ellas suele ser la más adecuada para las características de un tipo específico de problema no conocidas a priori, lo que dificulta la selección de la técnica con la que se desea abordar inicialmente el problema. Esto es, la teoría actual y las limitaciones de implementación en el campo del análisis de imágenes implican soluciones que, en gran medida, dependen del problema. Nuestro conocimiento y comprensión de los principios fundamentales del reconocimiento y la interpretación llega a ser mucho menos preciso y mucho más especulativo. Esa relativa falta de comprensión se traduce la final en una formulación de restricciones e idealizaciones cuyo propósito es reducir la complejidad de las tareas, hasta llegar a un nivel razonable. El producto final es un sistema con capacidades operativas sumamente especializadas. Por lo tanto, las técnicas de visión artificial, como demuestra su gran uso en la industria, son particularmente apropiadas para la realización de trabajos visuales altamente repetitivos que sean fatigosos o difíciles de realizar para un operario, especialmente cuando este trabajo es ineficiente o costoso en términos económicos o temporales.

Muchas aplicaciones notables relacionadas con la medicina o la biología, han fallado, ya sea por la mala calidad de las muestras, por una inadecuada iluminación o por una mala obtención de las fotografías etc. Para reducir el número de variables, el sistema de visión debe estar provisto con la mejor imagen que sea posible. En un sistema de visión artificial, la mejor imagen es aquella que no tiene

¹¹ GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard, Op. Cit., p. 616

ruido y tiene el mayor contraste donde las áreas de interés se destacan del fondo y facilita la tarea del sistema de visión. En el caso de los cromosomas una buena imagen se logra a partir de muestras bien preparadas. Las preparaciones de las células de alta calidad se caracterizan por exhibir los cromosomas bien separados unos de otros, teñidos de tal manera que sus bandas presentan una coloración homogénea y un ancho e intensidad diferente de su adyacente, permitiendo de esta manera realizar una adecuada clasificación y detección de anomalías.

Una buena muestra depende de la calidad y uso adecuado que se le dé a los reactivos, del tiempo en que se dejen actuar sobre la muestra y la manera como se realicen ciertas etapas de la preparación como incubación, lavados, centrifugación, goteo, deshidratación y tinción. Pero lograr una buena metafase es todo un desafío: Los cromosomas sufren grandes variaciones en su tamaño y forma a través del ciclo celular. Desde la etapa de interfase, algunos cromosomas no se replican al mismo tiempo (fenómeno conocido como replicación tardía), desarrollándose cada uno de ellos a un ritmo diferente, pasando de estar muy poco compactados (interfase) a estar muy compactados (metafase), dando lugar a tamaños y formas diferentes entre cromosomas homólogos, presentando el centrómero difuso, situado a todo lo largo del cromosoma, sin ubicarse en un solo punto concreto, cuando se detiene el proceso de división en la etapa de metafase (ver Figura 53). También en esta figura se puede observar como varía el tamaño entre cromosomas homólogos, donde uno de los cromosomas es más largo que su semejante. Estas variaciones también son debidas a los heteromorfismos cromosómicos, las cuales, las más obvias son las variaciones morfológicas. Según Lisker, se reconocen cuatro grupos principales de heteromorfismos cromosómicos a saber: 1) el tamaño del brazo largo (q) del cromosoma Y; 2) el tamaño de la heterocromatina constitutiva o centromérica; 3) las dimensiones y otras características propias de los satélites, y

4) sitios frágiles (además del centrómero, constricciones secundarias situadas en diferentes lugares) ¹².

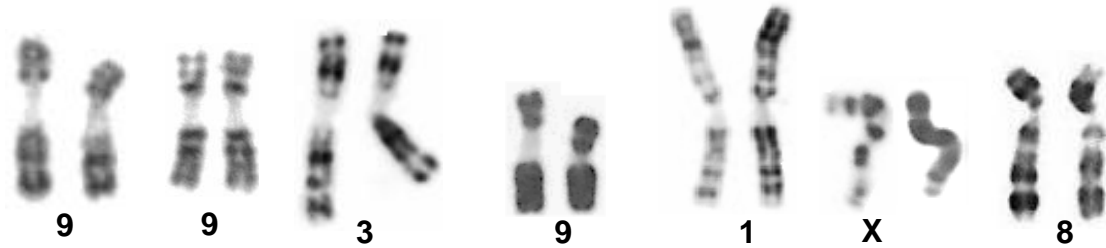


Figura 53. Parejas de cromosomas que presentan el centrómero difuso y distinta longitud entre cromosomas homólogos.

La apreciación de las bandas también se ve afectada por el proceso de replicación tardía, haciendo que en las parejas de cromosomas, uno de ellos presente bandas muy pálidas e incluso imperceptibles, dificultando mucho su reconocimiento (ver Figura 54) .Él número de bandas también se ve afectado a medida que los cromosomas se condensan durante transcurso del ciclo celular. En cromosomas poco condensados (prometafásicos) es posible identificar un mayor número de bandas, cuyo número se reduce a medida que aumenta la condensación, ya que se produce una fusión de estas bandas dando lugar a otras nuevas. Igualmente, si en etapa de metafase los cromosomas están muy condensados, su diferenciación y separación puede ser imposibles.

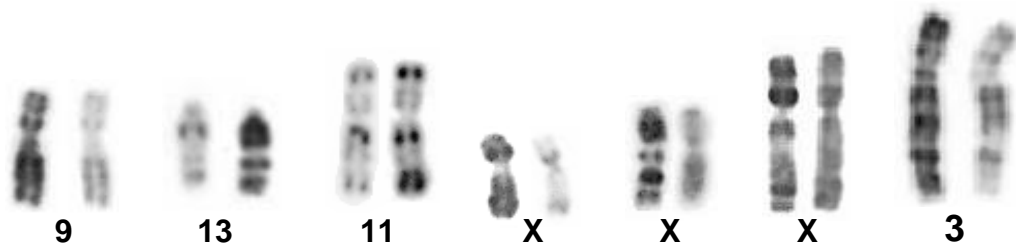


Figura 54. Pares de cromosomas que presentan diferente grado de palidez entre cromosomas homólogos.

Como expresa Ritter, aunque las técnicas de preparación modernas intentan sincronizar las fases del proceso de la división, la aplicación de estos métodos es

¹² LISKER, Rubén. Introducción a la Genética Humana. México: Mundo Moderno, 2001, p. 125

limitada y el clasificador, ya sea humano o un sistema de visión artificial, debe ser capaz de manipular profases y metafases simultáneamente¹³. Además, es necesario tener en cuenta que los tratamientos para teñir los cromosomas y para obtener las metafases mitóticas influyen de manera muy importante en el tamaño de los cromosomas.

El ruido introducido en la toma de la fotografía es otro factor determinante en la calidad de la imagen. Este deforma profundamente la zona de la imagen correspondiente al centrómero, dificultando mucho su distinción del fondo y afectando de manera considerable su ubicación. El ruido tampoco permite hacer una clara distinción entre las bandas, ya que enmascara los límites entre ellas así como también disfraza las fronteras entre cromosomas, haciendo que aparezcan en la imagen como un solo objeto.

Como es mencionado en [35], [48], [61], [76] y de acuerdo a lo mencionado anteriormente, no es posible realizar una determinación exacta del tamaño y posición del centrómero, en lugar de ello, lo que se obtiene son una serie de valores que se solapan con los de otros cromosomas, haciendo difícil o imposible la diferenciación entre pares de cromosomas homólogos para su correcta clasificación.

Otro factor es que en la mayoría de las metafases se observan cromosomas pegados y en varias ocasiones cromosomas solapados. Al mismo tiempo, las fronteras de los centrómeros en las imágenes de microscopio no están bien definidas, sus límites son confusos, y presentan niveles de gris muy similares al fondo. Además, todas las metafases presentan un mínimo de desechos celulares, material citoplasmático y residuos dejados por el proceso de preparación de la muestra que son fotografiados junto con los cromosomas, que en algunos casos

¹³ RITTER, Gunter y SCHREIB, Gernot. Profile and feature extraction from chromosomes. En: 15 Th. International Conference on Pattern Recognition. Vol. 2, 2000. p. 288.

impiden distinguir el centrómero del fondo, impiden la observación de las bandas o se pueden confundir fácilmente con los cromosomas, sobre todo con los que presentan replicación tardía (ver Figura 55) [35], [84].



Figura 55. Metafasas que presentan cromosomas pegados, solapados y desechos celulares.

Todas estas variaciones inadvertidas de las metafases y los cromosomas hacen que cualquier sistema por muy robusto que sea falle y requiera de la intervención del usuario en ciertas etapas del proceso de clasificación de cromosomas como la separación de cromosomas pegados, eliminación de objetos extraños y ubicación del centrómero, para garantizar un resultado aceptable en la organización de los cromosomas. Estos problemas han sido objeto de intenso estudio por varios autores, los cuales han probado nuevas técnicas de preprocesamiento de imágenes y de segmentación, algunas de las cuales resultan ser bastante complicadas, difíciles de programar y de alto costo computacional. Todo con el fin de conseguir la automatización de las etapas de mejora, segmentación y obtención de características de la imagen.

La poca confiabilidad que manifiestan los valores de longitud e índice centromérico por lo difícil que resulta su determinación, también ha originado la búsqueda de nuevas características por parte de varios autores, los cuales, han estudiado y ensayado con otros parámetros (perfil de densidad, volumen, simetría de la forma,

etc) con el fin de lograr un mayor porcentaje de acierto en la clasificación [46], [48], [49], [78]. Para este trabajo se utilizó el perfil de densidad, pero como se mencionó arriba este también varía entre cromosomas homólogos, debido a que en cada uno de estos la tinción de sus bandas no es del todo igual, sino que presenta ciertas diferencias en cuanto a la tinción, número, posición y ancho de las bandas y además se ve afectado por el ruido introducido en la fotografía. Aunque cabe resaltar que este parámetro es más confiable que el tamaño y el índice centromérico.

Algunos autores con el fin de garantizar un óptimo desempeño de su sistema de clasificación, imponen varias restricciones, como por ejemplo, no procesar cromosomas sexuales, cromosomas demasiado torcidos, cromosomas solapados, cromosomas con formas extrañas (ver Figura 56), e incluso algunos autores han preferido enfocarse en identificar los cromosomas que son más propensos a presentar anomalías, descartando el resto de cromosomas [48]. Otros prefieren enfocarse solo en el mejoramiento y segmentación de la imagen [79].

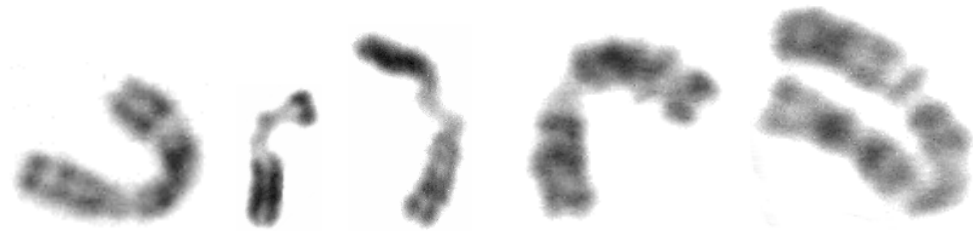


Figura 56. Cromosomas torcidos.

Por lo tanto la gran mayoría de aplicaciones utilizadas para la clasificación de cromosomas terminan siendo diseñadas como Corel, Fotoshop, Paint, Paint shop pro, etc., y el uso de estas herramientas es complejo dado que los algoritmos de procesamiento de imágenes incorporados son extremadamente potentes y donde el usuario a menudo aplica operaciones a imágenes digitales sin tener en cuenta los principios subyacentes tras dichas manipulaciones. Las imágenes que resultan de una manipulación descuidada están a menudo distorsionadas con respecto a

aquellas que podrían producirse si la potencia y versatilidad del software de procesamiento digital fuesen utilizadas correctamente. Lo anterior demuestra que el cerebro presenta una sofisticación en la percepción que ni ahora ni en mucho tiempo habrá posibilidad de implementar artificialmente.

5. CONCLUSIONES

Se diseñó y desarrollo un sistema de visión artificial para la clasificación de cromosomas aprovechando el conocimiento y la experiencia del citogenetista en el análisis visual y organización de los cromosomas en un cariotipo, empleando los parámetros con los que tradicionalmente se describe un cromosoma como son su longitud, índice centromérico y perfil de densidad, permitiéndole obtener los cariotipos a un bajo costo y en menos tiempo

Con este trabajo se demostró que contando con un microscopio de buena calidad y con un bajo presupuesto es posible implementar un sistema de visión artificial con prestaciones similares a las ofrecidas por las marcas comerciales y con la ventaja de poderse modificar según los avances tecnológicos.

En este trabajo se observó que la exactitud del conjunto de características empleadas por el clasificador, esta limitado por la calidad de las muestras y por el ruido introducido en la toma de las fotografías. Por lo tanto, aunque el algoritmo de clasificación funcione adecuadamente, si no se cuenta con metafases de buena calidad los resultados que se obtendrán serán desfavorables.

Los valores de longitud e índice centromérico no son parámetros confiables que garanticen una correcta clasificación de los cromosomas, debido a que no es posible medirlos con exactitud debido a la variabilidad con la que aparecen los cromosomas en las imágenes, obteniéndose valores que no permiten realizar una clasificación adecuada, sino que se obtienen grupos cuyas fronteras se solapan impidiendo así diferenciar un cromosoma de otro.

Entre mas baja es la calidad de la imagen, la efectividad de las etapas que componen el sistema de clasificación de cromosomas será menor, requiriendo una mayor intervención del usuario para corregir los errores cometidos por el sistema, ocasionando un mayor consumo de tiempo.

Aunque el sistema implementado no lograba un porcentaje alto en la clasificación de los cromosomas, este era de gran ayuda al citogenetista ya que al menos presentaba los cromosomas recortados en orden decreciente, lo cual era un importante ahorro de tiempo y facilitaba mucho la tarea de identificación de los cromosomas.

El desempeño del clasificador de K-medias empleado en este sistema fue bueno, a pesar de no contarse con un vector de características cuyos valores fueran lo suficientemente confiables. Para ciertos valores correspondientes a imágenes de metafases de buena calidad, su acierto en la clasificación fue notable.

Debido a que en la resolución de problemas de procesamiento de imágenes no se tiene un conocimiento a priori completo de las características del problema, esto por lo general conduce al uso de fórmulas heurísticas y a la formulación de restricciones e idealizaciones cuyo propósito es reducir la complejidad de las tareas, hasta llegar a un nivel razonable, originando aplicaciones con capacidades operativas sumamente especializadas y con bajo grado de flexibilidad.

6. RECOMENDACIONES

Se sugiere utilizar una cámara digital de mejor desempeño a fin de lograr fotografías con un mayor contraste y menor cantidad de ruido y que sea capaz de enviar la señal de video a través del puerto USB sin necesidad del uso de tarjeta importadora de video. También que los controles de la cámara puedan ser manejados desde el computador a través del puerto USB.

Se debe en lo posible contar con muestras de buena calidad para que el sistema de clasificación logre un mejor desempeño.

Investigar nuevas técnicas de procesamiento de imágenes que permitan superar muchas de las dificultades enunciadas en este trabajo, que sean de bajo costo computacional y que le permitan al sistema ser más robusto y flexible.

Efectuar la búsqueda de características que describan mejor la morfología del cromosoma y que sean más robustas ante las variaciones que se presenta en las muestras, a fin de evitar el solapamiento de los datos y asegurar la máxima separación de las clases.

Tener cuidado en la elección de las técnicas de procesamiento de imágenes encaminadas al mejoramiento, teniendo en cuenta que a veces en el propósito de lograr un mayor realce de la imagen, lo que se consigue es enmascarar alteraciones estructurales pequeñas de los cromosomas como microdeleciones, duplicaciones y sutiles translocaciones, afectando de esta manera el diagnóstico del citogenetista. Igualmente, con el proceso de segmentación, ya que en esta etapa se puede estar eliminando partes que componen los cromosomas como son los tallos y satélites.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBA, José Luis; MARTÍN, Fernando; CID, Jesús. Curso procesado de imagen. Universidad de Vigo. (Febrero. 2006) Disponible en la pagina Web: <http://www.gts.tsc.uvigo.es/pi>
2. AMATLLER, Antoni Marín. Fotografía digital: Manual de uso y recursos. Disponible en la pagina Web: <http://mosaic.gmmd.net/fotografia.html>
3. ARIMA, Chinatsu; HANAI, Taizo; OKAMOTO, Mosahiro. Gene expression analysis using fuzzy k-means clustering. En: Genome Informatics. Vol. 14. (2003) p. 334 - 335
4. BALLARD, Dana H., BROWN, Christopher M. Computer vision. New York: Prentice-Hall, 1982. 527p.
5. BATCHELOR; Bruce G y WHELAN, Paul F. Intelligent vision systems for industry. Springer, 2002. 457p
6. BOW, Sing Tze. Pattern Recognition and Image Preprocessing. 2ed. New York: Marcel Dekker, 2002. 698p
7. BRANCH, John William y OLAGUE, Gustavo. La visión por computador: Una aproximación al estado del arte. En: Revista Dyna. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. No 133 (jun. 2001) SIN 0012 – 735.

8. BRISSOT, Louis y CHAUTEMPS, Jacques. Sensores de imagen. CMOS y CCD: Comparación. En: Mundo Electrónico. N° 36 (Feb. 2005): p. 30 - 34.
9. BUSTOS, Jaime Motas. Una pequeña explicación sobre el funcionamiento de los dispositivos de captación CCD. Disponible en la pagina Web: <http://dis.um.es/~ginesgm/files/doc/par/tema1.ppt>
10. CABRERA, José; SANCHEZ, Ángel; HERRÁEZ, Miguel. Biología molecular e ingeniería genética. Ciudad: Elsevier España, 2001. 467 p. ISBN 8481745057
11. CASTLEMAN, Kenneth. Digital image processing. USA. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1996.
12. CASTELLO, Vicente. Localización y descodificación de códigos de barras en imágenes digitales. Castellán de la Plana, 2005, 62p. Trabajo de grado (titulo) Universidad Jaume. Ingeniería Informática.
13. Codificación de imágenes y video. Universidad de la Republica. Facultad de Ingeniería. Instituto de Ingeniería Eléctrica. Disponible en la página web: <http://iie.fing.edu.uy/ense/assign/codif/material.html>.
14. CHEN, Qing; YANG, Xiaoli y PATRIU, Emil. Watershed segmentation for binary images with different distance transform. University of Ottawa. Canadá. Lakehead University, Thunder Bay. Canadá
15. COUPRIE, M y BERTRAND, G. Topological grayscale watershed transformation. En: SPIE Vision Geometry V Proceedings. Vol. 3168 (1997) p. 136 - 146

16. Curso de Fotografía. Disponible en la página Web: <http://www.xatakafoto.com/categoria/curso-de-fotografia>.
17. DE LA ESCALERA, A. Visión por computador: Fundamentos y métodos. Madrid: Prentice Hall, 2001.
18. DETCHEVA, Ekaterina. Processing and analysis of metaphase and chromosome images. Bulgaria. Artificial intelligence department of the Institute of Mathematics and Informatics. Disponible en la pagina Web: <http://www.math.bas.bg/~detcheva/smb98.doc>
19. DRETSL, Máximo. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección biomédica. En: Revista Medica del Uruguay. Uruguay. Vol. 18, N°2 (Sept. 2002)
20. EDMUND OPTICS. Edmund Optics Technical Library: Imaging, Illumination and Optical Instruments. Disponible en la página web: <http://www.edmundoptics.com/techSupport>
21. ERIC, Vicente; RIVERA, Luís; David y Mauricio. Grasp en la resolución del problema del clustering. En: Investigación de Sistemas e Informática. Vol. 2, N°2 (2005): p. 16 -25.
22. ERTÜRK, Sarp. Digital image processing. Edition Part Number 323604A-01. University of Kocaeli, National Instruments Corporation. USA, 2003.
23. FERNADEZ, Antonio. Relación señal-ruido en astrofotografía digital de cielo profundo: Bases teóricas y aplicación practica (2006) Disponible en la pagina web: http://www.astrosurf.com/afernandez/equipment/ccd/snr_v11_mar06.pdf

24. FRATER, Harold y PAULISSEN, Dirk. El gran libro de multimedia. España: Marcombo S.A., 1994. p. 105 - 111, p. 291 - 301, p. 354 - 394.
25. GARCIA, Jaime. Curso: Usando su cámara CCD para hacer ciencia. Instituto Copérnico. Disponible en la pagina web: <http://institutocopernico.org/vs/ccdlectures/ccdlecture1.php>
26. GARDNER, Eldon. Principios de Genética. 5ª ED. México: Editorial Limusa, S.A., 1.979.
27. GIL, P.; TORRES, F. y ORTIZ, F. Detección de objetos por segmentación multinivel combinada de espacios de color. En: JORNADAS DE AUTOMATICA. (25º: 2004: Ciudad Real)
28. GONZALES, Oscar; VARGAS, Clara; SOTAQUIRA, Ángel; SÁNCHEZ, Jorge. Obtención de cariotipos mediante Procesamiento Digital de Imágenes. Bucaramanga, 2001, 78 p. Tesis de grado. (Título) Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones.
29. GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard. Tratamiento digital de imágenes. Delaware: Addison-Wesley / Dias de Santos, 1996.
30. GONZÁLES, Rafael y WOODS, Richard. Digital Image Processing. 2ed. USA. Prentice-Hall, 2001. 793p
31. GOUTSIAS, John. Mathematical morphology: A geometric approach to image processing and analysis. Baltimore. The Johns Hopkins University. Department of Electrical and Computer Engineering. Image Analysis and Communications Laboratory (IACL)

32. GOUZE, A; DE ROOVER, C; MACA, B; HERBULOT, A; DEBREUVE, E; BARLOND, M. Watershed - driven active contours for moving object segmentation. En: Image processing: IEEE International Conference (2005: Genova). Vol.2, p. 818
33. HIPR2, Image Processing Learning Resources Web site, en la página web: <http://www.dai.ed.ac.uk/HIPR2/>
34. HOLST, Gerhard. Noise in imaging: The good, the bad and the right. En: Photonics. Vol. 40, N°12 (Dic. 2006): p. 88 - 92.
35. HYOHOOON, Choit; CASTLEMAN, Kenneth y BOVIK, Alan. Joint segmentation and classification of M-FISH chromosomes images. En: 26 Th. Annual International Conference of the IEE. Vol. 1, N° 1-5 (Sept. 2004): p. 1636 - 1639.
36. IBRAHIEM, M y EL EMARY M. On the application of artificial neural networks in analyzing and classifying the human chromosomes. En: Journal of Computer Science. 2006. p. 72 - 75.
37. Introducción a la astronomía CCD. Disponible en la página web: <http://www.nto.org/curso>.
38. KANUNGO, Topas; MOUNT, David; NETANYANU, Nathan; PIATKO, Christine; SILVERMAN, Ruth y WU, Angela. An efficient k-means clustering algorithm: Analysis and implementation. En: IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE, Vol. 24, No 7 (Jul. 2002)
39. LIN, Gang; ADIGA, Umesh; OLSON, Katy; GUZAWSKI, John; BARNES, Carol y ROYSAM, Badrinath. A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient

- cues and objects models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. En: Cytometry Part A 56A: p. 23-26 (2003)
40. LISKER, Rubén. Introducción a la Genética Humana. México: Mundo Moderno, 2001.
41. LOAIZA, Humberto. Introducción a los sistemas de visión en colores. En: Energía y Computación. Vol. 8, N°1 (Ene. - jun 1999): p. 12 - 19.
42. MALPICA, Norberto; CASTILLO, José Luís; PASTRANA, Cristina; ALAVAREZ, Juan; ARIAS, Manuel; LOPEZ, Francisco y ANTORAZ, J: Carlos. El ordenador en el laboratorio: Medir con imágenes. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Facultad de Ciencias. Departamento de Física Matemática y Fluidos. Disponible en la página Web: <http://www.dfmf.uned.es/actividades/no-reglada/laboratorio>.
43. MARTI, José. Procesamiento de imágenes en la educación de postgrado en ciencias médicas y biológicas. En: Revista Cubana de Educación Superior. Cuba. Vol.22, N°1 (2002): p.113.
44. MARTINEZ, Enrique; FERRERES, Luis y GIL, Ana. Manual de patología. Club de informática aplicada. Sociedad española de anatomía patológica. (2001: Pamplona) ISBN 84-699-5286-2. Disponible en la página Web: <http://www.seap.es/telepatologia>.
45. MARTINEZ, Gonzalo. Clasificación mediante conjuntos. Madrid, 2006, 162p. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Escuela Politécnica Superior. Departamento de Ingeniería Informática.

46. MCMMASTER, T. J; WINFIELD, M. O; BAKER, A. A; KARP, A y MILES, M. J. Chromosome classification by atomic force microscopy volume measurement. En: American Vacuum Society. Vol. 14, N°2 (marzo - abril 1996)
47. MENA, J;B: Vectorización automática de una imagen binaria mediante k-means y degeneración de la triangulación de Delaunay. En: Revista de la Asociación Española de Teledetección. SIN 1133 - 0953, No. 17 (2002); p. 21 - 30
48. MOUSAVI, Parvin; WARD, Rabab Kreidieh; FELS, Sidney; SAMETI, Mohammad y LANSDORP, Peter. Feature analysis and centromere segmentation of human chromosome images using an iterative fuzzy algorithm. En: IEEE Transactions en biomedical engineering. Vol. 49, N°4 (abril 2002)
49. MORADI, Mehdí y SETAREHDAN, Kamaledin. New features for automatic classification of human chromosomes: A feasibility study. En: Pattern Recognition Letters. Vol. 27, N° 1 (enero 2006): p. 19-28.
50. MOUNT, David. Kmllocal: A tested for k-means clustering algorithms. University of Maryland. Department of computer science and Institute for advanced computer studies. (Agosto 2005) en <http://www.es.umd.edu/~mount/pubs.html>.
51. NATIONAL INSTRUMENTS. Choosing a camera. Disponible en la página Web: <http://zone.ni.com>.
52. NATIONAL INSTRUMENTS. 10 aspectos a considerar al elegir software de visión. Disponible en la página Web: <http://zone.ni.com>.
53. NATIONAL INSTRUMENTS. System setup: Fundamental parameters of an imaging system, lighting, movement considerations, image analysis and processing. Disponible en la página Web: <http://zone.ni.com>.

54. NGUYEN, Hieu; WORRING, Marcel y VAN DEN BROOMGAARD, Rein. Watersnakes: energy-driven watershed segmentation. En: Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on Vol. 25, ISSUE 3, (Marzo 2003); p. 330 - 342
55. ONCINA, José. Aprendizaje computacional y extracción de información: Inferencia gramatical. 2005. Universidad de Alicante. Departamento de lenguajes y sistemas informáticos.
56. PAJARES, Gonzalo y DE LA CRUZ, Jesús. Visión por computador: Imágenes digitales y aplicaciones. Madrid: RA-MA Editorial, 2002.
57. PAJARES, Gonzalo y DE LA CRUZ, Jesús. Clasificación de texturas naturales mediante k-means. En: Revista electrónica de visión por computador (REVC) No 6 (marzo 2002)
58. PLATERO, Carlos. Apuntes de visión artificial. En: Servicio de publicaciones EUITI - UPM, 2006. También disponible en la pagina Web: <http://www.elai.upm.es/>
59. RODRÍGUEZ, Dionisio y ESPERANZA, Sandra. Sistema de captura de movimiento grueso para animaciones tridimensionales en un ambiente controlado. Bogota, 2006, 63 p. Trabajo de grado. (Ingeniero de Sistemas) Fundación Universitaria San Martín. Facultad de Ingeniería. Departamento de Sistemas.
60. ROJAS, J. J. Baez; GUERRERO, M: L; ACEVEDO, J. Conde; PADILLA, A y SERRANO, G Urcid. Segmentación de imágenes de color. En: Revista Mexicana de Física. México. Vol. 50, N°6 (Dic. 2004): p. 579 - 587.

61. RITTER, Gunter y SCHREIB, Gernot. Profile and feature extraction from chromosomes. En: 15 Th. International Conference on Pattern Recognition. Vol. 2, 2000. p. 287 - 290.
62. RIVERA, J; OSORIO, F y PRIETO, F. Sistema para la adquisición de imágenes basado en microcontrolador. En: Revista Colombiana de Física. Vol.34, No 1 (2002); p. 256 - 261.
63. ROERDINK, Jos y MEIJSTER, Arnold. The watershed transform: Definitions, algorithms and parallelization strategies. En: Fundamenta Informaticae 41 (2001) 187-228
64. RODRÍGUEZ, Libia y ÁLVAREZ, Rosa. Guía de laboratorio: Elaboración del cariotipo humano. Popayán, 2002. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias de la Salud. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Unidad de Genética
65. ROJO, Marcial; GARCIA, Gloria; GONZALES, Jesús y CARBAJO, Manuel. Preparaciones digitales en los servicios de anatomía patológica (I): Aspectos básicos de imagen digital. En: Revista Española de Patología. Vol. 38, No 2 (2005)
66. RULOT, Héctor. Un algoritmo de inferencia gramatical. Valencia, 1992, 216 p. Trabajo de grado (Doctor en ciencias F) Universidad de Valencia. Departamento de Ingeniería de Sistemas, Computadores y Automática.
67. SAGRERA, Salvador. Citogenética Humana: Normal y Patológica. México Editorial Interamericana, S.A., 1968.

68. SÁNCHEZ, Joan Andreu. Reconocimiento de formas. 2005. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Sistemas Informáticos y Computación. Disponible en la página Web: <http://www.dsic.up.es/~jandreu>.
69. THE MATHWORKS ONLINE DOCUMENTATION. The image processing Toolbox of Matlab. Disponible en la página Web: <http://www.mathworks.com/>
70. TEKALP, Murat. Digital video processing. New Jersey: Prentice - Hall, 1995, 526p.
71. VAUGHAN, Tay. Multimedia: Manual de referencia. España: McGraw-Hill, 2002.
72. T. J., Nelson. Image measurement analysis lab. Disponible en la página web: <http://brneurosci.org/tnimage-manual/>
73. TOBIAS, Orlando y SERRA, Rui. Image segmentation by histogram thresholding using fuzzy sets. En: IEEE Transactions on image processing. Vol. 11, No 12 (dic. 2002); p. 1457 - 1465.
74. UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. Ingeniería en automatización y control industrial. Cátedra: Visión artificial (oct. 2005) segmentación por umbralización.
75. UNIVERSIDAD DE CORNELL. Llevando la teoría a la práctica: Tutorial de digitalización de imágenes. Biblioteca de la Universidad de Cornell. Departamento de Investigación 2000 - 2003. Disponible en la página Web: <http://www.library.cornell.edu>.
76. VAN VLIET, Lucas; YOUNG, Ian; TEN KATE, T. K; MAYALL, Brian; GROEN, Frans y ROOS, Roelof. Atenía: A Macintosh - based interactive karyotyping system. En: Automation of cytogenetics. (1989): p. 47 - 66.

77. VÉLEZ, Patricia y MORENO, Pedro. Guía de laboratorio: Cariotipo. Popayán. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.
78. VIDAL, E., y CASTRO, M. J. Classification of banded chromosomes using error correcting grammatical inference (ECGI) and multilayer perceptron (MLP). En: VII National Symposium on Pattern Recognition and image analysis. Vol. 1 (1997); p. 31 - 36.
79. WANG, Yu Ping; WU, Qiang, y CASTLEMAN, Kenneth. Chromosome image enhancement using multiscale differential operators. En: IEEE Transactions on medical imaging. Vol. 22, No 5 (mayo. 2003); p. 685 - 693.
80. WATKINS, Christopher. Modern image processing: Warping, morphing and classical techniques. Boston: Academic Press, 1993. 234p.
81. WEBB, Andrew R. Statistical pattern recognition. 2ed. England: John Wiley & Sons, Ltd., 2005. 496 p.
82. WU CHE, Fu; CHEM, Bing Yu; LIANG, Rung Huei; OUHYOUNG, Ming. Prong features detection of a 3D model based on the watershed algorithm. National Taiwan University.
83. YOUNG, Ian T.; GERBRANDS, Jan J y VAN VLIET, Lucas J. Fundamentals of image processing. Delft University of Technology, 1998. 111p
84. ZIXIANG, Xiong; WU, Qiang; y CASTLEMAN, Kenneth. Enhancement, classification and compression of chromosomes images. Dept of Electrical Engineering, Texas A&M University, College Station. Advanced Digital Imaging Research.