



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Ingeniería Biomédica

Aplicación de técnicas de procesamiento de imagen para la segmentación de núcleos en muestras histológicas humanas

Trabajo de Fin de Grado
Sofía Jiménez Hernández

Directores

Valery Naranjo Ornedo
Francisco José Peñaranda Gómez

Curso 2015/2016

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a Valery Naranjo Ornedo y a Francisco José Peñaranda Gómez, por haber accedido a colaborar conmigo en este trabajo, pero sobre todo por su atención y paciencia durante el tiempo que hemos trabajado juntos a pesar de la distancias.

Me gustaría seguir agradeciendo a las personas que he conocido en esta etapa de mi vida y en esta nueva ciudad, Valencia, que siempre formará parte de mi. A pesar de no estar físicamente en mi casa, he tenido la gran suerte de poder formar una familia lejos de ella, y creo que no puede haber salido mejor. Sin duda son lo mejor que me llevo de esta experiencia.

Por último, y más importante, tengo que agradecer a mi familia todo su apoyo en cada momento y en cada decisión. Gracias a mis padres, a mis hermanos y a mis tres abuelitas.

Resumen

El presente trabajo final de grado se relaciona con uno de los campos de mayor evolución en la medicina moderna, la patología digital. De manera más específica, este proyecto se centra en la segmentación nuclear la cual tiene como objetivo extraer las características del núcleo para conseguir información relevante que ayude al personal sanitario a conseguir realizar un mejor diagnóstico.

En la actualidad existen diferentes métodos computacionales que permiten realizar la detección, segmentación y clasificación nuclear en muestras histológicas de manera más eficiente y completa que los métodos convencionales de diagnóstico propios de la anatomía patológica. La elección de éstos depende de la aplicación, del propósito que se quiera conseguir y del tipo de muestras del que se disponga.

El objetivo principal de este trabajo es conseguir implementar diferentes técnicas de segmentación nuclear y realizar una comparación de éstas mediante análisis cuantitativo, para saber cuál ha obtenido mejores resultados, es decir, qué técnica ha sido la más eficiente para nuestro caso.

Tras realizar un análisis del estado del arte de la segmentación nuclear, y teniendo en cuenta las limitaciones presentes, se han implementado tres técnicas diferentes; el método Otsu (binivel y multinivel), la transformada *Watershed* con marcadores, ambas técnicas utilizan dos imágenes de grises diferentes como entrada y, por último, la técnica de agrupamiento *K-means*, que utiliza como entrada una imagen RGB. Las imágenes que estas técnicas van a utilizar son imágenes de muestras histopatológicas de colon que pertenecen a tres tipos distintos; muestras de células normales, muestras de células cancerosas y muestras de células que forman parte de adenomas.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	9
1.1.	Contexto	9
1.2.	Motivación	9
1.3.	Objetivos	10
1.4.	Anatomía del colon	11
1.4.1.	Histología del intestino grueso.....	11
1.4.2.	Enterocitos. Células del aparato digestivo.....	13
1.4.3.	Obtención y preparación de muestras histológicas.....	13
1.4.4.	Tipos de muestras. Adenomas y cáncer de colon.....	16
1.5.	Estado del arte. Técnicas de segmentación de núcleos.....	18
1.5.1.	Técnica de umbralización (<i>thresholding</i>)	19
1.5.2.	Procesamiento morfológico	19
1.5.3.	Crecimiento de región (<i>Region Grow</i>).....	20
1.5.4.	Transformada <i>Watershed</i>	20
1.5.5.	Algoritmos de agrupamientos o <i>Clustering</i>	20
1.5.6.	Modelos deformables	21
1.5.7.	Evolución de técnicas de segmentación nuclear.....	21
2.	METODOLOGÍA.....	24
2.1.	Contexto	24
2.2.	Tipos de imágenes.....	24
2.2.1.	Imágenes binarias.....	24
2.2.2.	Imágenes en escala de grises	25
2.2.3.	Espacio de color RGB.....	26
2.2.4.	Canal de luminancia.	27
2.2.5.	Componente hematoxilina.....	28
2.3.	Morfología matemática.....	29
2.4.	Técnica de umbralización	33
2.4.1.	Método OTSU binivel	33
2.4.2.	Método OTSU multinivel.....	34
2.5.	Algoritmos de agrupamiento o <i>Clustering</i>	35
2.5.1.	Algoritmo <i>K-means</i>	35
2.6.	Transformada <i>Watershed</i>	36
2.6.1.	Segmentación <i>Watershed</i> por distancia al borde	38
2.6.2.	Segmentación <i>Watershed</i> usando gradientes	39

2.6.3.	Segmentación <i>Watershed</i> con marcadores	40
3.	IMPLEMENTACIÓN DE LOS ALGORITMOS.....	43
3.1.	Contexto	43
3.2.	Técnica de segmentación por umbralización. Método Otsu.	43
3.2.1.	Método Otsu binivel. Luminancia.	44
3.2.2.	Método Otsu multinivel. Luminancia.....	45
3.2.3.	Método Otsu binivel. Componente hematoxilina.....	47
3.2.4.	Método Otsu multinivel. Componente hematoxilina.	49
3.3.	Técnica de segmentación mediante la transformada <i>Watershed</i> con marcadores. ..	50
3.3.1.	Transformada <i>Waterhsed</i> con marcadores. Luminancia.	51
3.3.2.	Transformada <i>Watershed</i> con marcadores. Componente hematoxilina.....	54
3.4.	Técnica de segmentación por agrupamiento o Clustering. K - means.....	57
4.	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS. EFICIENCIA ALGORITMO.	63
4.1.	Contexto.....	63
4.2.	Resultados	63
4.2.1.	Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante Kmeans.	64
4.2.2.	Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante la técnica Watershed con marcadores	65
4.2.3.	Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante el método Otsu.....	68
4.2.4.	Comparativa de los métodos	71
5.	CONCLUSIONES	74
6.	PRESUPUESTO DEL PROYECTO	77
6.1.	Costes directos	77
6.2.	Costes indirectos	78
7.	REFERENCIAS.....	81
	ANEXO A.....	84
	ANEXO B.....	87
	ANEXO C.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Capas del intestino grueso	11
Ilustración 2. Imagen histológica de colon.....	12
Ilustración 3. Muestra histológica de colon teñida por la coloración Hematoxilina-Eosina.....	15
Ilustración 4. Muestra histológica de un adenoma.....	17
Ilustración 5. Muestra histológica de cáncer de colon	18
Ilustración 6. Imagen binaria de una muestra histológica y su histograma correspondiente	25
Ilustración 7. Imagen en escala de grises de una muestra histológica y su histograma.....	25
Ilustración 8. (a) Canal R imagen original, (b) Canal G imagen original, (c) Canal B imagen original, (d) Imagen original de una muestra histológica.....	26
Ilustración 9. (a) Histograma canal R imagen original, (b) Histograma canal G imagen original, (c) Histograma canal B imagen original.....	27
Ilustración 10. Esquema del modelo RGB y esquema del modelo YUV.....	28
Ilustración 11. Imagen del canal de la hematoxilina y su histograma correspondiente al canal de la hematoxilina.....	29
Ilustración 12. Elementos estructurantes típico	30
Ilustración 13. Efectos de la dilatación y erosión sobre una imagen binaria (en gris), con un círculo como elemento estructurante.	30
Ilustración 14. (a) Imagen original, (b) Imagen tras la erosión, (c) Imagen tras la dilatación.....	31
Ilustración 15. Efectos de la apertura en imágenes binarias	32
Ilustración 16. Efecto del cierre a una imagen original.....	32
Ilustración 17. Efecto de la apertura y cierre en imágenes en escala de grises.....	32
Ilustración 18. Método Otsu binivel, (a) Imagen original, (b) histograma, (c) Imagen segmentada.....	34
Ilustración 19. Método Otsu multinivel. (a) Imagen original, (b) Histograma, (c) Imagen segmentada.....	34
Ilustración 20. (a) Gráfica que muestra los datos ordenados de manera aleatoria, (b) Gráfica que muestra la reorganización de los datos tras aplicar el k - means, estos se organizan en dos agrupaciones, con sus respectivos centroides	35
Ilustración 21. Concepto Watershed (a) Imagen en escala de grises y (b) representación en 3-D de la imagen en escala de grises.	36
Ilustración 22. Final de la transformada Watershed.....	37

Ilustración 23. a) Imagen original binaria, b) Imagen complementaria de la imagen original, c) Distancia de la transformada, e) Líneas Watershed, f) Líneas Watershed sobre la imagen original binaria.	38
Ilustración 24. a) Imagen original en escala de grises, b) Imagen del gradiente, c) Transformada Watershed de (b), donde se muestra sobresegmentación, d) Transformada Watershed de la imagen gradiente suavizada.	39
Ilustración 25.a) Imagen original, b) Sobresegmentación al aplicar la transformada a la imagen gradiente, c) Mínimos regionales de la imagen gradiente, d) Marcadores internos, e) Marcadores externos, f) Imagen gradiente modificada, g) Resultado de la segmentación Watershed.....	41
Ilustración 26. Imagen original RGB	44
Ilustración 27. Componente Y o luminancia de la imagen original.....	44
Ilustración 28. Canal Y segmentado, mediante el método OTSU binivel.....	45
Ilustración 29. Imagen correspondiente al canal Y segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando tres umbrales.....	46
Ilustración 30. Imagen correspondiente al canal Y segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando cuatro umbrales	47
Ilustración 31. Componente hematoxilina de la imagen original	48
Ilustración 32. Imagen correspondiente al canal hematoxilina segmentada mediante el método Otsu binivel	48
Ilustración 33. Imagen correspondiente a la componente hematoxilina segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando tres umbrales.....	49
Ilustración 34. Imagen gradiente correspondiente al canal de luminancia de la imagen original	51
Ilustración 35. Marcadores internos de la imagen del canal de la luminancia.....	52
Ilustración 36. Marcadores externos del canal de la luminancia.....	52
Ilustración 37. Imposición de marcadores internos y externos sobre la imagen gradiente	53
Ilustración 38. Resultado de la transformada Watershed con marcadores sobre la imagen original del canal luminancia.....	53
Ilustración 39. Imagen gradiente correspondiente a la componente de la hematoxilina	54
Ilustración 40. Marcadores internos de la componente de la hematoxilina	55
Ilustración 41. Marcadores externos de la componente de la hematoxilina	55
Ilustración 42. Imposición de marcadores internos y externos sobre la imagen gradiente	56
Ilustración 43. Resultado de la transformada Watershed con marcadores sobre la imagen original de la componente de la hematoxilina.....	56

Ilustración 44. Imagen que muestra los cuatro cluster resultado de la función K - means con 4 agrupaciones	58
Ilustración 45. Imagen que muestra los objetos del primer cluster	58
Ilustración 46. Imagen que muestra los objetos del segundo cluster.	59
Ilustración 47. Imagen que muestran los objetos del tercer cluster	59
Ilustración 48. Imagen que muestra los objetos del cuatro cluster.....	60
Ilustración 49. Cluster correspondiente a los núcleos.	61

Capítulo 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto

En este capítulo, en primer lugar, se presentará la motivación del trabajo y se enumerarán los objetivos que se quieren lograr a lo largo de éste.

A continuación, se va a describir en líneas generales la anatomía e histología del colon, las anomalías que este puede presentar, y la preparación de las imágenes de muestras histológicas, las cuales van a ser el objeto principal del trabajo.

Por último, se va a realizar un análisis del estado del arte de las técnicas más utilizadas en segmentación nuclear. Tras este estudio se seleccionarán tres de estas técnicas, que se implementarán y se compararán a lo largo del trabajo.

1.2. Motivación

En la actualidad, el vínculo entre la ingeniería y la medicina se está consolidando día a día. La estrecha relación entre ambas ciencias ha dado lugar al desarrollo de una nueva disciplina, la ingeniería biomédica, rama en la que se centra este trabajo. Se conoce como ingeniería biomédica a la ciencia que aplica los principios y métodos propios de la ingeniería a la solución de los problemas en medicina y a la mejora de los métodos de prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación.

La ingeniería biomédica es un campo que está en constante desarrollo, debido al avance continuo de las nuevas tecnologías. Esta estrecha relación de simbiosis que está apareciendo, permite, facilita y mejora la obtención de diagnósticos médicos. Dentro de la ingeniería biomédica, uno de los campos que más desarrollo está teniendo es la imagen médica. Es en esta área en la que se centra el presente trabajo.

El objeto de estudio del proyecto son imágenes de diferentes muestras histopatológicas de colon y el objetivo general es realizar su segmentación nuclear. La segmentación de núcleos es una tarea clásica en el análisis de imágenes de muestras histológicas. Se basa en la partición de la imagen en objetos de interés, los núcleos, los cuales presentan características similares y serán diferenciados del resto de la imagen y etiquetados.

Los cambios en la morfología nuclear son uno de los síntomas de infinidad de enfermedades por lo que la segmentación nuclear es una de las herramientas más útiles a la hora de realizar un mejor diagnóstico, y con ello un mejor tratamiento de enfermedades, ya que permite una óptima extracción de características y por tanto una clasificación más eficiente de los núcleos.

Por lo general, las imágenes de muestras histológicas son realmente heterogéneas, esto hace que realizar una segmentación correcta sea difícil. En la actualidad existen un gran número de técnicas automáticas y semiautomáticas destinadas a efectuar la segmentación nuclear, pero no todas son completamente eficaces en este tipo de imágenes. La selección de una u otra dependerá del objetivo de la aplicación, del tipo de imágenes que se quieran analizar y, en nuestro caso, de la complejidad de las mismas para el trabajo que puede conllevar un trabajo fin de grado.

1.3. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es comparar diferentes técnicas de segmentación nuclear que serán implementadas. Dada una serie de imágenes, se pretende que de manera automática los núcleos queden claramente diferenciados. El objetivo de la segmentación es facilitar el estudio de la morfología del núcleo, ya que esta aporta información muy relevante para el diagnóstico de enfermedades.

Los objetivos específicos de este proyecto, son:

- Acercarnos, de manera breve, a la anatomía del colon, estudiando las diferentes muestras que serán el objeto de nuestro trabajo con el objetivo de visualizar las diferencias que presentan. También estudiaremos, de manera breve, el proceso de obtención de las muestras histopatológicas, de las cuales se adquieren las imágenes que analizaremos.
- Realizar un análisis del estado del arte de algunas de las diferentes técnicas de segmentación nuclear, para poder seleccionar aquellas que serán implementadas.
- Desarrollar e implementar, con la información obtenida en el análisis del estado del arte, diferentes técnicas de segmentación. Los algoritmos serán implementados utilizando el software MATLAB.
- Comparar, mediante validación cuantitativa, los resultados de los diferentes métodos implementados, para comprobar cuál es el más eficiente en nuestro caso.

1.4. Anatomía del colon

El colon o intestino grueso es el último tramo del tubo digestivo. Tiene una longitud aproximada de 1,5 metros y se extiende desde el final del intestino delgado hasta el ano. La primera porción del intestino grueso está situada en la parte inferior derecha del abdomen, es donde desemboca el intestino delgado y se llama ciego. Desde aquí el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (colon ascendente) y atraviesa el abdomen (colon transverso). El colon se dirige posteriormente hacia abajo, denominándose colon descendente, hasta llegar a una zona denominada sigma que desemboca en el recto y finalmente en el ano que se abre al exterior por el esfínter anal a través del cual se eliminan las heces.

La función específica del colon ascendente y transverso consiste en absorber agua y electrolitos (sodio, potasio, etc.) mientras que la función del colon descendente y recto consiste en almacenar las materias fecales hasta su expulsión por el ano. [1]

1.4.1. Histología del intestino grueso.

La pared del intestino grueso, al igual que el resto del tracto digestivo, se puede dividir en cuatro capas principales: mucosa, submucosa, muscular y serosa, como se puede visualizar en la ilustración 1. [2], [3]

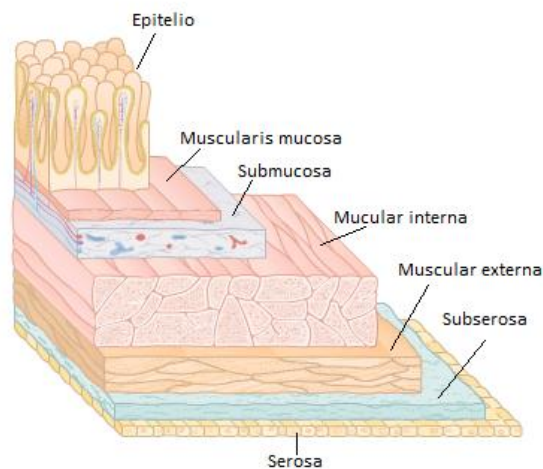


Ilustración 1. Capas del intestino grueso

- La **mucosa** está constituida por células cilíndricas o cúbicas dispuestas en una sola capa con presencia de células mucosecretorias intercaladas, denominadas criptas de Lieberkühn. Estas células epiteliales reciben soporte de la membrana basal. Las células cilíndricas muestran vellosidades en su superficie que aumentan el área de la célula para facilitar la función de absorción de iones y de líquido del proceso digestivo. La mucosa también secreta una gran cantidad de moco que favorece el tránsito de los desechos semisólidos no digeridos.

La lámina propia está constituida por tejido conectivo laxo. Es similar a la del resto del tubo digestivo, pero presenta algunas peculiaridades. En ella se encuentran células responsables de la inmunidad (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos), pequeñas estructuras vasculares, principalmente capilares y vasos linfáticos, y finas estructuras nerviosas.

La Muscularis mucosa es una delgada capa de fibras musculares que separa la mucosa (constituida por el epitelio y la lámina propia de la submucosa)

- La **submucosa** está formado por tejido conectivo muy denso y fibroblastos. En esta capa se encuentran los plexos nerviosos localizados inmediatamente después de la muscularis mucosa (Plexo de Meiner) y plexos vasculares constituidos por arteriolas, vénulas y vasos linfáticos.
- La **capa muscular** está formada por una capa interna de fibras musculares lisas que se disponen de forma circular y otra externa en la que se disponen de forma longitudinal. Esta capa externa se engruesa en tres lugares concretos formando bandas que se pueden observar a simple vista. Entre ambas capas se encuentra otro plexo nervioso (plexo de Auerbach). Las capas musculares están atravesadas tanto por vasos sanguíneos como linfáticos que se dirigen hacia la serosa.
- La serosa es una capa muy delgada de tejido conectivo, que viene precedida por la subserosa, capa de tejido conectivo que separa la capa muscular propia de la serosa. Corresponde a la capa de mesotelio, que reviste gran parte del colon a excepción de su segmento distal y el recto.

En la ilustración 2 observamos una muestra histológica de colon de tejido sano que se caracteriza por poseer células mucosas similares, tanto en su forma como en su tamaño, situadas a ambos lados de la imagen formando criptas. En el centro de la imagen observamos también el nódulo linfático, es decir, una agrupación de glóbulos blancos.

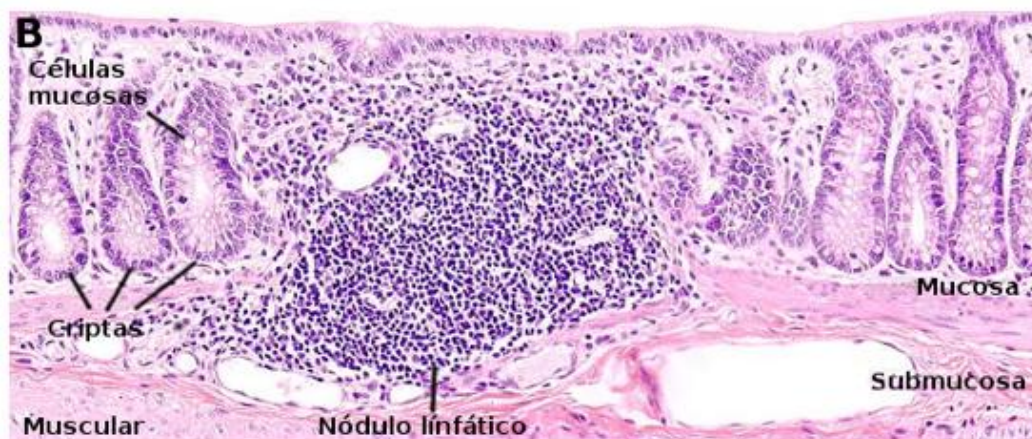


Ilustración 2. Imagen histológica de colon

1.4.2. Enterocitos. Células del aparato digestivo.

Los enterocitos son células columnares que forman la mayor parte del epitelio prismático simple de la mucosa del intestino. Son más abundantes en el epitelio del intestino delgado que en el del grueso. Su principal misión es la absorción de sustancias nutritivas desde la luz del intestino y su transporte al interior del cuerpo.

Los enterocitos poseen microvellosidades en su parte apical, numerosas mitocondrias en su base y un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi muy desarrollados. La integridad del epitelio, depende de los complejos de unión que se establecen entre enterocitos contiguos. Las uniones estrechas y uniones adherentes se encuentran próximas a la superficie apical de la célula. Además, las membranas laterales de los enterocitos interaccionan entre sí sobre todo mediante desmosomas y algunas uniones en hendidura. En sus membranas se encuentran los hemidesmosomas, los cuales mantienen los enterocitos unidos a la lámina basal.

Estas células tienen un ciclo de vida corto, ya que están sometidos a sustancias tóxicas y sufren daños continuos. Los enterocitos son renovados constantemente mediante una alta producción de nuevos enterocitos y la muerte por apoptosis de los más viejos o dañados. La mucosa intestinal presenta numerosos pliegues que en el intestino grueso forman criptas. El ciclo de vida de este tipo de células comienza en las profundidades de estas criptas y termina en la superficie epitelial del intestino grueso. En humanos, el epitelio intestinal es renovado completamente cada 4 o 5 días. [4]

1.4.3. Obtención y preparación de muestras histológicas.

En este apartado se realizará un resumen de la obtención y preparación de muestras histológicas, nombrando los diferentes procesos que transcurren desde la extracción de la biopsia perteneciente al colon hasta la obtención de las imágenes, objeto de estudio de este proyecto.

Las biopsias son pequeñas porciones de tejidos que han sido extraídas para ser examinadas en un laboratorio y, a partir de ellas, poder obtener un diagnóstico. [8]

La Patología Quirúrgica es la rama de la Anatomía Patológica que se encarga del estudio de las biopsias. Tiene un rol imprescindible en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, como el cáncer. Un buen diagnóstico puede mejorar notablemente el desarrollo de una enfermedad (su prevención, su cura, su evolución...).

Estas biopsias son las que se utilizarán para obtener las muestras que podemos observar en nuestras imágenes. Para ello tendrán que ser sometidas a un proceso de tratamiento de biopsias el cual consta de los siguientes procesos. [9]

- **FIJACIÓN:**

Procedimiento mediante el cual, gracias a la acción de un fijador, se detiene la autólisis de las células y el material extracelular, que se produciría en las biopsias y, en general, en cualquier muestra de material orgánico, una vez separado del organismo al que pertenecía, debido a la acción de las enzimas liberadas por los lisosomas destruidos. Además, lo que diferencia a este proceso de la conservación, es que se pretende mantener la ordenación espacial tridimensional de células y fibras. Esta característica es imprescindible para su posterior análisis.

- **INCLUSIÓN:**

Es el procedimiento que se realiza para permitir cortar los tejidos en secciones suficientemente delgadas que permiten el paso de la luz, de modo que los detalles finos puedan ser observados al microscopio.

Aunque los tejidos adquieren cierta consistencia al ser sometidos a la fijación, por lo general continúan siendo demasiados blandos para poder cortarlos en láminas delgadas (para microscopía óptica) o ultrafinas (para microscopía electrónica de transmisión); por lo tanto, es necesario que la porción de tejido a estudiar sea infiltrada y englobada por una sustancia líquida o semilíquida, de modo que una vez solidificada adquiera la suficiente dureza para formar bloques que puedan cortarse.

- **CORTE**

Es el proceso que tiene como finalidad la obtención de cortes muy delgados del tejido o muestra. Este se realiza por medio de un instrumento llamado micrótopo, del cual existen varios tipos. Se utilizará uno u otro dependiendo del tipo de muestra y del corte que se quiera obtener.

- **TINTE. COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA:**

Los cortes de muestra obtenidos tras el proceso anterior son teñidos para poder visualizarse mejor con el microscopio. Los diferentes componentes de la célula (núcleo, citoplasma) son tintados de colores distintos para que sean más diferenciables. Existen un gran número de técnicas de tinción que pueden ser utilizadas dependiendo de qué se quiera observar en las muestras.

Una de las más utilizadas es la coloración hematoxilina-eosina, que usa un colorante ácido y otro básico para teñir de diferente color las estructuras ácidas y básicas de la célula. Es esta la técnica utilizada en las imágenes en las que se basa nuestro trabajo. [10]

- Método de la Hematoxilina-Eosina: existen múltiples variantes, según se emplee un tipo u otro de eosina y de hematoxilina. Por lo común, este método siempre consta de una etapa inicial, en la que se colorean los núcleos celulares y material basófilo con la hematoxilina en tonos morados, y una fase posterior de contraste citoplasmático y de componentes extracelulares en la eosina, con un tono rosado.

Este tipo de coloración es la que podemos observar en la ilustración 5, donde se distinguen perfectamente los núcleos en tonos morados, más oscuros que el resto de los componentes extracelulares.

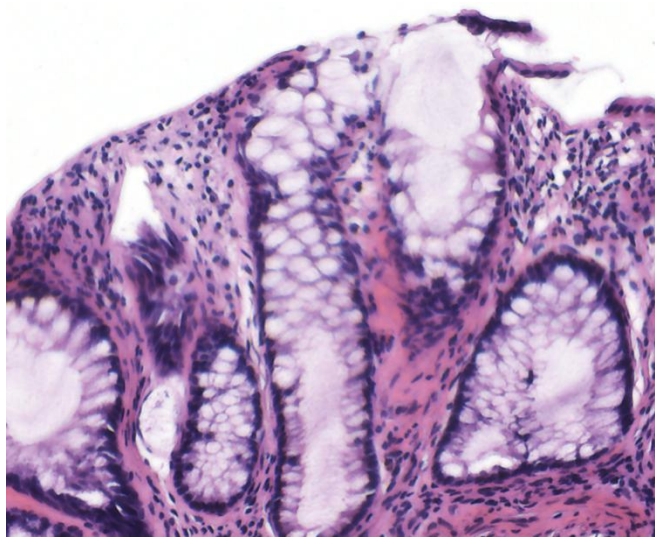


Ilustración 3. Muestra histológica de colon teñida por la coloración Hematoxilina-Eosina

- **OBTENCIÓN DE IMÁGENES HISTOLÓGICAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS**

Una vez que las muestras han sido teñidas, *fast slide scanners* son utilizados para generar imágenes digitales que contienen información relevante sobre la muestra a nivel microscopio.

Estos escáneres poseen una o varias lentes para aumentar la muestra y capturar imágenes digitales con una cámara. El resultado son imágenes multicapa, almacenadas en un formato que puede ser ampliado o alejado para obtener un buen estudio de la imagen.

La iluminación de estos escáneres es una luz uniforme que atraviesa la muestra. Las características del microscopio, el grosor de la muestra o el tinte utilizado pueden causar diferencias en la iluminación. Además, la mayoría de las cámaras tienen una baja respuesta para longitudes de onda bajas (azul) y presentan una alta sensibilidad a zonas de altas longitudes de onda (rojo). La mayoría de escáneres tienen la capacidad de corregir estas variaciones espectrales y espaciales de iluminación para que el estudio sea lo mejor posible. [11]

1.4.4. Tipos de muestras. Adenomas y cáncer de colon.

Por último, se va a realizar un acercamiento al tipo de imágenes que vamos a utilizar como objeto de estudio en este trabajo. Algunas de las imágenes se obtendrán a partir de muestras de tejidos sano, otras de muestras de tejido de células cancerígenas y, por último, se utilizarán muestras pertenecientes a células de adenomas de colon.

El cáncer y el adenoma son dos de las patologías más comunes que puede presentar el colon. El diagnóstico de este tipo de enfermedades es realizada por los patólogos a partir de la información obtenida del análisis de biopsias extraídas del tejido analizado. Estos normalmente se basan en la morfología y en la distribución de las células para realizar sus pronósticos.

Actualmente se está introduciendo el uso de métodos computacionales como herramientas de diagnóstico que ayudan al patólogo a la hora de realizar las tareas de detección, segmentación y clasificación nuclear. Estos métodos están permitiendo ayudar al especialista médico en su trabajo diario, minimizando la intervención humana y consolidando segundas opiniones relevantes [11]. La segmentación nuclear es una de las herramientas computacionales de ayuda al diagnóstico que se utiliza en la actualidad.

Como hemos dicho anteriormente, en este trabajo se van a utilizar diferentes tipos de muestras histológicas de colon para poder analizar la eficiencia de los algoritmos implementados. Éstos tendrán que ser capaces de realizar, de manera eficiente, la segmentación nuclear independientemente de las características de la imagen, si la muestra presenta anomalías o si es obtenida de un tejido sano.

Es interesante acercarse al tipo de anomalías mencionadas para saber cómo cambia la morfología de las células en los tres tipos de muestras descritos.

El adenoma [5] es la neoplasia más frecuente del intestino grueso. Se presenta en forma de pólipo sésil o pediculado. Pueden dar sintomatología por obstrucción o hemorragia oculta. Generalmente son únicos. Tienen algún grado de displasia, caracterizada por:

- Alteraciones celulares (células cilíndricas, núcleos elongados, pseudoestratificados hasta francamente polimorfos, desdiferenciación, mitosis no restringida al tercio inferior de la cripta)
- Alteración de la arquitectura: túbulos irregulares, ramificados, papilas.

Estas alteraciones celulares se visualizan en la ilustración 4, donde aparecen células de formas irregulares, al contrario de las que observábamos en la muestra histológica de tejido normal. Además observamos células redondas que caracterizan a este tipo de tejidos, y que no aparecen en tejidos sanos.

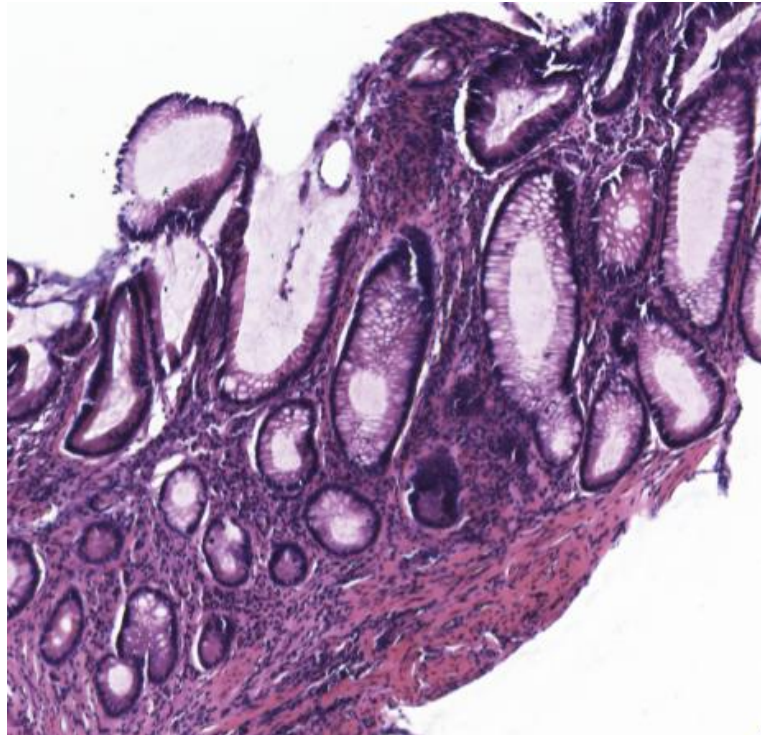


Ilustración 4. Muestra histológica de un adenoma

Por otro lado, también, vamos a estudiar muestras de células cancerosas. El cáncer de colon es una enfermedad con muy buenas posibilidades de tratamiento que por lo general se puede curar cuando se localiza en el intestino. La cirugía es la forma primaria de tratamiento, mediante la cual, aproximadamente, el 50% de los pacientes se curan. La recidiva después de la cirugía es un problema grave, y con frecuencia, es causa definitiva de muerte. [6]

El adenocarcinoma aparece como una masa que tiene un color que difiere del color del tejido circundante. Bajo el microscopio se observa una estructura glandular, si esta se asemeja al tejido sano es que el tumor está en un estadio bajo, sin embargo, si estas estructuras difieren mucho del tejido normal el tumor es de alto grado. Las células tienen un núcleo grande, con nucléolos prominentes y se observan una gran cantidad de células en mitosis. [7]

En la ilustración 5 podemos observar una muestra histológica de cáncer. Se observa claramente las diferencias con el tejido normal. Las criptas presentan formas muy irregulares, y los enterocitos que las forman están muy juntos, organizados en agrupaciones sobrepuestas, como se observa en la zona redondeada de la ilustración 5.

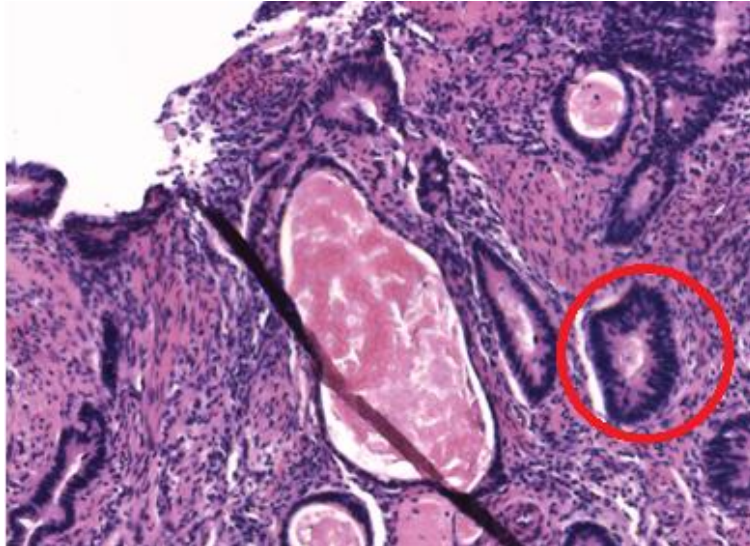


Ilustración 5. Muestra histológica de cáncer de colon

1.5. Estado del arte. Técnicas de segmentación de núcleos.

En la actualidad, la segmentación nuclear es uno de los procesos más recurrentes en imagen patológica, ya que, como se ha dicho anteriormente, la información que se obtiene a raíz del estudio del núcleo es imprescindible para el personal sanitario a la hora de realizar un diagnóstico.

Existen varios tipos de núcleos, que se observan de maneras diferentes teniendo en cuenta distintos factores, como el tipo de célula, el ciclo de vida de ésta, el tamaño y la forma del núcleo, o el desarrollo y la gravedad de la enfermedad. Además, existen casos donde el núcleo está separado de otras estructuras celulares, por lo que su segmentación es fácil, pero en otras imágenes histopatológicas los núcleos forman parte de estructuras celulares complejas y son más difíciles de diferenciar.

Debido a la importancia de la segmentación nuclear, un gran número de métodos han sido estudiados y siguen siendo investigados hoy en día, para conseguir la detección, segmentación y clasificación del núcleo en imágenes histopatológicas de manera óptima. Estos procesos presentan un problema computacional debido a la gran variabilidad de imágenes patológicas que existen. Esta versatilidad es producto de diferentes factores como la preparación de la muestra (concentración de los tintes, el corte, daños de la muestra), y la adquisición de la imagen (artefactos introducidos por la compresión de la imagen, presencia de ruidos digitales, características específicas del escáner). Además, los núcleos, pueden estar

organizados en agrupaciones sobrepuestas o tener formas heterogéneas. Todos estos problemas hacen que la detección, segmentación y clasificación de los núcleos pueda presentarse como un problema. Para conseguir una segmentación óptima de la imagen todas estas dificultades tienen que vencerse.

Actualmente existen numerosas técnicas de segmentación nuclear, la selección de una u otra depende del objetivo de su aplicación y del tipo de imágenes a analizar. Dependiendo de cada imagen se pueden utilizar por separado o combinándolas correctamente. A continuación, se explican de manera breve las más destacadas, analizando las características de cada una, para poder seleccionar aquellas que se implementarán posteriormente. [11] [25] [26]

1.5.1. Técnica de umbralización (*thresholding*)

La técnica de umbralización es una de las primeras que se utilizó para realizar la segmentación nuclear, a su vez, es una de las más simples a la hora de ser implementada. Este método utiliza como característica la luminancia o intensidad de cada pixel para realizar la segmentación. A pesar de la heterogeneidad que presentan las imágenes médicas, la diferencia entre la intensidad de los núcleos y el fondo de la imagen suele ser clara. Éste es el motivo que hace que esta técnica se siga utilizando hoy en día, a pesar de que no se trate de las más eficiente ya que en la práctica no se puede utilizar de manera aislada para conseguir una segmentación perfecta. [25]

Este método convierte imágenes en escala de grises en imágenes binarias, asignándole a todos los píxeles valores de 1 y 0, dependiendo si el valor de sus intensidades es mayor o menor que un umbral (*threshold*) fijado. De esta manera, nuestra imagen quedará separada en dos partes.

La complejidad la encontraremos a la hora de obtener el umbral óptimo, adecuado y válido para distintos pacientes y muestras. Los umbrales podrán ser locales o globales y, además, podrán ser obtenidos de diferentes formas. En el caso ideal en que el objeto de interés posea un rango estrecho de niveles de gris frente a un fondo uniforme y diferenciado, se establecerá un nivel de gris intermedio (umbral), que separará los objetos de interés del fondo. En la mayoría de los casos en nuestras imágenes de interés, el umbral no se puede establecer de esta manera, y se debe acudir el histograma para poder predecir el umbral. [13]

1.5.2. Procesamiento morfológico

Este método procesa las imágenes como formas geométricas. Consiste en la extracción de estructuras geométricas en las imágenes tratadas, utilizando para ello un elemento estructurante, cuya forma y tamaño es elegido a priori teniendo en cuenta la morfología de la imagen sobre la que se va a aplicar esta técnica y el objetivo que queremos obtener. [11]

Las operaciones morfológicas se utilizan para tratar la imagen, por lo que no se usará aisladamente para realizar la segmentación de nuestras imágenes, sino que se empleará como una parte del algoritmo.

1.5.3. Crecimiento de región (*Region Grow*)

El objetivo de esta técnica es la partición de la imagen en varias regiones que están conectadas según cierto criterio predefinido. Este criterio puede estar basado en información de intensidades y/o bordes de la imagen.

La segmentación basada en crecimiento de regiones requiere la selección de píxeles claves (*seed points*), que son elegidos manualmente por el usuario. Éstos extraen los píxeles conectados a ellos mismos, es decir, vecinos que tengan intensidades similares. Los píxeles seleccionados serán introducidos a una región, intentando conseguir el menor coste computacional posible.

Su desventaja principal es que se requiere interacción manual para obtener los píxeles claves, por lo que es una técnica semiautomática, aunque se puede pensar en técnicas de selección automática de las semillas. Este método también puede ser sensible al ruido, causando que las regiones extraídas tengan agujeros e incluso que se desconecten. [14]

1.5.4. Transformada *Watershed*

La transformada *Watershed* es una técnica morfológica de segmentación de imágenes de niveles de grises. Es un método basado en regiones, que divide todo el dominio de la imagen en conjuntos conexos. Se aplica a imágenes 2D y 3D.

El concepto de *Watershed* procede del campo de la topografía. La imagen es interpretada como un relieve topográfico, donde se interpretan los diferentes niveles de grises como alturas. Las líneas *Watershed* son las fronteras de separación entre las cuencas de deyección de ríos y lagos. Además, cada cuenca está asociada a un mínimo local del relieve. [15]

Esta técnica normalmente comienza desde píxeles específicos llamados marcadores y las inundaciones graduales de las zonas de sus alrededores, denominadas cuencas hidrográficas.

1.5.5. Algoritmos de agrupamientos o *Clustering*

Son técnicas no supervisadas de reconocimiento de patrones que buscan dividir un espacio característico derivado de la imagen usando datos con etiquetas conocidas. Un espacio característico es un rango espacial de cualquier función de la imagen, siendo las intensidades de la imagen el más común de los espacios característicos. Las técnicas irán segmentando la imagen y caracterizando las propiedades de cada clase. [12]

Cuando hablamos de agrupamiento (*clustering*) de datos, nos referimos a asociar un dato a un “*cluster* o grupo”. Éstos se utilizan para representar un conjunto de valores que tienen algo en común y se agrupan en función de ese determinado rasgo común.

La desventaja de este tipo de algoritmos es que necesitan una segmentación inicial o unos parámetros iniciales.

1.5.6. Modelos deformables

Esta técnica forma parte de la segmentación basada en transiciones. Estos métodos parten de la hipótesis de que los objetos de interés están separados por una frontera claramente identificable. Los modelos deformables vencen las limitaciones que presentan los métodos de procesamiento de imágenes tradicionales ya que son capaces de representar las formas complejas y variables que suelen presentar las estructuras celulares.

Los modelos deformables se usan para delinear los bordes de regiones usando curvas o superficies paramétricas cerradas que se deforman bajo la influencia de fuerzas externas e internas. Para ello se debe colocar una curva o superficie cerrada cerca del borde deseado y luego permitirle experimentar un proceso iterativo de relajación. Las fuerzas internas se calculan en el interior de la curva o superficie para mantenerla suave a lo largo de la deformación. Las fuerzas externas se derivan de la imagen para llevar la curva o superficie hacia la característica de interés deseada.

Dentro de los modelos deformables, los más comúnmente empleados son los Active Contour Models, también llamados snakes se basa en una curva que se va deformando para minimizar una función de energía. Pretende localizar bordes, líneas y contornos y será la imagen la que vaya guiando a la curva hacia los elementos prominentes. [16], [22]

1.5.7. Evolución de técnicas de segmentación nuclear

Conocer la evolución del uso de las técnicas de segmentación mencionadas anteriormente es realmente interesante para poder entender cómo ha ido evolucionando la segmentación nuclear. Las técnicas de umbralización son las más simples, intuitivas y antiguas, éstas fueron las primeras que consiguieron aproximarse a la segmentación nuclear, pero debido a las limitaciones que presentan, su uso ha ido disminuyendo lentamente y han ido apareciendo nuevas técnicas que enfocan el problema de la segmentación desde otro punto de vista. A pesar de ello, las técnicas de umbralización han seguido siendo utilizadas, pero como parte del proceso y combinándolas con otras, no de manera aislada.

Tras las técnicas de umbralización basadas en las diferencias de intensidad de la imagen, aparecieron técnicas que se centraban en las diferencias entre otras características de la imagen, como el tamaño o la forma de los objetos de interés, ya que los investigadores se dieron cuenta de que se podían utilizar estas características para realizar la segmentación nuclear computacionalmente. EL procesamiento morfológico empezó a emerger en la misma época que estas técnicas, existen estudios donde aparece su aplicación a finales de los años setenta.

Las siguientes técnicas que emergieron a mitad de los años ochenta son las de crecimiento de región y en los años noventa apareció el primer modelo deformable aplicado a segmentación nuclear. Desde ese momento se han ido utilizando numerosas y variadas técnicas para conseguir la segmentación nuclear, como la programación dinámica, las redes neuronales o la transformación *Watershed*.

La mayoría de las técnicas fueron desarrolladas originalmente con otro propósito o para su aplicación en otro campo, como robótica o ciencia de los materiales, y posteriormente se adaptaron para conseguir la segmentación nuclear. Esto se debe a que la segmentación nuclear es un concepto nuevo, por lo que todavía deben desarrollarse nuevas ideas y técnicas destinadas a conseguirla.

Capítulo 2

Metodología

2. METODOLOGÍA

2.1. Contexto

En este capítulo se van a detallar de manera profunda las técnicas que han sido seleccionadas para ser implementadas. Además, se estudiarán los tipos de imágenes que iremos utilizando a lo largo del trabajo, para poder comprender las características que presentan.

El algoritmo se ha implementado utilizando la herramienta de software *Matlab*, debido a que ofrece una gran variedad de funciones ya implementadas para el tratamiento de imágenes.

2.2. Tipos de imágenes.

Una imagen tiene que ser interpretada como una función matemática para trabajar computacionalmente con ella. Una característica de las imágenes tratadas con ordenador es que tienen una cantidad finita de puntos, cada punto está representado por dos valores naturales x e y , que hacen referencia a las coordenadas x e y del plano.

Las imágenes de las muestras histopatológicas que se tratan en este estudio son imágenes RGB. Aunque no se utilizarán solo este tipo de imágenes, también se usarán imágenes binarias e imágenes en escala de grises, que hacen referencia a la componente de la hematoxilina y al canal de luminancia de la imagen RGB.

A continuación se hará un análisis más profundo de este tipo de imágenes, definiéndolas e indicando en que situaciones se utilizarán.

2.2.1. Imágenes binarias

Una imagen binaria es una imagen digital que tiene únicamente dos valores posibles para cada pixel, el 0 y el 1. Normalmente los colores utilizados para su representación son el negro y el blanco, pero podría usarse cualquier pareja de colores. [17]

En la ilustración 6 se muestra una imagen binaria obtenida a partir de las imágenes de estudio de este proyecto, a su derecha se muestra su histograma correspondiente. En nuestro proyecto este tipo de imágenes se utilizarán como máscaras que indicarán dos regiones de interés que queremos diferenciar, una región será la que corresponde a los núcleos y la otra al resto de la imagen.

Muchas funciones que implementaremos en MATLAB, nos proporcionarán como salida, este tipo de imágenes, por lo que es importante conocer este concepto.

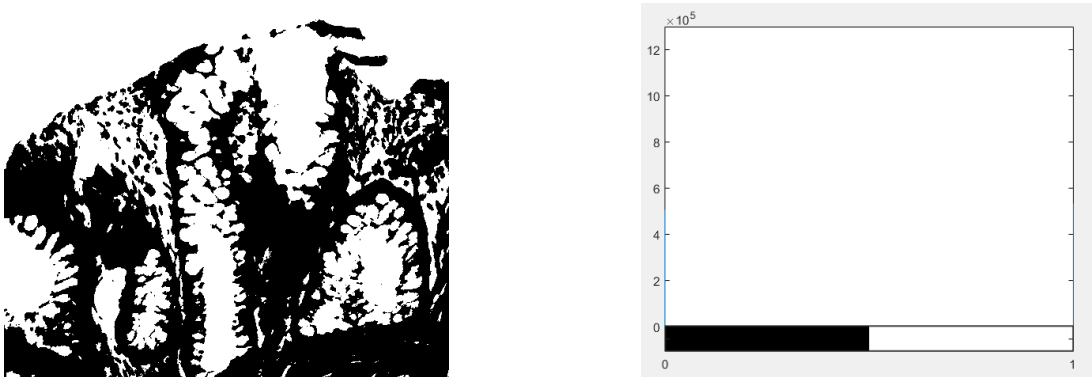


Ilustración 6. Imagen binaria de una muestra histológica y su histograma correspondiente

2.2.2. Imágenes en escala de grises

Como se ha comentado anteriormente, una característica de las imágenes tratadas en un ordenador es que tienen una cantidad finita de puntos. En las imágenes en escala de grises estos puntos están asociados únicamente a un solo plano o canal. Este canal podrá tener un valor establecido entre 0 y 255 ya que este rango describe los valores de grises que existen.

De manera más clara y esquemática, f es una imagen en escala de grises cuando está definida como $f(x, y): E \rightarrow T$, donde x e y es la posición del pixel y, $T = \{T_{min}, t_{min}+1, \dots, t_{max}\}$ es un conjunto ordenado de niveles de gris, siendo, en imágenes digitales de 8 bits, $t_{min} = 0$ y $t_{max} = 255$. [12]. Por lo que las imágenes en escala de grises son matrices con dimensiones M por N, formadas por píxeles cuyos valores están comprendido entre 0 y 255, dependiendo del nivel de gris que el pixel posea. [17]

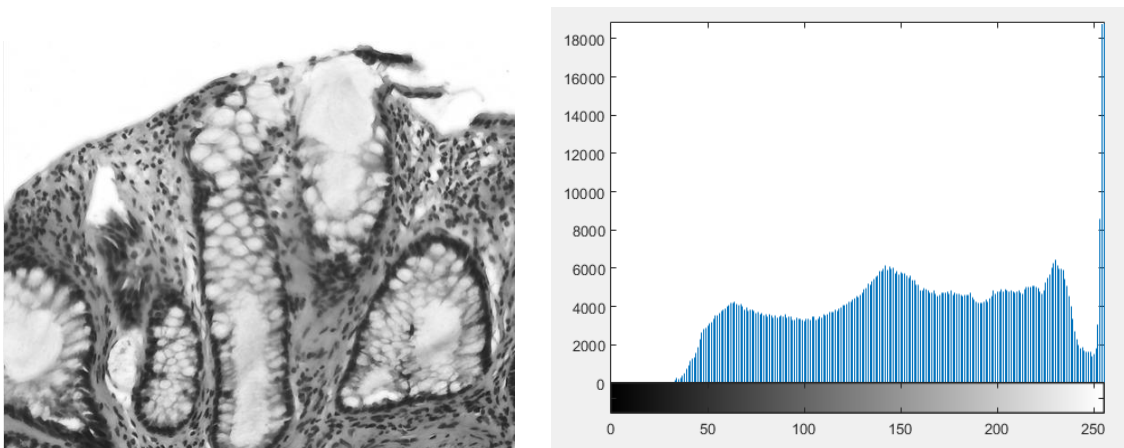


Ilustración 7. Imagen en escala de grises de una muestra histológica y su histograma

Observamos en la ilustración 7 una imagen en escala de grises y su histograma correspondiente. El histograma de una imagen es una gráfica donde se muestra el número de píxeles de cada nivel de gris que aparecen en la imagen. En el eje de abscisas se encuentran los niveles de gris que pueden adquirir los píxeles, que van desde 0 a 255. Los niveles más próximos a 255 corresponden a las intensidades claras y los niveles más próximos al 0, a las oscuras. En el eje de ordenadas se observa el número de píxeles que se asigna a cada nivel de gris.

2.2.3. Espacio de color RGB

El modelo de color RGB (Red Green Blue) define la composición de una imagen según la intensidad de cada uno de los 3 colores primarios que forman este espacio de color. Está basado en la síntesis aditiva, es decir, la representación de un color a partir de la suma de los 3 colores primarios [24].

Una imagen RGB está representada por una matriz $M \times N \times 3$. Al igual que en las imágenes en escala de grises, $M \times N$ representan las coordenadas de los píxeles de la imagen. La diferencia de las imágenes RGB, es que cada pixel está asociado a tres planos o canales, que se corresponden con las componentes *red* (R), *green* (G), *blue* (B). En cada canal, cada pixel puede adquirir un valor establecido entre 0 y 255. Una imagen RGB, por lo tanto, se puede considerar la unión de tres imágenes en escala de grises. [17].

En la ilustración 8 se muestra una imagen RGB y las imágenes de grises correspondientes a cada uno de los tres canales, el canal R, el canal G y el canal B.

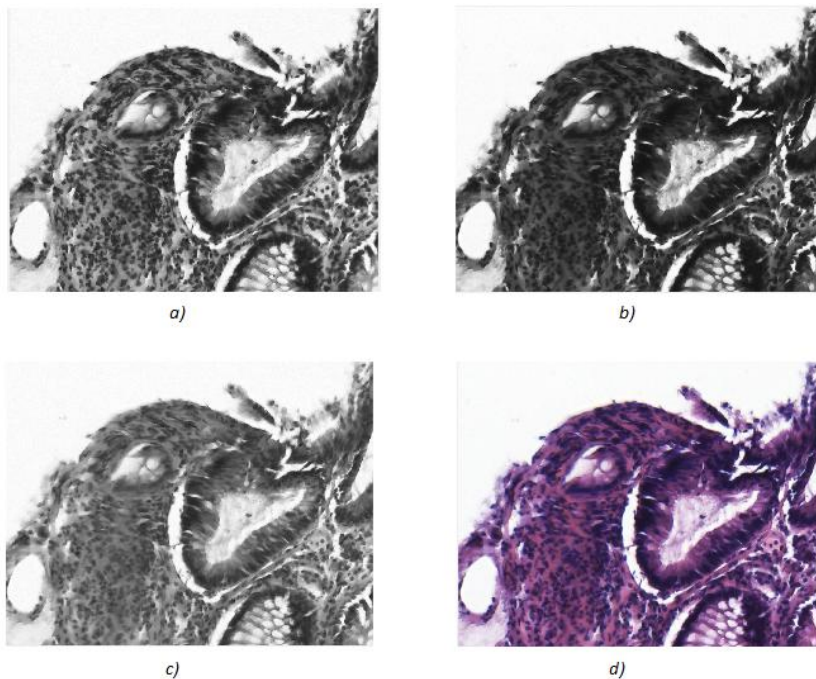


Ilustración 8. (a) Canal R imagen original, (b) Canal G imagen original, (c) Canal B imagen original, (d) Imagen original de una muestra histológica

En la ilustración 9 observamos los histogramas de las tres imágenes en escalas de grises correspondientes a cada uno de los canales que existen R, G y B. De la imagen original no podemos obtener el histograma, ya que tiene tres dimensiones.

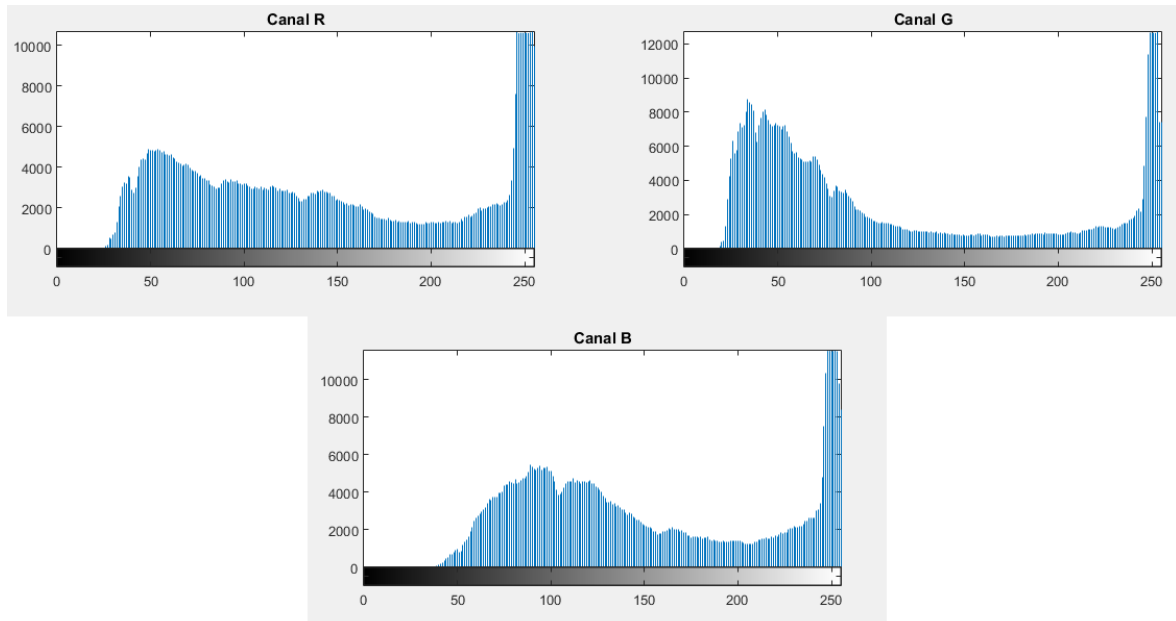


Ilustración 9. (a) Histograma canal R imagen original, (b) Histograma canal G imagen original, (c) Histograma canal B imagen original

2.2.4. Canal de luminancia.

La componente Y o luminancia es uno de los tres canales que forman el modelo de color YUV. Este espacio de color, que se puede obtener a partir del espacio de color RGB, se denomina YUV o YCbCr, y está formado por tres componentes: la componente Y o luminancia, la cual vamos a utilizar para realizar la segmentación, la componente U o Cb, que es la diferencia del azul, es decir, se relativiza la imagen entre azul y rojo, y por último la componente V o Cr que es la diferencia del rojo, se relativiza la imagen entre verde y rojo. Estas dos últimas componentes son conocidas como crominancia e información de color, respectivamente.

La componente Y o luminancia, que será la que estudiaremos más profundamente, nos proporciona la información del brillo de la imagen RGB, es decir, su imagen es escala de grises, explicada anteriormente en el apartado 2.2.3.

Se debe considerar que el intervalo de valores para las componentes RGB es [0,255]. Sin embargo, el canal de luminancia tiene como valor máximo el 235. [18]

En la ilustración 10 podemos observar, a la izquierda, un esquema del modelo RGB, donde se muestran los tres canales que lo forman, y a la derecha el esquema del modelo YUV, formado también por tres canales. El que se utilizará en este proyecto es el que se muestra en la parte de arriba del cubo, el canal luminancia.

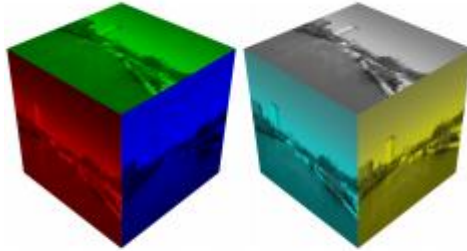


Ilustración 10. Esquema del modelo RGB y esquema del modelo YUV

El software Matlab tiene una función que obtiene la componente Y a partir de la imagen RGB, esta función es *rgb2gray*. [17]

2.2.5. Componente hematoxilina

Las imágenes que se utilizan a lo largo del proyecto, como se comentó en la introducción, son imágenes de muestras histológicas teñidas mediante la coloración hematoxilina – eosina. Para estudiar la segmentación nuclear vamos a utilizar la componente de la hematoxilina. Esta se va a obtener mediante técnicas de deconvolución de color.

El algoritmo implementado para obtener esta componente, es un algoritmo robusto computado por Ruiforck AC y Johnston DA. Este algoritmo permite realizar la deconvolución de la información de color obtenida por cámaras estándar RGB (rojo-azul-verde) y obtiene la contribución que cada una de las manchas aporta en función de la absorción RGB- colorante, hematoxilina en nuestro caso. [19]

En la ilustración 11 observamos, a la izquierda, la imagen correspondiente a la componente de la hematoxilina obtenida a partir de una imagen RGB utilizando el algoritmo mencionado anteriormente. En esta imagen se observan en gris oscuro las zonas teñidas en tonos morados de la imagen RGB original, es decir, se destacan los núcleos. A la derecha, se encuentra el histograma correspondiente a la imagen del canal de la hematoxilina.

Si comparamos los histogramas correspondientes a esta imagen y la imagen en escala de grises de la luminancia, que se encuentra en el apartado 2.2.2., observamos que la imagen correspondiente al canal de la luminancia está formada por un mayor número de píxeles que tienen valores de nivel de gris intermedio. Sin embargo observamos, en el histograma de la imagen del canal de la hematoxilina, que existen un mayor número de píxeles con niveles de gris extremos. Esto explica las diferencias que existen entre las dos imágenes de gris que se

van a comparar, la imagen correspondiente al canal de la luminancia presenta niveles de grises más uniformes, sin embargo en la imagen de la ilustración 11, se observan zonas muy claras y muy oscuras claramente diferenciadas. Estas diferencias harán que la segmentación nuclear de ambas imágenes sea distinta y que se obtengan resultados diferentes que se van a comparar.

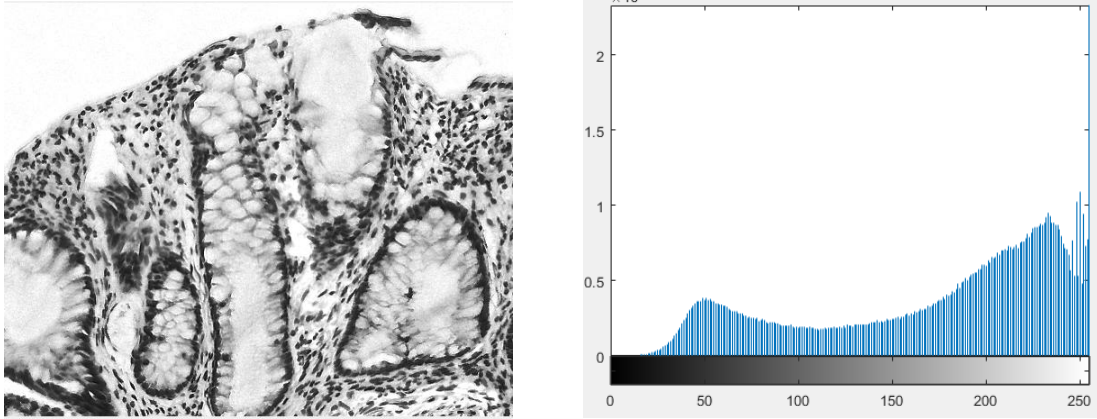


Ilustración 11 Imagen del canal de la hematoxilina y su histograma correspondiente al canal de la hematoxilina

2.3. Morfología matemática

Los procesos de segmentación no suelen proporcionar un resultado totalmente preciso de la delimitación de los objetos de interés, en este caso, los núcleos. Con frecuencia aparecen píxeles mal clasificados, bordes de los objetos no precisos o regiones que están solapadas. Por ello, se necesita una etapa de post/pre-procesamiento de la imagen, en la que, en nuestro caso, se va a emplear la morfología matemática.

Conocemos como morfología matemática una metodología de procesado no lineal basada en operaciones de máximos y mínimos cuyo propósito es extraer estructuras relevantes de una imagen. [23]

Como se ha dicho anteriormente, sea f una imagen en escala de grises, la cual está definida como $f(x): E \rightarrow T$, donde x es la posición del pixel y , en el caso de imágenes discretas, $T = \{T_{min}, t_{min}+1, \dots, t_{max}\}$ es un conjunto ordenado de niveles de gris, siendo, en imágenes digitales de 8 bits, $t_{min} = 0$ y $t_{max} = 255$.

Además, $B(x)$ es un subconjunto cuadrado de Z^2 llamado elemento estructurante (EE) centrado en el punto x cuya forma (cuadrado, línea, círculo, ...) es elegida, a priori, de acuerdo a algún conocimiento sobre la geometría de las estructuras irrelevantes de la imagen, las que se quieren eliminar, o las relevantes, las que se desean preservar. La ilustración 12 muestra algunos de los elementos estructurantes más utilizados.



Ilustración 12. Elementos estructurantes típico

Los dos operadores morfológicos básicos son:

 **Dilatación**

$$[\delta_B(f)](x) = \text{máx}_{b \in B(x)} f(x+b)$$

 **Erosión**

$$[\varepsilon_B(f)](x) = \text{mín}_{b \in B(x)} f(x+b)$$

Una de las características más importantes de este tipo de operaciones es la no existencia del operador inverso. En concreto, la dilatación y la erosión son operadores duales, es decir, la aplicación de uno de ellos sobre una imagen es equivalente a aplicar el otro sobre la imagen complementaria.

En la ilustración 13 se observa el efecto de ambos operadores sobre una imagen binaria. La dilatación consiste en situar el elemento estructural sobre cada punto dentro de la figura, y todos los nuevos puntos alcanzados (que antes estaban en el fondo) pasan ahora a la figura. La erosión consiste en situar el elemento estructural sobre cada punto fuera de la figura, y todos los puntos alcanzados (que antes estaban en la figura) pasan ahora al fondo.

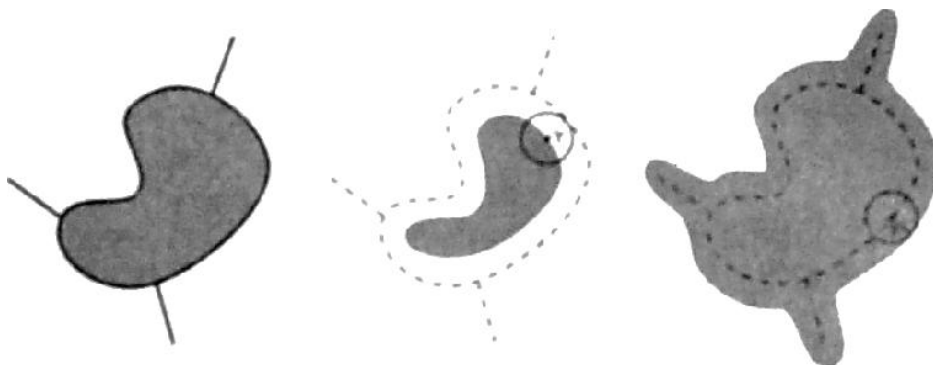


Ilustración 13. Efectos de la dilatación y erosión sobre una imagen binaria (en gris), con un círculo como elemento estructurante.

Si este proceso lo realizamos en una imagen en escala de grises, obtenemos el resultado mostrado en la ilustración 14:



Ilustración 14. (a) Imagen original, (b) Imagen tras la erosión, (c) Imagen tras la dilatación

Por lo tanto, podemos observar que los efectos de estas dos operaciones morfológicas sobre una imagen en escala de grises son:

Erosión:

- Eliminar las zonas claras más estrechas que el elemento estructurante.
- Estrechar las zonas claras más anchas que el elemento estructurante.
- Ensanchar las zonas oscuras.

Dilatación:

- Eliminar las zonas oscuras más estrechas que el elemento estructurante.
- Estrechar las zonas oscuras más anchas que el elemento estructurante.
- Ensanchar las zonas claras

Se observa que la imagen resultado de la dilatación es más clara que la original, y por el contrario que la resultante de la erosión es más oscura que la original.

Estas dos operaciones pueden ser combinadas obteniendo así un nuevo conjunto de operadores conocidos como filtros básicos elementales. Estos son una sucesión de los operadores básicos que cumplen también la propiedad de dualidad y vienen dados por las ecuaciones siguiente:

Apertura: $\Upsilon_B(f) = \delta_B(\varepsilon_B(f))$

Cierre: $\Phi_B(f) = \varepsilon_B(\delta_B(f))$

Si aplicamos una apertura sobre una imagen en escala de grises, observamos que las zonas claras más pequeñas que el EE son eliminadas, mientras que el resto permanece inalterable. Sin embargo, la operación de cierre elimina las zonas oscuras más pequeñas que el EE, manteniendo el resto sin modificar.

La ilustración 15 muestra los efectos de la apertura en imágenes binarias. A la izquierda podemos observar la imagen original, en medio de la ilustración encontramos la erosión, y finalmente aparece la apertura, tras realizar el proceso de dilatación a la erosión.



Ilustración 15. Efectos de la apertura en imágenes binarias

La ilustración 16 muestra los efectos del cierre en imágenes binarias. A la izquierda podemos observar la imagen original, en medio de la ilustración encontramos la dilatación, y finalmente aparece el cierre, tras realizar el proceso de erosión a la dilatación.

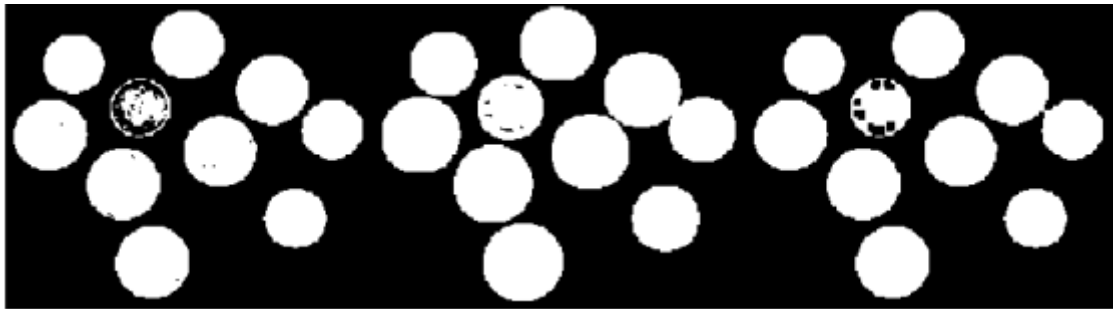


Ilustración 16. Efecto del cierre a una imagen original

Este proceso, también se puede realizar en imágenes en escala de grises. Este efecto se observa en la ilustración 17, en la que encontramos de izquierda a derecha, la imagen original, la imagen tras la apertura y finalmente la imagen tras el cierre



Ilustración 17. Efecto de la apertura y cierre en imágenes en escala de grises.

2.4. Técnica de umbralización

Esta técnica consiste en segmentar diferentes objetos de una imagen en función de si la intensidad de un píxel es inferior o superior a un valor definido de umbral. El resultado de este método proporcionará una imagen binaria con los píxeles cuyo valor de gris cumple las condiciones establecidas por el umbral. La umbralización no suele ser un método utilizado de manera aislada, sino que suele emplearse como paso previo a la segmentación realizada por otros algoritmos. La principal limitación que presenta esta técnica es que se basa únicamente en la intensidad del píxel sin tener en cuenta ninguna característica espacial, por lo que es muy sensible al ruido y a las variaciones de intensidad. A pesar de estos inconvenientes, este método va a ser implementado para poder comparar su resultado con otros métodos.

La determinación del umbral adecuado para una imagen dada es un factor crítico de la segmentación. Conociendo las distribuciones de intensidad propias de cada objeto en la imagen, el umbral puede estimarse mediante consideraciones estadísticas. Sin embargo, puede haber limitaciones: si las distribuciones están solapadas, ningún umbral aplicado directamente sobre la intensidad de la imagen puede obtener una segmentación libre de errores. Esto puede mejorarse aplicando un preprocesado a la imagen.

En este proyecto el umbral va a ser obtenido utilizando el método Otsu ya que es el más reconocido para obtener el umbral óptimo. Esta técnica, denominada así en honor a Otsu, quien la inventó en 1979, es un procedimiento no paramétrico que obtiene este umbral utilizando técnicas estadísticas.

2.4.1. Método OTSU binivel

La varianza es una medida de dispersión de valores, en este caso éstos son los de la dispersión de los niveles de gris de la imagen. Para obtener el umbral óptimo se maximiza la varianza entre clases mediante una búsqueda exhaustiva. Por lo tanto, el objetivo del método Otsu es calcular el umbral de manera que la dispersión dentro de cada clase sea lo más pequeña posible, pero al mismo tiempo la dispersión sea lo más alta posible entre las diferentes clases. [20]

El método Otsu consta de diferentes pasos para obtener el umbral óptimo. La información que aporta el histograma de la imagen es fundamental para la búsqueda de dicho umbral. En *Matlab*, el método Otsu tiene su propia función, *graythresh*, que proporciona como salida el umbral óptimo de manera automática. [21]

En la ilustración 18 se muestra este tipo de segmentación. A la izquierda se encuentra la imagen original, en el medio se observa el histograma, el cual nos muestra la distribución de los niveles de gris de la imagen. A la derecha se encuentra la imagen segmentada tras aplicar el umbral óptimo.

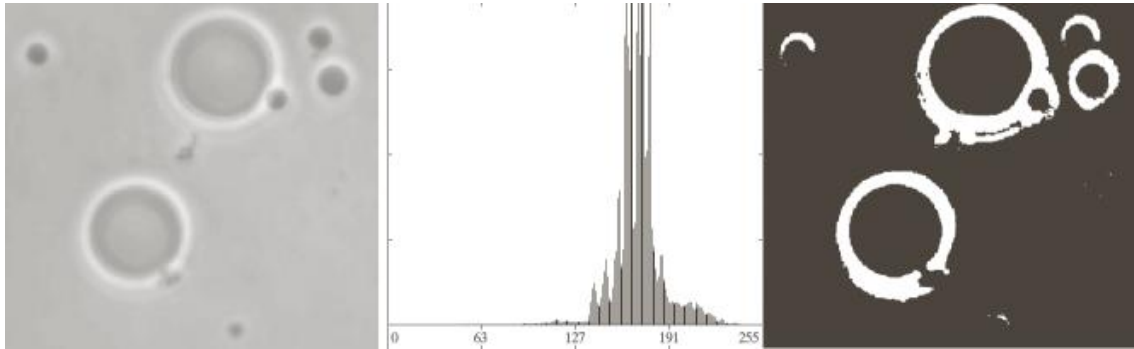


Ilustración 18. Método Otsu binivel, (a) Imagen original, (b) histograma, (c) Imagen segmentada

2.4.2. Método OTSU multinivel

El método Otsu puede ser extendido a un número mayor de clases, predefinidas por el usuario según la aplicación que se quiera obtener. En *Matlab*, al igual que para el método anterior, existe una función que realiza esta segmentación, *multithresh*. Esta necesita de entrada la imagen que se quiere segmentar y el número de umbrales, que determinarán en cuantas partes se divide la imagen. Además, obtiene como salida los umbrales óptimos buscados. [21]

En la ilustración 19 observamos este tipo de segmentación. A la izquierda se encuentra la imagen original, en el centro está el histograma de la imagen que nos ofrece la distribución de los niveles de gris de los píxeles. A partir de este se obtienen los umbrales óptimos que son aplicados sobre la imagen original, obteniendo la imagen segmentada en el número de partes establecido por los umbrales, situada a la derecha en la ilustración 19.

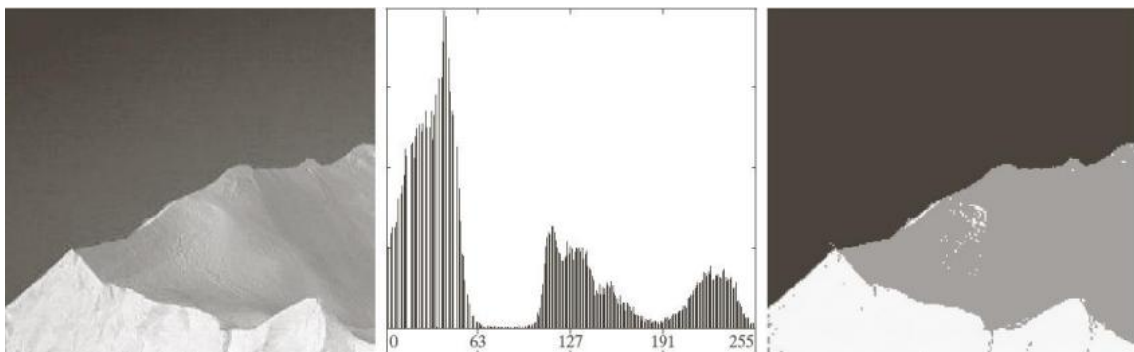


Ilustración 19. Método Otsu multinivel.(a) Imagen original, (b) Histograma, (c) Imagen segmentada

2.5. Algoritmos de agrupamiento o *Clustering*.

Los algoritmos de agrupamiento o *clustering* tienen como objetivo dividir los píxeles de la imagen en grupos o *clusters* de objetos que compartan características similares entre sí y que difieran de los elementos del resto de agrupaciones. Existen diferentes variantes de este tipo de algoritmos, el que se va a implementar en este trabajo, es el algoritmo K-medias.

2.5.1. Algoritmo *K-means*

El algoritmo *K-means* es un algoritmo clasificador no supervisado, es decir, no requiere de un entrenamiento previo, sin embargo, sí que es necesario que se identifique previamente el número de agrupaciones que se van a establecer.

Es uno de los algoritmos más simples y conocidos. Este método iterativo se encarga de realizar la segmentación de una imagen en K grupos, basándose en un criterio de similitud entre ellos, aunque lo más habitual es aplicar algún tipo de medida de distancia, como por ejemplo la distancia euclídea.

El primer paso del algoritmo es la elección de K centros que corresponderán a K agrupaciones, de manera aleatoria o basándose en algún heurístico. A continuación, el algoritmo repite iterativamente dos pasos, la asignación de píxeles a las K agrupaciones correspondientes y la reubicación de los centroides de éstas. El algoritmo terminará cuando los píxeles no cambien de agrupación. [11]

En la ilustración 20 se muestra un esquema de esta técnica. En la gráfica de la izquierda observamos una distribución aleatoria de los datos, en la gráfica de la derecha observamos como los diferentes datos se han situado en su correspondiente agrupación. Además observamos, señalado con una cruz, el centroide de cada agrupación.

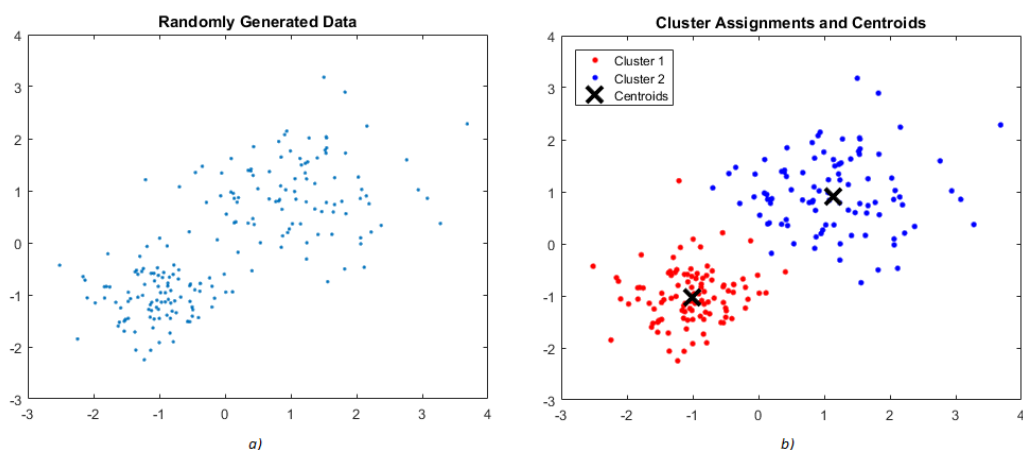


Ilustración 20. (a) Gráfica que muestra los datos ordenados de manera aleatoria, (b) Gráfica que muestra la reorganización de los datos tras aplicar el k - means, estos se organizan en dos agrupaciones, con sus respectivos centroides

2.6. Transformada *Watershed*

La transformación *Watershed* es una técnica de segmentación de imágenes que interpreta la imagen como un relieve topográfico, donde la intensidad de cada píxel se interpreta como la altura del mismo [17]

En geografía conocemos como cuenca (*Watershed*), a la cordillera que divide áreas drenadas por diferentes sistemas fluviales. Además, una cuenca hidrográfica es el área geográfica donde desemboca un río o un embalse. Esta técnica gráfica utiliza estos conceptos para realizar la segmentación de imágenes, por lo que es imprescindible conocerlos bien.

A continuación, vamos a profundizar más en este concepto, utilizando imágenes, con el fin de comprenderlo mejor.

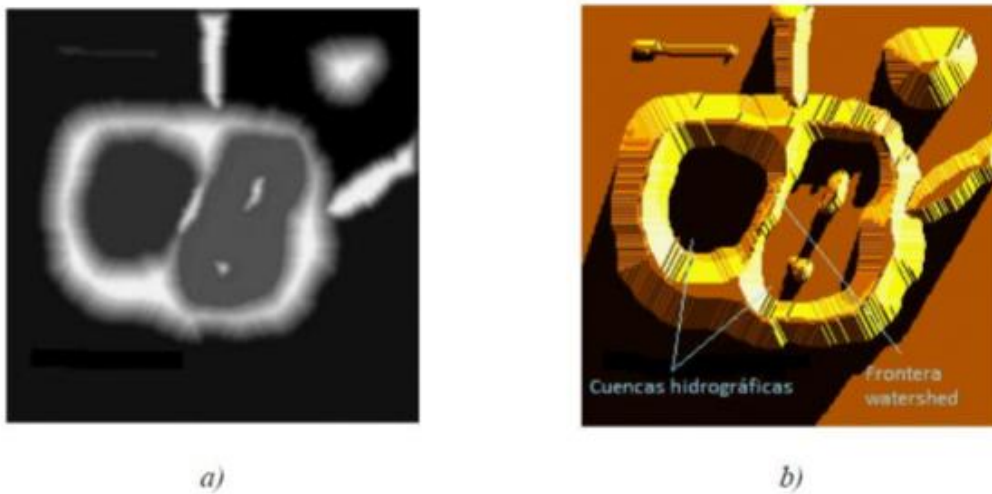


Ilustración 21. Concepto *Watershed* (a) Imagen en escala de grises y (b) representación en 3-D de la imagen en escala de grises.

En la imagen de la izquierda de la ilustración 21, observamos una imagen en escala de grises, y a la derecha su representación en 3D, en forma de superficie topográfica. Imaginemos que comenzara a llover, el agua se quedaría estancada en las dos áreas denominadas cuencas hidrográficas (correspondientes a los niveles más bajos de intensidad). La transformada *Watershed* tiene como objetivo encontrar cuencas hidrográficas y fronteras en una imagen de escala de grises. El resultado de este proceso lo observamos en la ilustración 22.



Ilustración 22. Final de la transformada *Watershed*

El resultado de la transformada *Watershed* dependerá en gran medida de la imagen de entrada, por lo que es imprescindible hacer una buena elección de ésta. En este trabajo, los objetos que se quieren identificar son los núcleos, por lo que estos deberán corresponderse con las cuencas hidrográficas, es decir, los mínimos de la imagen.

Existen diferentes tipos de técnicas de segmentación que utilizan la transformada *Watershed*. Dependiendo de las características de nuestra imagen utilizaremos una técnica u otra.

2.6.1. Segmentación *Watershed* por distancia al borde

La segmentación *Watershed* por distancia al borde de una imagen binaria es un concepto muy sencillo. Se obtiene calculando la distancia euclídea de cada píxel de la imagen, al píxel más cercano con un valor distinto a cero. [17]

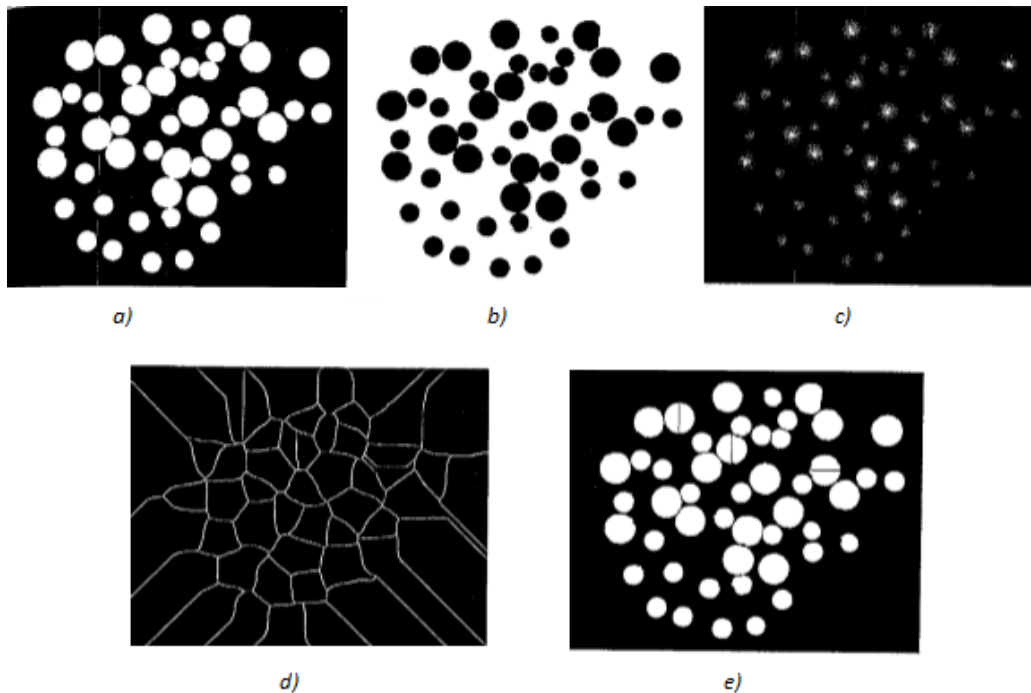


Ilustración 23. a) Imagen original binaria, b) Imagen complementaria de la imagen original, c) Distancia de la transformada, e) Líneas Watershed, f) Líneas Watershed sobre la imagen original binaria.

En la ilustración 23, podemos observar el proceso de la segmentación *Watershed* por distancia al borde. En nuestro caso es muy probable que apareciera el efecto de sobresegmentación, por lo que vamos a analizar otras técnicas *Watershed* que intentan resolver este problema frecuente.

El efecto de sobresegmentación [12] provoca que los verdaderos contornos de los objetos de interés queden enmascarados por una infinidad de otros contornos falsos o irrelevantes. Con frecuencia, esta sobresegmentación es debida a la presencia de ruido, aunque también puede ser causada por los efectos de las texturas o de objetos presentes poco relevantes, que no son objetos de interés, y por lo tanto no se desean segmentar. Estos objetos provocan la aparición de falsos contornos asociados a valles o zonas de depresión que no se corresponden con objetos o regiones de interés. El efecto de la sobresegmentación debe ser solucionado para obtener unos resultados óptimos de la aplicación de la transformada *Watershed*. [16]

Para solucionar esta sobresegmentación existen dos posibilidades:

- Eliminar los contornos irrelevantes una vez realizado la transformada *Watershed*.
- Modificar la imagen entrada, de tal forma que las regiones de depresión o valles se correspondan únicamente con los objetos deseados. Esta última opción es la que se implementará.

2.6.2. Segmentación *Watershed* usando gradientes

La elección de una imagen correcta de entrada es imprescindible para obtener unos buenos resultados utilizando la transformada *Watershed*. Por ello debemos procesar nuestra imagen original, con el objetivo de tener una imagen donde las cuencas sean los objetos que queramos segmentar, en nuestro caso, los núcleos.

En muchas ocasiones, se utiliza la imagen gradiente como imagen de entrada para realizar la segmentación *Watershed*. Esta imagen está formada por píxeles cuyo valor es el módulo del gradiente en cada punto, por lo tanto, poseerá píxeles con valores altos en los bordes de los objetos y píxeles con valores bajos en el resto de la imagen.

Idealmente, al aplicar la transformada *Watershed* sobre la imagen gradiente, las líneas *Watershed* se situarían en los bordes de los objetos. En la mayoría de los casos, esto no ocurre, por lo que la imagen gradiente tendrá que ser tratada, con el fin de obtener buenos resultados de la transformada.

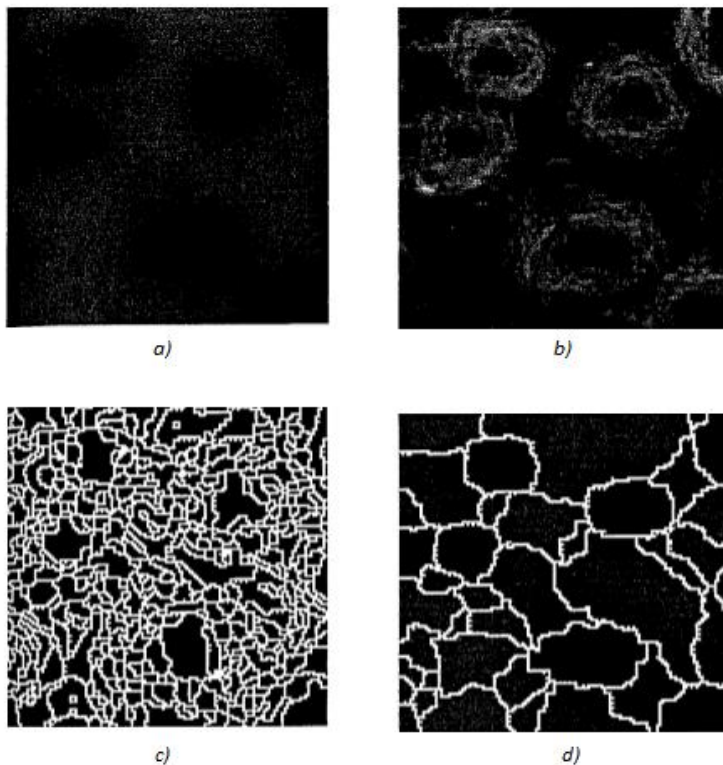


Ilustración 24. a) Imagen original en escala de grises, b) Imagen del gradiente, c) Transformada *Watershed* de (b), donde se muestra sobresegmentación, d) Transformada *Watershed* de la imagen gradiente suavizada.

Para realizar la transformada *Watershed* sobre la imagen gradiente, se comienza obteniendo esta imagen a partir de una imagen en escala de grises. Para ello se pueden utilizar los métodos de filtros lineales o utilizar la imagen gradiente morfológica.

Al aplicar la transformada directamente, no se obtiene un buen resultado, ya que aparece sobresegmentación, como se refleja en la ilustración 24 (C). Ésta se produce debido a la presencia de un elevado número de mínimos, por ejemplo debido al ruido, y al hecho de que la transformación asocia cada región a un mínimo local de la imagen. Además se observan demasiadas líneas *Watershed* que no corresponden a los objetos de interés.

Una de las soluciones para este problema es suavizar la imagen gradiente antes de realizar la transformación *Watershed*, para ello se usarán las operaciones morfológicas explicadas anteriormente. El tipo de operaciones dependerá de la clase de imagen que tengamos y de los objetos de interés de ésta.

Incluso al utilizar estas operaciones sobre la imagen gradiente y realizar la transformada *Watershed*, aparecen regiones que no se identifican con los objetos de interés, por lo que la imagen gradiente tendrá que seguir siendo preprocesada, para resolver este problema, o procesar la imagen de grises antes de obtener el gradiente para que éste resulte más simplificado. [17]

2.6.3. Segmentación *Watershed* con marcadores

Esta variante de la transformada *Watershed* se ha diseñado como una solución práctica al problema más común de esta técnica, la sobresegmentación, ya mencionado anteriormente. Este método intenta limitar la cantidad de regiones admisibles, mediante una etapa previa de preprocesado de la imagen, proporcionando un conocimiento extra sobre el proceso de segmentación.

La transformada *Watershed* con marcadores se basa en el concepto de la búsqueda de un marcador dentro de cada objeto de interés, a partir del cual se inundarán las zonas *Watershed*. Además, trata de encontrar los marcadores externos que limiten la zona que hay que inundar por objeto que se intenta segmentar, asegurando que esté fuera de dicho objeto. En nuestro caso necesitaremos un marcador interno por cada núcleo de nuestra imagen, y los marcadores externos deberán corresponder con los límites de éstos.

Se propone como ejemplo para entender la transformada *Watershed* con marcadores la imagen de la ilustración 25(a). Se trata de una imagen en escala de grises, de la cual se quiere obtener la segmentación de las zonas oscuras que aparecen en ella.

En primer lugar, se realiza el gradiente (Ilustración 25. (a)), y se aplica la transformada sobre esta imagen, se observa en la Ilustración 25(c), la sobresegmentación producida debido, como hemos dicho, al gran número de mínimos regionales que aparecen en la imagen.

A continuación, se eliminan parte de estos mínimos regionales, que no corresponden con objetos de interés, para lo que se aplica un umbral a la imagen de la Ilustración 23(d). Esto quiere decir, que se seleccionan aquellos mínimos regionales que superen un valor determinado establecido por un umbral impuesto previamente. Estos mínimos regionales actuarán como marcadores internos y también serán necesarios para obtener los marcadores

externos, los cuales se hallarán computando la transformada *Watershed* a la imagen resultante de aplicar la distancia euclídea a la imagen binaria de los marcadores internos, hallada utilizando la función del software Matlab *bwdist*.

Como se ha comentado anteriormente, el concepto clave es modificar los marcadores empleados antes, los mínimos regionales, mediante el procedimiento denominado imposición de mínimos, con el cual se fijan los nuevos mínimos que tendrá la imagen, los cuales coincidirán con los marcadores seleccionados.

Finalmente se procede a calcular la transformada *Watershed* sobre esta modificación de la imagen gradiente obteniendo el resultado mostrado en la Figura 25(h). Como se puede apreciar se consiguen mejores resultados que con las técnicas anteriores. [17]

Al analizar las tres técnicas estudiadas de segmentación utilizando la transformada *Watershed*, se comprueba que es la técnica que usa marcadores la más eficiente, por lo que será esta la utilizada en nuestro algoritmo.

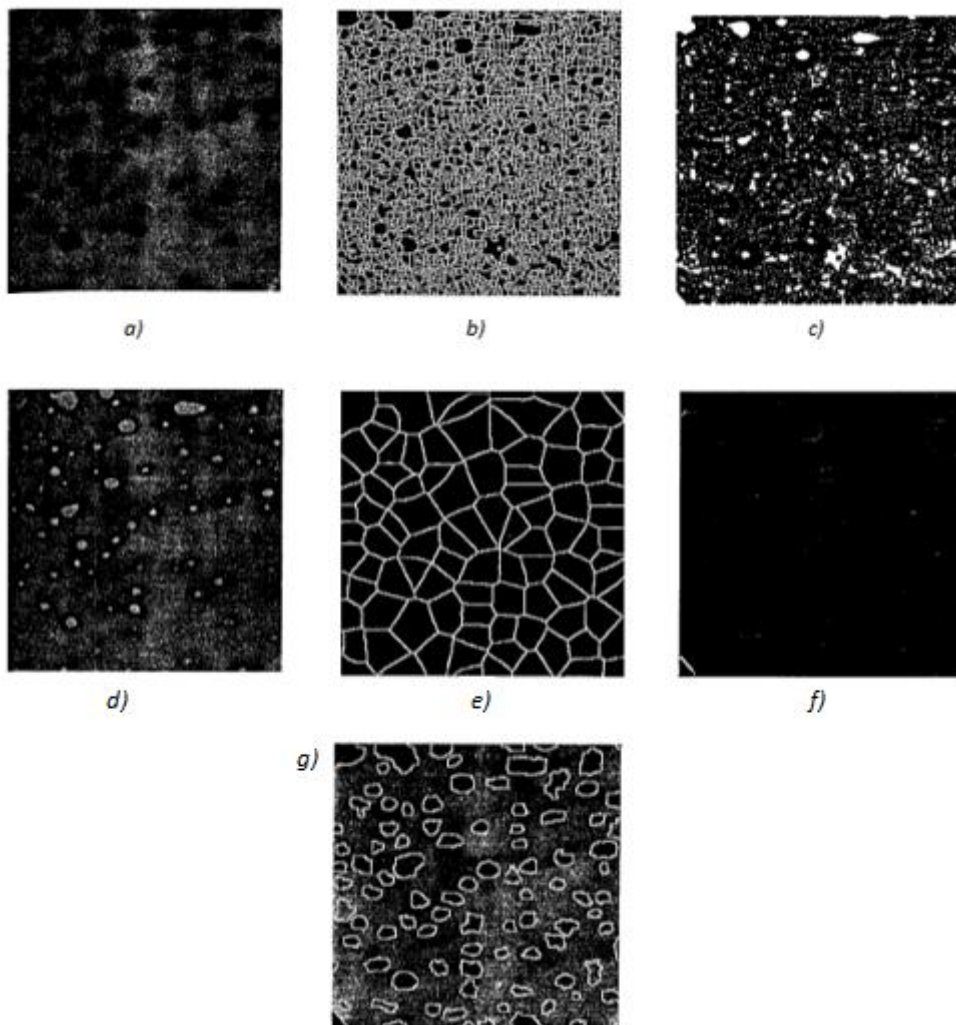


Ilustración 25.a) Imagen original, b) Sobresegmentación al aplicar la transformada a la imagen gradiente, c) Mínimos regionales de la imagen gradiente, d) Marcadores internos, e) Marcadores externos, f) Imagen gradiente modificada, g) Resultado de la segmentación Wate

Capítulo 3

Implementación de los algoritmos seleccionados

3. IMPLEMENTACIÓN DE LOS ALGORITMOS

3.1. Contexto

En el tercer capítulo se explicarán de manera detallada los algoritmos implementados para los diferentes métodos de segmentación elegidos. Para ello se explicarán los pasos seguidos, mostrando ilustraciones de los resultados de cada uno de ellos. Los tres métodos que se han implementado son:

- Segmentación por umbralización mediante el método Otsu, binivel y multinivel, utilizando como imagen de entrada dos imágenes en escala de grises diferentes, la imagen correspondiente al canal de la luminancia y la imagen de la componente hematoxilina.
- Segmentación mediante la transformada *Watershed*, utilizando como imagen de entrada las dos imágenes de grises utilizadas en el método anterior.
- Segmentación por agrupamiento o *clustering*. Técnica *k-means*. En este caso la imagen de entrada será la imagen original RGB.

3.2. Técnica de segmentación por umbralización. Método Otsu.

El primer método que va a ser implementado es el método Otsu. Este método, como se ha explicado anteriormente, divide la imagen utilizando un umbral o varios, calculados de manera automática mediante diferentes funciones de *Matlab*.

El método Otsu necesita como imagen de entrada una imagen de grises. Vamos a visualizar los resultados de esta segmentación utilizando dos imágenes diferentes de grises obtenidas a partir de la imagen RGB original, para comprobar cuál nos aporta mejores resultados. Estas imágenes serán la imagen correspondiente a la luminancia y la imagen correspondiente a la componente de hematoxilina, explicadas anteriormente.

3.2.1. Método Otsu binivel. Luminancia.

La implementación de este método comienza convirtiendo la imagen RGB original a una imagen en escala de grises (luminancia) utilizando la función *rgb2gray*.

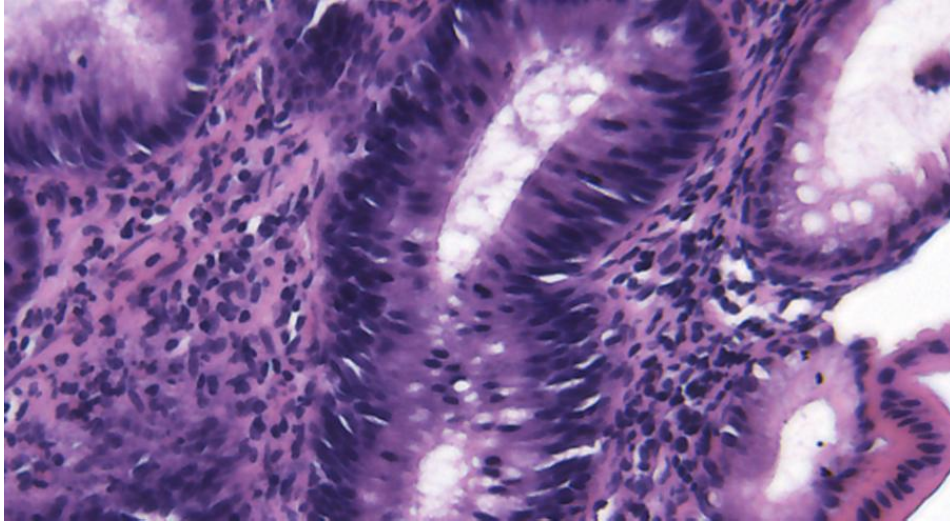


Ilustración 26. Imagen original RGB

En la ilustración 27 observamos la imagen en escala de grises correspondiente a la luminancia de la imagen original mostrada en la ilustración 26.

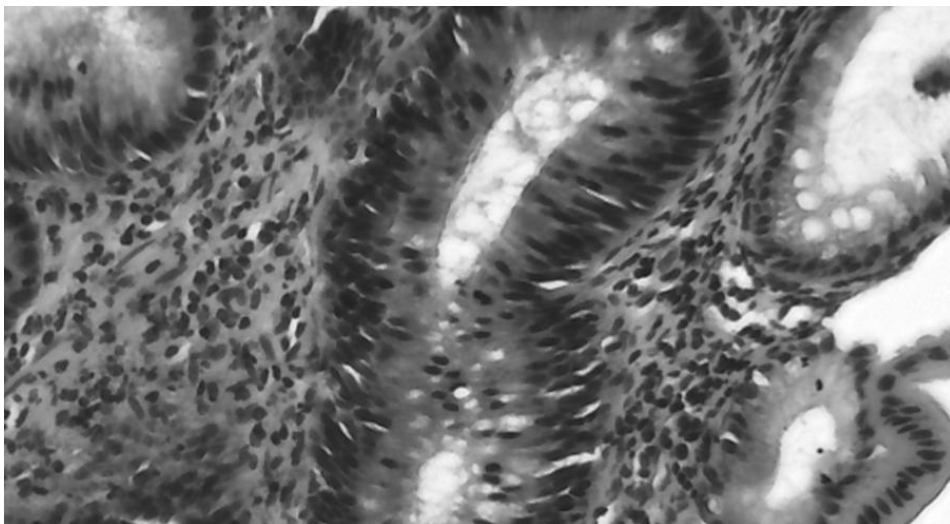


Ilustración 27. Componente Y o luminancia de la imagen original

Una vez que tenemos la imagen en escala de grises podemos aplicar el método Otsu binivel. Para obtener el umbral óptimo se utilizará la función de *Matlab graythresh*, ésta nos proporciona el umbral que se utilizará para realizar la segmentación de la imagen en escala de grises.

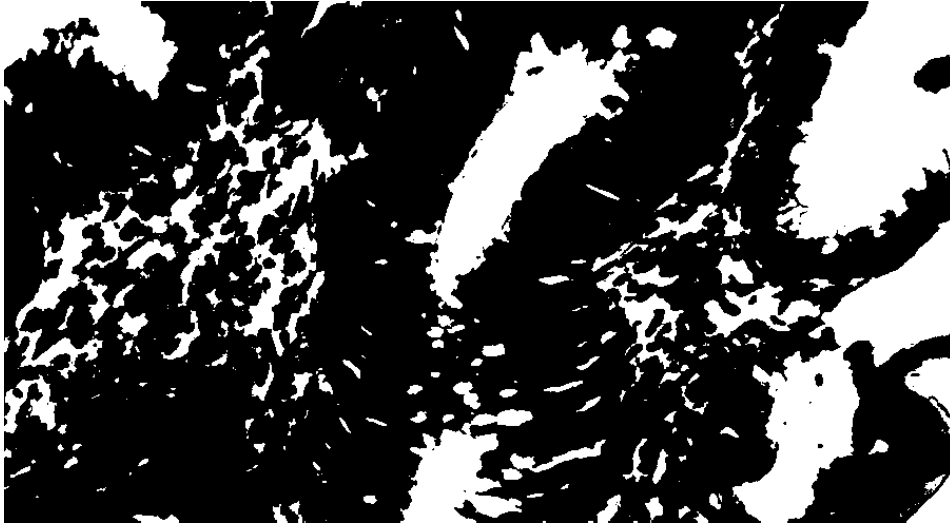


Ilustración 28. Canal Y segmentado, mediante el método OTSU binivel

En la ilustración 28 observamos una imagen binaria que ha dividido la imagen original en dos partes. La parte blanca de la imagen se corresponde con las zonas de nivel gris mayor, es decir, las zonas más claras en la imagen de grises. Los núcleos se corresponden en la imagen en escala de grises de la ilustración 27 con las zonas de nivel gris menor, que observamos en negro en la ilustración 28, por lo que podemos afirmar que no se obtiene un resultado muy eficiente ya que no se consigue segmentar correctamente los núcleos y este es el objetivo final. Esto se debe a que el método Otsu binivel hace una división de la imagen muy general al obtener únicamente dos partes, objetos de interés y fondo. En nuestro caso, este método incluye en la parte de objetos de interés demasiados píxeles que no forman parte de núcleos reales.

3.2.2. Método Otsu multinivel. Luminancia

El siguiente método que vamos a implementar es una variante del método Otsu multinivel. En este caso no se va a aplicar un umbral único al realizar la segmentación, sino que se van a utilizar varios umbrales dependiendo del número de agrupaciones que se quieran observar. La imagen en escala de grises que se utilizará como imagen de entrada es la misma que la utilizada en el método anterior, por lo que se obtiene de la misma manera.

La función de *Matlab* que nos proporciona los umbrales óptimos es *multithresh*, y el número de umbrales que se quieren obtener para segmentar la imagen tiene que ser

introducido previamente por el usuario. En nuestro caso, se van a probar dos umbrales diferentes para comparar los resultados.

En primer lugar, se van a utilizar tres umbrales, por lo que nuestra imagen se dividirá en cuatro partes diferentes, que se observan en la imagen siguiente en amarillo, rojo, azul oscuro y azul claro.

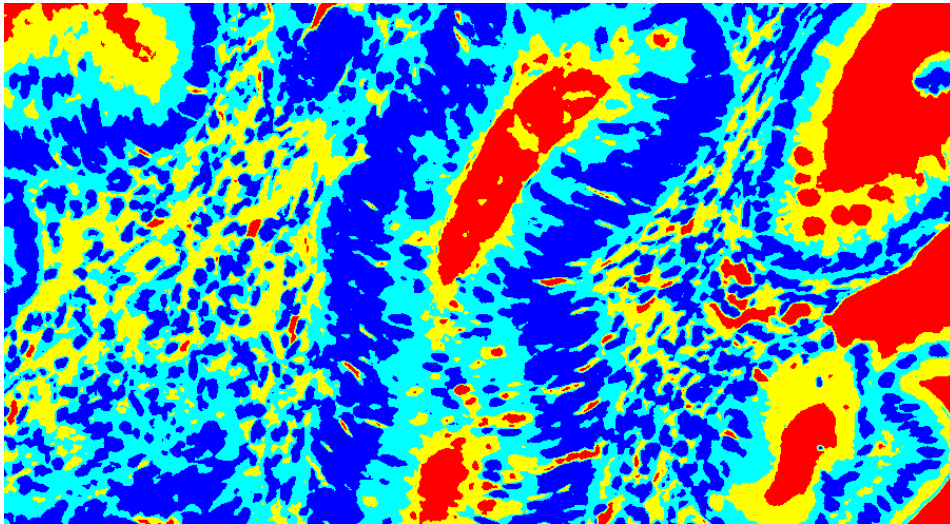


Ilustración 29. Imagen correspondiente al canal Y segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando tres umbrales

Se puede observar en la ilustración 29 que los núcleos corresponden a la parte azul oscura. Podemos afirmar, en este caso, que la segmentación mediante el método Otsu multinivel es más eficiente que la binivel, ya que utilizando este método conseguimos obtener una máscara que corresponde a los núcleos. Esta mejoría se debe a que al dividir la imagen en un mayor número de partes la segmentación es más precisa.

A continuación, se va a segmentar la imagen utilizando el mismo método, pero en este caso el número de umbrales predefinido será cuatro y por lo tanto el número de partes diferenciables serán cinco. Estas se observan en la siguiente imagen en los colores verde, azul claro, azul oscuro, amarillo y naranja.

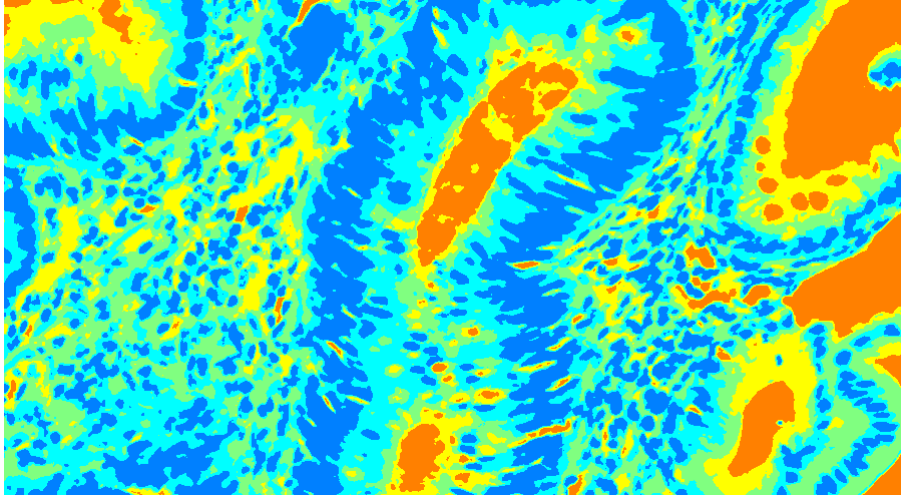


Ilustración 30. Imagen correspondiente al canal Y segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando cuatro umbrales

En la ilustración 30 podemos afirmar que los núcleos se corresponden a las manchas azules oscuras. Sin embargo, si comparamos esta imagen con la imagen en escala de grises de la que parte la segmentación, comprobamos que muchos núcleos que difieren en el tono de gris no se introducen en el grupo de las manchas azules oscuras. Esto nos permite afirmar que cuatro umbrales son demasiados a la hora de realizar esta segmentación, ya que de esta manera los núcleos que tengan diferentes tonos de grises formarán parte de diferentes clases, y el objetivo es introducir todos los núcleos en el mismo grupo para realizar una segmentación eficiente.

3.2.3. Método Otsu binivel. Componente hematoxilina.

En este caso, el proceso de segmentación es el mismo que el explicado en el apartado 3.2.1. La única diferencia es que la imagen de grises que se utilizará como imagen de entrada es diferente a la utilizada en ese apartado.

En esta ocasión se trata de la imagen de grises correspondiente a la componente hematoxilina. Esta imagen se obtiene mediante técnicas de deconvolución de color, utilizando un algoritmo desarrollado por Ruiforck AC y Johonston DA , como se ha explicado en el apartado 2.2.6. del capítulo anterior. La imagen correspondiente a la componente hematoxilina es la que muestra en la ilustración 31.

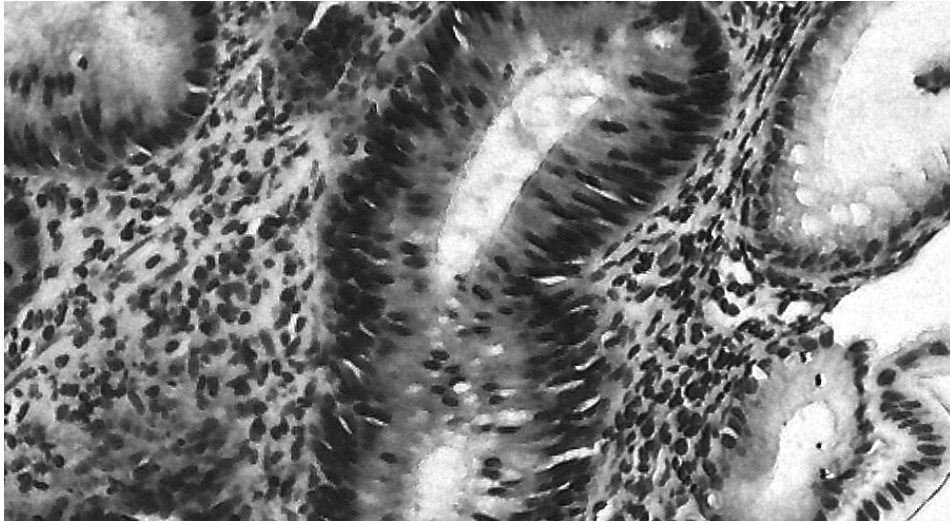


Ilustración 31. Componente hematoxilina de la imagen original

Observamos en la ilustración 31 que los núcleos son más oscuros y están más diferenciados del fondo de la imagen que en la imagen correspondiente a la componente de luminancia. Esto nos proporcionará una mejor segmentación al aplicar el método Otsu que en el caso anterior. El resultado de la segmentación se muestra en la ilustración 32.



Ilustración 32. Imagen correspondiente al canal hematoxilina segmentada mediante el método Otsu binivel

Como se esperaba, la segmentación que se consigue es más eficiente que en el caso de la imagen correspondiente al canal de la luminancia anterior. Los núcleos en la imagen de la componente hematoxilina se diferenciaban mejor del fondo y tenían un nivel de gris más parecido entre ellos, por lo que el umbral óptimo obtenido mediante el método Otsu permitiría una mejor segmentación que se observa perfectamente en la ilustración 32, donde los núcleos se sitúan en la parte negra de la imagen y se diferencian mejor que en el caso anterior.

3.2.4. Método Otsu multinivel. Componente hematoxilina.

Al igual que en el apartado anterior, el proceso que se explicará en este punto solo difiere del expuesto en el apartado 3.2.2. en la imagen de entrada, que será la imagen en escala de grises correspondiente a la componente hematoxilina. Al igual que en el apartado 3.2.2 el número de umbrales ,que nos dará mejores resultados, será tres. La cantidad de umbrales óptimo se puede averiguar si observamos la imagen que queremos segmentar, el número de clases óptimo corresponderá al número de tonalidades de grises diferentes que se pueden observar en la imagen, en nuestro caso cuatro, el blanco, el negro, el gris claro y el gris oscuro. Por lo que vamos a realizar la segmentación mediante el método Otsu multinivel, aplicando tres umbrales y obteniendo cuatro partes diferentes.

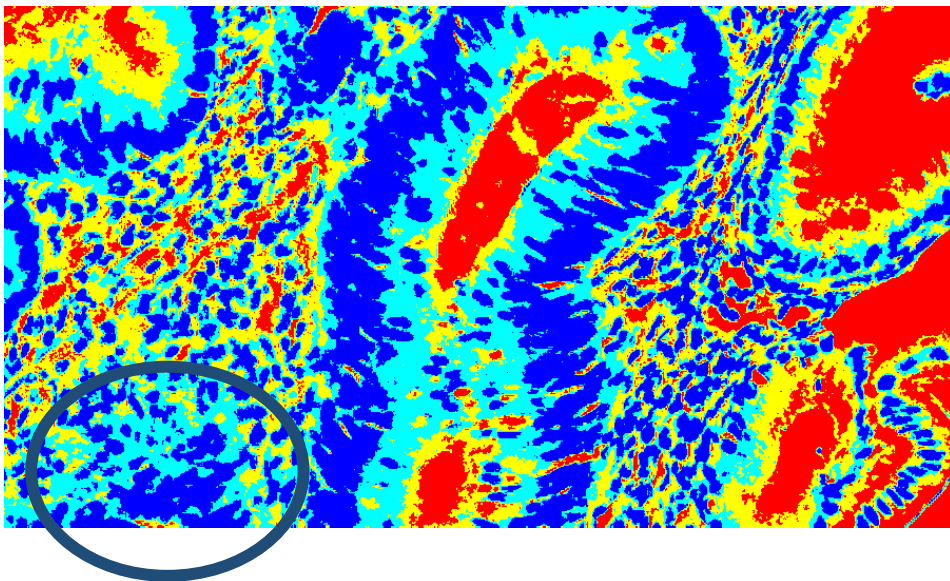


Ilustración 33. Imagen correspondiente a la componente hematoxilina segmentada mediante el método Otsu multinivel, utilizando tres umbrales

Observamos en la ilustración 33 que la clase que corresponde a los núcleos es la que se observa en azul oscuro. En este caso no podemos decir que la diferencia entre los resultados de las dos variantes del Método Otsu difieran tanto como en el caso anterior. Sin embargo, si se puede afirmar que la última técnica implementada aporta una mejora en los resultados en

las zonas donde los núcleos están superpuestos o se percibe algo de ruido, como en la parte de la imagen enmarcada en el círculo gris.

Cabe destacar que ninguno de los casos mencionados anteriormente consigue realiza una segmentación nuclear realmente eficiente. Esta tarea, como se ha dicho anteriormente, es realmente compleja, y es prácticamente imposible realizar una segmentación perfecta con una técnica tan simple como los métodos de umbralización.

3.3. Técnica de segmentación mediante la transformada *Watershed* con marcadores.

La técnica que vamos a implementar es la segmentación mediante la transformada *Watershed* con marcadores. Ésta, como se ha comentado anteriormente, consiste en la búsqueda de marcadores externos e internos. Se pretende encontrar un marcador interno por cada objeto de interés y marcadores externos que se encuentren fuera de estos objetos de interés. Será a partir de estos marcadores por donde se empezará a “inundar” la superficie topográfica que simula la imagen. Esta inundación será frenada por los límites que impondrá la imagen gradiente.

Al igual que en la técnica del método Otsu, la imagen de entrada será una imagen en escala de grises, y las que vamos a utilizar son las mismas que en el apartado anterior por lo que el proceso para obtenerlas es el mismo que el comentado anteriormente. Estas serán la imagen de grises correspondiente al canal de luminancia y la correspondiente a la componente hematoxilina.

Los pasos del algoritmo implementado a continuación han sido explicados detalladamente en el capítulo anterior, por lo que a continuación, nos centraremos únicamente en visualizar y comentar los resultados de cada paso

3.3.1. Transformada *Waterhsed* con marcadores. Luminancia.

El algoritmo comienza mediante la obtención de la imagen gradiente a partir de la imagen de entrada en escala de grises. En nuestro caso, esta imagen gradiente se ha obtenido mediante el uso de un filtro 2D predefinido por Matlab, pero hay diferentes formas de obtener esta imagen.



Ilustración 34. Imagen gradiente correspondiente al canal de luminancia de la imagen original

El siguiente paso que se va a implementar es la búsqueda de marcadores internos, mediante la función de Matlab *imextendedmin*. Esta función aplica una operación morfológica para calcular mínimos y necesita como entrada la imagen en escala de grises del canal de luminancia.

Esta función es más robusta que otra función de Matlab la cual también se probó para obtener el algoritmo, *imregionalmin*. Esta función nos proporcionaba todos los mínimos regionales que aparecían en la imagen, la cantidad de estos era demasiada, por lo que era necesario aplicar un filtro, este se consigue con la función seleccionada, *imextendedmin*, que solo obtiene los mínimos regionales que tengan un cierto contraste que se especifica en la función obteniendo así los mínimos suficientemente contrastados.



Ilustración 35. Marcadores internos de la imagen del canal de la luminancia

El siguiente paso implementado es la búsqueda de marcadores externos ,los cuales se hallarán, como se ha dicho en el capítulo anterior, computando la transformada *Watershed* sobre la imagen resultante de aplicar la distancia euclídea a la imagen de los marcadores internos, hallada anteriormente.

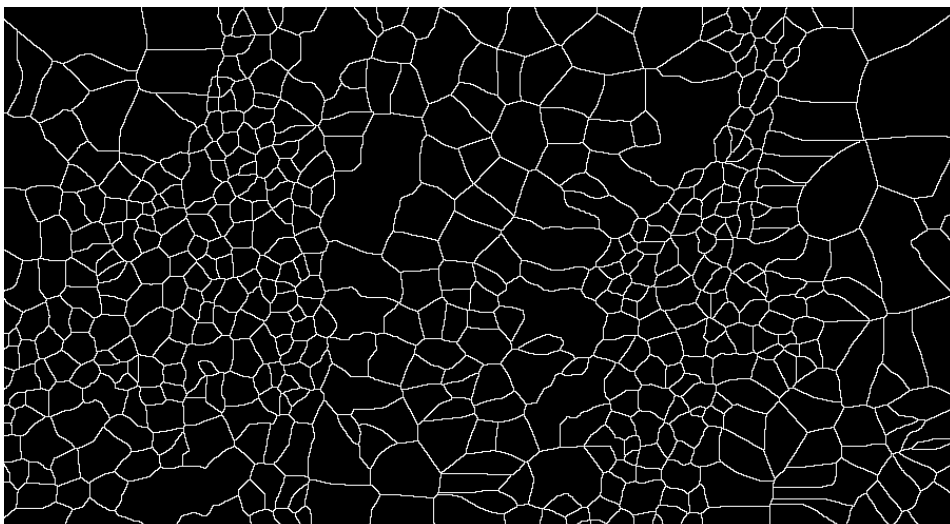


Ilustración 36. Marcadores externos del canal de la luminancia

Por último, imponemos los marcadores internos y externos obtenidos anteriormente sobre la imagen gradiente, mediante la función de Matlab *imimposemin*.

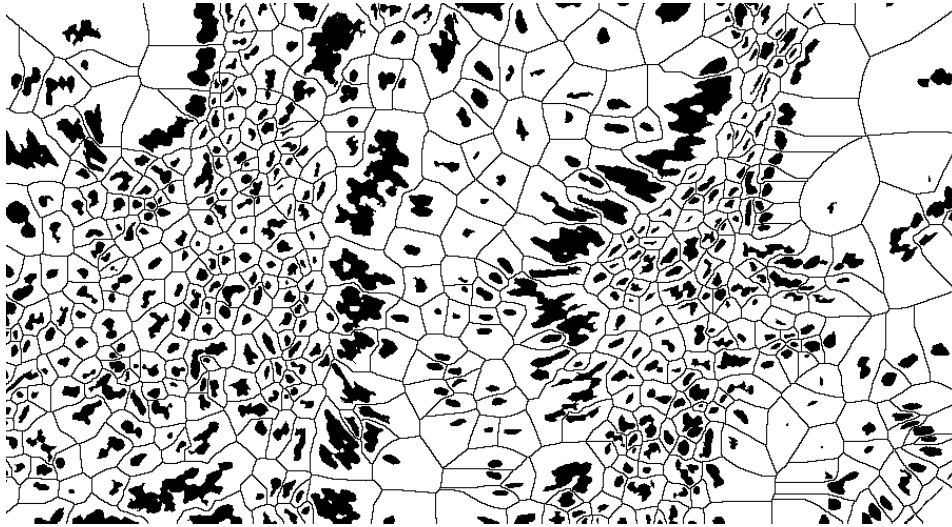


Ilustración 37. Imposición de marcadores internos y externos sobre la imagen gradiente

La transformada *Watershed* será implementada sobre esta imagen, utilizando la función de Matlab, *Watershed*. El resultado de la transformada *Watershed* será superpuesto con la imagen original RGB para poder visualizar mejor los resultados en la siguiente ilustración.

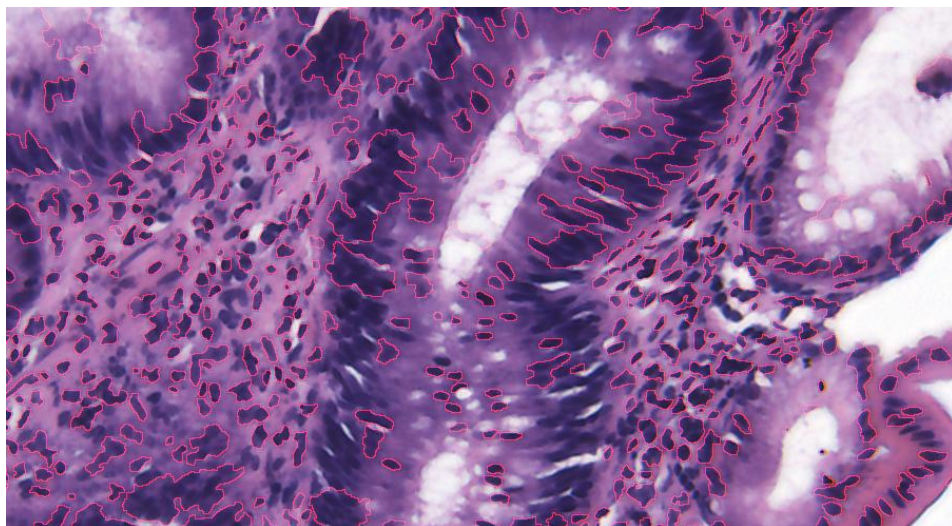


Ilustración 38. Resultado de la transformada Watershed con marcadores sobre la imagen original del canal luminanci

3.3.2. Transformada *Watershed* con marcadores. Componente hematoxilina.

En este apartado se visualizarán los resultados de la transformada *Watershed* con marcadores explicada en el capítulo anterior. El proceso es similar al realizado anteriormente, pero en este caso la imagen en escala de grises que necesita esta técnica como imagen de entrada será la componente hematoxilina, mostrada en el apartado 3.2.3.

Comenzaremos obteniendo la imagen gradiente a partir de la imagen en escala de grises.

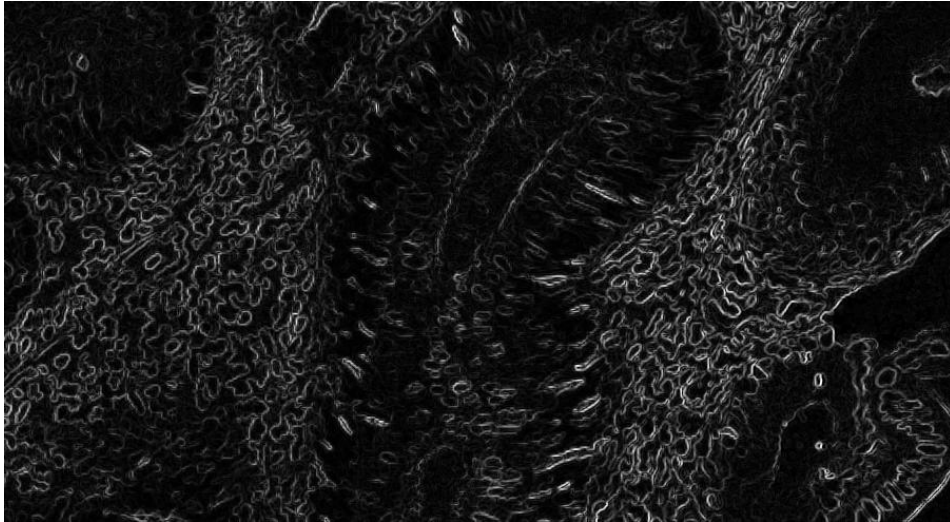


Ilustración 39. Imagen gradiente correspondiente a la componente de la hematoxilina

Continuamos obteniendo los marcadores internos y los marcadores externos de la imagen de la componente hematoxilina. Debido a la similitud del proceso explicado anteriormente únicamente se mostrarán las imágenes obtenidas como resultado en cada paso.

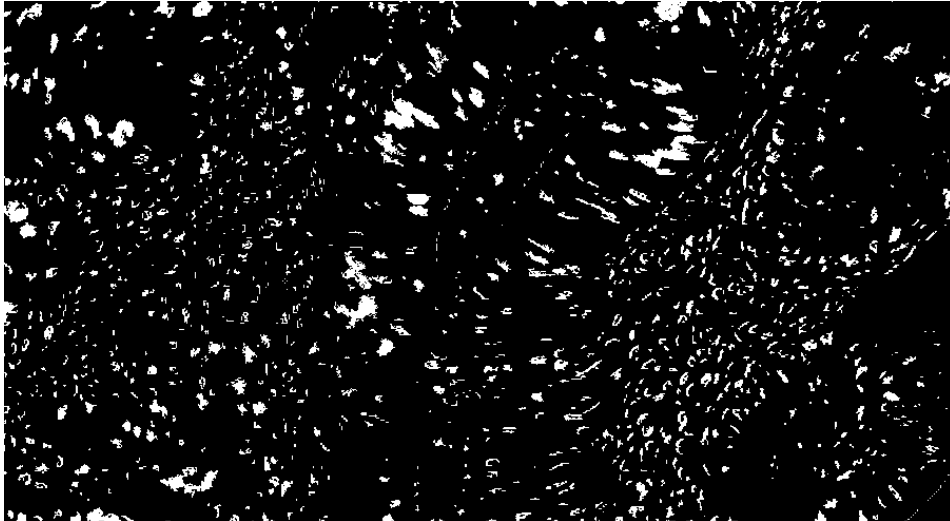


Ilustración 40. Marcadores internos de la componente de la hematoxilina

En la ilustración 41 se observan los marcadores externos que se han obtenido siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior.

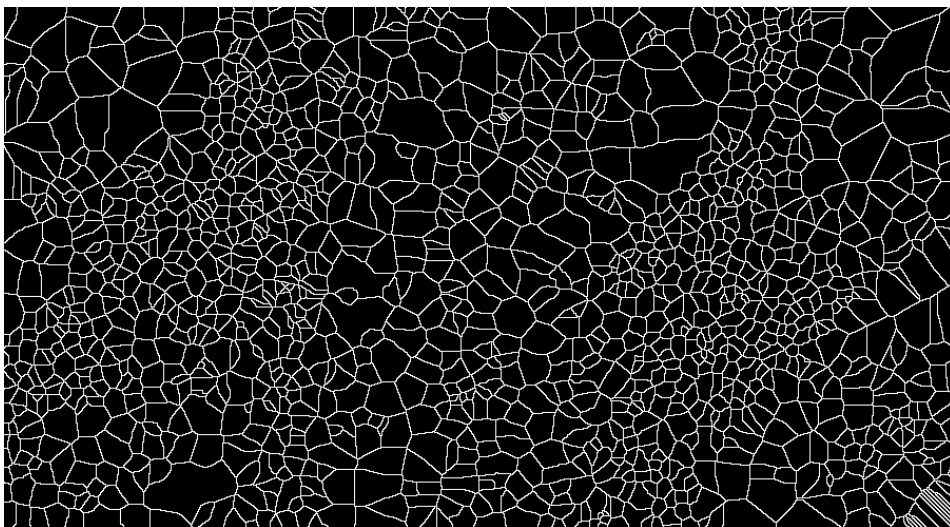


Ilustración 41. Marcadores externos de la componente de la hematoxilina

A continuación, imponemos los marcadores internos y externos, sobre la imagen gradiente. La imagen resultante será el objeto de la transformada *Watershed*.

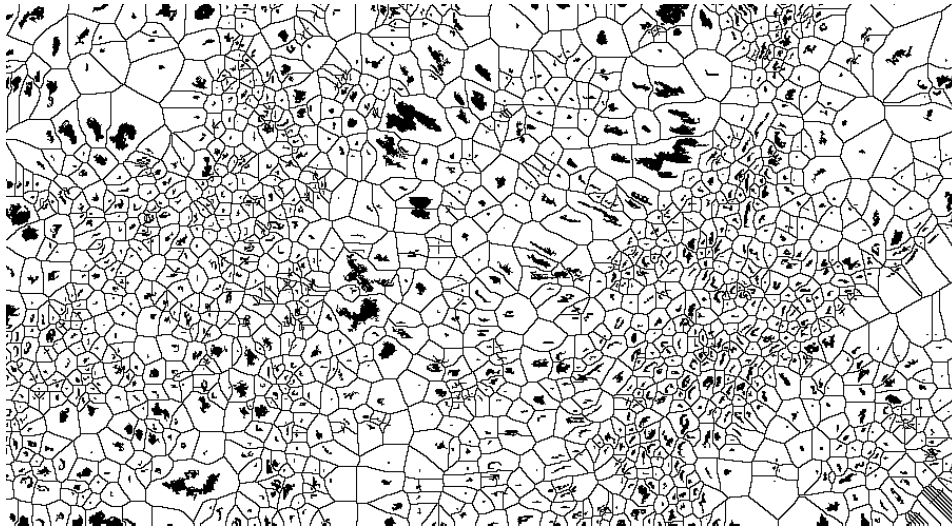


Ilustración 42. Imposición de marcadores internos y externos sobre la imagen gradiente

Por último, visualizamos el resultado de la transformada *Watershed* con marcadores sobre la imagen original de la componente de la hematoxilina.

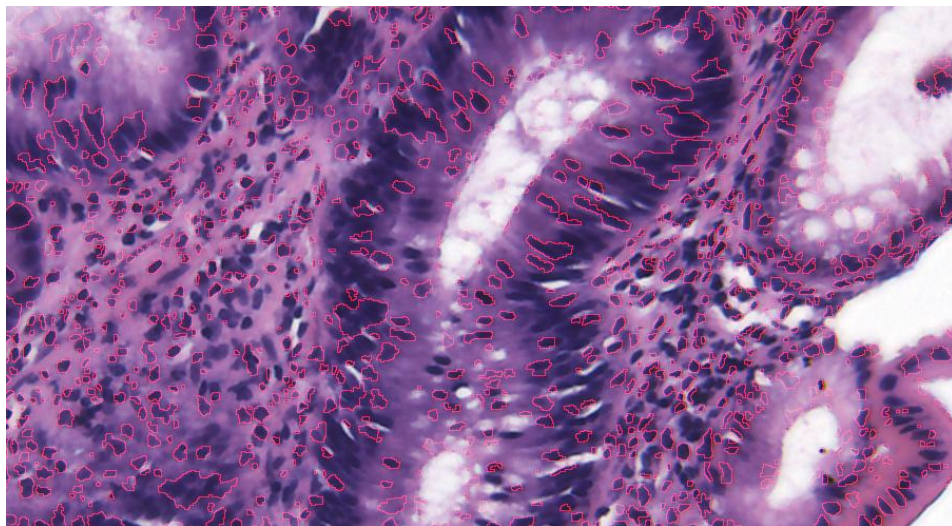


Ilustración 43. Resultado de la transformada Watershed con marcadores sobre la imagen original de la componente de la hematoxilina

El resultado de la transformada *Watershed* en ambos casos no es eficiente ya que, como observamos, no se consigue realizar una segmentación muy precisa. A simple vista, el resultado en el primer caso es mejor que en el segundo porque como se muestra en las imágenes correspondientes a los marcadores internos, aunque no se han segmentado todos los núcleos, si observamos que no existen marcadores internos en las zonas que no aparecen núcleos, sin embargo en el segundo caso, en la esquina superior derecha no existen núcleos y si que aparecen marcadores internos.

Este método es el más robusto de las tres técnicas implementadas, y también el más complejo debido de la dificultad que presenta conseguir un resultado eficiente en cada uno de sus pasos.

3.4. Técnica de segmentación por agrupamiento o Clustering. K - means.

La última técnica de segmentación implementada será el método *K - means*. Esta técnica como se ha comentado anteriormente, durante el análisis del estado del arte y la explicación profunda de la metodología, realiza la segmentación separando los objetos de la imagen en diferentes grupos que comparten unas características comunes. El algoritmo *K - means* necesita que el número de grupos o *clusters* sea predefinido por el usuario.

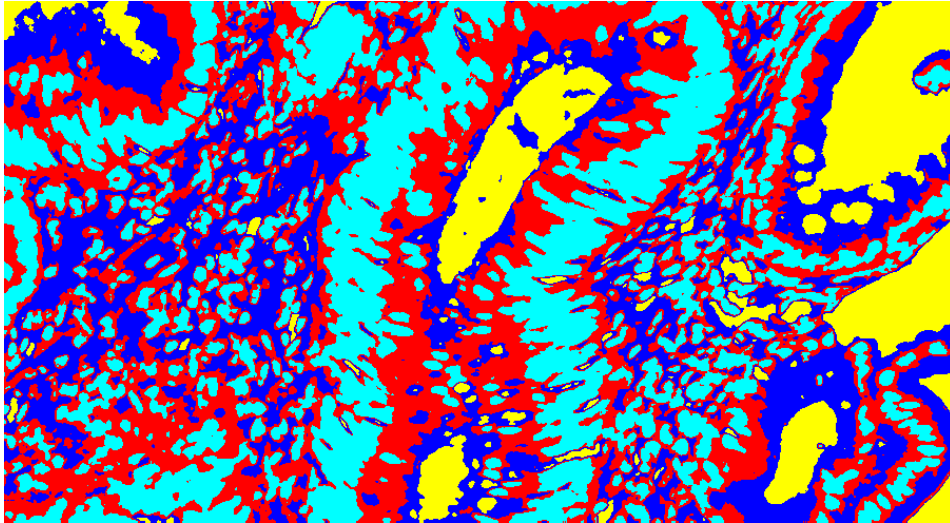
Una de las diferencias claves entre esta técnica y las dos implementadas anteriormente es la imagen de entrada del algoritmo que se utiliza, en este caso se trata de una imagen RGB, por lo que utilizamos la información que nos aporta el color de la imagen.

El algoritmo implementado comienza con la transformación de la imagen original en una matriz de dos dimensiones. Las filas corresponderán a los píxeles, y las columnas a cada uno de los canales RGB, por lo que habrá tres columnas. De esta manera, toda la información que teníamos en la matriz de tres dimensiones correspondiente a la imagen original está en esta nueva matriz.

A continuación, aplicamos la función proporcionada por Matlab, *K - means*. Esta función necesita como entrada la matriz de dos dimensiones explicada anteriormente y el número de *clusters* o agrupaciones en los que vamos a dividir la imagen. En nuestro caso, el número de agrupaciones será cuatro, ya que en la imagen original RGB se pueden distinguir cuatro colores más diferenciados.

La función *kmeans* nos proporcionará los centroides de cada agrupación y una matriz que nos dirá el cluster al que pertenece cada pixel de la imagen.

La ilustración 44 muestra las agrupaciones en los que se ha dividido la imagen; rojo, amarillo, azul claro y azul oscuro. Hay que tener en cuenta, aunque la imagen obtenida es similar a la obtenida mediante el método Otsu multinivel, que el algoritmo *K - means* utiliza toda la información obtenida a partir de la imagen RGB para realizar esta segmentación.



*Ilustración 44. Imagen que muestra los cuatro cluster resultado de la función *K - means* con 4 agrupaciones*

Tras aplicar la función *K - means* visualizaremos cada una de las agrupaciones obtenidas, para saber cuál es la que nos interesa, es decir, cual se corresponde con los núcleos.



Ilustración 45. Imagen que muestra los objetos del primer cluster

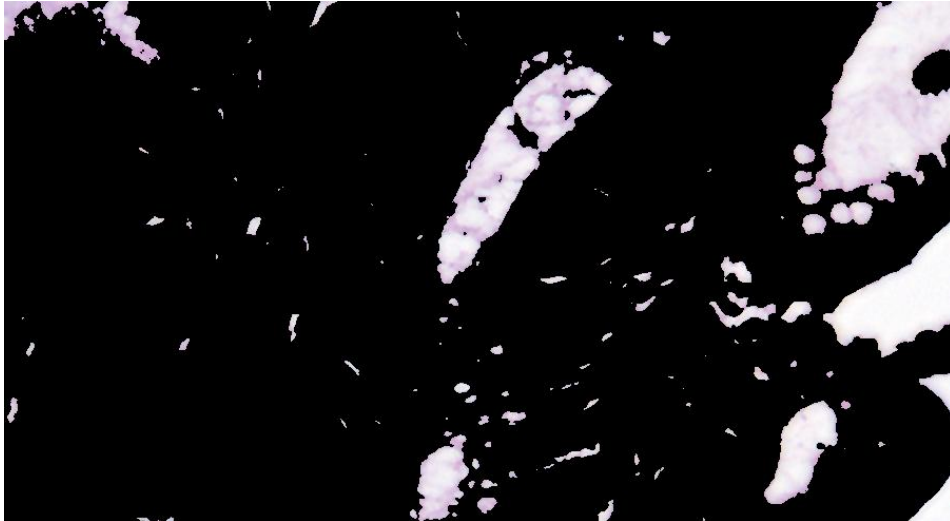


Ilustración 46. Imagen que muestra los objetos del segundo cluster.

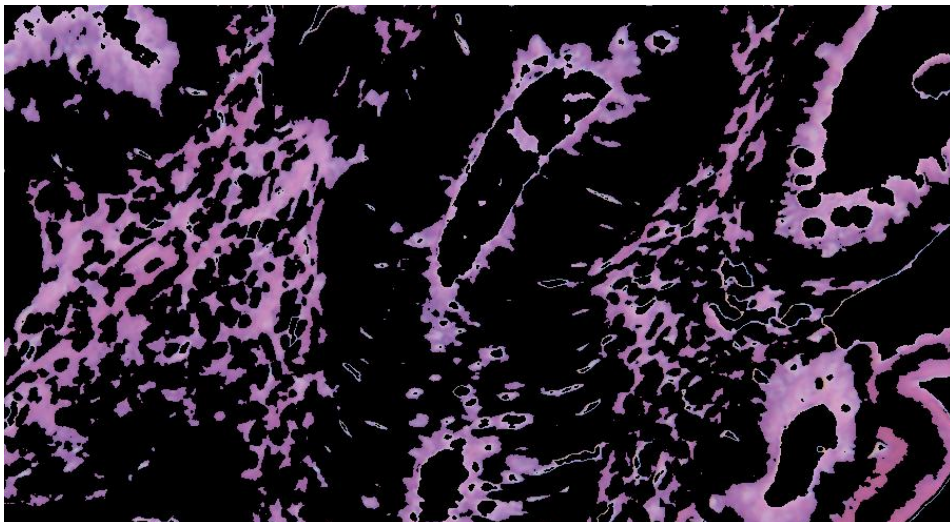


Ilustración 47. Imagen que muestran los objetos del tercer cluster

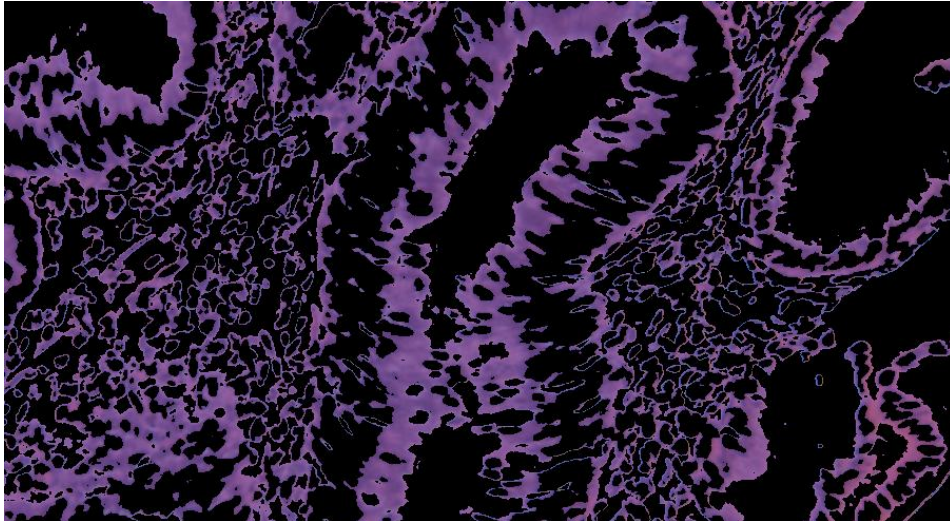


Ilustración 48. Imagen que muestra los objetos del cuatro cluster

Como se puede observar en las cuatro ilustraciones anteriores la función *K - means*, hace una distribución aleatoria de los *clusters*, por lo que tenemos que asegurarnos de cuál es el *cluster* que corresponde a nuestros objetos de interés, los núcleos.

Para ello observamos de nuevo, en las imágenes anteriores, que los núcleos son los objetos más oscuros, por lo que nos tenemos que quedar con el *cluster* que tenga objetos más oscuros, es decir los que tienen un valor de intensidad menor. Para ello realizamos la media de los valores de los centroides obtenidos a partir de la función *K - means*. Los centroides son valores de intensidad de la imagen, por lo que el *cluster* más oscuro corresponderá con el valor del centroide menor. Ordenamos los centroides de manera ascendente, mediante la función de Matlab *sort*, y nos quedaremos con los objetos que pertenecen al *cluster* del centroide más bajo, es decir el primero de la lista que nos proporciona la función *sort*. El resultado que obtendremos al seleccionar este *cluster* serán los objetos más oscuros, los núcleos.

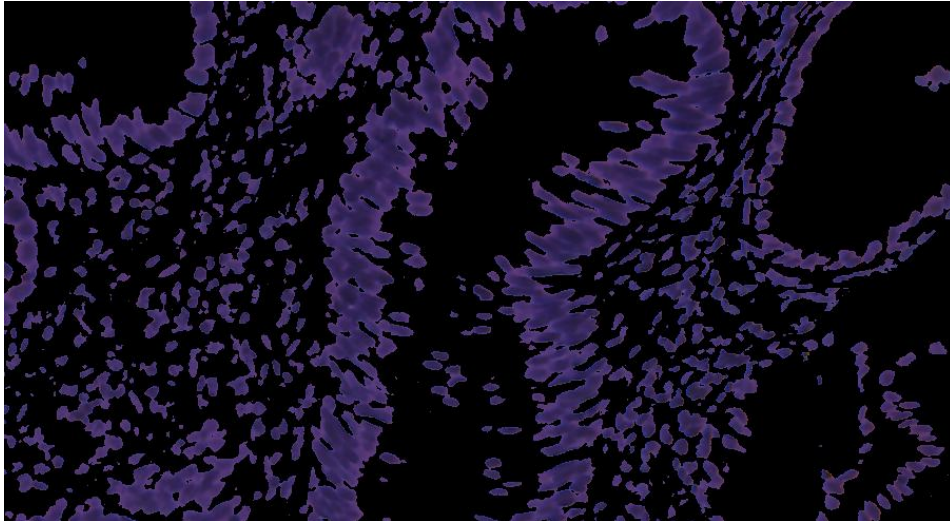


Ilustración 49. Cluster correspondiente a los núcleos.

A simple vista, observamos que la segmentación es bastante eficiente, ya que, si observamos la imagen RGB vemos que la mayoría de los núcleos han sido segmentados, y además, apenas se observan objetos que hayan sido introducidos en la agrupación correspondiente a los núcleos y no sean núcleos reales.

Capítulo 4.

Análisis cuantitativo de los algoritmos implementados

4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS. EFICIENCIA ALGORITMO.

4.1. Contexto.

En este capítulo se va realizar un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos a partir de los algoritmos implementados. De esta manera, se podrá realizar una comparación entre estos y se medirá la eficiencia de cada uno.

Para realizar el análisis cuantitativo se ha contado manualmente el número de núcleos en siete muestras diferentes utilizando una aplicación Android.

4.2. Resultados

La validación de precisión de los algoritmos implementados es un requisito fundamental para su posterior utilización. En este capítulo se compara la eficiencia de los tres métodos implementados a la hora de realizar la segmentación nuclear para saber cuál sería el que mejor realiza su función realizando un análisis cuantitativo.

Muchas investigaciones en patología están descubriendo la importancia del análisis cuantitativo de las imágenes patológicas. Este tipo de análisis puede utilizarse para respaldar la decisión del patólogo en la presencia o ausencia de la enfermedad, y también para ayudar en la evaluación de la progresión de la enfermedad por lo que el uso del diagnóstico asistido por ordenador (CAD) en patología puede mejorar sustancialmente la eficiencia y la exactitud de las decisiones del especialista y aumentar los beneficios del paciente.

La validación de los resultados se hará comparando la similitud entre dos máscaras, una de referencia y otra de análisis. La máscara de referencia es la que se obtendrá mediante una aplicación Android. Esta aplicación permite seleccionar de forma manual los núcleos en las muestras y obtener una máscara donde aparecerán los núcleos segmentados que será considerada como imagen de referencia o ground truth. La imagen de análisis será la máscara que obtendremos al implementar cada una de las tres técnicas; *K - means*, *Watershed* con marcadores o el método Otsu. Estas máscaras son imágenes binarias que muestran los resultados de la segmentación, es decir, muestran los núcleos segmentados al implementar las diferentes técnicas. El tamaño de las máscaras seleccionadas para realizar el análisis cuantitativo es pequeño, ya que se tenía que hacer la selección manual de los núcleos y es una tarea muy costosa.

Los parámetros utilizados para realizar la validación serán los coeficientes de Jaccard (JC) y Dice (S), y la fracción de verdaderos positivos y de falsos positivos.

Los coeficientes de Jaccard (JC) y Dice (S), también llamados coeficientes de solape de volúmenes, son unos estimadores cuantitativos que describen el grado de asociación o semejanza entre dos elementos comparados, en nuestro caso las dos máscaras obtenidas.

$$JC = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \quad S = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}$$

Se considera A la máscara obtenida mediante las técnicas implementadas y B como la máscara resultado de la segmentación manual. Normalmente esta última máscara que sirve de referencia debería presentar una buena segmentación, en este caso, hay que destacar, de nuevo, que la segmentación no ha sido del todo eficiente debido a la dificultad a la hora de diferenciar los núcleos manualmente en las muestras. Las máscaras obtenidas a partir de esta aplicación se podrán visualizar superpuestas a la imagen original en los anexos del trabajo.

Los coeficientes estudiados varían desde 0 a 1, siendo el uno en ambos casos, la segmentación perfecta. Además, estos coeficientes están relacionados matemáticamente, a partir de uno se puede obtener el otro, mediante la ecuación:

$$S = \frac{2JC}{1+JC}$$

Por otro lado, se van a analizar la fracción de verdaderos positivos (TPF), que se calcula dividiendo los píxeles clasificados correctamente como núcleos (TP) por el número total de píxeles considerados núcleos. La fracción de falsos positivos (FPF), se obtiene dividiendo los píxeles mal clasificados como núcleos (FP) por el número total de píxeles que no son núcleos reales. El valor óptimo de TPF es uno, y el valor óptimo para FPF es cero.

$$TPF = \frac{TP}{\text{Píxeles núcleo}} \quad FPF = \frac{FP}{\text{Píxeles no núcleo}}$$

El análisis cuantitativo se ha realizado para siete muestras diferentes, dos pertenece a muestras histológicas de adenoma, dos a muestras cancerosas y, por último, tres son muestras de tejidos sanos. Es difícil realizar una comparativa entre este tipo de muestras por la diversidad que presentan, por lo que se van a analizar los parámetros presentados anteriormente.

4.2.1. Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante Kmeans.

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos al comparar las máscaras conseguidas con la técnica *Kmeans* y las máscaras resultantes de la segmentación manual.

En el Anexo A se muestran las imágenes obtenidas como resultado final para este método. Primero se muestra la imagen original RGB de la muestra, a continuación, se visualiza la máscara resultado de la segmentación manual (*ground truth*) superpuesta a la imagen original y por último se observa el resultado tras aplicar la técnica *Kmeans*, superpuesta a la imagen original de nuevo.

En este apartado, se va a realizar una tabla comparativa donde se calculará el valor de los coeficientes de Dice, de los coeficientes de Jaccard, los TPF y los FPF. Finalmente se hará la media de todos estos parámetros, estos valores nos servirán para comparar las técnicas implementadas.

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.6054	0.7542	0.7542	0.0955
Adenoma 2	0.5576	0.7160	0.7158	0.1412
Cáncer 1	0.6127	0.7599	0.7295	0.0852
Cáncer 2	0.5571	0.7156	0.6399	0.0857
Normal 1	0.6550	0.7915	0.8306	0.0470
Normal 2	0.6023	0.7518	0.7328	0.0517
Normal 3	0.6105	0.7582	0.7959	0.0698
MEDIA TOTAL	0.6001	0.7496	0.7426	0.0823

Tabla 1. Resultados de la técnica K- means

Se puede apreciar gracias a los resultados obtenidos que la segmentación ha sido correcta. Como se ha dicho anteriormente, una segmentación perfecta se conseguiría cuando los valores JC, DS y TPF fueran 1, y el valor de FPF fuera 0. Las imperfecciones producidas se deben, sobre todo, a la incapacidad del método implementado para segmentar los núcleos que están juntos. Este método sólo es capaz de segmentar los núcleos que se encuentran aislados, en la mayoría de los casos se tratan de linfocitos, que se encuentran en el nódulo linfático.

Los núcleos que están sobrepuestos y juntos los considera un único objeto, y en la mayoría de los casos este tipo de núcleos son los que corresponden a los enterocitos, las células propias de colon. Desgraciadamente, estos son los núcleos que más nos interesa segmentar ya que es su morfología y distribución lo que indica si el tejido presenta una anomalía o es sano, por lo que este método no será el más eficiente en la práctica para realizar la segmentación perfecta de este tipo de imágenes, sin embargo consigue obtener resultados correctos de la segmentación nuclear.

4.2.2. Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante la técnica Watershed con marcadores

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos mediante la técnica *Watershed* con marcadores y las máscaras resultantes de la segmentación manual.

En el Anexo B se muestran las imágenes obtenidas como resultado final para este método. Primero aparece la imagen original RGB de la muestra, a continuación, se visualiza la máscara resultante de la segmentación manual (*ground truth*) superpuesta a la imagen original. Al visualizar los resultados de cada uno de los pasos de la técnica de *Watershed* con marcadores, observamos que la máscara que muestra los marcadores internos podría servirnos como máscara de la segmentación nuclear para compararla con la imagen *ground*

truth , por lo que la siguiente imagen que visualizamos es dicha máscara sobrepuesta sobre la imagen original. Por último, se muestra el resultado final de la segmentación *Watershed* sobrepuesta sobre la imagen original.

La técnica de segmentación *Watershed* ha sido implementada para dos imágenes de grises diferente, la componente hematoxilina y el canal Y o luminancia, por lo que se van a analizar los resultados para ambas imágenes.

En este apartado, se va a realizar una tabla comparativa donde se calculará el valor de los coeficientes de Dice, de los coeficientes de *Jaccard*, los TPF y los FPF para cada imagen. Finalmente se hará la media de todos estos parámetros, estos valores nos servirán para comparar las técnicas implementadas en los dos tipos de imágenes

Canal Y o Luminancia

- Marcadores internos

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.3985	0.5699	0.4513	0.0328
Adenoma 2	0.4410	0.6121	0.4766	0.0402
Cáncer 1	0.4302	0.6016	0.4660	0.0372
Cáncer 2	0.4552	0.6256	0.4848	0.0375
Normal 1	0.4164	0.5880	0.4674	0.0214
Normal 2	0.1656	0.2842	0.1806	0.0215
Normal 3	0.4052	0.5767	0.4590	0.0305
MEDIA TOTAL	0.4195	0.5907	0.4619	0.0319

Tabla 2. Resultados para los marcadores internos de la transformada Watershed para el canal luminancia

En este caso, como cabe esperar, los resultados de nuestro algoritmo no son demasiado buenos ya que es un paso intermedio de la técnica que está siendo implementada. Sin embargo, observamos que el valor de FPF es muy próximo cero, esto quiere decir que el número de falsos positivos es muy bajo, es decir, que existen muy poco píxeles clasificados como núcleos que no lo sean realmente. Uno de los objetivos de esta técnica es conseguir un marcador internos por cada objeto de interés, el número mínimo de falsos positivos nos indica que la mayoría de los marcadores internos realmente están bien colocados en un objeto de interés. Por otro lado, el bajo valor del parámetro TPF también puede indicarnos que existen muchos núcleos que no han sido marcados por un marcador interno.

- *Watershed*

Watershed	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.3520	0.5208	0.6114	0.1821
Adenoma 2	0.4416	0.6126	0.5415	0.1127
Cáncer 1	0.4987	0.6655	0.6717	0.1552
Cáncer 2	0.5282	0.6913	0.7507	0.2429
Normal 1	0.4329	0.6042	0.7219	0.1169
Normal 2	0.3105	0.4738	0.4145	0.0799
Normal 3	0.4675	0.6371	0.7215	0.1250
MEDIA TOTAL	0.4331	0.6001	0.6333	0.1450

Tabla 3. Resultados de la transformada *Watershed* para el canal luminancia

Al analizar los resultados obtenidos tras finalizar la segmentación *Watershed* se aprecia que estos sólo son un poco mejores que los anteriores. La técnica *Watershed* depende, a parte de los marcadores internos, de la imagen gradiente y de los marcadores externos, por lo que la mínima mejoría de los resultados podría ser producida por errores cometidos en la obtención de estas dos imágenes.

Componente hematoxilina

- **Marcadores internos**

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.2161	0.3554	0.2433	0.0311
Adenoma 2	0.1478	0.2576	0.1552	0.0249
Cáncer 1	0.1502	0.2612	0.1580	0.0233
Cáncer 2	0.2789	0.4362	0.2939	0.0308
Normal 1	0.1288	0.2282	0.1491	0.0276
Normal 2	0.1584	0.2735	0.1727	0.0215
Normal 3	0.1711	0.2922	0.1935	0.0301
MEDIA TOTAL	0.1788	0.3006	0.1951	0.0270

Tabla 4. Resultados para los marcadores internos de la transformada *Watershed* para la componente hematoxilina

- Watershed completa

Watershed	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 2	0.2955	0.4562	0.3749	0.1339
Cáncer 2	0.4061	0.5777	0.5217	0.1641
Normal 1	0.2335	0.3785	0.3789	0.1091
Normal 2	0.3318	0.4983	0.4725	0.1011
Normal 3	0.3258	0.4915	0.5401	0.1513
MEDIA TOTAL	0.3239	0.4804	0.4576	0.1319

Tabla 5. Resultados de la transformada Watershed para la componente hematoxilina

Oservamos, que para la componente hematoxilina, los resultados obtenidos son peores que los obtenidos en el caso anterior, tanto en el caso de la máscara de los marcadores internos como la máscara resultante de la transformada Watershed completa.

4.2.3. Validación cuantitativa de los resultados obtenidos mediante el método Otsu.

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos mediante el método Otsu binivel y multinivel y las máscaras resultantes de la segmentación manual

En el Anexo C se muestran las imágenes obtenidas del resultado final para este método. Primero se muestra la imagen original RGB de la muestra, a continuación, se visualiza la máscara resultante de la segmentación manual (*ground truth*) superpuesta a la imagen original. La tercera imagen que aparece para cada muestra es el resultado de la sobreposición de la imagen original y la máscara resultado del método Otsu binivel. Finalmente, se muestra la máscara resultado del método Otsu multinivel sobre la imagen original.

La técnica del método Otsu ha sido implementada para dos imágenes de grises diferentes, la componente hematoxilina y el canal Y o luminancia, por lo que se van a analizar los resultados para ambas imágenes.

En este apartado, se va a realizar una tabla comparativa donde se calculará el valor de los coeficientes de Dice, de los coeficientes de *Jaccard*, los TPF y los FPF para cada imagen. Finalmente se hará la media de todos estos parámetros, estos valores nos servirán para comparar las técnicas implementadas en los dos tipos de imágenes

✚ Canal Y o luminancia

- Método Otsu binivel

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.3529	0.5217	0.9866	0.4439
Adenoma 2	0.4588	0.6290	0.9380	0.5202
Cáncer 1	0.5895	0.7418	0.9581	0.2795
Cáncer 2	0.6310	0.7738	0.9001	0.2459
Normal 1	0.3237	0.4891	0.9901	0.3605
Normal 2	0.4737	0.6429	0.9580	0.2438
Normal 3	0.4172	0.5888	0.9871	0.3143
MEDIA	0.4638	0.6266	0.9597	0.3440

Tabla 6. Resultados obtenidos del método Otsu binivel para el canal de luminancia

- Método Otsu multinivel

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.5876	0.7403	0.8611	0.1150
Adenoma 2	0.5638	0.7210	0.7423	0.1577
Cáncer 1	0.6559	0.7922	0.8370	0.1235
Cáncer 2	0.5935	0.7449	0.6975	0.1001
Normal 1	0.6563	0.7925	0.8614	0.0547
Normal 2	0.6153	0.7619	0.7803	0.0639
Normal 3	0.6167	0.7629	0.8403	0.0834
MEDIA	0.6127	0.7594	0.8028	0.0998

Tabla 7. Resultados obtenidos del método Otsu multinivel para el canal de luminancia

Tras analizar los resultados, podemos afirmar que aunque la segmentación conseguida no es perfecta pero esta técnica es una de las que mejores resultados obtiene. Como es de esperar, obtiene mejores resultados el método Otsu multinivel, ya que esta técnica divide la imagen en cuatro clases diferentes, por lo que es más precisa. Cabe destacar para ambas técnicas, el valor de TPF, ya que es bastante bueno. Este parámetro nos indica que los píxeles que son clasificados como núcleos al comparar ambas máscaras son píxeles de núcleos reales, que sea tan próximo a uno indica que la mayoría de los píxeles de núcleos reales de la imagen están clasificados como núcleos. En el método Otsu binivel observamos que el valor de FPF es bastante alto, por lo que el número de falsos positivos obtenidos tras la segmentación es alto, es decir, existen píxeles clasificados como núcleos que realmente no son núcleos.

Componente hematoxilina

- Método Otsu binivel

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.4506	0.6213	0.9587	0.2785
Adenoma 2	0.4726	0.6419	0.9361	0.4884
Cáncer 1	0.6383	0.7792	0.9378	0.2099
Cáncer 2	0.6513	0.7888	0.9196	0.2375
Normal 1	0.5385	0.7000	0.9199	0.1240
Normal 2	0.5676	0.7242	0.9165	0.1466
Normal 3	0.5377	0.6994	0.9380	0.1713
MEDIA TOTAL	0.5509	0.7078	0.9324	0.2366

Tabla 8. Resultados obtenidos del método Otsu binivel para la componente de la hematoxilina

- Método Otsu multinivel

	JC	DS	TPF	FPF
Adenoma 1	0.6241	0.7685	0.7914	0.0663
Adenoma 2	0.5904	0.7424	0.7854	0.1645
Cáncer 1	0.6415	0.7816	0.7815	0.0976
Cáncer 2	0.6449	0.7841	0.7647	0.1071
Normal 1	0.5590	0.7171	0.6139	0.0172
Normal 2	0.6336	0.7757	0.7768	0.0539
Normal 3	0.6269	0.7707	0.7980	0.0628
MEDIA TOTAL	0.6172	0.7628	0.7588	0.0813

Tabla 9. Resultados obtenidos del método Otsu multinivel para la componente hematoxilina

Los resultados obtenidos al realizar la segmentación mediante el método Otsu en la imagen de la componente hematoxilina son parecidos a los obtenidos para la componente de la luminancia, aunque estos son un poco peores para el primer caso. Este empeoramiento es debido a la diferencia entre las imágenes de grises correspondientes a cada canal. En la componente de la hematoxilina existe mayor diferencia entre los niveles de gris de los objetos y del fondo, las clases en las que se divide la imagen se perciben mejor a simple vista.

Como se ha dicho a lo largo de trabajo, las técnicas de umbralización no consiguen realizar una segmentación perfecta de manera aislada, por lo que se puede afirmar que se han obtenidos buenos resultados para esta técnica. Este método consigue realizar una segmentación correcta de manera sencilla, es por esta razón por la cual se sigue utilizando en la actualidad, aunque normalmente, se suele combinar con otras técnicas para mejorar los resultados y conseguir una segmentación perfecta

4.2.4. Comparativa de los métodos

Una vez que se han analizado todos los métodos por separado se va a realizar una tabla comparativa de todos ellos.

	JC	DS	TPF	FPF
<i>K - means</i>	0.6001	0.7496	0.7426	0.0823
Marcadores internos (Luminancia)	0.4195	0.5907	0.4619	0.0319
<i>Watershed</i> (Luminancia)	0.2452	0.3901	0.2791	0.0425
Marcadores internos (Hematoxilina)	0.1788	0.3006	0.1951	0.0270
<i>Watershed</i> (Hematoxilina)	0.3239	0.4804	0.4576	0.1319
Otsu binivel (luminancia)	0.4638	0.6266	0.9597	0.3440
Otsu multinivel (luminancia)	0.6127	0.7594	0.8028	0.0998
Otsu binivel (Hematoxilina)	0.5509	0.7078	0.9324	0.2366
Otsu multinivel (Hematoxilina)	0.6172	0.7628	0.7588	0.0813

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenidos de los métodos implementados

Al realizar la comparación entre los métodos hay que tener en cuenta las diferencias que presentan las imágenes en contenido, es decir, el tamaño y la morfología de los núcleos son distintos dependiendo a qué tipo de muestra pertenezcan. Además hay que considerar, como se ha dicho anteriormente, la dificultad que conlleva realizar la segmentación manual perfecta ya que es un proceso costoso y laborioso. El resultado de esta segmentación manual son las máscaras que se utilizan como modelo en la comparación al realizar el análisis cuantitativo y posiblemente existan en estas máscaras píxeles clasificados como núcleos que no lo sean y viceversa.

Tras observar los parámetros estadísticos podemos afirmar que ninguno de los métodos implementados ha llegado a realizar una segmentación perfecta, aunque la calidad de la segmentación conseguida por alguna de las técnicas implementadas se mantiene en niveles aceptables. El método que mejor ha realizado la segmentación se trata del método Otsu multinivel, tanto en la en la componente hematoxilina como en el canal de luminancia. El método Otsu multinivel es más preciso que el binivel debido a que el primero divide la imagen en varias clases, elegidas previamente por el usuario al observar la imagen, por lo que los resultados son mejores.

El método Otsu binivel también ha conseguido obtener resultados aceptables. Sin embargo el valor de FPF es el mayor para ambos casos, el canal luminancia y la componente hematoxilina, esto es debido a que esta técnica divide la imagen segmentada en dos partes, los píxeles pueden ser clasificados como núcleos o como fondo, por lo que habrá muchos píxeles que serán clasificados como núcleos cuando realmente no lo son y forman parte del fondo.

Esto también hace que se consiga un valor muy bueno para el parámetro TPF, ya que la mayoría de los píxeles que son clasificados como núcleos son núcleos reales.

El método Kmeans tampoco ha conseguido realizar la segmentación perfecta, pero ha obtenido unos resultados aceptables. Esta técnica, como se ha dicho a lo largo del trabajo, utiliza la información de color que aporta la imagen RGB, no solo se centra en la información que aporta la intensidad de la imagen.

Por último, la técnica que peores resultados ha obtenido se trata de la transformada *Watershed*, tanto para la componente de la hematoxilina, como para el canal de luminancia. La transformada *Watershed* se trataba de la técnica más compleja a la hora de implementar, y de la que se esperaba obtener mejores resultados, pero su complejidad ha conseguido que los resultados no sean los esperados. Como se ha dicho en el apartado 4.3.2. la transformada *Watershed* depende de diferentes imágenes, por lo que estos malos resultados se pueden deber a la mala obtención de éstas.

Capítulo 5.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

La segmentación nuclear, como se ha ido comentado a lo largo del trabajo, es un proceso muy complejo. Conseguir una segmentación perfecta de una muestra histológica requiere de un gran trabajo y de la correcta combinación de diferentes técnicas.

A pesar de no haber conseguido algoritmos aislados muy eficientes, en este proyecto se ha realizado un acercamiento a la segmentación nuclear. Para ello se han implementado diferentes técnicas de manera aislada y se han utilizado para segmentar diferentes tipos de imágenes, observando los resultados en cada caso. Tras realizar el análisis de la segmentación hemos podido comprobar diferentes aspectos:

- Las técnicas de umbralización , en nuestro caso se ha implementado el método Otsu binivel y multinivel, son métodos sencillos que logran conseguir una segmentación correcta, no de gran calidad, por lo que esta técnica sería una muy buena opción si la combináramos con otra.
- Las técnicas de agrupamiento , *K-means*, ha conseguido un resultado parecido a las técnicas mencionadas anteriormente. En este caso no se utiliza la información que aporta un único canal, si no que se emplea la información de color que da la imagen RGB.
- Por último, la técnica más complicada y robusta que se ha implementado se trata de la transformada *Watershed*. Debido a su complejidad, es más difícil conseguir buenos resultados ya que depende de un mayor número de parámetros, y además, estos son más difíciles de obtener. La mala obtención de estos ha producido que los peores resultados conseguidos hayan sido con esta técnica, aunque se esperaba que fuera la más eficiente.

Por último , debido a los resultados obtenidos y a las limitaciones de las técnicas implementadas se considera que queda mucho por avanzar en esta línea de trabajo, y se proponen las siguientes líneas futuras para conseguir una mejor segmentación y una mejora de las técnicas:

- Tratar las imágenes antes de comenzar con el proceso de segmentación. Las imágenes que han sido el objeto de estudio de este proyecto son muy heterogéneas, por lo que se podrían plantear diferentes métodos de preprocesado de estas para obtener mejores resultados. En nuestro caso solamente se han utilizado operaciones morfológicas para realizar el preprocesado de las imágenes en escalas de grises.
- El número de agrupaciones en el método Kmeans se introduce manualmente. Sería conveniente explorar mecanismos que permitan la obtención automática y óptimo de este parámetro.
- Utilizar la combinación de diferentes técnicas, partiendo de las obtenidas, con el objetivo de conseguir una mejor segmentación. Las técnicas de agrupamiento y de umbralización son técnicas simples que podrían ser parte del proceso de

segmentación, no ser utilizadas como método aislado ya que, como hemos observado, la segmentación es correcta , pero no perfecta.

- Estudiar diferentes propiedades de la imagen. En nuestro caso hemos estudiado la mayoría de las veces la luminancia de los píxeles. Solo con la técnica *K-means* hemos utilizado la información que nos aporta una imagen RGB. Las imágenes tienen un gran número de características que pueden ser estudiadas para conseguir una mejor segmentación.
- Mejorar el algoritmo de la técnica de la transformada *Watershed*, para conseguir los objetivos esperados. Como se ha dicho anteriormente, posiblemente el problema en esta técnica está en la obtención de los marcadores externos o la imagen gradiente. Por ejemplo para obtener los marcadores internos se podría usar el resultado del método Otsu multinivel para comprobar si nos daría mejores resultados.

Capítulo 6

Presupuesto del proyecto

6. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

El presente presupuesto hace referencia al proyecto de implementación de técnicas de segmentación nuclear de imágenes de muestras histológicas de colon que ha sido explicado anteriormente.

En este proyecto no es necesaria la utilización de un gran cantidad de material, ya que la parte más importante de este tipo de proyectos es el trabajo que realiza el programador por lo que la parte principal del presupuesto sería destinada a pagar el coste de las horas empleadas por el trabajador para realizar el proyecto y los costes indirectos de este.

El presupuesto se podría desglosar en dos partes, la primera parte estaría destinada a la obtención de las imágenes de las muestras histológicas, objeto de estudio de este proyecto, sin embargo el punto de vista seleccionado para realizar el presupuesto es considerar nuestro proyecto como un programa informático original realizado a medida que responde a las necesidades concretas de un determinado cliente, de esta manera es el cliente el que nos proporcionará las imágenes, por lo que el ingeniero biomédico no tiene que tener en cuenta este gasto. Teniendo en cuenta este punto de vista el presupuesto va a dividirse en costes directos y costes indirectos

6.1. Costes directos

Los costes directos son los gastos de personal, es decir incluye el dinero que irá destinado a pagar el salario del trabajador, este es el principal protagonista del proyecto, ya que el futuro de este depende de su ingenio y profesionalidad. Dentro del salario del trabajador se incluirán todos los gastos que tendrá el profesional. Se ha enfocado al trabajador como un ingeniero biomédico que trabaja de forma independiente, por lo que no depende de ninguna empresa ni institución, trabaja de forma privada.

COSTES DIRECTOS					
COSTES DE PERSONAL					
Perfil del trabajador	Tareas a realizar	Número de trabajadores	Coste unitario	Número de horas del proyecto	Coste total personal
Ingeniero biomédico	Implementación y comparación de diferentes técnicas para realizar la segmentación nuclear en muestras histológicas de colon	1	50€/hora	300 horas	15.000€

Tabla 11. .Costes directos totales

6.2. Costes indirectos

Los costes indirectos a su vez podrían desglosarse en dos tipos, los costes indirectos del proyecto y los costes indirectos generales de la empresa. Como hemos dicho en nuestro caso, hemos considerado que el proyecto es realizado por un ingeniero biomédico que trabaje de forma individual y sea autónomo, de esta manera los costes indirectos generales de la empresa no existen.

Por lo tanto, los costes indirectos del proyecto incluirán los sistemas informáticos utilizados para realizar el proyecto, tanto el hardware como el software.

COSTES INDIRECTOS				
COSTES DE HARDWARE				
Dispositivo	Coste total del equipo	Período de amortización	Período de uso (durante el proyecto)	Coste total por hardware
Toshiba tecra z40 - c- 103	1572,00 €	4 años	6 meses	196,5 €
COSTES DE SOFTWARE				
Programas	Coste de la licencia (para un año)	Número de licencias	Período de uso (durante el proyecto)	Coste total por software
Matlab R2016a	2000,00 €	1	6 meses	1000,00 €
Microsoft Office Profesional 2010	69,99 €	1	6 meses	35,00 €
Microsoft Windows 10	73,81 €	1	6 meses	36,905 €
COSTES DE SOFTWARE TOTAL				1071.905 €
COSTES TOTALES INDIRECTOS (SOFTWARE + HARDWARE)				1268.405€

Tabla 12. Costes indirectos totales

Hay que tener en cuenta a la hora de obtener los costes indirectos que las licencias de los sistemas de software utilizados tiene un precio bastante elevado, al igual que el hardware empleado por lo que los gastos de estos productos no pueden ser cubiertos en su totalidad por el cliente, por esta razón hay que calcular el tiempo que van a ser utilizados en este proyecto y calcular el dinero que costarían solamente su uso para este trabajo.

Por último, vamos a realizar una tabla resumen de los gastos directos e indirectos para poder ver cuál será el presupuesto final del proyecto.

COSTES DIRECTOS	15.000 €
COSTES INDIRECTOS (Costes software + costes hardware)	1268. 405 €
COSTE TOTAL DEL PROYECTO	16268. 405 €

Tabla 13. Coste total del proyecto

A priori el resultado del presupuesto total puede resultar excesivo, no obstante hay que tener en cuenta que el proyecto se ha realizado bajo el pedido de un cliente, no se ha realizado con vistas a una posible comercialización. Si las condiciones del proyecto hubieran cambiado en este ámbito, el presupuesto hubiera sido diferente. Por ejemplo, si no fuera un pedido exclusivo por parte de un cliente o si el ingeniero biomédico no actuará de forma independiente y trabajara en una empresa pública, el coste total sería mucho menor.

Capítulo 7

Referencias

7. REFERENCIAS

- [1] Aecc. (diciembre 16, 2014). v. v, de Aecc Sitio web: Anatomía del colon o intestino grueso. , a partir de <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDECOLON/Paginas/anatomia.asp>
- [2] Atlas de Histología Vegetal y Animal. ,a partir de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-grueso.php>
- [3] Histología - Fundació Olga Torres., a partir de http://www.fundacionolgatorres.org/cancer_colorrectal/metodos_diagnosticos/histologia/
- [4] M. Megías Pacheco. Tipos celulares. Enterocitos.. 2, abril 2016, de Universidad de Vigo Sitio web: <http://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/enterocito.php>
- [5] PATOLOGIA DEL INTESTINO, a partir de http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/anatomiapatologica/04digestivo/4intestino_2.html
- [6] Cáncer de colon. [pdqCancerInfoSummary]., a partir de <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/tratamiento-colorrectal-pdq>
- [7] T. K. (2009, diciembre 2). Histopatología de la Adenocarcinoma, a partir de [http://www.news-medical.net/health/Adenocarcinoma-Histopathology-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Adenocarcinoma-Histopathology-(Spanish).aspx)
- [8] Biopsia: MedlinePlus enciclopedia médica, a partir de <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003416.htm>

- [9] Segura L., *Curso para técnicos de anatomía patológica, fijación y procesamiento de las muestras*. Departamento Anatomía Patológica HH.UU. Virgen del Rocío., a partir de http://www.seapcongresos.com/2011/SEAP/19_mayo_jueves/Anfiteatro/08.00/Dolor_es_Isabel.pdf
- [10] Técnicas Hitológicas. 5- Tinción: Tinciones generales. Atlas de Histología Vegetal y Animal , a partir de <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>
- [11] H. Irshad, A.Veillard, L.Roux & D. Racoceanu. (julio, 2014). Methods for Nuclei Detection, Segmentation, and Classification in Digital Histopathology: A Review— Current Status and Future Potential. IEEE Review, Volumen 7, 18.
- [12] Cabanilles Mengual, P (Mayo,2014), *Segmentación automática del cerebro mediante técnicas de tratamiento digital de imagen*. Proyecto Final de Carrera. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia.
- [13] SEGMENTACIÓN DE IMÁGENES POR NIVELES DE GRISES Y ETIQUETADO DE IMÁGENES BINARIAS. , a partir de <https://es.scribd.com/doc/95955221/SEGMENTACION-DE-IMAGENES-POR-NIVELES-DE-GRISES-Y-ETIQUETADO-DE-IMAGENES-BINARIAS>
- [14] Moyano García – Cuevas, J.L. (Marzo 2012). *Segmentación 3D del hígado a partir de imágenes de resonancia magnética basada en el algoritmo Support Vector Machine*. Trabajo Fin de Máster MUIT-TINC. Extermadura, Escuela Politécnica , Universidad de Extermadura.
- [15] J.E. Ortuño, N. Malpica, S. Reig, R. Martínez, M. Desco & A. Santos. (2001). Algoritmo Morfológico de Segmentación de Imágenes de Resonancia Magnética Normales Ponderadas en T1 . Caseib, 4.
- [16] Martínez Samboal, M. (Junio 2012). *Detección de células cancerosas en imágenes de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)*. Proyecto Fin de Carrera. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid, Escuela Politécnica Superior.

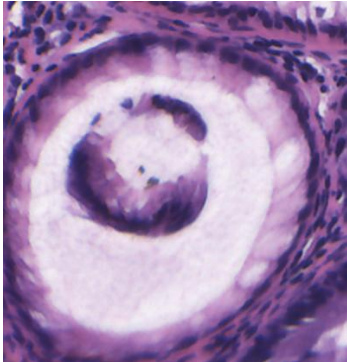
- [17] R. C. Gonzalez, R. E. Woods & S. L. Eddins. (2004). Digital Image Processing using Matlab. New Jersey: Pearson, Prentice Hall.
- [18] *Tratamiento de imágenes en Matlab*; http://profesores.fi-b.unam.mx/maixx/Biblioteca/Librero_Telecom/Libro_Matlab/Imagenes/Imagenes.pdf
- [19] Arnout C. Ruifrok, & Dennis A. Johnston,. . (2001, Agosto). Quantification of histochemical staining by color deconvolution . Pubmed, 2, 21.
- [20] López Espejo, Iván (2016, 23 febrero), *Método Otsu (Segmentación por umbralización)*, .Recuperado de: <http://myslide.es/documents/metodo-de-Otsu-segmentacion-por-umbralizacion.html>
- [21] Tema5_SegmentacionRegionesUmbralizacion.pdf. (2015-2016). Recuperado a partir de http://asignatura.us.es/imagendigital/Tema5_SegmentacionRegionesUmbralizacion.pdf
- [22] S. W. Yoon, «Medical endoscopic image segmentation using snakes,» IEICE Trans Inf Syst, vol. 87, nº 3, pp. 785-789, 2004.
- [23] Serra, J. (1982). Image Analysis and Mathematical Morphology, volume I. Ac. Press, London.
- [24] I. Pitas, Digital Image Processing Algorithms and Applications. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1st ed., 2000.
- [25] A. Štajduhar , « Automatic detection of neurons in histological images of human brain». Croatian Institute for Brain Research, School of Medicine, University of Zagreb.
- [26] A. Vahadane y A. Sethi. « Towards Generalized Nuclear Segmentation in Histological Images». 2013

ANEXO A

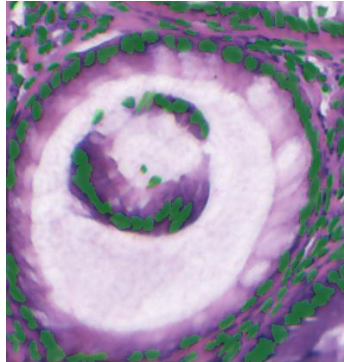
RESULTADOS PARA LA SEGMENTACIÓN CON LA TÉCNICA K - MEANS

✚ Muestra 1. Adenoma 1.

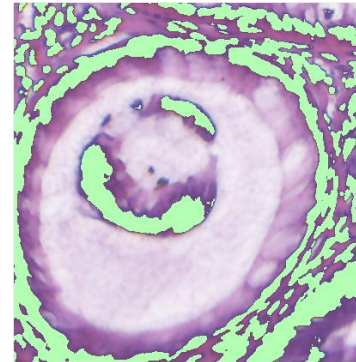
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

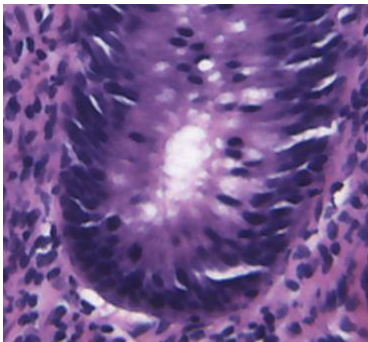


MÁSCARA K-MEANS

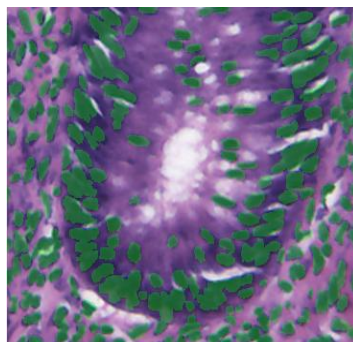


✚ Muestra 2. Adenoma 2.

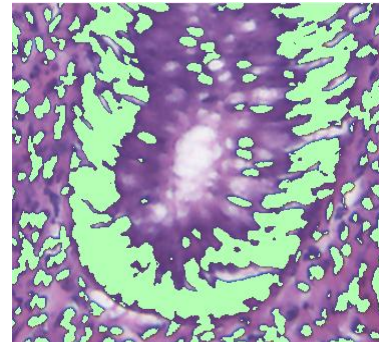
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

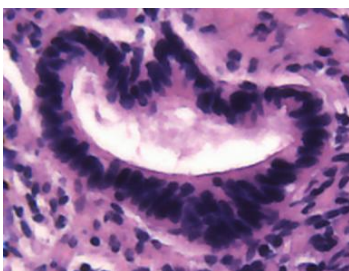


MÁSCARA K-MEANS

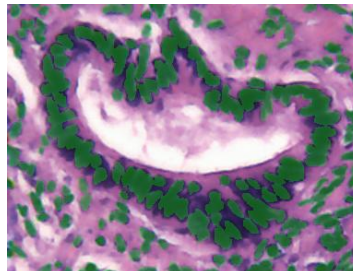


✚ Muestra 2. Cáncer 1.

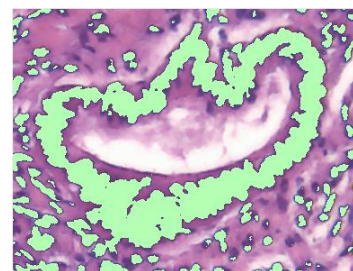
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA K-MEANS




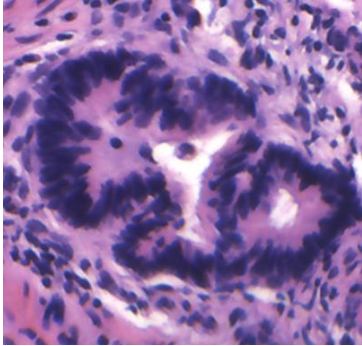
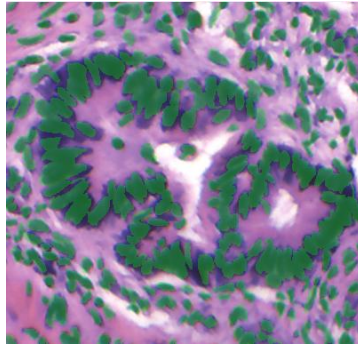
 **Muestra 4. Cáncer 2.**

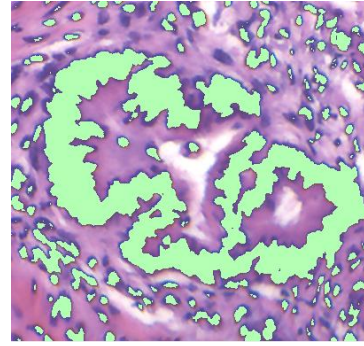
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA K-MEANS




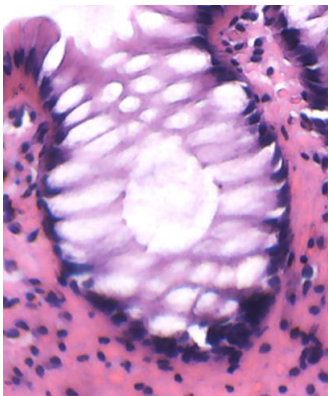
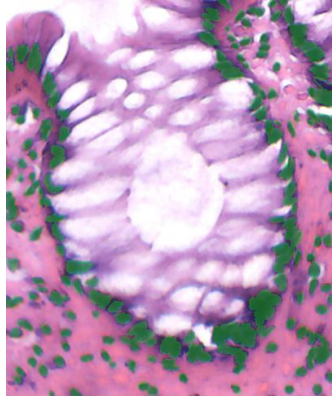
 **Muestra 5. Normal 1.**

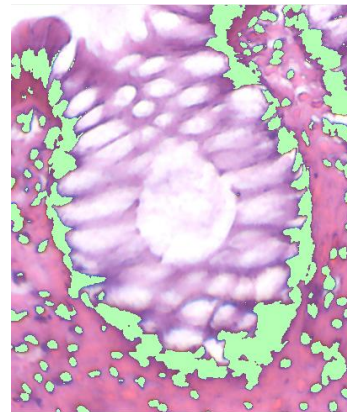
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

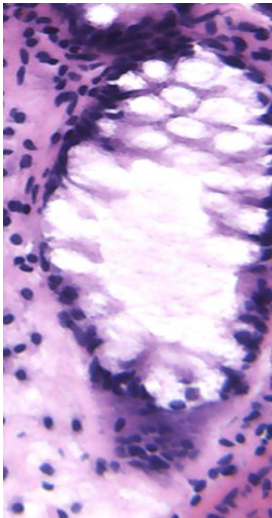


MÁSCARA K-MEANS

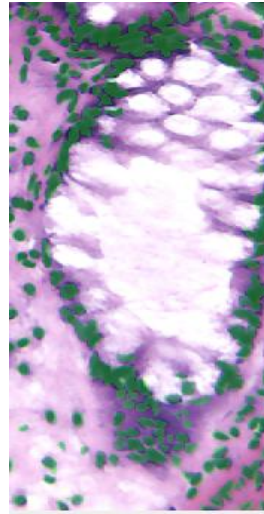


✚ Muestra 6. Normal 2.

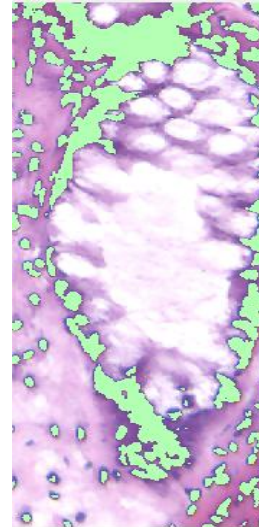
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

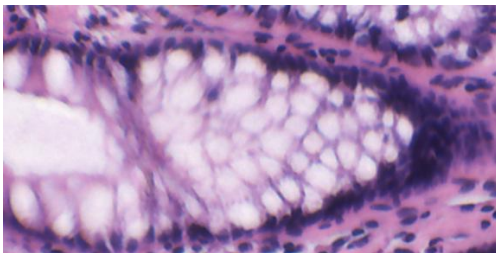


MÁSCARA K-MEANS

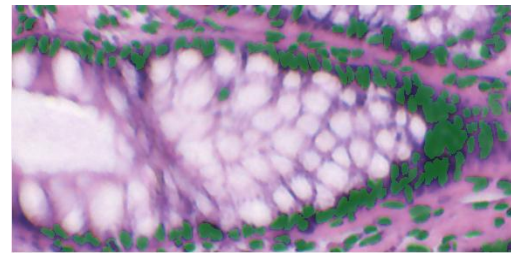


✚ Muestra 7. Normal 3.

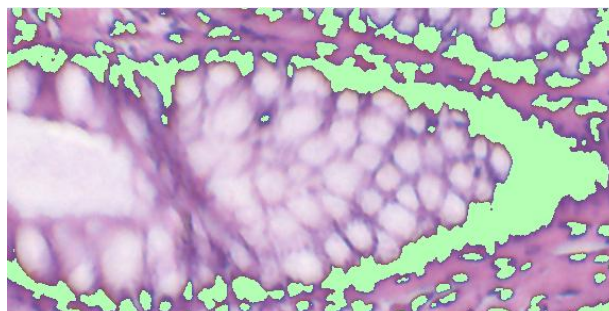
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA K - MEANS



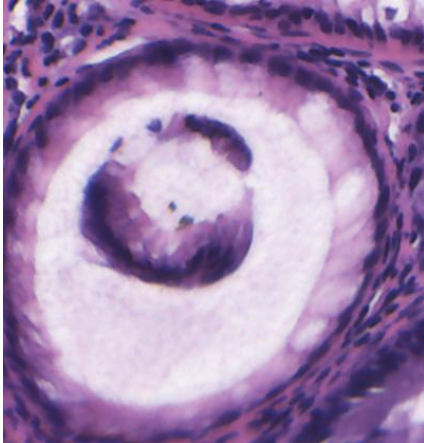
ANEXO B

RESULTADOS PARA LA SEGMENTACIÓN CON LA TÉCNICA WATERSHED

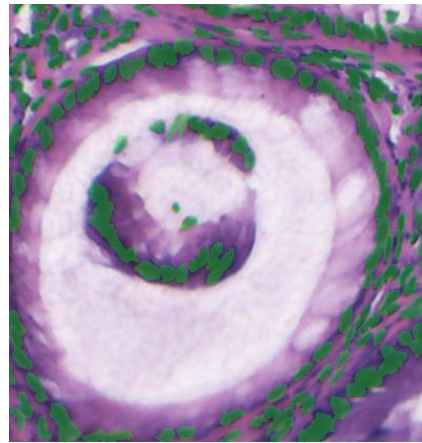
1. CANAL Y O LUMINANCIA

✚ Muestra 1. Adenoma 1.

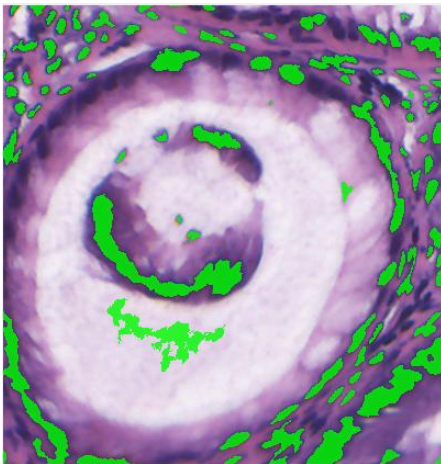
IMAGEN ORIGINAL



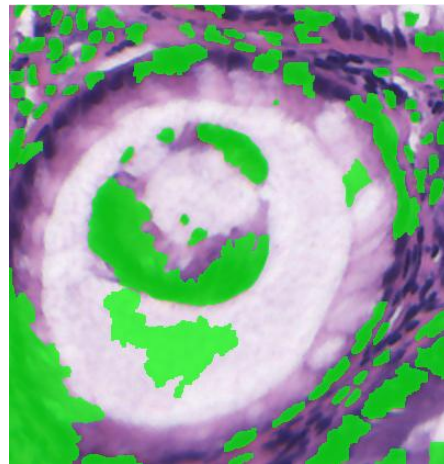
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

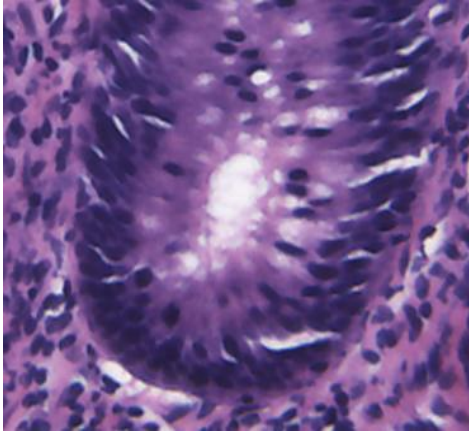


MÁSCARA WATERSHED FINAL

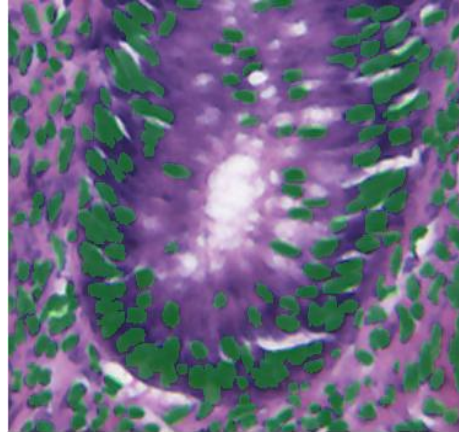


Muestra 2. Adenoma 2

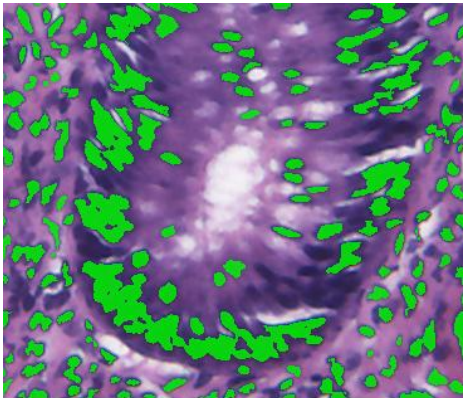
IMAGEN ORIGINAL



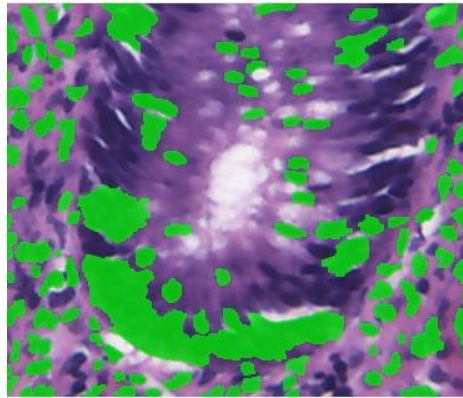
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

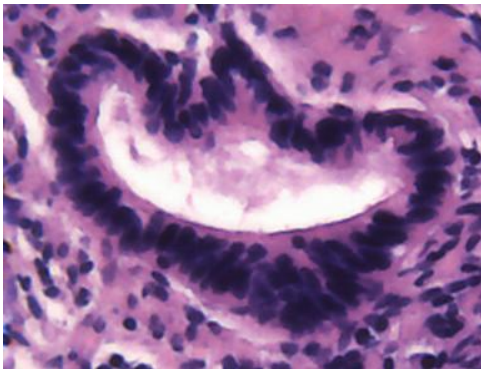


MÁSCARA WATERSHED FINAL

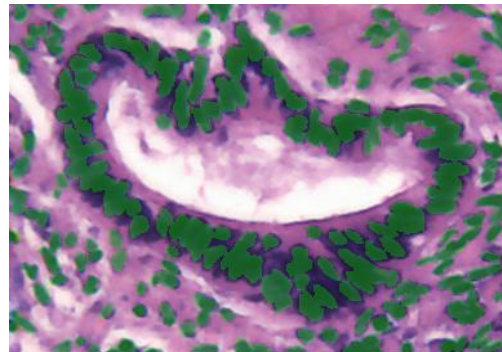


Muestra 3. Cáncer 1.

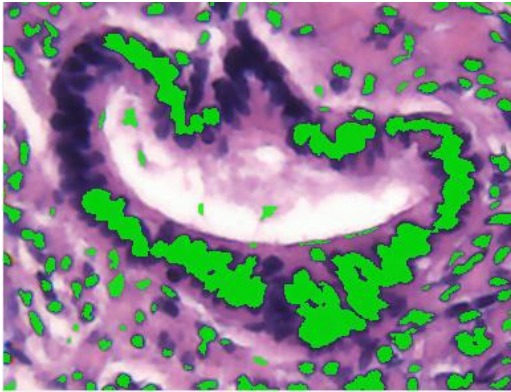
IMAGEN ORIGINAL



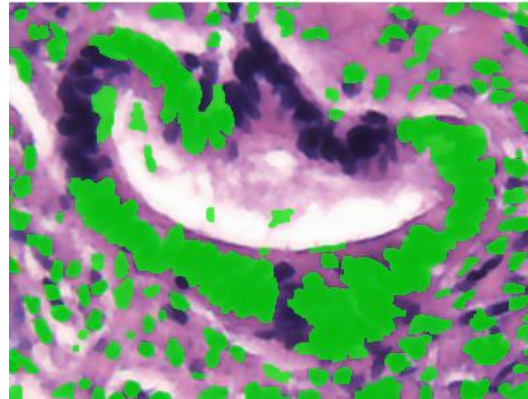
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

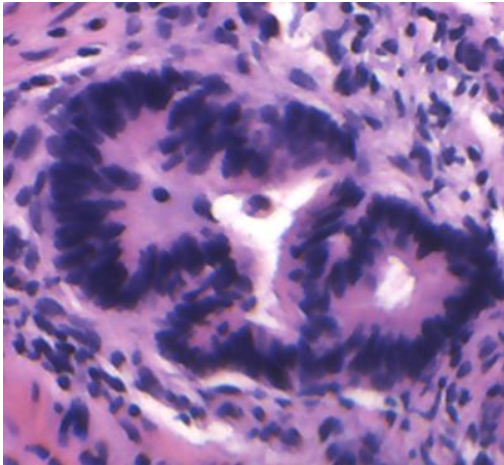


MÁSCARA WATERSHED FINAL

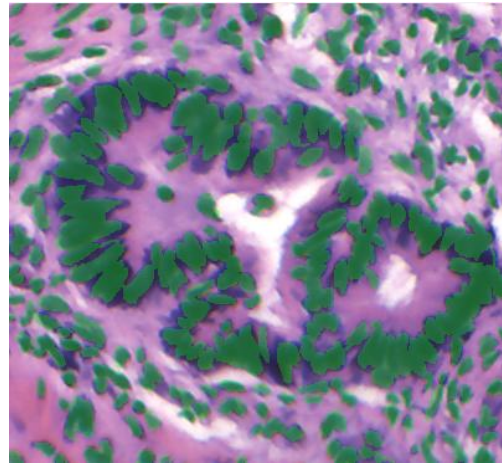


✚ Muestra 4. Cáncer 2.

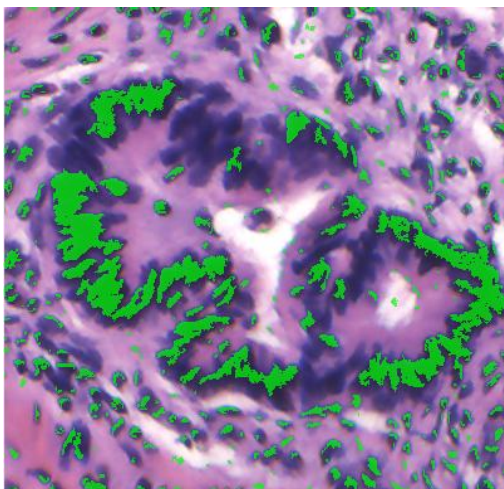
IMAGEN ORIGINAL



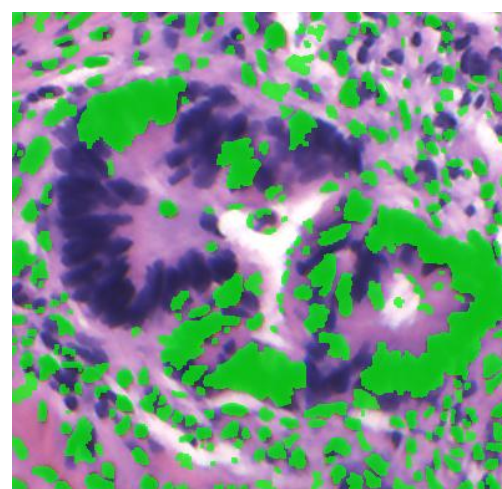
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

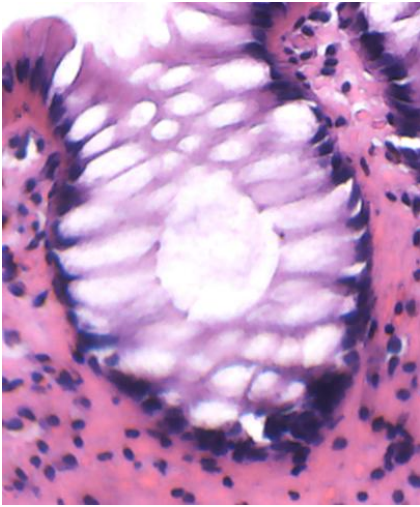


MÁSCARA WATERSHED FINAL

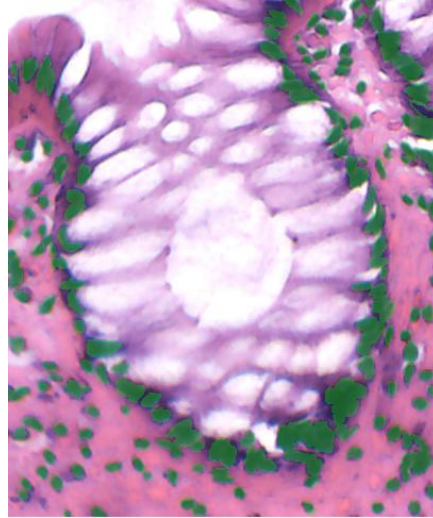


✚ Muestra 5. Normal 1.

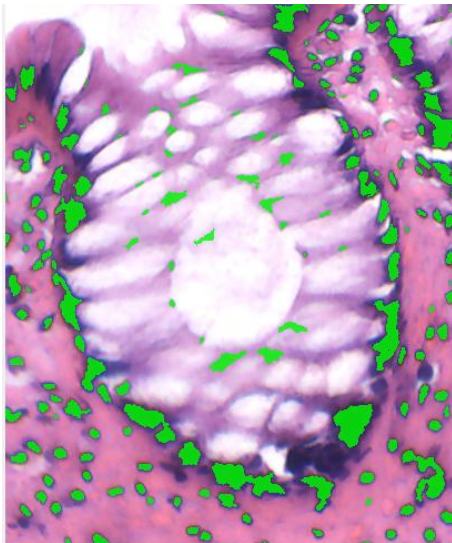
IMAGEN ORIGINAL



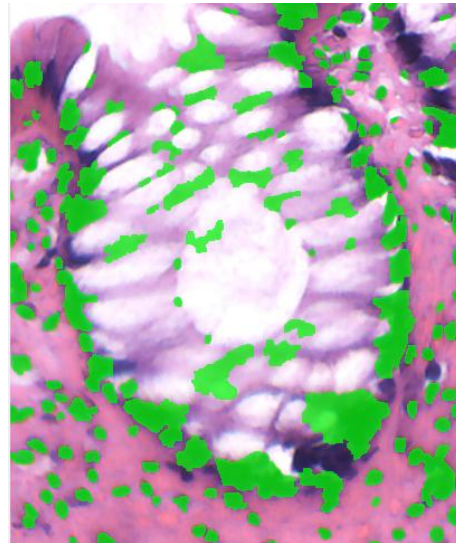
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

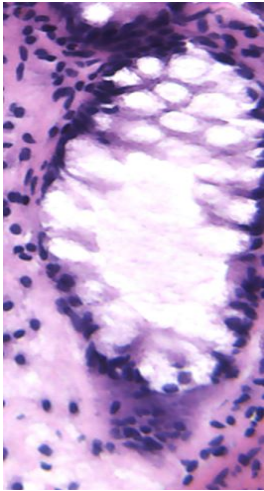


MÁSCARA WATERSHED FINAL

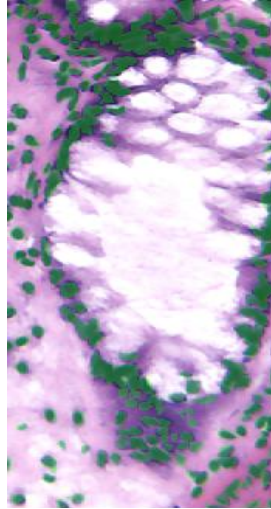


✚ Muestra 6. Normal 2.

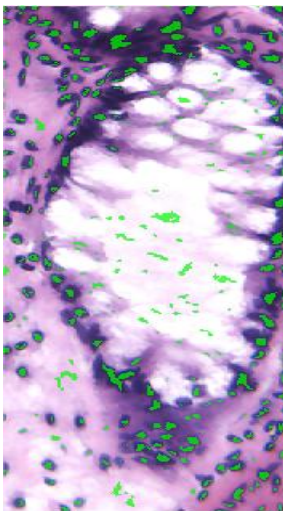
IMAGEN ORIGINAL



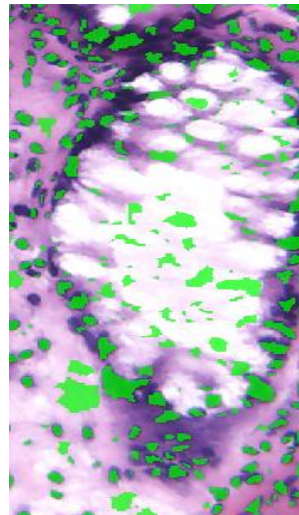
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

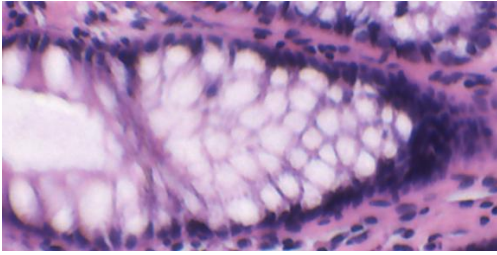


MÁSCARA WATERSHED FINAL

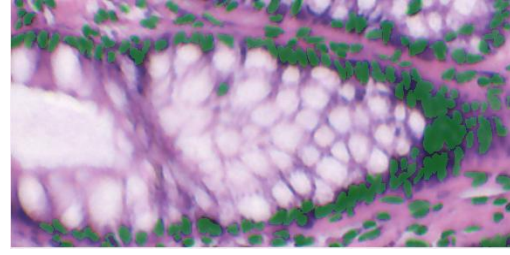


Muestra 7. Normal 3.

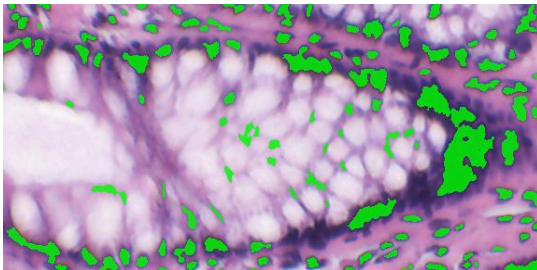
IMAGEN ORIGINAL



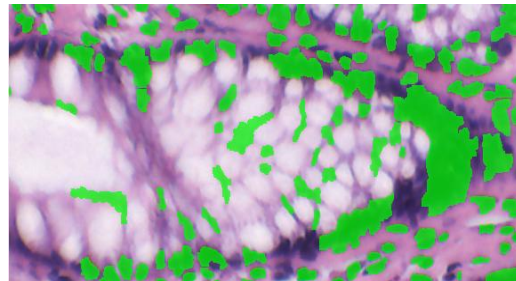
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS



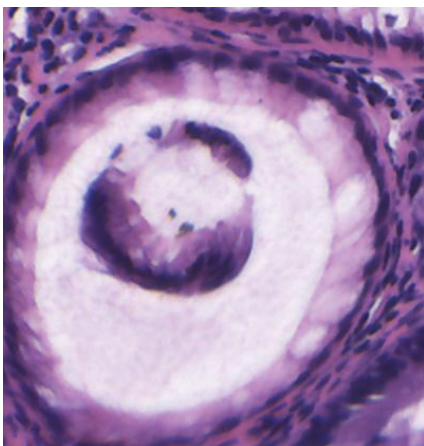
MÁSCARA WATERSEHED FINAL



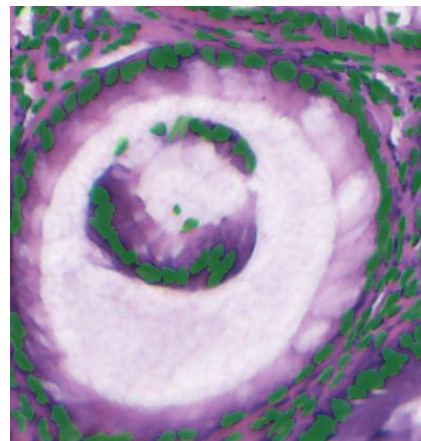
2. COMPONENTE HEMATOXILINA

Muestra 1. Adenoma 1.

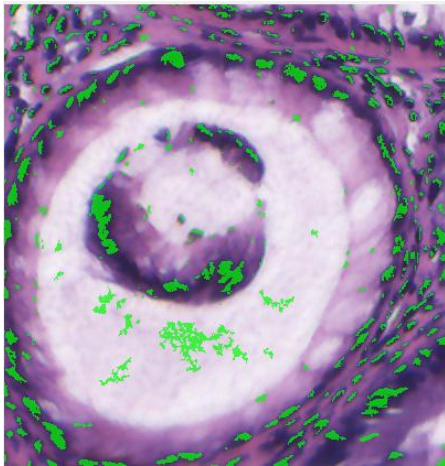
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

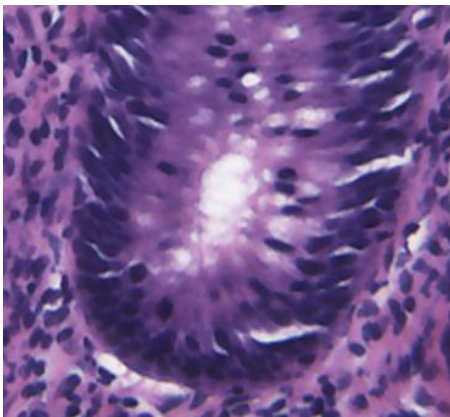


MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

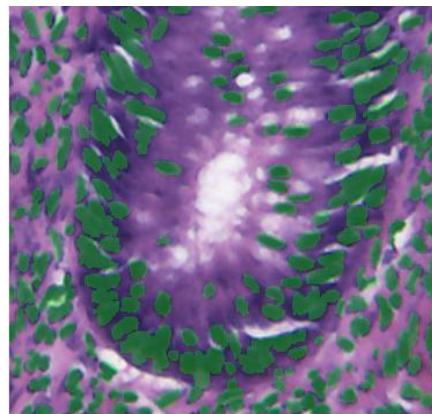


✚ Muestra 2. Adenoma 2.

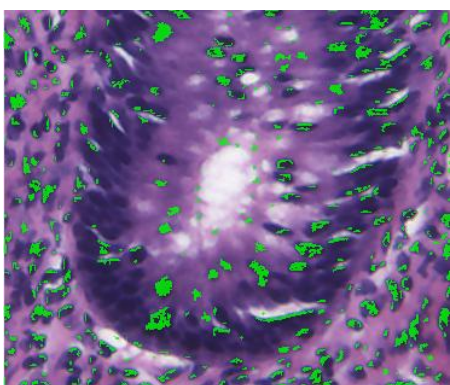
IMAGEN ORIGINAL



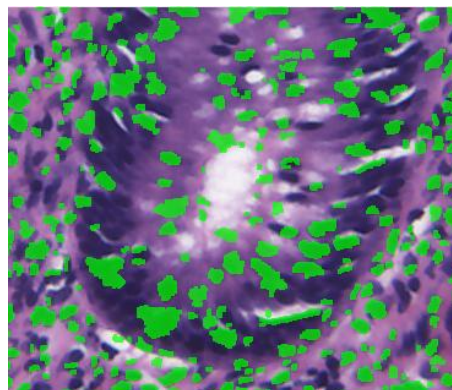
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

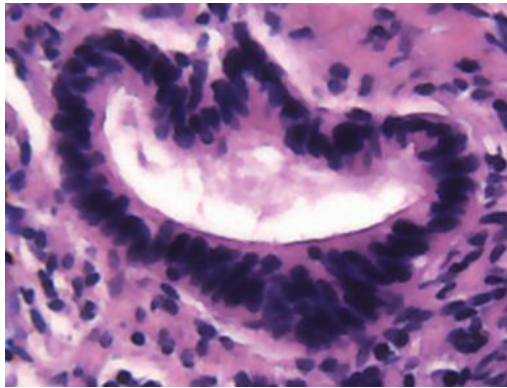


MÁSCARA WATERSHED FINAL

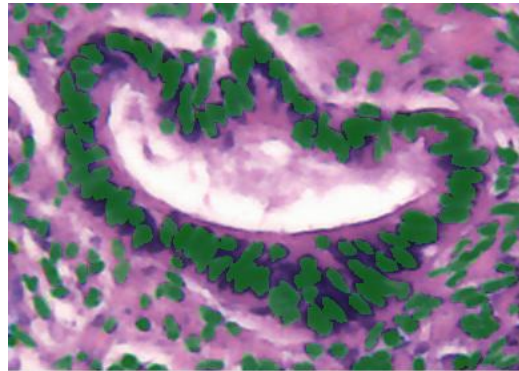


Muestra 3. Cáncer 1.

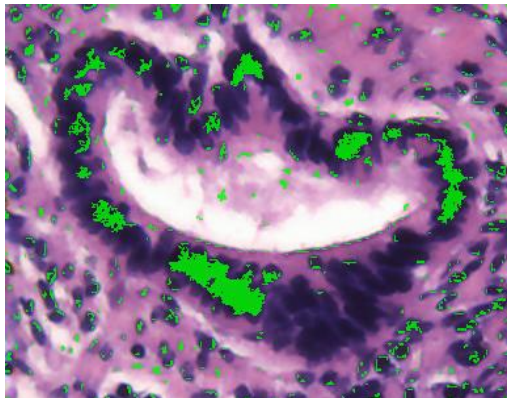
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL

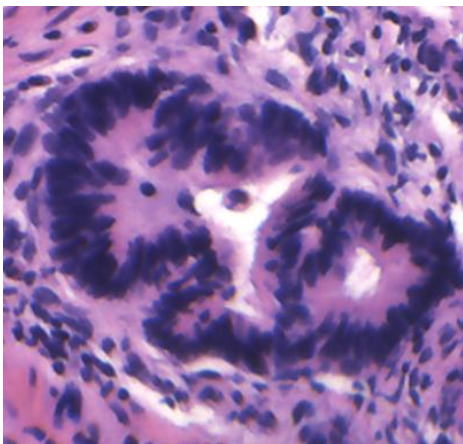


MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

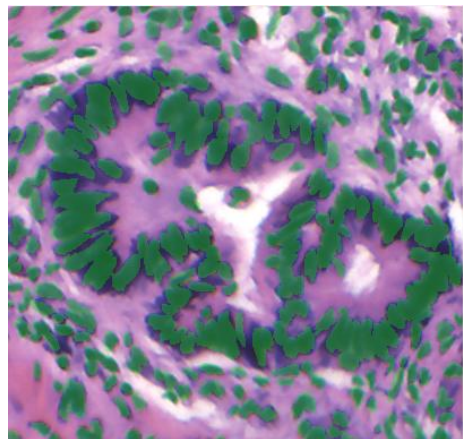


Muestra 4. Cáncer 2.

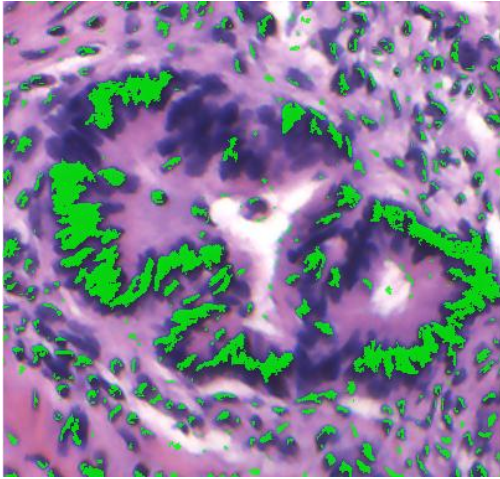
IMAGEN ORIGINAL



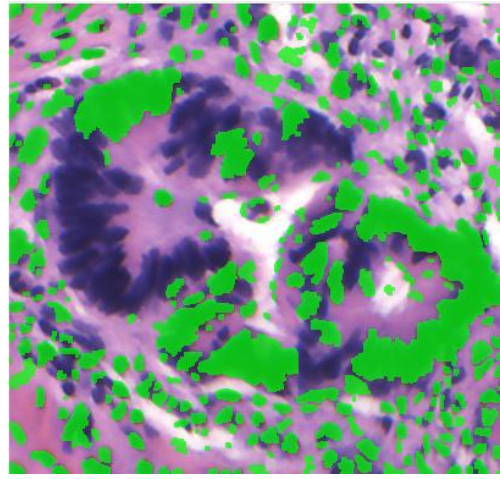
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS



MÁSCARA WATERSHED FINAL

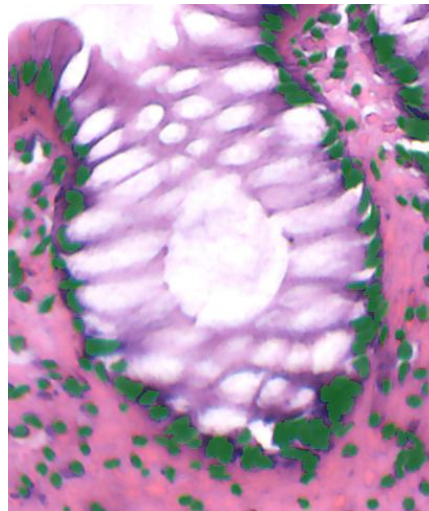


✚ Muestra 5. Normal 1.

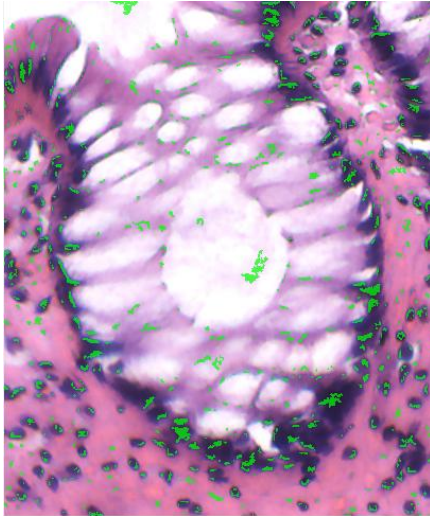
IMAGEN ORIGINAL



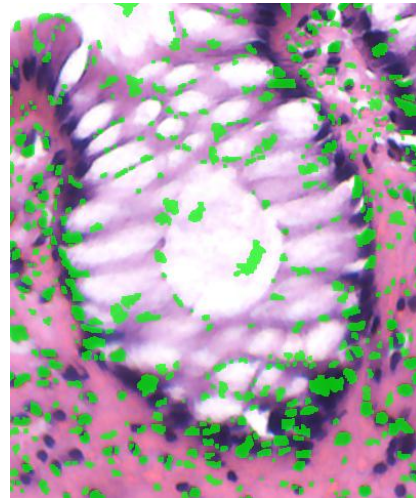
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

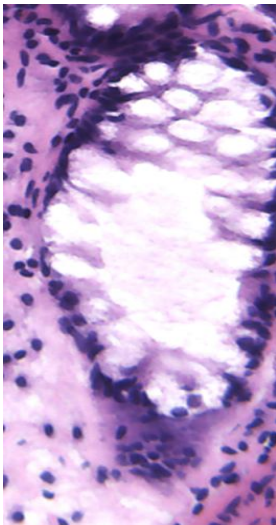


MÁSCARA *WATERSHED* FINAL

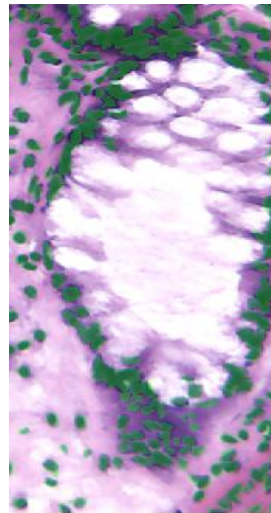


✚ Muestra 6. Normal 2.

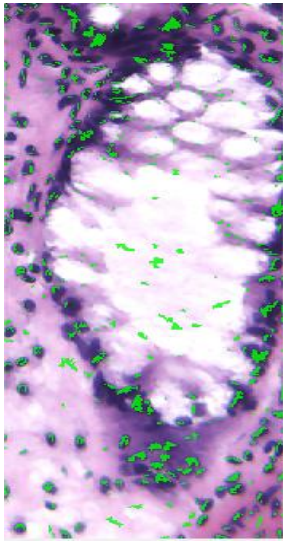
IMAGEN ORIGINAL



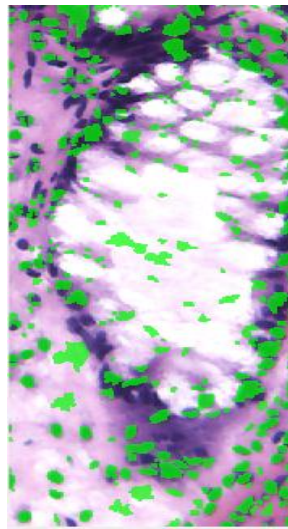
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS

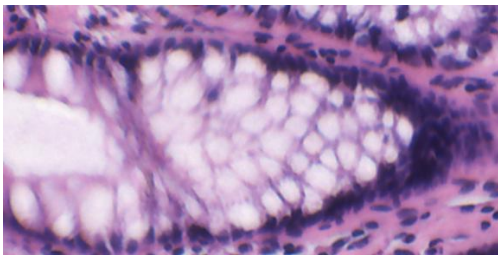


MÁSCARA WATERSHED FINAL

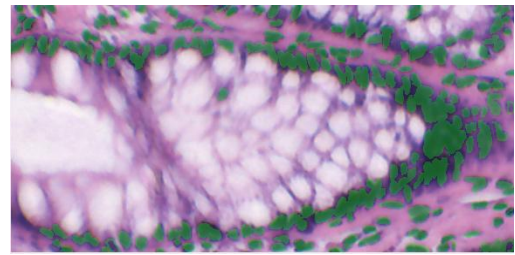


 **Muestra 7. Normal 3.**

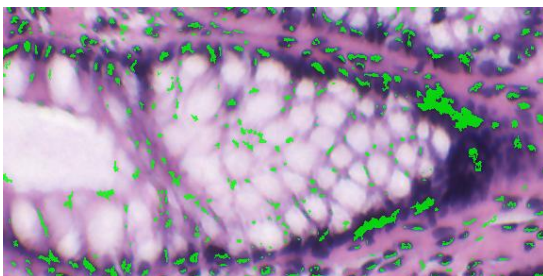
IMAGEN ORIGINAL



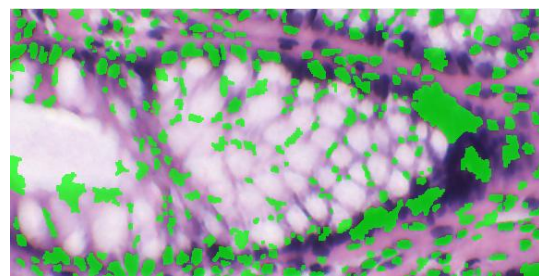
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MARCADORES INTERNOS



MÁSCARA WATERSHED FINAL



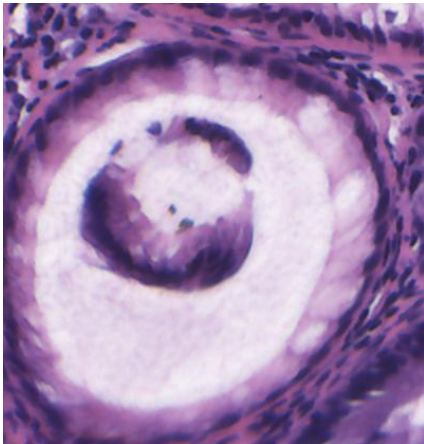
ANEXO C

RESULTADOS PARA LA SEGMENTACIÓN CON EL MÉTODO OTSU.

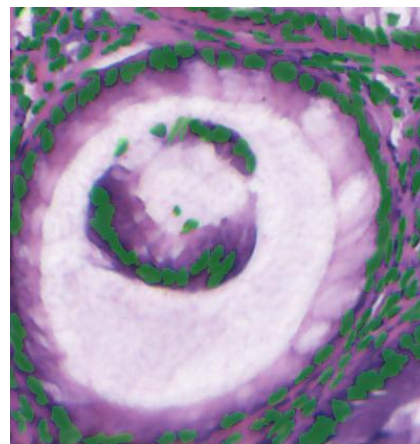
3. CANAL Y O LUMINANCIA

✚ Muestra 1. Adenoma 1.

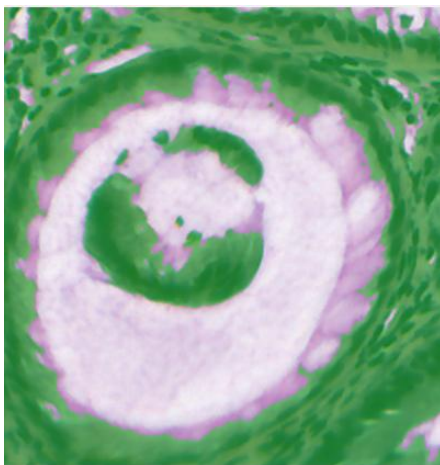
IMAGEN ORIGINAL



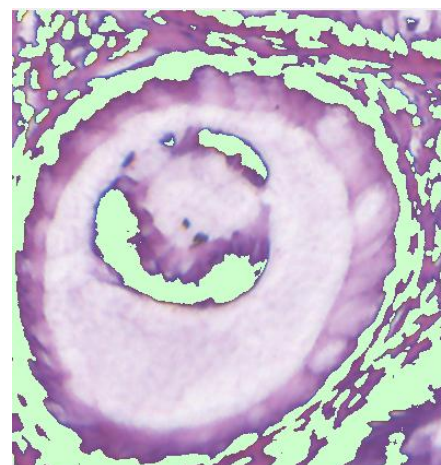
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

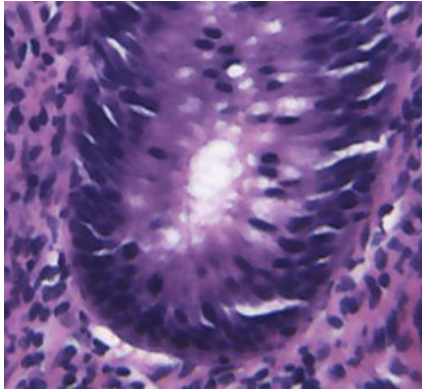


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

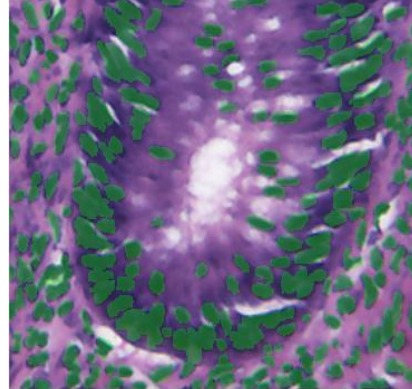


Muestra 2. Adenoma 2.

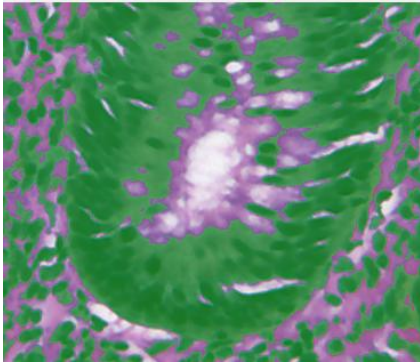
IMAGEN ORIGINAL



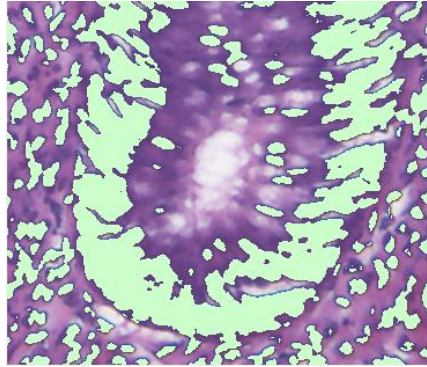
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

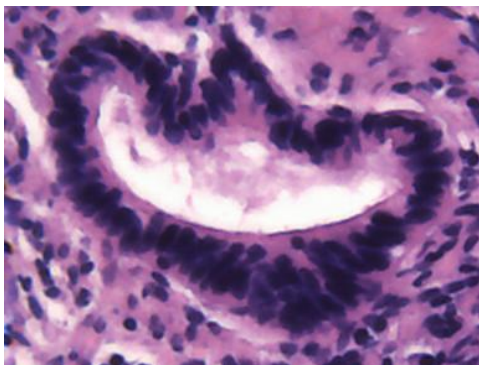


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

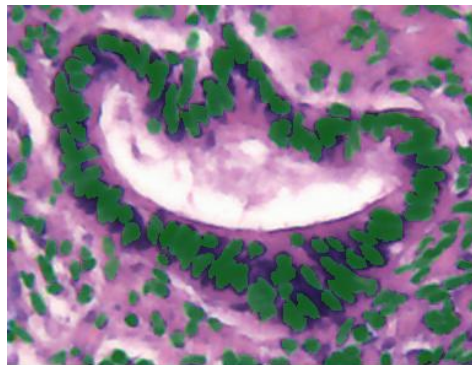


Muestra 3. Cáncer 1.

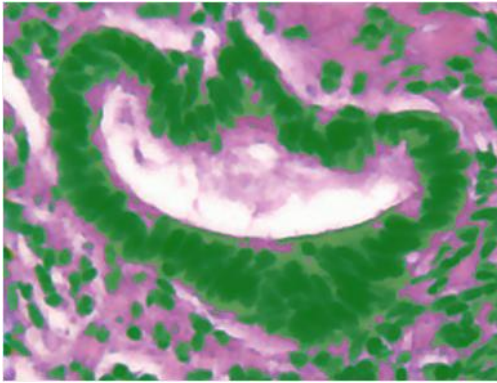
IMAGEN ORIGINAL



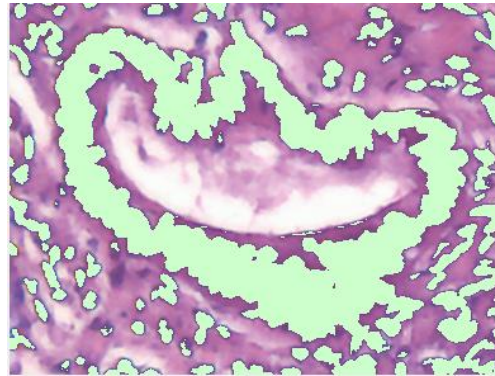
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

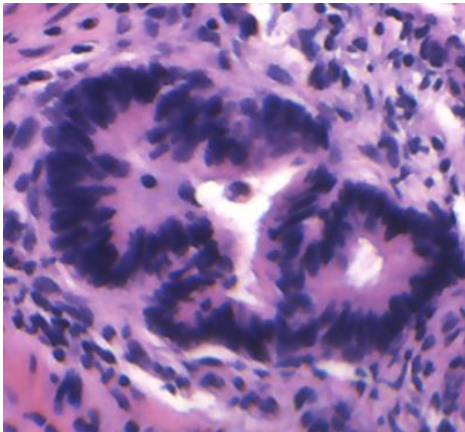


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

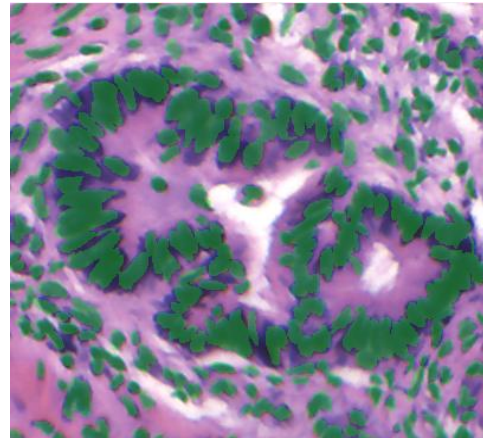


✚ Muestra 4. Cáncer 2.

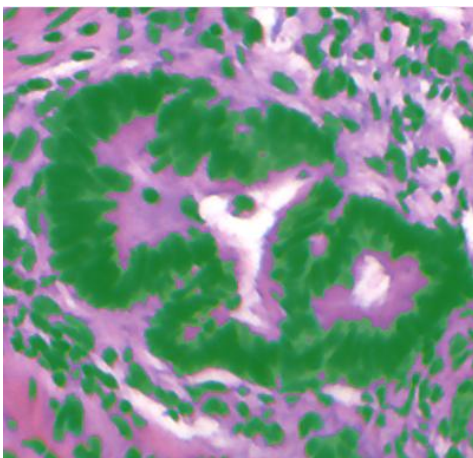
IMAGEN ORIGINAL



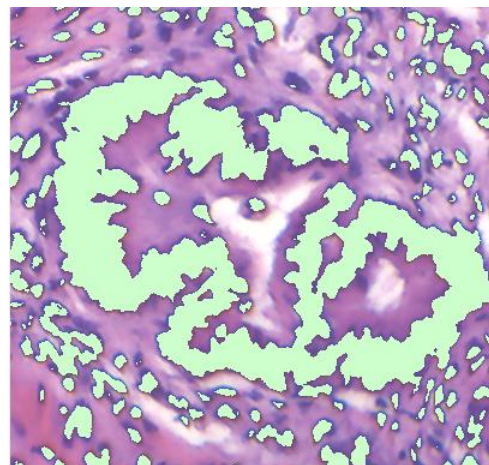
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

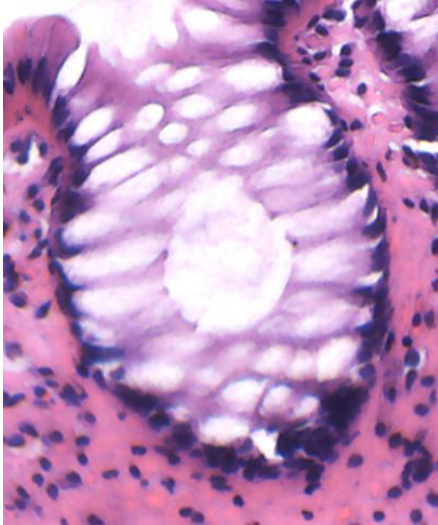


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

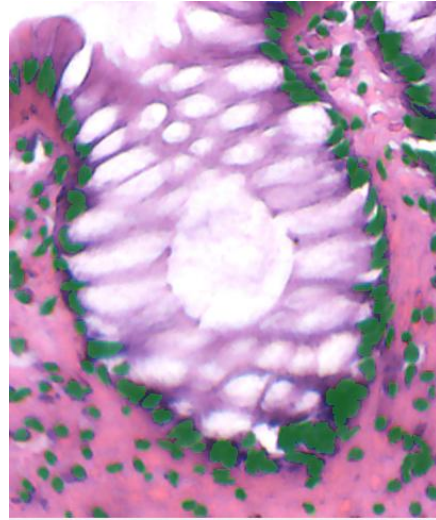


✚ Muestra 5. Normal 1.

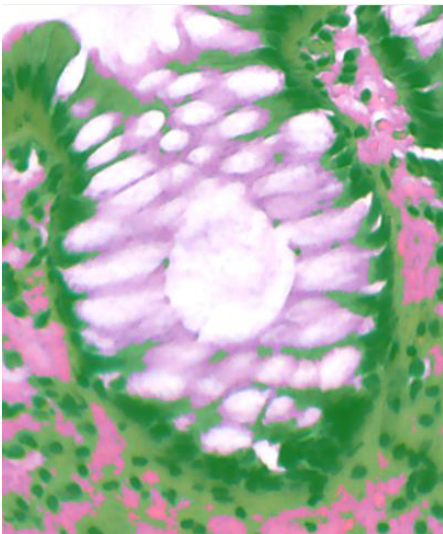
IMAGEN ORIGINAL



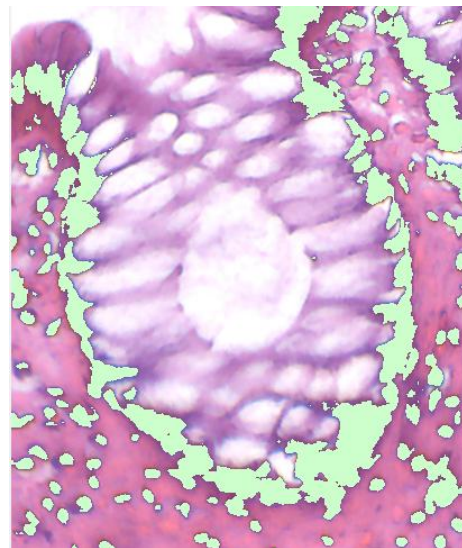
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

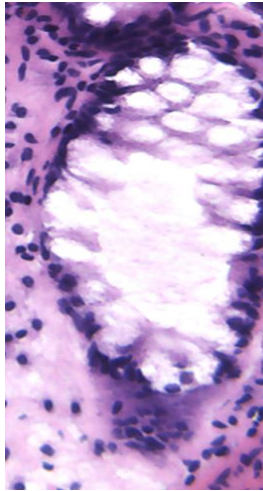


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

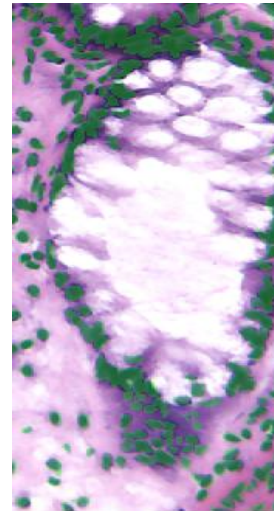


✚ Muestra 6. Normal 2.

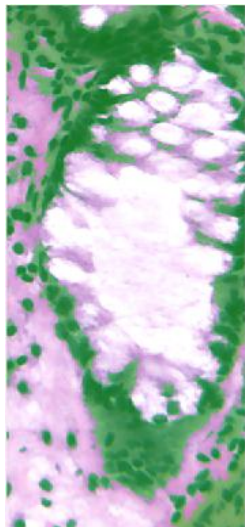
IMAGEN ORIGINAL



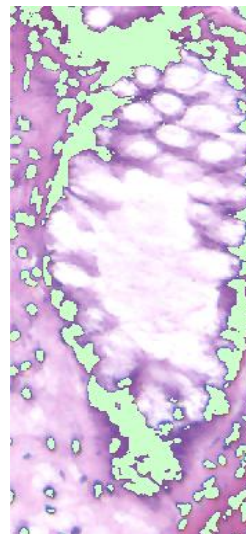
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

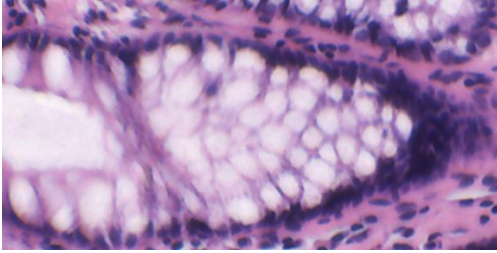


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

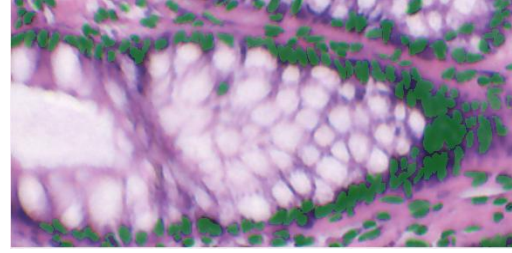


Muestra 7. Normal 3.

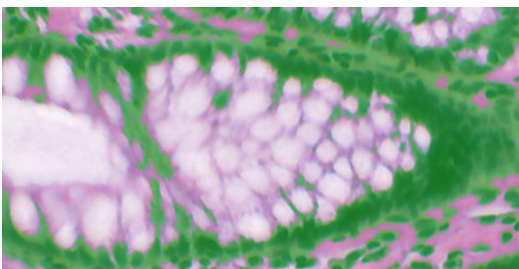
IMAGEN ORIGINAL



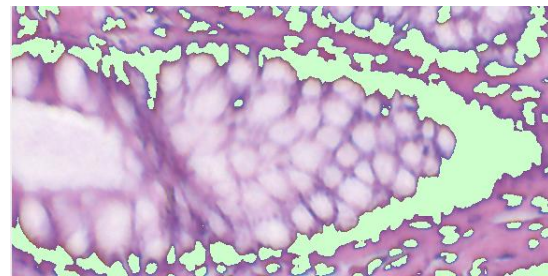
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL



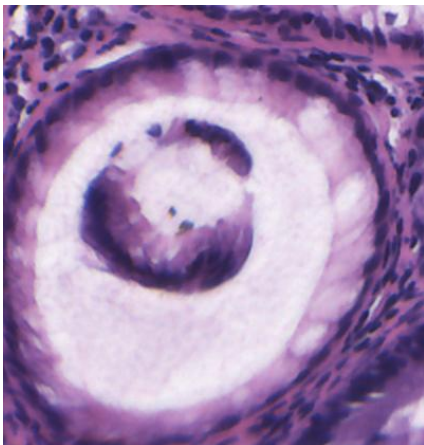
MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL



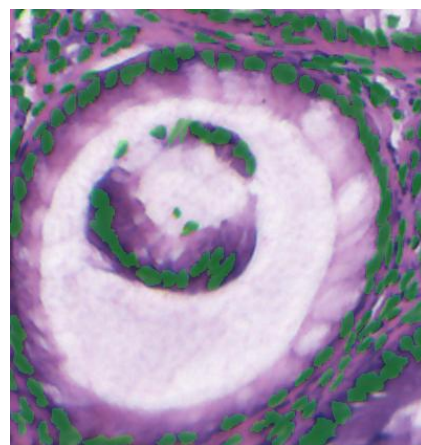
4. COMPONENTE HEMATOXILINA

Muestra 1. Adenoma 1.

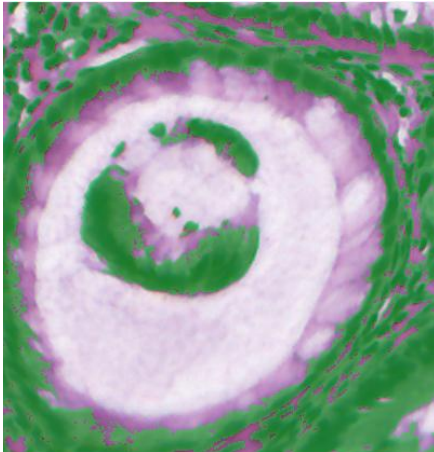
IMAGEN ORIGINAL



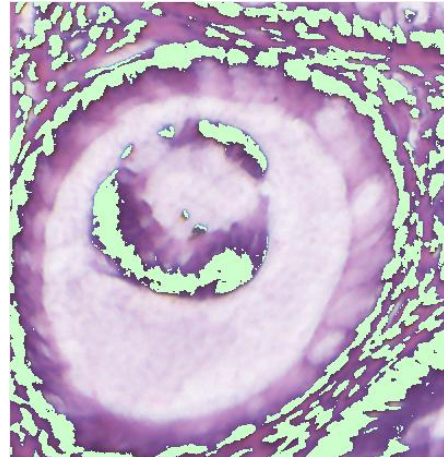
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

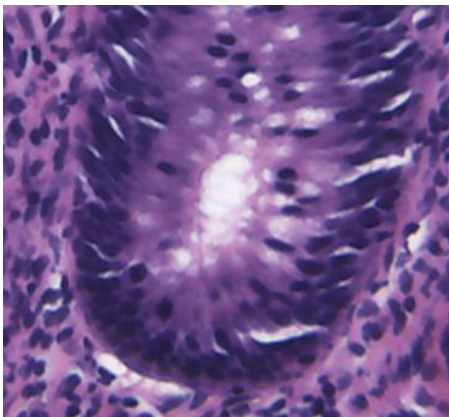


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

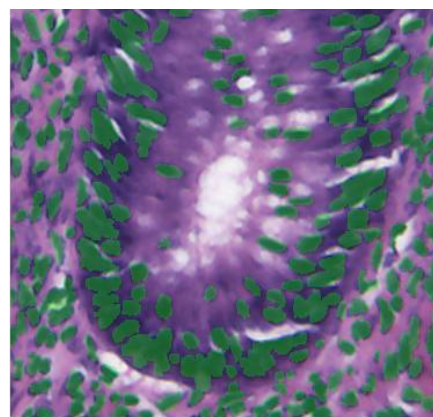


✚ Muestra 2. Adenoma 2.

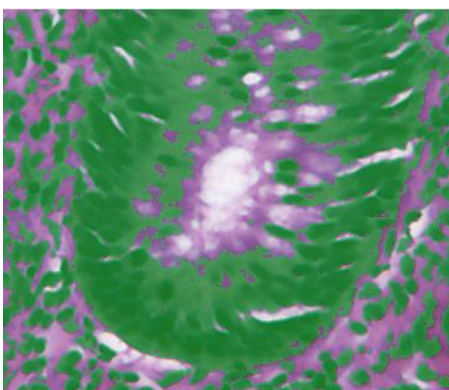
IMAGEN ORIGINAL



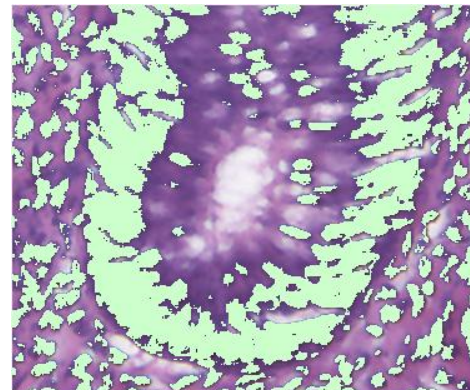
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

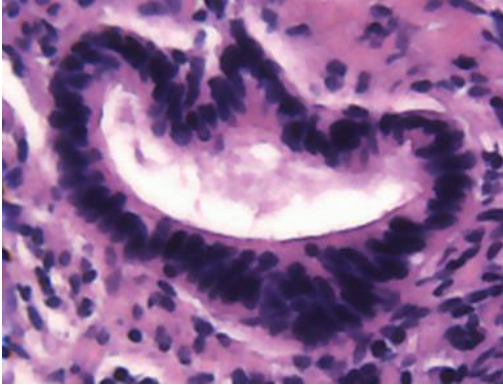


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

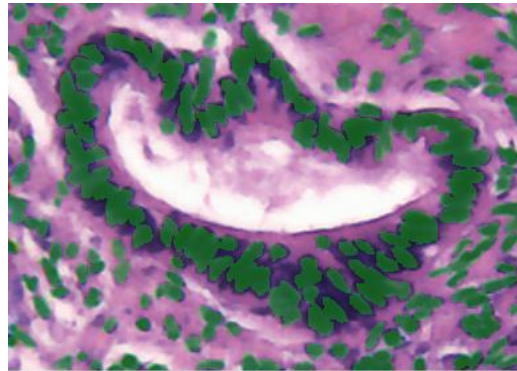


Muestra 3. Cáncer 1.

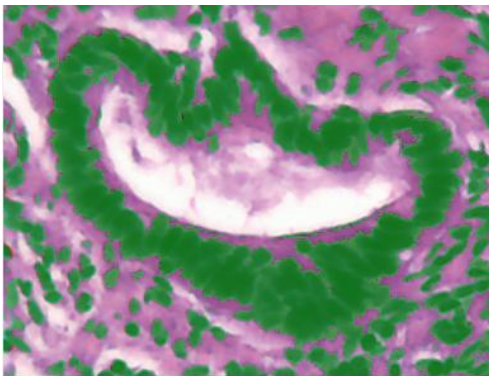
IMAGEN ORIGINAL



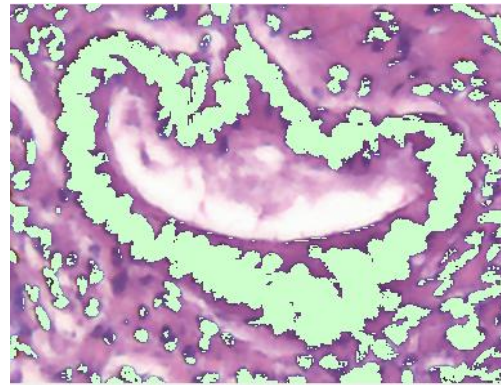
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

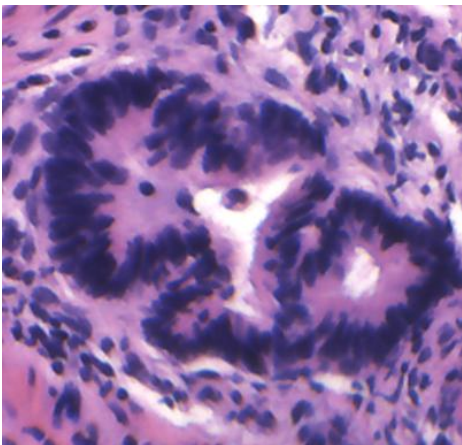


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

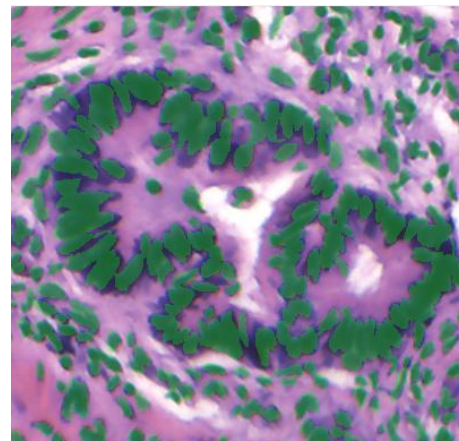


Muestra 4. Cáncer 2.

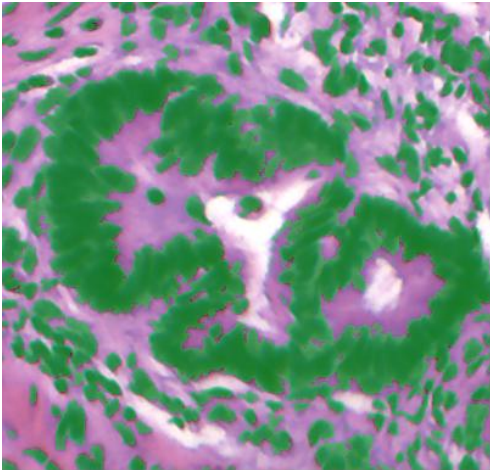
IMAGEN ORIGINAL



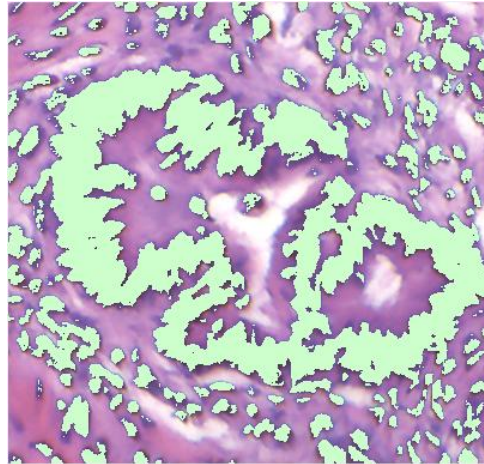
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

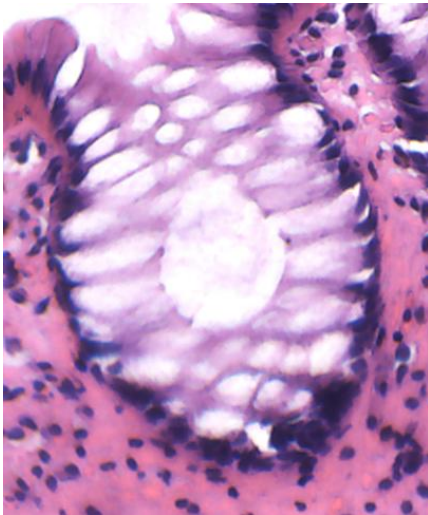


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

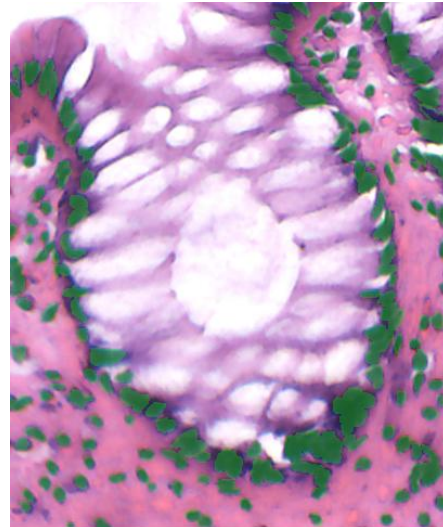


✚ Muestra 5. Normal 1.

IMAGEN ORIGINAL



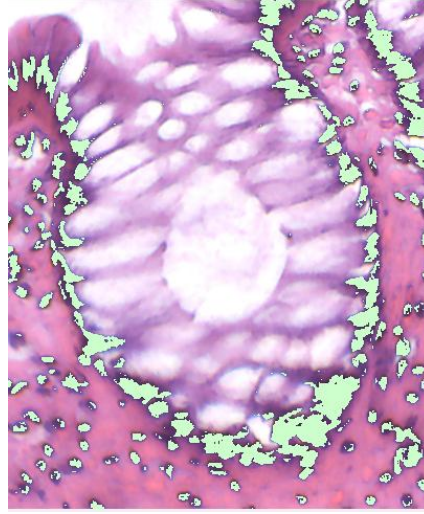
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

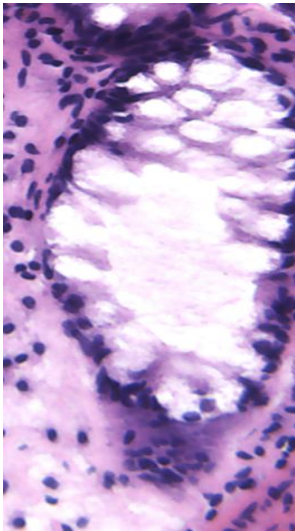


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

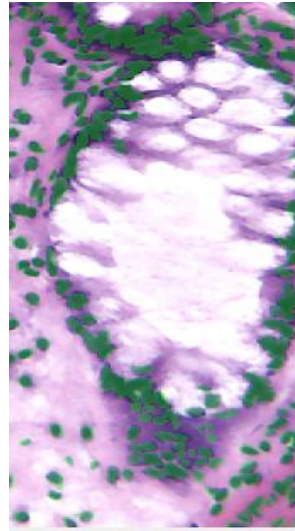


✚ Muestra 6. Normal 2.

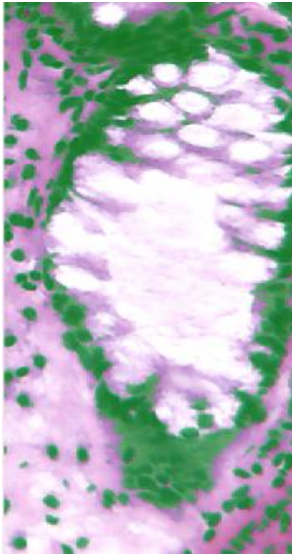
IMAGEN ORIGINAL



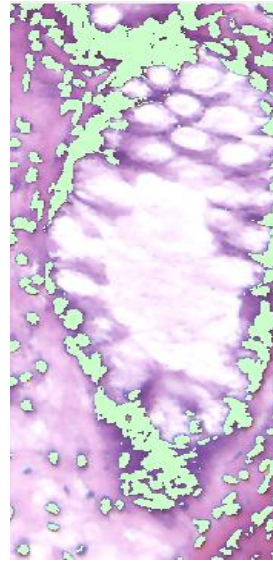
MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL

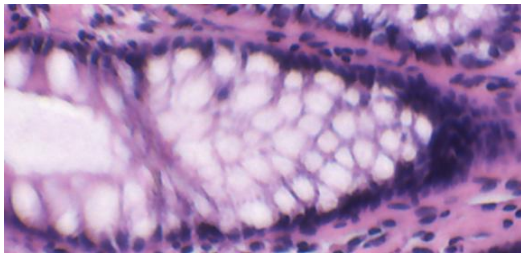


MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

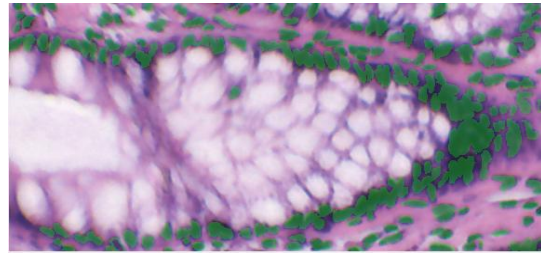


 **Muestra 7. Normal 3.**

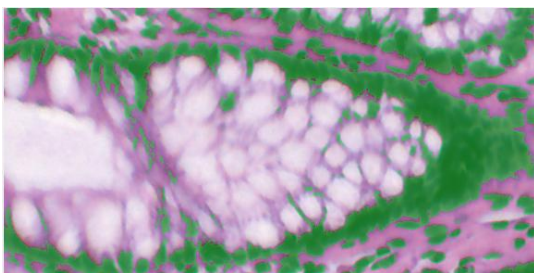
IMAGEN ORIGINAL



MÁSCARA MANUAL



MÁSCARA MÉTODO OTSU BINIVEL



MÁSCARA MÉTODO OTSU MULTINIVEL

