



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

**Curso Académico:**



# Agradecimientos

A Valery, mi tutora, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y ofrecerme siempre su ayuda.

A Sandra, mi cotutora, por su paciencia y su dedicación a lo largo del desarrollo del trabajo.

A mi familia, por su interés y preocupación constantes.

A mis amigos, por su apoyo incondicional.



# RESUMEN

Hoy en día el cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes entre varones. El riesgo de padecer este tipo de cáncer aumenta con la edad y compromete la esperanza de vida de esta población, por ello un diagnóstico temprano es de vital importancia. La prueba más determinante para su detección es la biopsia de próstata.

Con la implantación de nuevas tecnologías que permiten la digitalización de las muestras, se facilita el estudio al patólogo y se impulsa el desarrollo de técnicas de procesado automático de estas imágenes; técnicas capaces de determinar la existencia del cáncer y su grado a partir de la histología del tejido y el estudio de algunos de sus elementos: glándulas, estroma, núcleos, etc. Los métodos de segmentación automática juegan un papel importante en el despliegue de dichas técnicas pues hacen posible la extracción de rasgos característicos en imágenes histológicas.

En este trabajo Fin de Grado se han elaborado una serie de algoritmos que corresponden a cinco métodos distintos de segmentación de núcleos en imágenes histológicas de cáncer de próstata. Dicha segmentación ha sido abordada desde dos puntos de vista: mediante técnicas de *clusterización* y mediante la técnica *Watershed* con marcadores. Además, estos algoritmos se han implementado para el desarrollo de una interfaz gráfica de usuario capaz de segmentar automáticamente imágenes de tejido prostático de manera rápida e intuitiva.

Se ha realizado un análisis para determinar la bondad de dichos métodos aportando resultados cuantitativos al compararlos con una máscara de referencia (*ground truth*). Los valores obtenidos sugieren que el método que realiza una mejor segmentación de los núcleos es el algoritmo de *clusterización K-means*.

**Palabras Clave:** cáncer de próstata, imágenes histológicas, segmentación de núcleos, *clusterización*, *watershed* con marcadores.



# RESUM

Hui en dia el càncer de pròstata és un dels càncers més comuns entre homes. El risc de patir aquest tipus de càncer augmenta amb l'edat i compromet l'esperança de vida d'aquesta població, per això un diagnòstic primerenc és de vital importància. La prova més determinant per a la seua detecció és la biòpsia de pròstata.

Amb la implantació de noves tecnologies que permeten la digitalització de les mostres, es facilita l'estudi al patòleg i s'impulsa el desenvolupament de tècniques de processament automàtic d'aquestes imatges; tècniques capaces de determinar l'existència del càncer i el seu grau a partir de la histologia del teixit i l'estudi d'alguns dels seus elements: glàndules, estroma, nuclis, etc. Els mètodes de segmentació automàtica juguen un paper important en el desplegament d'aquestes tècniques ja que fan possible l'extracció de trets característics en imatges histològiques.

En aquest treball Fi de Grau s'han elaborat una sèrie d'algoritmes que corresponen a cinc mètodes diferents de segmentació de nuclis en imatges histològiques de càncer de pròstata. Aquesta segmentació ha estat abordada des de dos punts de vista: mitjançant tècniques de clusterització i mitjançant la tècnica *Watershed* amb marcadors. A més, aquests algoritmes s'han implementat per al desenvolupament d'una interfície gràfica d'usuari capaç de segmentar automàticament imatges de teixit prostàtic de manera ràpida i intuïtiva.

S'ha realitzat una anàlisi per determinar la bondat d'aquests mètodes aportant resultats quantitatius al comparar-los amb una màscara de referència (*ground truth*). Els valors obtinguts suggereixen que el mètode que realitza una millor segmentació dels nuclis és l'algoritme de clusterització K-means.

Paraules Clau: càncer de pròstata, imatges histològiques, segmentació de nuclis, clusterització, *watershed* amb marcadors.



# ABSTRACT

Nowadays, prostate cancer has become one of the most common cancers among men. The risk of suffering this type of cancer increases with age and jeopardizes the life expectancy of this specific population. That is why an early diagnosis is of vital importance. The most determining test regarding detection is the prostate biopsy.

Along with the introduction of new technologies which enable the digitalization of samples, the pathologists work is facilitated and the development of automatic processing techniques is enhanced; techniques capable of determining the existence of the cancer and its stage by studying the tissues histology and some of its elements: glands, stroma, nucleus, etc. Automatic segmentation methods play an important role in the deployment of such techniques since they enable the extraction of characteristic features in histological images.

In this Bachelor's Degree Final Thesis, a series of algorithms representing five different nuclei segmentation methods in histological images of prostate cancer have been carried out. Such segmentation has been approached from two points of view: using clusterization techniques and using marker-controlled watershed. Moreover, these algorithms have been implemented in order to develop a graphical user interface capable of automatically segmenting prostatic tissue images in a very fast and intuitive way.

An analysis to determine the goodness of such methods providing quantitative results has been carried out by comparing the segmented images to a ground truth. The obtained values suggest that the best method for nuclei segmentation is the clusterization algorithm K-means.

**Key Words:** prostate cancer, histological images, nuclei segmentation, clusterization, marker-controlled watershed.



# ÍNDICE GENERAL

## Documentos principales:

1. Memoria
2. Presupuesto
3. Anexos



## Lista de Esquemas y Figuras

<b>Esquema 3.1.</b> Metodología general. . . . .	21
<b>Esquema 4.1.</b> Esquema global de los métodos propuestos. . . . .	49
<b>Figura 1.1.</b> Anatomía de la próstata . . . . .	6
<b>Figura 1.2.</b> Distribución glandular en la próstata. . . . .	7
<b>Figura 1.3.</b> Imagen histológica de epitelio glandular en próstata . . . . .	8
<b>Figura 1.4.</b> Muestra histológica de adenocarcinoma de próstata. . . . .	9
<b>Figura 1.5.</b> Grados de diferenciación en el sistema <i>Gleason</i> . . . . .	10
<b>Figura 1.6.</b> Imagen histológica de cáncer de próstata con dos tipos de tejidos, grado 3 y grado 5. . . . .	10
<b>Figura 3.1.</b> Representación de las tres componentes del espacio RGB en planos. . . . .	22
<b>Figura 3.2.</b> Separación de componentes del espacio RGB . . . . .	22
<b>Figura 3.3.</b> Relación entre los espacios RGB y CIELAB. Resultados al sumar dos componentes en el espacio RGB. . . . .	23
<b>Figura 3.4.</b> Conversión a CIELAB. . . . .	25
<b>Figura 3.5.</b> Deconvolución de color . . . . .	28
<b>Figura 3.6.</b> Comparación entre Componente R y componente He. . . . .	28
<b>Figura 3.7.</b> Efectos de la erosión y dilatación. . . . .	30
<b>Figura 3.8.</b> Efectos de la erosión y la dilatación en una imagen en escala de grises con un EE cuadrado . . . . .	30
<b>Figura 3.9.</b> Efectos de la apertura y el cierre en una imagen binaria con un EE circular. . . . .	31
<b>Figura 3.10.</b> Representación de la segmentación <i>Watershed</i> . . . . .	32
<b>Figura 3.11.</b> <i>Watershed</i> sin marcadores. . . . .	33
<b>Figura 3.12.</b> Resultado de aplicar <i>watershed</i> con marcadores (transformada de la distancia). . . . .	33
<b>Figura 3.13.</b> Marcadores obtenidos a partir de la transformada de la distancia. . . . .	34
<b>Figura 3.14.</b> Marcadores obtenidos a partir de la función geodistancia. . . . .	35
<b>Figura 3.15.</b> Representación de $p_{+ve}(p)$ y $p_{-ve}(p)$ a $n=2$ . . . . .	36
<b>Figura 3.16.</b> Marcadores obtenidos a partir de la transformada de la simetría radial . . . . .	38
<b>Figura 3.17.</b> Comparación de resultados en la segmentación usando distintas técnicas de conversión a escala de grises. . . . .	39
<b>Figura 3.18.</b> Ilustración del algoritmo <i>K-means</i> con $K=2$ . . . . .	41
<b>Figura 3.19.</b> Resultados del algoritmo <i>K-means</i> con 3 clases . . . . .	42
<b>Figura 3.20.</b> Resultado del algoritmo <i>Fuzzy c-means</i> con 3 clases. . . . .	43
<b>Figura 3.21.</b> Representación de un dendograma sencillo para la clasificación de datos (1, 2, 3, 4, 5) en dos clusters A y B. . . . .	44
<b>Figura 3.22.</b> Representación de la densidad de puntos en un espacio. . . . .	45

<b>Figura 3.23.</b> Aplicación del algoritmo <i>Mean Shift</i> . . . . .	46
<b>Figura 4.1.</b> Distribución de las ventanas y comandos en la interfaz gráfica diseñada. . . . .	48
<b>Figura 4.2.</b> Clusterización <i>Fuzzy c-means</i> . . . . .	51
<b>Figura 4.3.</b> Aplicación de la deconvolución de color. . . . .	52
<b>Figura 4.4.</b> Aplicación de los operadores morfológicos . . . . .	52
<b>Figura 4.5.</b> Conversión a espacio CIELAB . . . . .	53
<b>Figura 4.6.</b> Implementación de la transformada de la distancia para obtener los marcadores internos. . . . .	54
<b>Figura 4.7.</b> Implementación de la función geodistancia para obtener los marcadores internos. . . . .	55
<b>Figura 4.8.</b> Implementación de la transformada de la simetría radial para obtener los marcadores internos. . . . .	57
<b>Figura 4.9.</b> Imágenes a partir de las cuales se hallan los gradientes de entrada al <i>Watershed</i> . . . . .	58
<b>Figura 4.10.</b> Segmentación <i>Watershed</i> . . . . .	59
<b>Figura 4.11.</b> Resultados de segmentación <i>Watershed</i> . . . . .	60
<b>Figura 4.12.</b> Aplicación del algoritmo <i>K-means</i> . . . . .	61
<b>Figura 4.13.</b> Aplicación del algoritmo <i>Mean Shift</i> . . . . .	62
<b>Figura 4.14.</b> Post-procesado. . . . .	63
<b>Figura 5.1.</b> Representación de los valores TP, FP y FN. . . . .	65

# Lista de Tablas

## Memoria

**Tabla 6.1.** Resultados para PPV. . . . . 66  
**Tabla 6.2.** Resultados para la Sensibilidad. . . . .67  
**Tabla 6.3.** Valor medio (PPV y Sensibilidad). . . . . 68  
**Tabla 6.4.** Resultados para FP. . . . .68  
**Tabla 6.5.** Resultados para FN. . . . . 69  
**Tabla 6.6.** Resultados para TP. . . . . 69

## Presupuesto

**Tabla I.** Presupuesto parcial I. . . . . 77  
**Tabla II.** Presupuesto parcial II. . . . . 77  
**Tabla III.** Presupuesto parcial III. . . . . 78  
**Tabla IV.** Presupuesto parcial IV. . . . .78  
**Tabla V.** Suma de presupuestos parciales. . . . . 79  
**Tabla VI.** Presupuesto total. . . . .79



**MEMORIA**



# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Motivación	3
1.2. Objetivos	5
1.3. La Próstata	6
1.3.1. Anatomía de la próstata	6
1.3.2. Histología de la próstata	7
1.3.3. Cáncer de próstata	8
1.3.4. Sistema de gradación	9
1.4. Obtención y procesado de imágenes histológicas	11
1.4.1. Fijación	11
1.4.2. Inclusión	11
1.4.3. Corte	12
1.4.4. Tinción	12
1.4.5. Observación	13
<b>CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE</b>	<b>14</b>
2.1. Antecedentes	15
2.2. Técnicas de Segmentación	15
2.2.1. Segmentación orientada a regiones	16
2.2.2. Segmentación orientada a los bordes	18
2.3. Detección de núcleos	19
<b>CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA</b>	<b>20</b>
3.1. Selección de la imagen de entrada	21
3.1.1. Espacio RGB	21
3.1.2. Conversión al espacio CIELAB	23
3.1.3. Conversión a escala de grises	25
3.2. Operaciones morfológicas	30
3.3. <i>Watershed</i> con marcadores	32
3.3.1. Transformada de la distancia	34
3.3.2. Función geodistancia	35
3.3.3. Transformada de la simetría radial	36
3.4. Técnicas basadas en la clusterización	39
3.4.1. Algoritmo <i>K-means</i>	40
3.4.2. Algoritmo <i>Fuzzy c-means</i>	42
3.4.3. Algoritmo <i>Mean Shift</i>	44

<b>CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS PROPUESTOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. Materiales .....	47
4.2. Métodos propuestos.....	47
4.2.1. Detalle de la etapa de pre-procesado.....	50
4.2.2. Obtención de los marcadores .....	53
4.2.3. Segmentación.....	58
4.2.4. Detalle de la etapa de post-procesado.....	63
 <b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS.....</b>	 <b>64</b>
 <b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....</b>	 <b>70</b>
 <b>Bibliografía.....</b>	 <b>72</b>

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se describirá la motivación que ha llevado a escoger este trabajo Final de Grado y los objetivos que este persigue y que se pretenden lograr a través de su desarrollo.

En segundo lugar, se realizará una breve introducción a la anatomía y función de la próstata y se explicarán algunas de sus estructuras más relevantes, además de las características de este órgano a nivel histológico, pues es importante conocer la composición de su tejido para poder entender cómo actúa el cáncer y, sobre todo, como éste afecta a la morfología nuclear.

Finalmente se expondrá el proceso a través del cual se obtiene y se digitaliza una biopsia de próstata y, así, poder conocer el origen de las imágenes que se van a utilizar para el estudio de la segmentación.

## 1.1. Motivación

El cáncer de próstata es uno de los tumores más comunes en varones en España, estimándose que uno de cada seis hombres será diagnosticado con cáncer de próstata a lo largo de su vida (Seom.org, 2017). Las probabilidades de padecer este tipo de cáncer aumentan hasta un 20% en varones mayores de 50 años (Jack y Tom, 2014). Estas estadísticas, junto con su tasa de mortalidad (21 de cada 100.000) hacen que el cáncer de próstata sea la tercera causa de muerte por cáncer más común en España y una de los tumores con mayor prevalencia a nivel mundial (Granado de la Orden et al., 2006).

La mayoría de los cánceres de próstata se pueden detectar con un examen de tracto rectal o una simple prueba de sangre. La medición en sangre del antígeno prostático específico o PSA es una de las pruebas iniciales que se realizan en hombres que presentan síntomas. Niveles superiores a 4 nanogramos por mililitro de sangre son un indicio de la formación del tumor y, por lo general, el especialista recomendará una biopsia de próstata (Cancer.org, 2017).

La prueba médica que sigue siendo clave en el diagnóstico del cáncer de próstata es la biopsia. Los avances en la tecnología han logrado satisfacer algunas de las carencias que envolvían su visualización; con la llegada de los sistemas *Whole Slide Image* (WSI), que proporcionan imágenes digitales de alta resolución (Kårnsnäs, 2014), se automatiza la obtención de muestras completas de tejido y, además, se propulsa y agiliza el análisis histopatológico para los especialistas.

Sin embargo, las aplicaciones y los softwares de apoyo que existen en la actualidad y que acompañan a estos sistemas son demasiado simples y presentan todavía muchas limitaciones. Así, el diagnóstico final sigue dependiendo enteramente de la evaluación subjetiva del patólogo, la cual varía de un especialista a otro, conduciendo en muchos casos a la aplicación de terapias demasiado agresivas, poco adecuadas o incluso equívocas.

Después de una década de investigación dedicada a los sistemas de apoyo al diagnóstico en el cáncer de próstata (Mosquera-López et al., 2015), empiezan a desarrollarse proyectos que buscan alternativas al diagnóstico convencional. Con la incorporación de análisis cuantitativos basados en sistemas de aprendizaje automático, es posible reducir la carga observacional de los especialistas y reducir errores en la clasificación de la enfermedad. Este es el caso del proyecto multidisciplinar SICAP llevado a cabo entre la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y la Universidad de Granada (UGR) que, con la colaboración de especialistas médicos, trabajan conjuntamente en la creación de un sistema capaz de interpretar las imágenes histopatológicas y clasificar el grado de malignidad del cáncer.

El desarrollo de métodos de segmentación automática juega un papel importante en el despliegue de dicho proyecto. A partir de su implementación en imágenes histológicas, se hace posible la extracción de rasgos característicos de las mismas, que servirán como entradas en los modelos de clasificación de la enfermedad. Así pues, el presente proyecto trata de generar una herramienta capaz de segmentar automáticamente ciertos elementos relevantes del tejido en muestras de cáncer de próstata usando el entorno de programación Matlab®.

Dado que en la investigación del cáncer, la morfología nuclear es clave en la mayoría de los sistemas de gradación empleados, los elementos que en este caso se busca segmentar son los núcleos celulares. Toda información cuantitativa que se pueda obtener a partir de estos en un tejido es extremadamente útil para el diagnóstico de un cáncer (Irshad et al., 2014). Si se implementan los algoritmos adecuados, es posible extraer parámetros significativos que sean capaces de describir estos núcleos de manera que se puedan asociar a determinados grados de malignidad eficientemente (Nielsen et al., 2008).

Este nuevo enfoque del diagnóstico basado en la objetividad de los modelos matemáticos y las valoraciones cuantitativas, proporcionan una mayor trazabilidad de la información clínica y una reducción del tiempo de análisis para los especialistas. Por lo que supondría un gran avance para la gradación tumoral prostática, minimizando la intervención quirúrgica en enfermos cuyo estado no lo requiera y mejorando la calidad de vida y la salud de los pacientes intervenidos. Es precisamente esta consecuencia la que justifica el presente Trabajo de Fin de Grado.

## 1.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es diseñar una herramienta que permita realizar automáticamente la segmentación de núcleos en muestras histológicas de la próstata que facilitará el posterior desarrollo de un sistema de clasificación según el grado tumoral.

A continuación, se exponen una serie de objetivos específicos derivados de la intención global del proyecto y que son igualmente relevantes en su desarrollo:

- Se pretende conocer más de cerca la anatomía de la próstata y los conocimientos básicos que se necesitan para el desarrollo del método óptimo. Paralelamente, se estudiará la histología de la próstata, logrando entender la importancia del papel que juegan los núcleos en el diagnóstico tumoral.
- En el desarrollo del trabajo, se busca también entender la programación de los métodos y su implementación. Además de realizar un estudio detallado de los mismos y de cualquier modificación que se aplique para lograr un mayor rendimiento.
- Establecer el método óptimo dependerá del análisis de los resultados, es por ello que otro de los objetivos de este trabajo es realizar una validación cuantitativa a través del cálculo de una serie de parámetros que permitan determinar, de una manera objetiva, el método de segmentación nuclear más eficiente.
- En la herramienta desarrollada, se van a incluir una serie de métodos de segmentación, cada uno con ciertas particularidades. Así, el objetivo final del proyecto será realizar un análisis comparativo de los resultados sobre un directorio de imágenes.

## 1.3. La Próstata

### 1.3.1. Anatomía de la próstata

La próstata es un órgano glandular que pertenece únicamente a la anatomía masculina. Se encuentra justo debajo de la vejiga y en frente del recto, rodeando por completo la primera porción de la uretra (uretra prostática) (Jack y Tom, 2014).

Su principal función es la secreción de un fluido que nutre y protege al espermatozoide, proporcionando un medio adecuado para su supervivencia (Nickel, 1999). Este es secretado durante la eyaculación; la próstata ejerce presión sobre la uretra para que el fluido y el espermatozoide sean expulsados conjuntamente como semen (McNeal, 1998).

A grandes rasgos es posible dividir el órgano en cuatro zonas: periférica, central, transicional y fibromuscular anterior (Jack y Tom, 2014). En la Figura 1.1a se puede observar la disposición de dichas zonas y en la Figura 1.1b el corte transversal de las mismas.

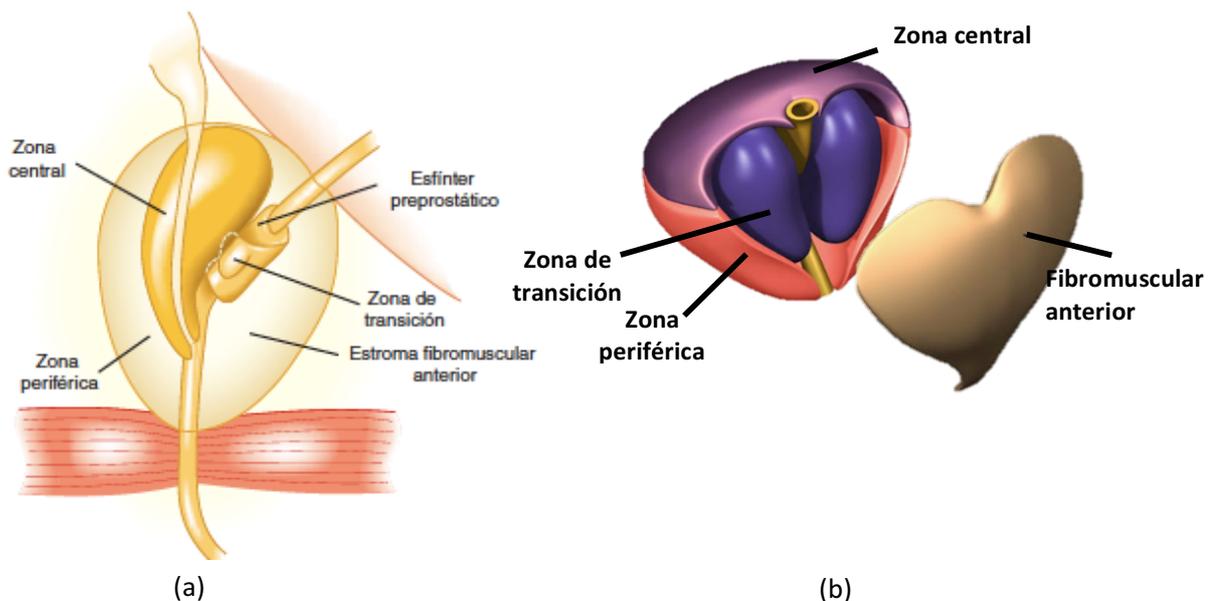


Figura 1.1. Anatomía de la próstata. (a) Visión lateral, (b) Visión interior (Adaptado de: Jack y Tom, 2014).

La próstata está rodeada por una delgada envoltura fibromuscular que define sus límites (Jack y Tom, 2014). Este órgano presenta dos estructuras principales: glándulas y estroma. El estroma se encuentra rodeando las glándulas y contiene tejido conjuntivo y fibras musculares (Oberley, Zhong y Szewda, 2000).

Las glándulas son estructuras formadas por conductos que irradian desde la uretra prostática, acaban en acinos y drenan a los conductos mayores de excreción (Jack y Tom, 2014). Se encuentran distribuidas de manera desigual a lo largo de las zonas que dividen la próstata. La zona periférica supone el 75% del tejido glandular total, mientras que la zona central y de transición, tan solo suponen el 20-25% y el 5-10% respectivamente. El estroma fibromuscular anterior es la única zona no glandular (Nickel, 1999).

La Figura 1.2 muestra un corte transversal simplificado con respecto a la Figura 1.1 de manera que se pueda distinguir con claridad la extensión glandular en las distintas zonas.

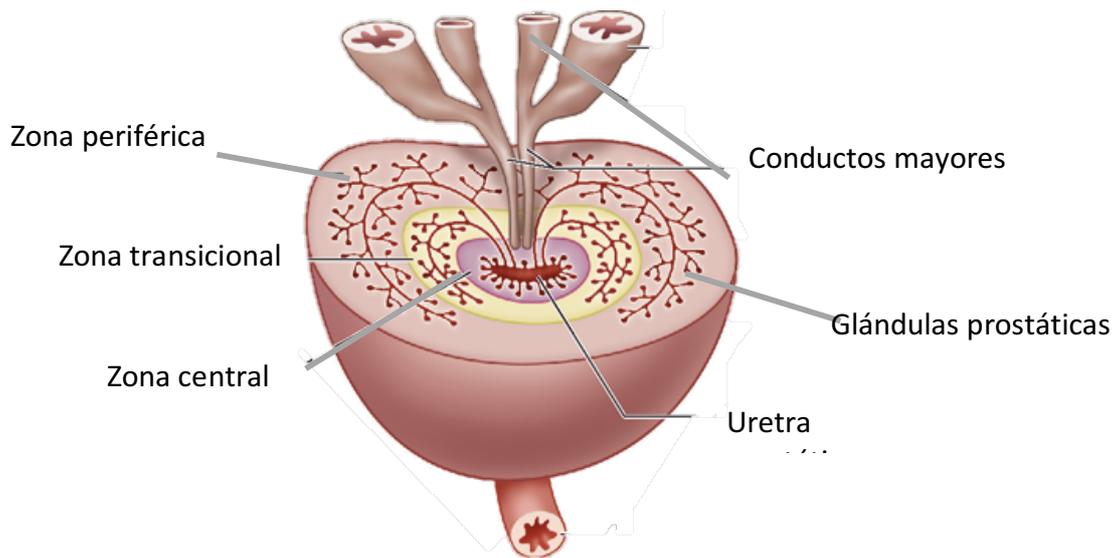


Figura 1.2. Distribución glandular en la próstata (Adaptado de: Mescher, 2013).

### **1.3.2. Histología de la próstata**

La histología de la próstata presenta varios elementos cuya forma y disposición tienen una gran relevancia en el estudio del desarrollo de enfermedades. En el cáncer de próstata son especialmente importantes los núcleos; orgánulos membranosos en el centro de las células encargados de controlar la expresión genética (Mescher, 2013).

Estos revelan información del estado del tumor que será clave a la hora de realizar el diagnóstico. En la Figura 3.1. se observa la disposición nuclear en un epitelio glandular sano. Es interesante conocer la estructura de este epitelio con más detalle, pues juega, junto a los núcleos, un papel importante en el cáncer de próstata.

Existen principalmente dos tipos de células formando el epitelio glandular prostático: células basales y secretoras (Nickel, 1999). Las células secretoras son células cilíndricas que han sufrido una

diferenciación terminal. En disposición paralela y justo debajo de la capa secretora, en la periferia glandular, se encuentran las células basales en forma de huso (Rajal y Zhou, 2012). Son las células proliferativas que darán lugar a las células secretoras maduras (Nickel, 1999).

Con una tinción H&E puede ser difícil distinguir entre ambas células o las basales y el estroma (Rajal y Zhou, 2012). En la Figura 1.3 las células secretoras son las que aparecen dispuestas como en columnas justo después del lumen y a continuación se encontrarían las basales, con poco citoplasma (Nickel, 1999). Las células fibromusculares se caracterizan por una forma alargada y se pueden ver en la imagen distribuidas por el estroma.

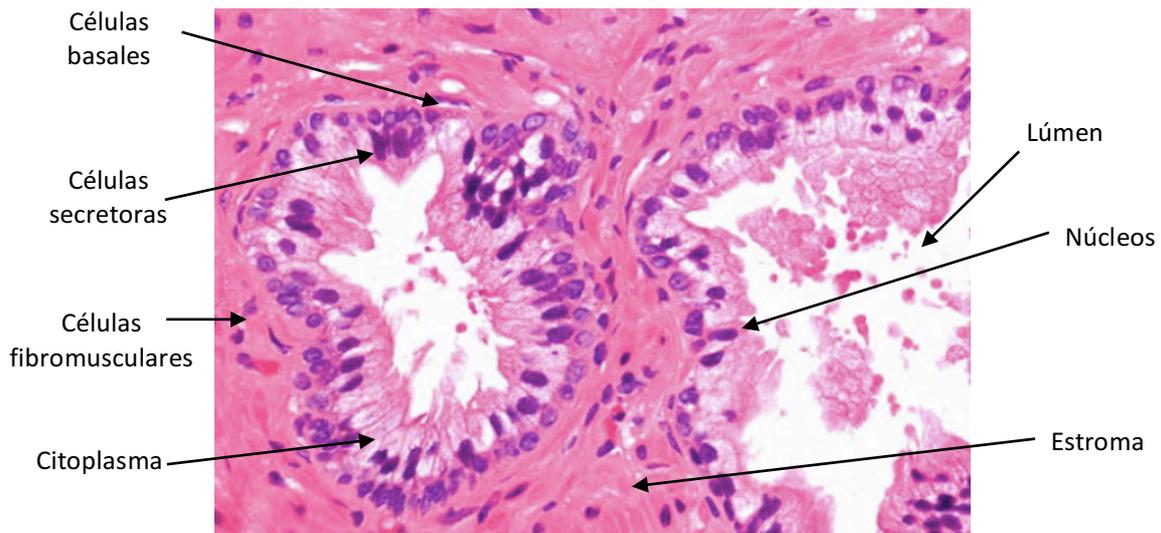


Figura 1.3. Imagen histológica de epitelio glandular en la próstata (Adaptado de: Rajal y Zhou, 2012).

### **1.3.3. Cáncer de próstata**

Una gran parte de los avances presentes a día de hoy a la hora de realizar un diagnóstico han sido introducidos a través de la tecnología y la ingeniería. Éstas han hecho posible la existencia de plataformas y técnicas encargadas de facilitar y agilizar el trabajo de los profesionales mejorando su rendimiento. Para el desarrollo de estas tecnologías es necesario conocer los patrones que presentan los tejidos, por ello, en el desarrollo de este trabajo, se estudian también los cambios que produce el cáncer de próstata a nivel histológico.

El cáncer de próstata más común es el adenocarcinoma cuyo origen tiene lugar en el tejido glandular. A este le corresponden un 95% de los casos diagnosticados con cáncer. El 5% restante es de histología heterogénea y se conoce como cáncer neuroendocrino; surge de células pequeñas que pueden ser de tipo epitelial, estromal o ectópico (Jack y Tom, 2014).

El adenocarcinoma se caracteriza por presentar glándulas de tamaños mediano y pequeño que infiltran el estroma. Además, se produce una pérdida de la capa basal por lo que las glándulas se

encuentran formadas por una sola capa de células que presentan núcleos grandes y nucléolos prominentes (Epstein y Hutchins, 1984).

En la Figura 1.4 se observan algunas de estas particularidades como lo son los núcleos y nucléolos considerablemente agrandados y la ausencia de la capa basal (Oberley et al., 2000).

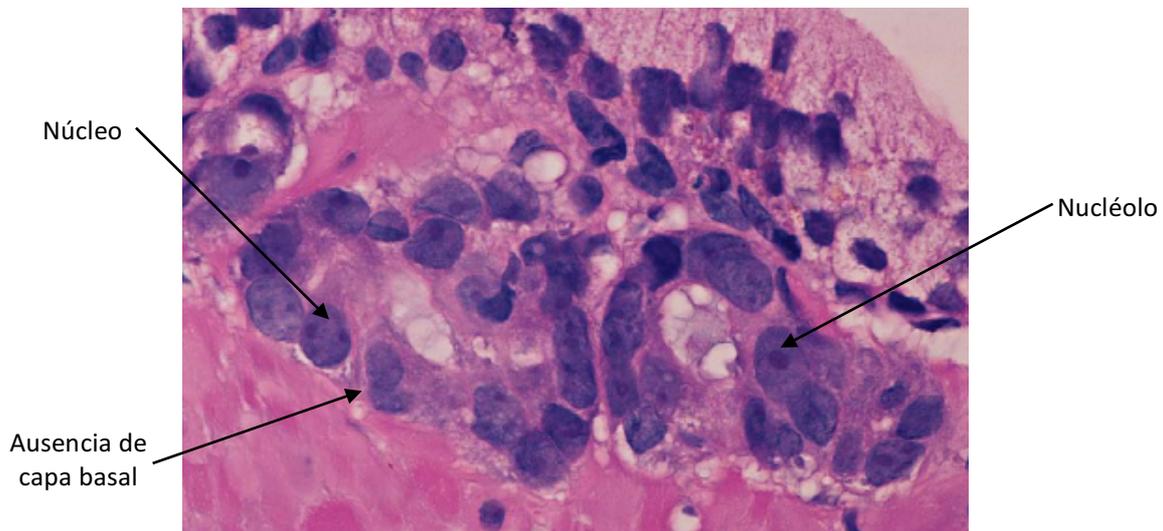


Figura 1.4. Muestra histológica de adenocarcinoma de próstata. (Adaptado de: Rajal y Zhou, 2012).

#### **1.3.4. Sistema de gradación**

El diagnóstico tumoral es un proceso complicado y poco preciso dado que los cambios que un cáncer produce no siguen siempre el mismo patrón ni se presentan de la misma forma. Los profesionales utilizan distintos sistemas que, en base a la observación histológica de estas variaciones, permiten establecer una gradación que determine, de la manera más aproximada posible, el estado del tumor. Según el resultado que se obtenga, se puede determinar que tratamiento es más favorable en cada caso.

Para el cáncer de próstata se utiliza *el sistema de gradación de Gleason*. Este establece cinco grados donde el grado 1 corresponde a un tumor muy bien diferenciado y el grado 5 a un tumor indiferenciado (Epstein, 2013). Los tejidos se clasifican pues, según esta diferenciación tumoral mostrada en la Figura 1.5.

A lo largo de un mismo tejido se pueden presentar distintos patrones, pues un tumor no suele distribuirse uniformemente (Epstein, 2013). En estos casos, se establece un grado de diferenciación (1-5) para cada uno de los dos patrones más representativos del tejido, se suman obteniendo un valor del 2 al 10 y se clasifican en cinco grupos donde el primero hace referencia a los tumores bien diferenciados y el quinto a los peor diferenciados (Epstein et al., 2015).

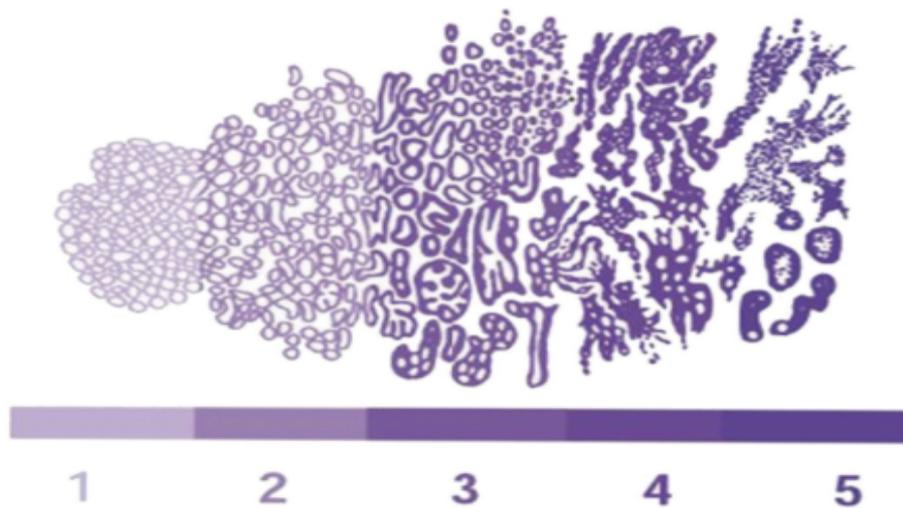


Figura 1.5. Grados de diferenciación en el sistema *Gleason*. (1) Glándulas pequeñas y uniformes. (2) Mayor cantidad de estroma entre glándulas. (3) Comienzo de Infiltración. (4) Glándulas irregulares y neoplásicas. (5) Escasa y ocasional formación glandular (Usmdpcc.com, 2017).

En la Figura 1.6. se ilustra un ejemplo de este sistema de gradación. Es posible distinguir con claridad la presencia de dos tipos de tejidos. En la parte superior, el tejido presenta una escasa diferenciación con núcleos agrandados y más abundantes y una pobre formación de glándulas (grado 5) mientras que en el resto del tejido se aprecia una diferenciación moderada (grado 3). De esta forma, el tumor se clasificaría en grado  $3+5=8$ , siendo el primer dígito de la suma el grado del tejido más abundante.

Uno de los objetos que se estudian para poder establecer el grado del tumor son los núcleos celulares (Bueno, 2007). Su tamaño, su forma y su número son información clave a la hora de determinar en qué estado se encuentra el cáncer y, así, poder aplicar el tratamiento específico requerido.

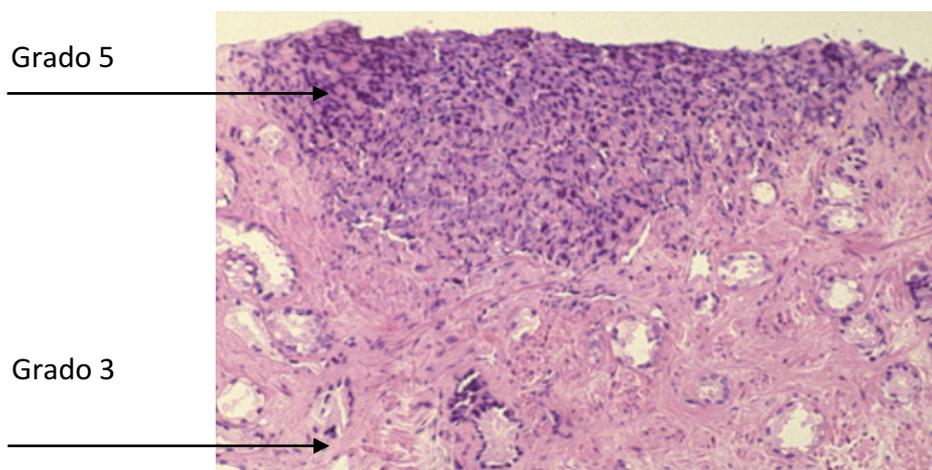


Figura 1.6. Imagen histológica de cáncer de próstata con dos tipos de tejidos, grado 3 y grado 5 (Adaptado de: Humphrey, 2017).

## **1.4. Obtención y procesado de imágenes histológicas**

La histología es la ciencia que aborda la descripción estructural del cuerpo humano desde el nivel microscópico. Este campo de estudio impulsa la familiarización con la arquitectura de los tejidos y proporciona un contexto físico para otras ciencias básicas como la fisiología y la bioquímica (Ash et al., 2013). Conocer las estructuras desde el punto de vista histológico facilita la detección de los cambios producidos por anomalías y enfermedades y, por consiguiente, la predicción de las consecuencias funcionales que pueden presentar estos cambios (Ash et al. 2013).

En el presente proyecto se han utilizado muestras histológicas para desarrollar el estudio, por ello, es importante conocer la técnica de preparación de estas imágenes y el papel que ésta desempeña.

Estas imágenes se obtienen a partir de una biopsia. Esta prueba médica consiste en la extracción de una porción de células o tejido de cierta parte del cuerpo cuyo estudio pretende obtener un diagnóstico óptimo (Epstein y Netto, 2008). Por lo tanto, puede adoptar un papel decisivo en la detección de tumores u otras enfermedades.

Dependiendo del objetivo, se emplean distintos métodos con el fin de hacer el proceso lo más efectivo y cómodo para el paciente. En el caso de la próstata, se suele emplear una biopsia transrectal en la cual se introduce una sonda, guiada por ecografía, a través del recto, que tomará varias muestras. Estas muestras son, posteriormente, enviadas al laboratorio para examinarlas bajo el microscopio (Epstein y Netto, 2008).

A continuación se detallan las distintas fases que se realizan en la preparación de la muestra una vez extraída la biopsia, y cómo éstas se digitalizan para su posterior observación.

### **1.4.1. Fijación**

Es necesaria la conservación de la muestra al separarla del organismo para simular un estudio 'in vivo' del tejido. Con elementos fijadores se puede prevenir la autólisis de las moléculas y preservar los componentes celulares además de mantener la consistencia morfológica de las estructuras (Suvarna et al., 2013).

El fijador más común en el procesado de la biopsia de próstata es el formaldehído en estado acuoso o *formalina* (Epstein y Netto, 2008). Este reacciona con los ácidos y proteínas nucleicas de modo que se consiguen potenciar los detalles a nivel nuclear (Suvarna *et al.* 2013).

### **1.4.2. Inclusión**

A continuación, se le aplica un proceso de deshidratación a la muestra para sustituir este agua por una sustancia capaz de solidificar y aportar consistencia al tejido. Con este proceso se consigue incrustar

la muestra en un bloque sólido que endurece el material y facilita el corte del mismo en láminas muy delgadas. En la mayoría de los casos se suele utilizar la parafina (Cooper et al., 2013).

Las biopsias obtenidas a través de sonda suelen curvarse con facilidad tras la fijación. Antes de la filtración de la parafina, las muestras se pueden aplanar o estrechar entre dos mallas de Nylon de forma que se potencie la cantidad de tejido visible a través del microscopio (Kwast et al. 2003) .

### **1.4.3. Corte**

En esta etapa, se secciona el bloque en finas láminas de manera que se obtenga el mayor detalle posible en la microestructura de los tejidos y las células (Cooper et al., 2013). El instrumento que se utiliza para realizar los cortes es el micrótopo y, adicionalmente, puede usarse un histo-colimador para alcanzar un alineamiento entre plano y superficie seccionada, reduciendo el residuo del material (Kwast et al. 2003).

### **1.4.4. Tinción**

Con la muestra ya seccionada, esta se trata con un tinte para aumentar el contraste y poder diferenciar las distintas estructuras presentes en el tejido. El método empleado depende de qué características se quieran destacar (Cooper et al., 2013).

Las técnicas de tinción se pueden clasificar en específicas o no específicas. Las primeras se encargan de teñir ciertas agrupaciones químicas o moléculas de manera selectiva, mientras que las técnicas no específicas tiñen la mayoría de la célula uniformemente. De todas ellas, la más empleada en histopatología se forma a partir de la combinación de dos compuestos, Hematoxilina y Eosina (Kårnsås, 2014).

La tinción Hematoxilina-Eosina se clasifica como no específica y se usa principalmente para visualizar características estructurales del tejido. Es muy popular entre los patólogos por su gran utilidad en el estudio de la morfología y la distribución nuclear debido a su habilidad para teñir los núcleos de las células: la hematoxilina reacciona con las histonas de los núcleos haciendo que estos se tiñan de azul mientras que la eosina se utiliza como contra-tinción, tiñendo el resto de estructuras de tonos que varían desde anaranjados y rojos hasta rosas y púrpuras (Cooper et al., 2013).

En la Figura 1.3 y 1.4 que se mostraron previamente, se emplea este tipo de tinción. En ellas se puede apreciar este efecto, pues los núcleos se diferencian con claridad del resto del tejido por presentar un color morado o azul oscuro. Dado que en este proyecto el elemento de interés son los núcleos, todas las imágenes que se han empleado a lo largo del estudio han sido teñidas con Hematoxilina-Eosina.

#### **1.4.5. Observación**

La digitalización de las imágenes histológicas se está introduciendo de manera progresiva en la práctica clínica suponiendo un gran apoyo para el diagnóstico tumoral. Los escáneres digitales de microscopía o *Whole Slide Scanners* analizan rápidamente y de manera automática las muestras completas del tejido a partir de las cuales obtienen imágenes en formato digital de elevada calidad (Kårsnäs, 2014).

Estos instrumentos simulan la luz del microscopio para visualizar las muestras. Las imágenes digitales se construyen como una pirámide de distintas resoluciones que se crea escaneando a varios niveles de resolución en un mismo punto. El resultado se obtiene en cuestión de minutos (Pantanowitz, 2010). El tiempo de escaneado, que depende de muchos factores pero puede llegar a ser incluso de 1 minuto para muestras de 10mm x 10mm en los escáneres más modernos.

Con la microscopía digital, pueden estudiarse los tejidos con más detalle, ampliando y alejando las zonas de interés. Así, se mantiene la función del microscopio convencional, configurando los aumentos con las distintas lentes objetivo y disponiendo de la laminilla original, a la que se podrán aplicar otras tinciones para realizar otros estudios (Pantanowitz, 2010).



## CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE

En la práctica clínica, el patólogo se encarga de realizar un diagnóstico que dependerá en gran medida de la observación de anomalías e irregularidades en los tejidos del paciente. En el caso del cáncer, el estado de los núcleos es, como ya se ha comentado, muy determinante, por lo que se requiere un estudio riguroso de la muestra. Los profesionales médicos examinan las imágenes cuidadosamente y estudian el contenido nuclear y la forma de los núcleos. Esto supone una carga de trabajo elevada puesto que hay que emplear mucho tiempo para poder garantizar cierta fiabilidad a la hora de establecer un diagnóstico.

Gracias a la continua investigación en el ámbito de la imagen médica, se está logrando agilizar tremendamente su desarrollo tecnológico. A día de hoy, es posible obtener imágenes de muy alta calidad, a partir de las cuales se pueden estudiar los tejidos con el máximo detalle (Nielsen et al., 2012). Este rápido desarrollo, conduce al diagnóstico basado en la imagen médica a un punto de inflexión en el que se busca abandonar la evaluación subjetiva extraída de una simple observación al microscopio para adoptar un análisis automático, basado en medidas cuantitativas de características relevantes en la imagen (Nielsen et al., 2012).

Alcanzar, definitivamente, una prognosis objetiva requiere la aplicación de métodos capaces de obtener información sobre las regiones de interés en una imagen (Nielsen et al., 2012). En el campo de la patología digital, los métodos de análisis computarizados y automáticos se desarrollan rápidamente y así lo hacen también sus aplicaciones en clasificación, segmentación y detección de puntos de interés (Nielsen et al., 2008).

En este capítulo se van a describir brevemente las distintas técnicas de segmentación automática que se emplean en la actualidad y que aparecen de manera recurrente en la literatura. En el capítulo 3, se hablará más en detalle de aquellas que se hayan utilizado concretamente para el desarrollo de la interfaz gráfica diseñada en el presente trabajo Final de Grado.

Por lo general, todas las técnicas expuestas a continuación se presentan en la literatura como técnicas de segmentación. Sin embargo, es posible diferenciar entre aquellas que dividen una imagen en regiones y las que detectan puntos de interés dentro de las regiones. Las primeras son a las que llamaremos a lo largo del trabajo técnicas de segmentación mientras que al resto las denominaremos técnicas de detección de puntos de interés.

En algunas ocasiones, la aplicación directa de métodos de segmentación no logran resultados satisfactorios y no consiguen detectar de manera adecuada las regiones deseadas; los núcleos en este caso. Las técnicas de detección se utilizan para dar soporte en estas situaciones. Estas se aplican a priori y se encargan de detectar una serie de puntos dentro de los núcleos, de manera que el algoritmo de segmentación pueda partir de estos puntos para localizar y segmentar las regiones completas.

Es importante entender por qué ambas técnicas son diferentes ya que, en este capítulo y, en general a lo largo del trabajo, se explicarán de manera independiente y serán mencionadas en diversas ocasiones.

## 2.1. Antecedentes

La historia de la segmentación computarizada en imágenes digitales empezó hace unos 40 años. En 1965 se introdujo por primera vez un operador capaz de detectar los bordes de diferentes objetos de una imagen, el operador Roberts. Desde entonces el campo de la segmentación de imagen ha ido evolucionando y se ha visto envuelto en cambios considerables (Zhang, 2009).

En los años 70 aparecieron los primeros ordenadores a precios más asequibles y el procesado de imágenes comenzó a proliferar (Ashraf et al., 2011). Entre los primeros métodos de tratamiento de imágenes capaces de segmentar se encuentra la umbralización, cuyas primeras referencias datan de los años 80. Dentro de los métodos de tipo umbral, cabe destacar el *método Otsu* publicado en 1979 (López, 2016). Estos se tratan de algoritmos muy sencillos y de escaso coste computacional pero con resultados bastante limitados.

Dada la simplicidad de los métodos de segmentación del momento, comienzan a estudiarse otros algoritmos. Uno de ellos es la transformada de *watershed* que, originalmente, era muy susceptible a la sobre-segmentación. Para superar este problema, se desarrolla su versión modificada que incorpora algoritmos de obtención de marcadores que controlan la función y reducen el exceso de segmentación. Las publicaciones y artículos en los que se introduce este método empiezan a aparecer alrededor de 1992 cuyos principales autores son Beucher S. y Meyer F. (Beucher y Meyer, 1992).

Todos estos métodos nacen con objetivos distintos o aplicaciones en otros campos distintos de la medicina pero se ha demostrado su adaptabilidad al estudio de la imagen médica. Las primeras publicaciones relacionadas con la aplicación de algoritmos en el estudio de la morfología nuclear surgen apenas hace 10 años, así, es muy complicado hablar de una evolución consistente respecto la segmentación nuclear, pues es un concepto muy nuevo que todavía requiere una fuerte investigación.

## 2.2. Técnicas de Segmentación

Las técnicas de segmentación localizan las regiones de interés en una imagen para que estas puedan ser analizadas a posteriori (Bueno, 2007). Obtener resultados satisfactorios es una tarea compleja debido a que se trabaja con imágenes, por lo general, ruidosas, con artefactos y de poco contraste.

Concretamente, los algoritmos de segmentación nuclear suelen presentar ciertos problemas, dando como resultado núcleos agrupados y mal segmentados (Xing y Yang, 2016). Por ello, es muy importante la elección del método correcto, capaz de obtener el mayor número posible de núcleos bien segmentados, de forma que se pueda realizar una cuantificación fiable de la imagen (Bueno, 2007).

Existen varios métodos para la segmentación de imágenes que se aplican al estudio de la morfología nuclear en muestras histológica digitalizadas. En términos generales, se podrían clasificar en dos grandes grupos (La Serna y Román, 2009). técnicas de segmentación orientada a regiones y técnicas de segmentación orientada a los bordes.

### **2.2.1. Segmentación orientada a regiones**

Los métodos que se orientan a la segmentación por regiones realizan el agrupamiento de los píxeles según la homogeneidad que exista entre ellos. El algoritmo evalúa las similitudes de sus propiedades y en base a ello, dividirá los píxeles en regiones (La Serna y Román, 2009). Actualmente, las técnicas más consolidadas son la umbralización, el crecimiento de regiones, la transformada *watershed*, los algoritmos de clusterización y las operaciones morfológicas (Irshad et al., 2014).

#### Umbralización

Las técnicas de umbralización son las más simples y suponen muy poco coste computacional (Irshad et al., 2014). Realizan la segmentación en base a las distintas intensidades que presenta la imagen; convierten una imagen de grises en una imagen binaria usando un umbral previamente establecido según la intensidad de las regiones de interés (Xing y Yang, 2016). Es un algoritmo rápido y eficiente, siempre y cuando exista un alto contraste entre el fondo y los objetos que se quiere segmentar (Bueno, 2007).

Se pueden emplear umbrales globales o locales dependiendo de las características de las imágenes a estudiar. Alternativamente, existen algoritmos, como el método *Otsu*, que establece el umbral más óptimo de manera automática. Para ello realiza un análisis estadístico del histograma de intensidades que separa la imagen en clases (Xing y Yang, 2016).

El problema más común con el que se enfrentan estos algoritmos es el solapamiento de las intensidades en la imagen y, en este caso, los núcleos agrupados o superpuestos, que imposibilitan la selección de un umbral óptimo para la segmentación (Xing y Yang, 2016).

#### Crecimiento de regiones

Este método consiste en la formación de regiones cuyo punto de partida es un píxel “semilla”. A estos píxeles “semilla”, previamente seleccionados, se les van anexionando píxeles adyacentes que presenten propiedades similares, de manera que se crean regiones alrededor de los mismos (Beucher y Meyer, 1993).

Un criterio para la unión de píxeles a regiones suele ser el nivel de gris (Bueno, 2007); se establece un límite o umbral de intensidad y si el píxel vecino presenta una intensidad por debajo de este valor, se

anexiona a la “semilla” para formar parte de esa región (Beucher y Meyer, 1993). Este tipo de algoritmos pueden dar lugar a problemas de sobre-segmentación o de regiones incompletas (Bueno, 2007).

### Transformada Watershed

La transformada *watershed* es uno de los métodos de segmentación más destacados y utilizados actualmente (Irshad et al., 2014). Se puede aplicar para segmentar regiones en imágenes tanto en 2D como en 3D (Bueno, 2007). Al igual que en los algoritmos de crecimiento de regiones, la transformada requiere unos píxeles “semilla” para ser iniciada (Xing y Yang, 2016).

Para entender cómo trabaja la función, se puede intuir la imagen como un relieve topográfico donde los mínimos son las zonas menos elevadas y los bordes que dividen las regiones son las zonas más elevadas. El *watershed* es el proceso de inundación desde los mínimos hasta los bordes simulando cuencas (*watershed* en inglés) cuyas fronteras segmentan la imagen (Xing y Yang, 2016).

En una imagen de grises, la transformada *watershed* suele dar lugar a sobre-segmentación por la presencia de muchos mínimos locales (Roerdink y Meijster, 2001), generalmente debidos a la presencia de ruido. La segmentación resultante va a depender enormemente de los píxeles establecidos como “semillas” y por ello, normalmente, antes de la aplicación del *watershed*, se utilizan técnicas para limitar los mínimos utilizados, asegurando que pertenecen al objeto o región de interés que se desea segmentar, dando lugar a lo que se conoce como la transformada *watershed* con marcadores (Beucher y Meyer, 1993). Estas técnicas son las que se han comentado anteriormente en la introducción de este capítulo, denominadas técnicas de detección de puntos de interés.

### Clusterización

Clusterización es un término derivado de la palabra clúster y hace referencia a la clasificación de los datos en distintas regiones o clusters en base a un criterio de similitud entre ellos (Xing y Yang, 2016). Los datos o vectores de datos, se denominan características y serán agrupados según su grado de semejanza en una serie de clusters. La medida para determinar este criterio más utilizada es la distancia Euclídea, la cual resulta en una buena segmentación cuando existe una clasificación compacta y definida (Beucher y Meyer, 1993).

La principal idea de estos procedimientos es comenzar con una partición inicial e ir intercambiando los datos con el fin de alcanzar una partición óptima (Trevino, 2016). Dependiendo de la dinámica del procedimiento, se puede distinguir entre dos tipos de algoritmos:

1. *Algoritmos no jerárquicos*. Los métodos pertenecientes a este grupo clasifican puntos en clusters. El número de clusters  $K$  es definido a priori. (Hafiane et al., 2005).

2. *Algoritmos jerárquicos.* Alternativamente, los métodos jerárquicos parten de un número de clusters igual al número de puntos  $p$  existentes y se van agrupando unos con otros creando grupos mayores hasta construir un solo clúster de  $p$  puntos. Estos son los llamados métodos aglomerativos y si el proceso sucede al contrario, se habla de métodos disociativos (Zhou, Yuan y Shi, 2009).

### Operaciones morfológicas

Una operación morfológica es una función matemática que cambia la forma o estructura de los elementos de la imagen (Bueno, 2007). Utiliza un elemento estructurante que se configura según los objetos presentes y que se quiere segmentar y, al aplicarlo, los modifica tratándolos como figuras geométricas (Irshad et al., 2014).

Las dos operaciones morfológicas más básicas son la dilatación, junta y agranda los objetos, y la erosión, reduce y separa los objetos (Irshad et al., 2014). Es más común aplicar este tipo de operaciones en las etapas de pre-procesado puesto que facilitan la posterior segmentación modelando la morfología de los objetos (Xing y Yang, 2016).

#### **2.2.2. Segmentación orientada a los bordes.**

La segmentación orientada a los bordes consiste en la detección de discontinuidades en la imagen dividiéndola en los lugares donde se den estos cambios bruscos. La detección de discontinuidades puede derivarse de la extracción de bordes de los objetos en una imagen –sabemos que existe un borde cuando una característica es diferente en dos regiones adyacentes (La Serna y Román, 2009). Los modelos deformables son el método más empleado en este tipo de segmentación (Bueno, 2007).

### Modelos deformables

Son descriptores de contorno, moldeables y ajustables a las superficies de los objetos de la imagen (Bueno, 2007). Los modelos deformables son muy populares en aplicaciones biomédicas ya que suponen un equilibrio entre eficiencia y flexibilidad (Xing y Yang, 2016).

Se establece un punto de inicio a partir del cual una curva se deforma adaptándose al contorno del objeto por minimización de una funcional de energía (Bueno, 2007). Esta función depende de las fuerzas internas y externas que se ejercen sobre la curva, las internas son fruto de las propiedades intrínsecas de la curva mientras que las externas derivan de la imagen, permitiendo que se adopten figuras más complejas (Ashraf et al., 2011).

El punto inicial se escoge manualmente pero también puede ser establecido de manera automática por ciertos algoritmos (Xing y Yang, 2016). Los modelos deformables de mayor aplicación son los métodos de contornos activos o *snakes* (Bueno, 2007).

### **2.3. Detección de núcleos**

Como se ha comentado previamente, en ocasiones se requieren algoritmos previos a los algoritmos de segmentación que den soporte a los mismos y mejoren los resultados (Beucher y Meyer, 1993). Este tipo de algoritmos establece un marcador inicial por objeto de interés, generalmente un punto o pequeña región cercano al centro del mismo (Irshad et al., 2014). Se consigue entonces, una detección de los objetos de la imagen sin delimitar sus bordes y que, posteriormente, servirá de soporte para la segmentación de los mismos (Xing y Yang, 2016).

A pesar de que distintos tipos de imágenes histológicas presenten variaciones significantes en cuanto a sus características y requieran específicos algoritmos de detección de núcleos, la mayoría de los métodos que se describen en los estudios más recientes son la transformada de la distancia, el filtro laplaciano de gaussiano (LoG), la transformada de Hough o la transformada de la simetría radial (Irshad et al., 2014).

En aplicaciones biomédicas de segmentación de núcleos, la detección nuclear es prácticamente un prerrequisito ya que la precisión de los métodos de segmentación depende de manera crítica de la fiabilidad de los marcadores iniciales (Irshad et al., 2014). Por ello, en este trabajo se recurre a la implementación de alguno de los algoritmos de detección nuclear mencionados que, junto a los algoritmos de segmentación, constituyen métodos completos y más eficientes.

## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

En este proyecto, se han estudiado en profundidad dos de los métodos de segmentación mencionados en el capítulo anterior; la técnica *Watershed* con marcadores y los métodos de clusterización, con el fin de generar métodos completos de segmentación e incluirlos en la herramienta diseñada. Su aplicación se ha realizado en combinación con algoritmos de pre procesado, detección nuclear y post procesado. En este capítulo, se explica con más detalle la teoría de las técnicas de segmentación implementadas y además, se introducirán los algoritmos de detección de puntos de interés que les darán soporte.

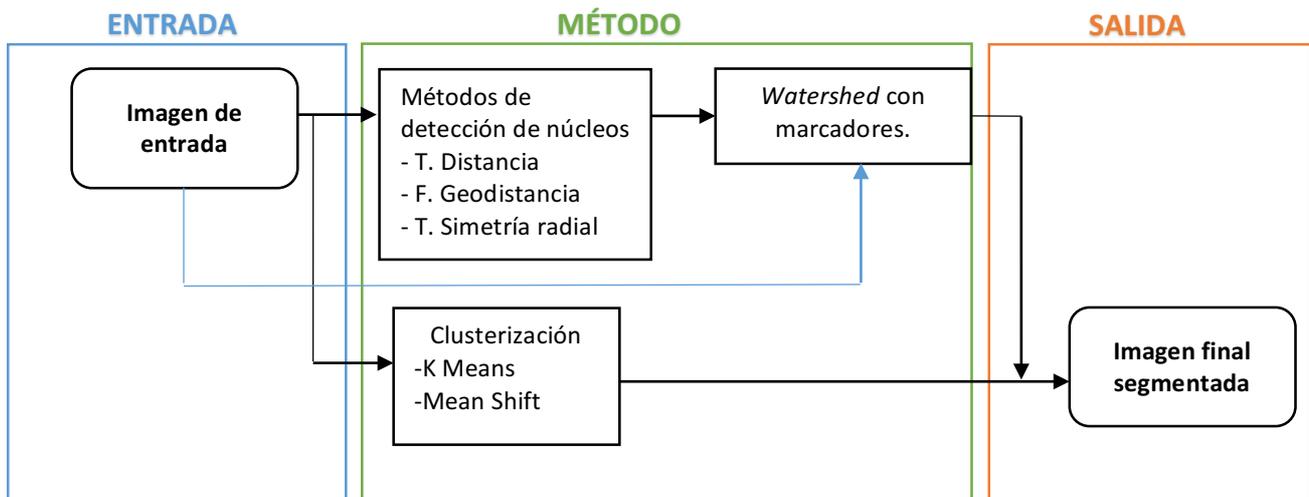
En primer lugar, se va a explicar cómo obtener las imágenes de entrada. Es sabido que, en la mayoría de las aplicaciones de análisis automático, las imágenes originales no se usan directamente como entrada en los algoritmos, si no que son tratadas previamente para facilitar su procesado. En este proyecto, se ha querido dar dos enfoques distintos al tratamiento de las imágenes, que originalmente se encuentran en formato RGB, según el método de segmentación a implementar:

- Conversión al espacio CIELAB. Se llevará a cabo una transformación al espacio de color CIELAB para aplicar uno de los métodos de clusterización sobre las componentes a y b de este espacio; el algoritmo *K-means*.
- Conversión a grises. Las imágenes serán convertidas a escala de grises cuando se quiera aplicar la segmentación *Watershed* con marcadores. Esto se abordará de dos manera: mediante una deconvolución de color y mediante el algoritmo *Fuzzy c-means*.

En algunas ocasiones, tras la conversión, las imágenes de entrada pueden presentar ruido y estructuras irrelevantes. Para suavizar o eliminar estos obstáculos, se recurre a operaciones morfológicas que filtren la imagen y faciliten la obtención de marcadores (Xing y Yang, 2016). Por ello, en el presente capítulo, también se explicará en profundidad en qué consisten estas operaciones y qué efecto tienen sobre las imágenes.

Una vez se ha entendido esta primera etapa de pre-procesado para obtener las imágenes de entrada, en el resto del capítulo se realiza una exposición siguiendo el Esquema 3.1. Este esquema sirve también para ilustrar la estructura global de la metodología propuesta para abordar la segmentación, la cual se detalla en el capítulo 4.

Atendiendo al esquema, por un lado, se explicará con detalle cómo trabaja la técnica *Watershed* con marcadores y qué algoritmos de detección se van a emplear para obtener estos marcadores. Por otro lado, se expondrán los dos métodos de clusterización escogidos para realizar la segmentación, *K-means* y *Mean Shift*. Es importante aclarar que para este último método no se necesita un tratamiento de la imagen de HE; entrada se usará esta misma imagen en RGB. En esta sección también se hablará del método de clusterización *Fuzzy-c-means*, pero cabe mencionar que éste no se utiliza como método de segmentación, si no en la conversión de la imagen a escala de grises.



Esquema 3.1. Metodología general.

### 3.1. Selección de la Imagen de Entrada.

Elegir la imagen adecuada que se usará como entrada es especialmente importante ya que una correcta segmentación no solo depende de la eficacia del algoritmo, si no también de cómo este reconoce y reacciona ante la imagen de entrada. Si la imagen presenta mucho ruido, artefactos o es difícil de interpretar por el algoritmo, las probabilidades de obtener un pobre resultado en la segmentación ascienden enormemente.

Dado que originalmente las imágenes de Hematoxilina-Eosina se encuentran en formato RGB, es importante, en primer lugar, conocer cómo trabaja este espacio de color. No suele ser conveniente utilizar una imagen en este formato como imagen de entrada, por ello se han estudiado diversas técnicas para tratarla.

#### 3.1.1. Espacio RGB

Las siglas RGB hacen referencia a los colores que componen este espacio: *Red*, *Green*, *Blue*. Es el espacio más comúnmente utilizado donde los píxeles vienen representados por un vector de tres dimensiones  $(r, g, b)$ , las cuales proporcionan la intensidad presente en la imagen de los tres colores primarios (Burger y Burge, 2009). Se trata de un modelo basado en la síntesis aditiva (Figura 3.3.), así, la suma de cierta proporción de intensidad de dos de los canales o incluso de los tres permite representar hasta 16 millones de colores  $(256^3)$  (Kårnsnäs, 2014).

Estos tres canales de color pueden definirse como tres planos distintos donde un píxel tiene un valor de intensidad en cada uno de los planos (Figura 3.1.). Por tanto, cada plano consiste en una colección de píxeles cuyos valores se asemejan a los que se dan en una imagen en escala de grises. De esta forma,

si se representan las componentes RGB individualmente es posible visualizarlas como una imagen de grises (Jayaraman et al., 2009).

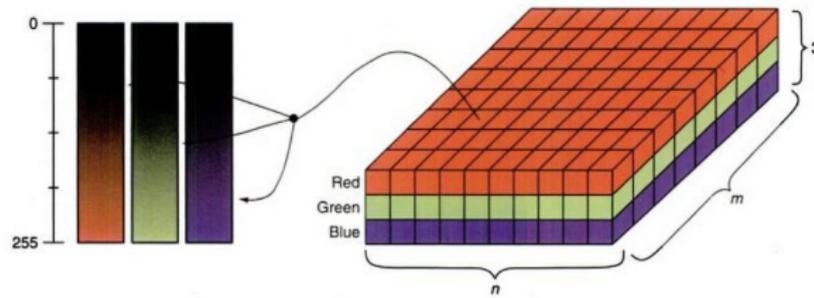


Figura 3.1. Representación de las tres componentes del espacio RGB en planos (Jayaraman et al., 2009).

Como se ha mencionado previamente, en este trabajo se emplea la conversión a escala de grises para obtener la imagen de entrada. Es interesante saber que, partiendo de una imagen RGB, si se calculan sus componentes por separado como se ha hecho en la Figura 3.2., tendríamos la versión en grises de la imagen. Sin embargo, no se utilizará esta técnica de conversión a escala de grises en el presente trabajo. Más adelante se estudiarán otras técnicas a partir de las cuales es posible conseguir un mayor detalle de los núcleos.

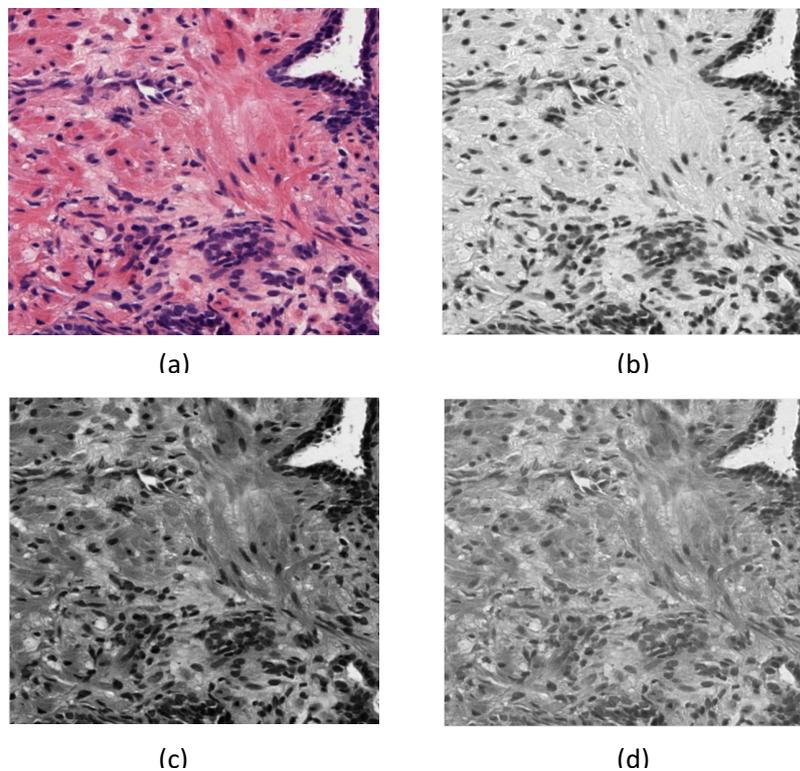


Figura 3.2. Separación de las componentes del espacio RGB. (a) Imagen en espacio RGB. (b) Componente Roja, R. (c) Componente Verde, G. (d) Componente Azul, B.

### 3.1.2. Conversión al Espacio CIELAB

Una de las técnicas que se ha empleado para tratar las imágenes con el fin de obtener una imagen de entrada adecuada es la conversión al espacio CIELAB desde el espacio RGB. Este primer enfoque del tratamiento de las imágenes se ha utilizado para la implementación del algoritmo de clusterización *K-means*.

El espacio CIELAB, también conocido como espacio  $L^*a^*b^*$ , aporta más información acerca del color con respecto al espacio RGB, cuantificando las diferencias visuales a través de dos capas. Está formado por tres parámetros donde  $L$  representa la luminosidad, mientras que  $a$  y  $b$  son las dos capas de cromaticidad que indican el color característico a lo largo del eje magenta-verde y a lo largo del eje azul-amarillo, respectivamente (Figura 3.3.) (Mathworks, 2014).

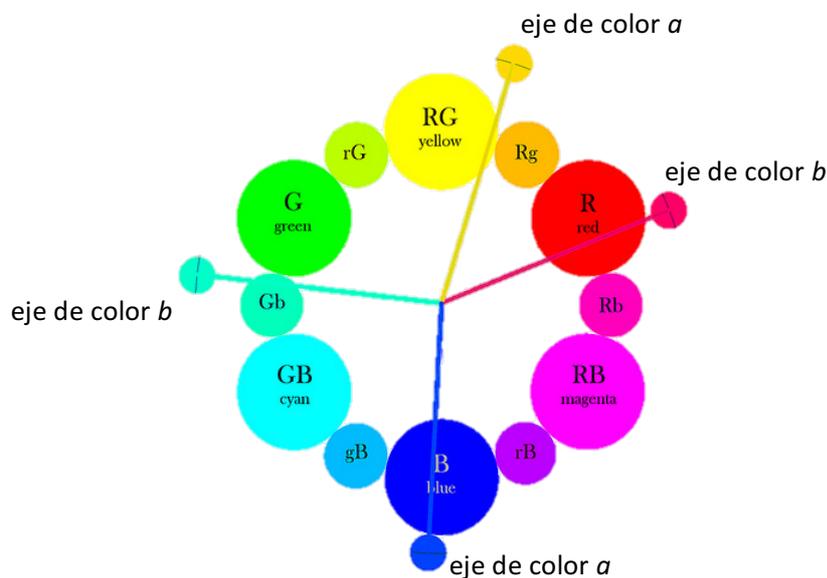


Figura 3.3. Relación entre los espacios RGB y CIELAB. Resultados al sumar dos componentes en el espacio RGB (Adaptado de: Abeln, 2017).

Si se desea trabajar con CIELAB, es necesario saber realizar correctamente la transformación desde el espacio RGB, puesto que las imágenes originales de Hematoxilina-Eosina se encuentran habitualmente en formato RGB.

Para relacionar ambos espacios, se ha de acudir a una fase intermedia de adaptación en la que se necesita un blanco de referencia, el cual representa la luminancia al que el sistema visual ha sido adaptado, y la transformada linealizada de Bradford, cuya matriz distribuye los distintos colores en el mapa XYZ (Hoffmann, 2013).

Dadas las coordenadas de un sistema RGB  $(x_r, y_r)$ ,  $(x_g, y_g)$  y  $(x_b, y_b)$  y su blanco de referencia  $(X_w, Y_w, Z_w)$ . El método para convertir una matriz 3x3 del espacio RGB a XYZ es,

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = [M] \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

Donde M se halla a partir de,

$$[M] = \begin{bmatrix} S_r X_r & S_g X_g & S_b X_b \\ S_r Y_r & S_g Y_g & S_b Y_b \\ S_r Z_r & S_g Z_g & S_b Z_b \end{bmatrix} \quad (2)$$

$$X_r = \frac{x_r}{y_r}, \quad Y_r = 1, \quad Z_r = \frac{(1 - x_r - y_r)}{y_r} \quad (3, 4, 5)$$

$$X_g = \frac{x_g}{y_g}, \quad Y_g = 1, \quad Z_g = \frac{(1 - x_g - y_g)}{y_g} \quad (6, 7, 8)$$

$$X_b = \frac{x_b}{y_b}, \quad Y_b = 1, \quad Z_b = \frac{(1 - x_b - y_b)}{y_b} \quad (9, 10, 11)$$

$$\begin{bmatrix} S_r \\ S_g \\ S_b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_r & X_g & X_b \\ Y_r & Y_g & Y_b \\ Z_r & Z_g & Z_b \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X_w \\ Y_w \\ Z_w \end{bmatrix} \quad (12)$$

Una vez se hayan transformado las componentes RGB al mapa XYZ, estas se relacionan con el espacio L\*a\*b\* a partir de la siguiente ecuación lineal (Hoffmann, 2013):

$$L = 116Y_1 - 16 \quad (13)$$

$$a = 500(X_1 - Y_1) \quad (14)$$

$$b = 200(Y_1 - Z_1) \quad (15)$$

Donde  $(X_1, Y_1, Z_1)$  se halla a partir de,

$$Y_1 = \begin{cases} \frac{\sqrt[3]{x_1}}{116} & x_1 > \epsilon; \\ \frac{\kappa x_1 + 16}{116} & x_1 < \epsilon; \end{cases} \quad X_1 = \begin{cases} \frac{\sqrt[3]{y_1}}{116} & y_1 > \epsilon; \\ \frac{\kappa y_1 + 16}{116} & y_1 < \epsilon; \end{cases} \quad Z_1 = \begin{cases} \frac{\sqrt[3]{z_1}}{116} & z_1 > \epsilon; \\ \frac{\kappa z_1 + 16}{116} & z_1 < \epsilon; \end{cases} \quad (16, 17, 18)$$

$$x_1 = \frac{X}{X_w}, \quad y_1 = \frac{Y}{Y_w}, \quad z_1 = \frac{Z}{Z_w} \quad (19, 20, 21)$$

$$\epsilon = 0.008856 \quad \kappa = 903.3 \quad (22, 23)$$

La transformación de la imagen del espacio RGB al espacio CIELAB quedaría como se muestra en la Figura 3.4.

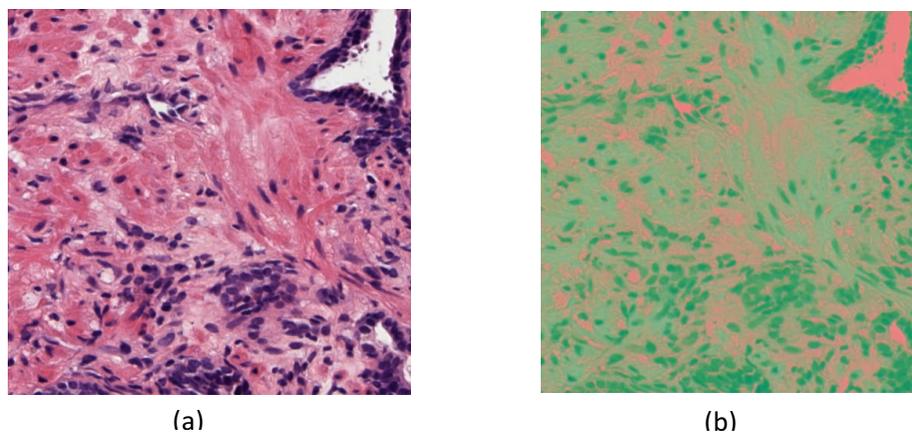


Figura 3.4. Conversión a CIELAB (a) Imagen en RGB. (b) Imagen convertida a CIELAB.

Como se ha comentado antes, la componente L aporta información sobre la luminosidad, mientras que a y b son las encargadas de informar acerca del color. En la Figura 3.4.b, si se observan los núcleos, es posible deducir que los valores de sus píxeles se encuentran más bien a lo largo de los ejes de color y no tanto en el eje de la luminosidad. Es por esto que, para generar la imagen de entrada, se combinarán ambas componentes, a y b, mientras que la componente L será descartada.

### 3.1.3. Conversión a escala de grises.

En la mayoría de las aplicaciones de procesamiento de imagen, la información derivada del color no siempre es útil y puede dificultar la detección de objetos o bordes de interés (Jayaraman et al., 2009). Es por eso que, en ciertos algoritmos de segmentación de núcleos, es conveniente partir de una imagen en escala de grises, como es el caso de la segmentación *watershed*.

En una imagen en escala de grises, cada píxel representa un solo byte, el valor del cual corresponde con la intensidad de ese punto en la imagen. Estas imágenes de 8 bits presentan, por lo tanto, 256 valores distintos donde el 0 corresponde al negro, el 255 al blanco y el resto de valores posibles dentro del rango corresponden a toda la gama de grises comprendidos entre ambos (Jayaraman et al., 2009).

Existen multitud de formas para obtener una imagen en escala de grises. Una de ellas se ilustró en 3.1.1. *Espacio RGB* separando las componentes de este mismo espacio. Para este proyecto, se han estudiado otras dos formas que, como se verá, han resultado ser más convenientes para la segmentación *watershed*. Una de ellas es la deconvolución de imágenes HE la cual se describirá a continuación. La segunda forma para obtener imágenes en grises es implementando el algoritmo *Fuzzy c-means*. La teoría de este método se explicará más adelante en 3.4. *Métodos basados en la clusterización*.

## Deconvolución de imágenes HE

Las imágenes estudiadas en el presente trabajo corresponden a muestras histológicas que han sido teñidas con la coloración hematoxilina-eosina. Como se comentó con anterioridad, la hematoxilina es la que se encarga de la tinción de los núcleos de un color azul oscuro, por ello se busca obtener este canal de color por separado ya que mostrará la información de los objetos más relevantes.

Este proceso se consigue a través de una deconvolución de color. Para ello, la función usa la información aportada por el sistema RGB. Así, es capaz de separar prácticamente toda combinación de dos o tres colores siempre que los colores sean suficientemente diferentes en sus características de absorción rojas, verdes y azules (Ruifrok y Johnston, 2001).

Para conseguir esta deconvolución, se aplica una transformación ortonormal a la imagen RGB original. Para ello, se utiliza la densidad óptica de los canales de color (OD), la cual se define como

$$OD_c = A * c_c \quad (24)$$

Donde  $OD$  es lineal a la concentración de tinción absorbida  $A$ , y al factor de absorción  $c$ , en un determinado canal de color  $c$  subíndice.

Cada tinción presenta una OD para cada canal de color, es decir, para el canal RGB, tendremos un vector con un valor de densidad óptica para el canal R, otro para el canal G y otro para el canal B. Así, por cada tinción presente en la imagen, se suma una fila, siendo la longitud del vector proporcional al número de tinciones (Ruifrok y Johnston, 2001).

En el caso de tres tinciones aplicadas en una imagen, el sistema formaría una matriz donde cada fila representa una tinción específica y cada columna un canal, por lo que cada elemento será la densidad óptica de uno de los canales en una tinción determinada.

Supongamos la combinación de las tinciones Hematoxilina, Eosina y DAB<sup>1</sup>, resultando en una matriz con la siguiente forma:

$$\begin{array}{ccc} \mathbf{R} & \mathbf{G} & \mathbf{B} \\ \left( \begin{array}{ccc} OD_{11} & OD_{12} & OD_{13} \\ OD_{21} & OD_{22} & OD_{23} \\ OD_{31} & OD_{32} & OD_{33} \end{array} \right) & \text{Hematoxilina} \\ & \text{Eosina} \\ & \text{DAB} \end{array} \quad (25)$$

Una vez se tiene la matriz, se realiza una normalización de la matriz seguida de una transformación ortogonal para extraer la información de cada tinción de manera independiente.

---

<sup>1</sup> *Diaminobencidina* que al reaccionar con agua oxigenada resulta en un color marrón que se usa como tinción en muestras histopatológicas.

Normalizamos los elementos de la matriz dividiendo cada uno por la longitud total del vector.

$$\widehat{OD}_{11} = \frac{OD_{11}}{\sqrt{OD_{11}^2 + OD_{12}^2 + OD_{13}^2}} \quad (26)$$

$$\widehat{OD}_{21} = \frac{OD_{21}}{\sqrt{OD_{21}^2 + OD_{22}^2 + OD_{23}^2}} \quad (27)$$

$$\widehat{OD}_{31} = \frac{OD_{31}}{\sqrt{OD_{31}^2 + OD_{32}^2 + OD_{33}^2}} \quad (28)$$

...

Se obtiene entonces una nueva matriz  $M$  formada por los vectores normalizados de los valores de  $OD$ .

Siendo  $C$  un vector 3 por 1 que contiene las cantidades de cada tinción en un píxel, el vector de los valores de  $OD$  para este mismo píxel es  $y = C * M$ . De aquí se obtiene,

$$C = M^{-1} * [y] \quad (29)$$

y definiendo la matriz inversa  $M$  como la matriz de deconvolución  $D$ ,

$$C = D * [y] \quad (30)$$

Esta multiplicación resulta en una representación ortogonal de las tinciones que forman la imagen de manera que se hace posible la separación de la contribución de las distintas tinciones en la misma. (Ruifrok y Johnston, 2001).

En la Figura 3.5. se ha realizado la deconvolución de la imagen en las tinciones Hematoxilina, Eosina y DAB. A partir de estas imágenes es posible confirmar lo que se comentó al principio acerca de la tinción hematoxilina; es de las tres la componente que mayor información aporta sobre los núcleos.

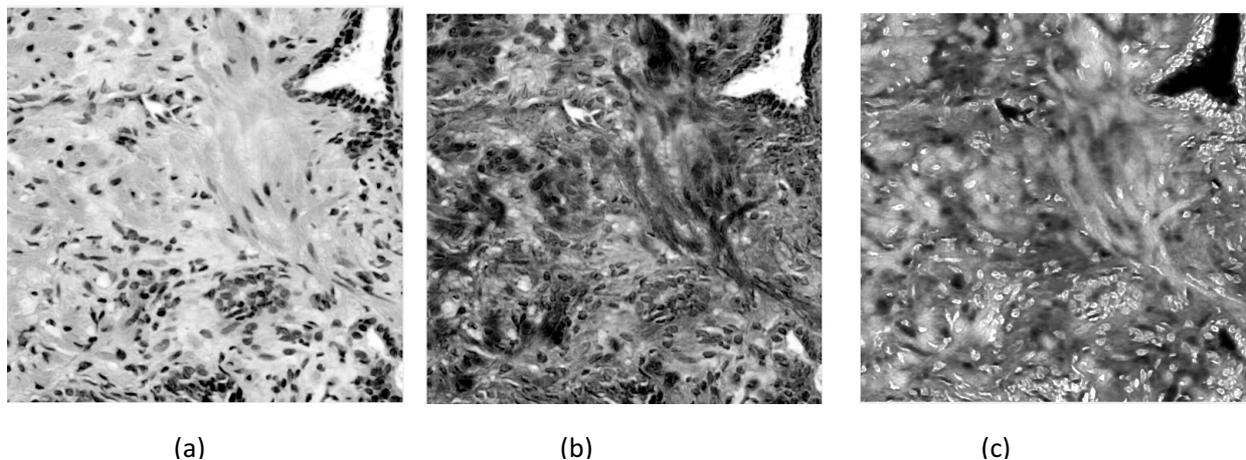


Figura 3.5. Deconvolución de color. (a) Componente Hematoxilina. (b) Componente DAB. (c) Componente Eosina.

Comparando la componente R (obtenida de la imagen en formato RGB) con los resultados de deconvolucionar la componente de hematoxilina en la Figura 3.6., se puede apreciar una mejor visualización de los núcleos. La componente R presenta una mayor nitidez en el estroma lo cual puede entorpecer la detección de los objetos de interés.

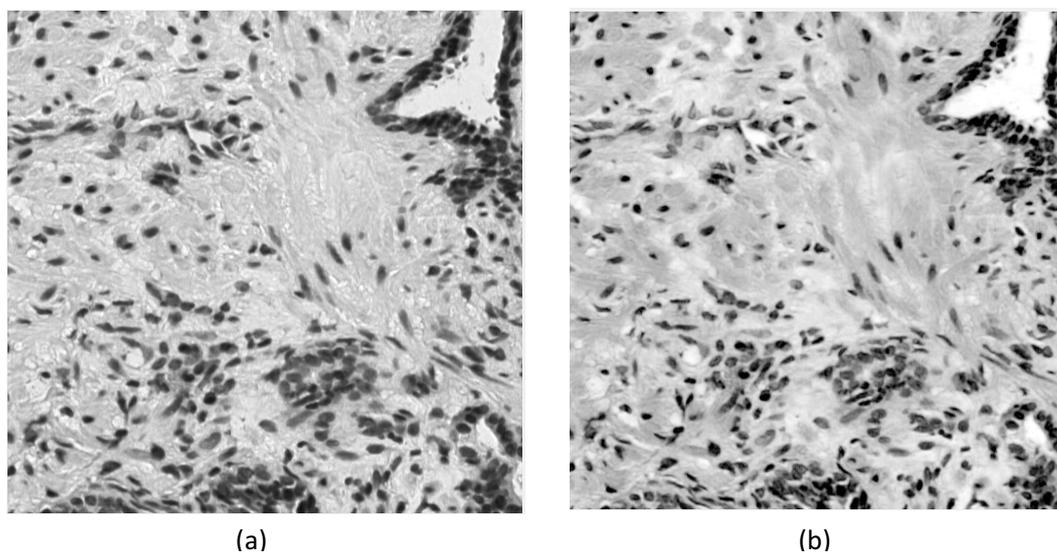


Figura 3.6. Comparación entre Componente R (a) y componente He (b).

### 3.2. Operaciones morfológicas

Las operaciones morfológicas son un conjunto de funciones no lineales que procesan las imágenes usando elementos estructurantes. Realizan un filtrado con una figura predefinida la cual se escoge en base a la geometría y la estructura de los objetos relevantes de la imagen (Xing y Yang, 2016).

Como se mencionó en la introducción del capítulo, en la metodología propuesta se utilizarán estas operaciones en las fases de pre-procesado de uno de los métodos y no como técnica de segmentación, pues lo que se busca es reducir el ruido y objetos irrelevantes que obstaculicen la detección de los núcleos en las imágenes de entrada. Más adelante, en el capítulo 4, se detallarán las operaciones morfológicas específicas que se van a usar en este trabajo.

Para definir los operadores morfológicos básicos, se toma una imagen  $I$  como una función  $I: \mathcal{U} \rightarrow [0,1]^c$  donde  $\mathcal{U}$  es el conjunto de píxeles con  $m$  filas y  $n$  columnas y  $c \in \{1,3\}$  es el número de canales de colores.

Si se considera  $I$  como una imagen binaria y  $\mathcal{U}_f$  como los píxeles del fondo, no pertenecientes a objetos, la erosión y la dilatación pueden definirse como

$$\text{Erosión: } \mathcal{U}_f \ominus S = \{x | \forall s \in S, x + s \in \mathcal{U}_f\} \quad (31)$$

$$\text{Dilatación: } \mathcal{U}_f \oplus S = \{x + s | x \in \mathcal{U}_f \wedge s \in S\} \quad (32)$$

Donde  $S$  es el elemento estructurante y  $S \in \mathbb{Z} \times \mathbb{Z}$  (Irshad et al., 2014).

Estos operadores cumplen el criterio de dualidad, esto quiere decir que si se aplica la erosión sobre una imagen se obtiene el mismo resultado que si se aplica la dilatación sobre su complementaria y viceversa.

El efecto principal que tiene la erosión al aplicarla sobre una imagen es estrechar los objetos. El elemento estructurante (EE) se escoge adrede según la morfología de los objetos en la imagen, por lo general los EE más empleados suelen ser cuadrados o discos, y este se posiciona punto a punto en el borde del objeto, erosionándolo. La dilatación actúa de la misma forma, con un EE de forma y tamaño predefinido, pero que, al contrario que en la erosión, agranda los objetos de la imagen. En la Figura 3.6. es posible ver los efectos de ambos operadores.

Además de estrechar o agrandar los objetos, los EE pueden conseguir otros efectos (Figura 3.7). En el caso de la erosión, si el objeto es más pequeño que el EE escogido, este será eliminado. Por otro lado, la dilatación puede juntar objetos cercanos que acaban colindando cuando se ven agrandados.

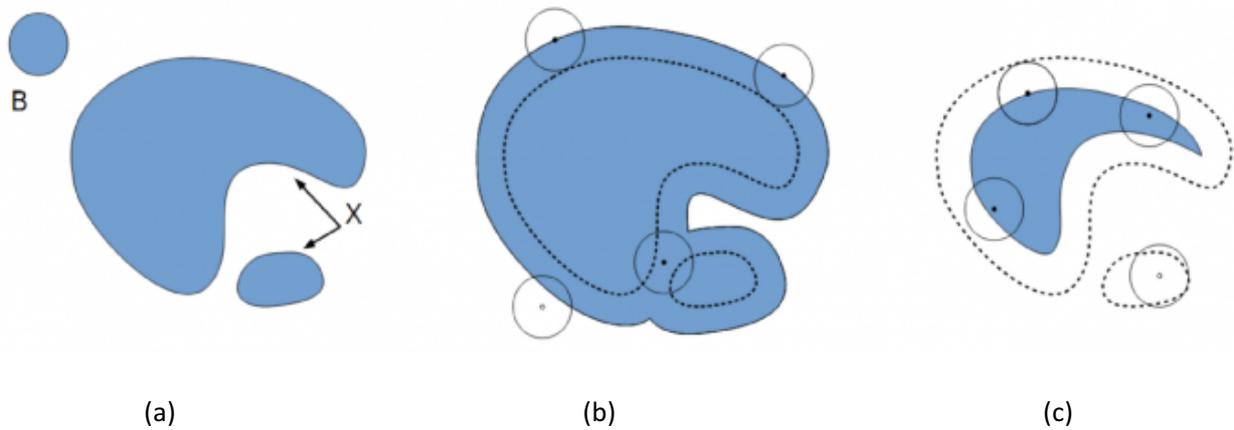


Figura 3.7. Efectos de la erosión y dilatación. (a) Objetos originales con EE en forma de disco,  $B$ . (b) Efectos de la dilatación al aplicar  $B$ . (c) Efectos de la erosión al aplicar  $B$  (Adaptado de: ImageJ, 2017).

Se han supuesto los efectos de estas operaciones sobre imágenes binarias, pero también pueden aplicarse sobre imágenes en escala de grises con resultados interesantes como en la Figura 3.8. En una imagen en grises, la erosión actuaría computando para cada píxel el mínimo valor dentro del vecindario de píxeles comprendido en el EE, de manera que las zonas oscuras se ensancharán y las zonas claras se estrecharán, o se eliminarán en el caso de ser más pequeñas que el EE. La dilatación, en cambio, computará cada píxel con el valor máximo comprendido en los píxeles bajo el EE, ensanchando las zonas claras y estrechando las oscuras, eliminando aquellas más pequeñas que el EE.

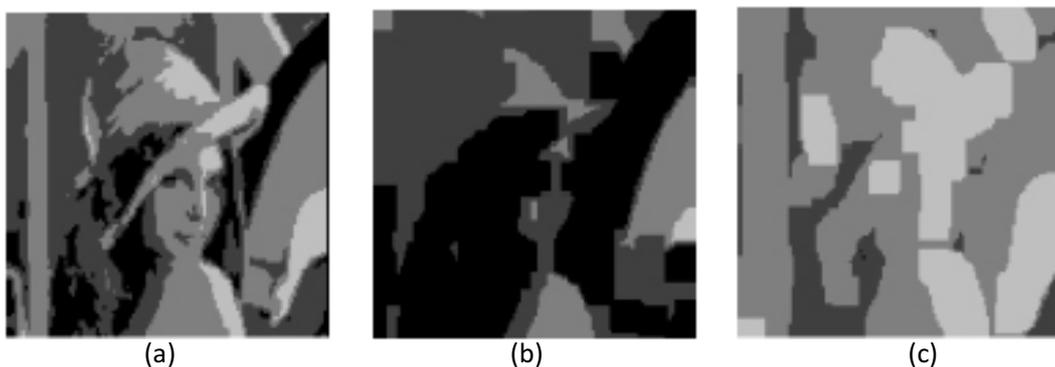


Figura 3.8. Efectos de la erosión y la dilatación en imagen en escala de grises con un EE cuadrado. (a) Imagen original. (b) Imagen original erosionada. (c) Imagen original dilatada (Peñaranda, 2014).

Combinando estos dos operadores, se obtienen los llamados filtros elementales, apertura y cierre, también duales y aplicables en imágenes binarias (Figura 3.9) y en escala de grises.

$$\text{Apertura: } \mathcal{U}_f \circ S = [\mathcal{U}_f \ominus S] \oplus S \quad (33)$$

$$\text{Cierre: } \mathcal{U}_f * S = [\mathcal{U}_f \oplus S] \ominus S \quad (34)$$

Dadas las ecuaciones, la apertura está compuestas por una primera operación de erosión seguida de una dilatación mientras que el cierre empieza por una dilatación y termina con una erosión.

Se obtienen efectos diferentes pues al aplicar el EE en la dilatación se eliminarán las zonas oscuras más pequeñas mientras que el resto de los objetos no se verá afectado. De la misma forma, en la erosión solo se eliminan las zonas claras en las que el EE no cabe y el resto no se modifica.

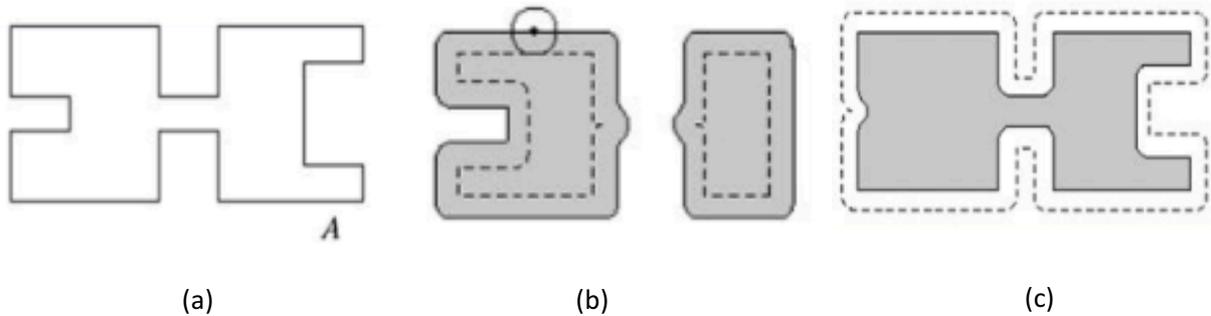


Figura 3.9. Efectos de la apertura y el cierre en una imagen binaria con un EE circular. (a) Imagen original A. (b) Efecto de la apertura en Imagen A. (c) Efecto del cierre en imagen A. (Adaptado de: Ballerini, 2017).

### 3.3. *Watershed* con marcadores

En este apartado se estudia más en profundidad la transformada *watershed* con marcadores y cómo funcionan los algoritmos de detección que se van a utilizar para hallar los marcadores. Así, es posible entender la influencia de cada uno de ellos al combinarlos con la segmentación *watershed*.

En primer lugar, es importante conocer en detalle la transformada que realiza la segmentación. Se comentó en el capítulo 2 que su comportamiento se podía asemejar al proceso de rellenado de agua de unas cuencas (Figura 3.10). En el momento en que el nivel de agua de las cuencas comienza a converger, las presas o diques se levantan para evitar la unión de las mismas. Estos diques representan las líneas de *watershed* que segmentan en regiones la imagen (Hahn, 2003).

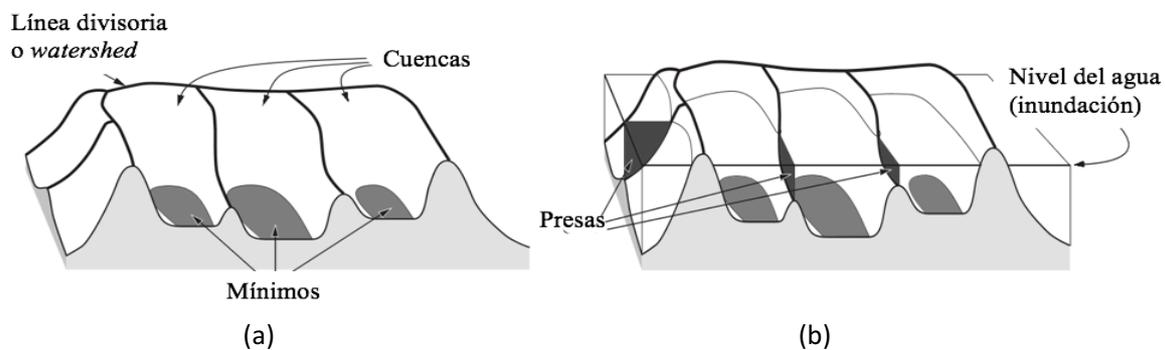


Figura 3.10. Representación de la segmentación *watershed*. (a) Relieve topográfico de unas cuencas. (b) Proceso de inundación. Donde el agua de las distintas cuencas confluye, las presas se construyen. (Hahn, 2003).

La segmentación *watershed* se aplica normalmente a imágenes gradiente, dado que interesa que los mínimos de la imagen representen los objetos de interés y los máximos las fronteras de separación entre los objetos. Se obtienen buenos resultados siempre y cuando presenten una distribución homogénea de grises dentro de los objetos. Si, por el contrario, hay muchas variaciones en la intensidad, al aplicar la transformada, esta resulta en una sobre segmentación. Así sucede al aplicar la segmentación *watershed* a la imagen en la Figura 3.11.

Para abordar el problema, cuando se busca la segmentación de los núcleos, en la mayoría de ocasiones se acude a los algoritmos de detección, a través de los cuales se obtiene un único marcador o mínimo por objeto. Como se ha comentado anteriormente, la técnica por la que se asignan marcadores que indiquen de manera artificial cuáles son los objetos de interés recibe el nombre de *watershed con marcadores*.

En la técnica *watershed con marcadores* se establecen ciertos píxeles dentro de los objetos de interés como marcadores internos, y píxeles del fondo como marcadores externos. Estos se van a considerar como los mínimos locales de la imagen, de manera que, el proceso de 'inundación' comience en dichos puntos.

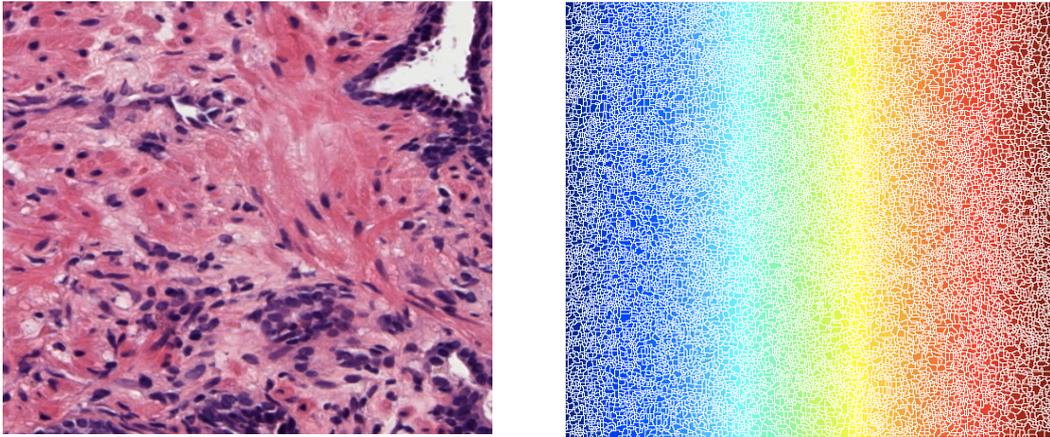


Figura 3.11. *Watershed* sin marcadores. (a) Imagen RGB. (b) Imagen segmentada.

En la Figura 3.12. se vuelve a realizar la segmentación *watershed*, esta vez utilizando algoritmos que generen marcadores. En este caso se ha empleado la transformada de la distancia como algoritmo de detección. Así se ilustra la importancia de usar unos marcadores adecuados ya que, como se puede observar, existe una enorme mejora con respecto a la Figura 3.11 *b* en la cual resulta imposible reconocer los núcleos.

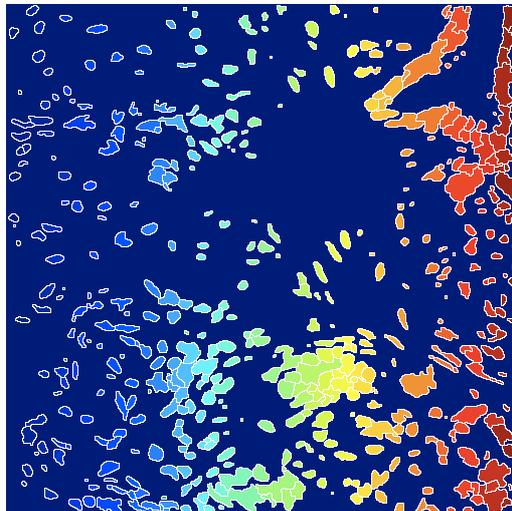


Figura 3.12. Resultado de aplicar *watershed* con marcadores (transformada de la distancia).

En el presente trabajo, se han empleado tres algoritmos distintos para obtener los marcadores antes de aplicar el *watershed*: la ya mencionada transformada de la distancia, la función geodistancia y la transformada de la simetría radial.

### 3.3.1. Transformada de la distancia

La transformada de la distancia trabaja asignando a cada píxel el valor de una distancia existente a un punto característico. Al aplicar la transformada sobre una imagen se crea un mapa de distancia en el que los centroides de los núcleos o células (Irshad et al., 2014) corresponden con los picos o máximos locales (Xing y Yang, 2016).

Aunque es posible generalizar la función distancia (Friel y Molchanov, 1998), normalmente se aplica sobre imágenes binarias dado que trabajar únicamente con dos valores posibles de píxel, 0 y 1, facilita el cálculo de la distancia y reduce enormemente el coste computacional. El resultado es una imagen en escala de grises donde a los píxeles se les ha asignado valores de intensidad según su posición con respecto a puntos característicos en la imagen binaria (Friel y Molchanov, 1998).

Existen distintas métricas que se utilizan para calcular esta distancia, pero la más común es la distancia Euclídea. Para entender el concepto de transformada de la distancia, la clave es visualizar la imagen como un mapa topográfico, siguiendo la dinámica de la técnica *watershed*, donde la altitud representa el valor de intensidad de gris. Los picos son los puntos más brillantes de la imagen mientras que los valles corresponden a las zonas más oscuras (Kårsnäs, 2014).

En la Figura 3.13. se observa el resultado de aplicar la transformada de la distancia en la imagen que se ha usado en los ejemplos anteriores. Esta sería la fase intermedia antes de llegar al resultado de la segmentación que se ha mostrado en la Figura 3.11. donde se indicaba que se había utilizado esta misma transformada para obtener los marcadores.

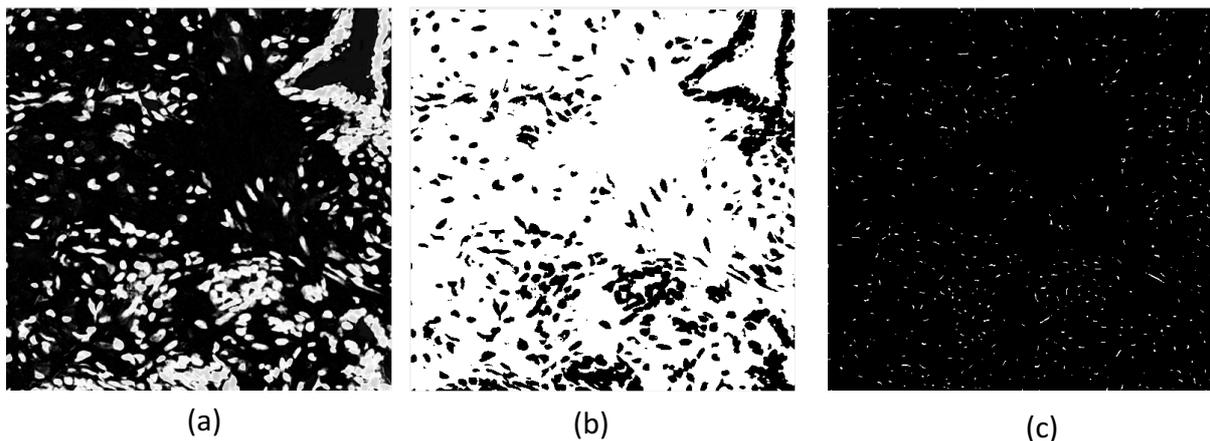


Figura 3.13. Proceso de obtención de marcadores a partir de la transformada de la distancia. (a) Imagen en grises tras aplicar el *Fuzzy c-means*. (b) Entrada a la función: Negativo y binario de (a). (c) Marcadores.

Anteriormente se comentó que para la segmentación *watershed* se utilizaría como entrada una imagen en escala de grises. En el caso de la Figura 3.13, en el que se utiliza la transformada de la distancia para calcular los marcadores, la imagen de entrada se ha obtenido haciendo uso del

algoritmo *Fuzzy c-means*. Una vez aplicado el *Fuzzy c-means* y antes de aplicar la transformada de la distancia, se halla el negativo de la imagen en grises y se pasa a binario través de una umbralización. Los detalles de todo el proceso se expondrán en el capítulo 4.

### 3.3.2. Función geodistancia

Otro de los algoritmos que se utiliza para obtener marcadores es la función geodistancia. Esta obtiene los mínimos locales o píxeles “semilla” realizando un cálculo iterativo aditivo entre los valores mínimos y máximos de una imagen. Ésta calcula la suma acumulativa de la distancia que existe entre el píxel obtenido con la iteración y el resto de los píxeles en la imagen de mayor valor (Esteban et al., 2017). El algoritmo que sigue esta función para la obtención de los marcadores es el siguiente (Esteban et al., 2017):

**Entrada:** Imagen clusterizada,  $im_{in}$

**Salida:** Imagen geodistancia,  $im_{out}$

*Inicialización:*

$b \leftarrow \max(im_{in});$

$a \leftarrow \min(im_{in});$

*Función Geodistancia:*

**for**  $k \leftarrow a$  **to**  $b$  **do**

$im_{out} \leftarrow im_{out} + \text{dist}(im_{in} >= k);$

**end**

En la Figura 3.14. se han calculado los marcadores usando la función geodistancia sobre la imagen en escala de grises. De la misma forma que para la transformada de la distancia, la imagen en escala de grises viene dada por el algoritmo *Fuzzy c-means*, proceso que se detallará en el capítulo 4.

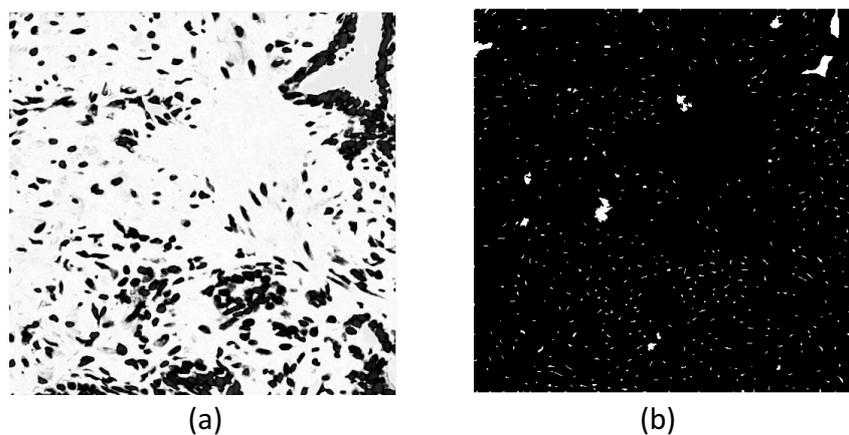


Figura 3.14. Proceso de obtención de marcadores a partir de la función geodistancia. (a) Entrada a la función: imagen tras aplicar el *Fuzzy c-means*. (b) Marcadores.

### 3.3.3. Transformada de la simetría radial

Por último, la transformada de la simetría radial será el tercer algoritmo que acompañará a la segmentación *watershed* en el cálculo de los marcadores. Se trata de un operador basado en el gradiente capaz de detectar puntos que presentan una simetría radial elevada (Loy y Zelinsky, 2003). Dado que los núcleos pueden considerarse como objetos simétricamente radiales, este algoritmo es bastante adecuado para su localización (Veta et al., 2011).

Matemáticamente hablando, la transformada presenta orden  $O(K, N)$  al considerar la simetría radial local en  $N \times N$  conjuntos en una imagen con  $K$  píxeles. Se puede calcular para todos los rangos  $n \in N$  de la imagen pero con un solo subconjunto de los mismos es posible obtener resultados representativos.

Por cada punto  $p$  de la imagen, se estudia el gradiente  $g$  a partir del cual se determinan un píxel positivamente afectado  $p_{+ve}(p)$  y otro píxel negativamente afectado  $p_{-ve}(p)$ . Para realizar el cálculo se redondea al entero más cercano (Loy y Zelinsky, 2003):

$$p_{+ve}(p) = p + \text{round}\left(\frac{g(p)}{\|g(p)\|} n\right) \quad (35)$$

$$p_{-ve}(p) = p - \text{round}\left(\frac{g(p)}{\|g(p)\|} n\right) \quad (36)$$

En la figura 3.15. se muestran gráficamente ambos píxeles;  $p_{+ve}(p)$  definido como el píxel al que el vector gradiente  $g(p)$  apunta mientras que  $p_{-ve}(p)$  es justo el punto contrario, ambos a una distancia  $n$  de  $p$ .

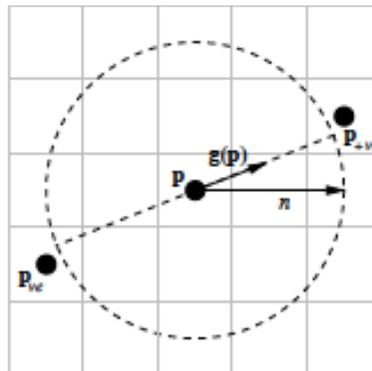


Figura 3.15. Representación de  $p_{+ve}(p)$  y  $p_{-ve}(p)$  a  $n=2$  (Loy y Zelinsky, 2003).

Para cada píxel afectado, se forman dos proyecciones, la proyección de orientación  $O_n$  y la proyección de magnitud  $M_n$ . Ambas son inicialmente cero y por cada set de píxeles afectados,  $O_n$  se ve alterado en 1 unidad y  $M_n$  por  $\|g(p)\|$ , de manera que para  $p_{+ve}(p)$ , ambas se incrementan y para  $p_{-ve}(p)$  ambas se reducen por estas cantidades (Loy y Zelinsky, 2003).

$$O_n(p_{+ve}(p)) = O_n(p_{+ve}(p)) + 1 \quad (37)$$

$$O_n(p_{-ve}(p)) = O_n(p_{-ve}(p)) - 1 \quad (38)$$

$$M_n(p_{+ve}(p)) = M_n(p_{+ve}(p)) + \|g(p)\| \quad (39)$$

$$M_n(p_{-ve}(p)) = M_n(p_{-ve}(p)) - \|g(p)\| \quad (40)$$

La simetría radial para un rango  $n$  se define como la convolución,

$$S_n = F_n * A_n \quad (41)$$

Donde  $A_n$  es una Gaussiana de dos dimensiones y  $F_n$  depende de las proyecciones  $O_n$  y  $M_n$  y del parámetro de rigidez radial  $\alpha$ ,

$$F_n(p) = \|\tilde{O}_n(p)\|^{(\alpha)} \tilde{M}_n(p) \quad (42)$$

Finalmente, la transformada se define como la suma de  $S_n$  en todos los rangos  $n$  considerados,

$$S = \sum_{n \in N} S_n \quad (43)$$

Para comprender cómo funciona su aplicación en los métodos propuestos en el siguiente capítulo se deben entender ciertos parámetros presentes en algunas de las ecuaciones que se han expuesto. La configuración de  $A_n$  y  $\alpha$  tiene una gran influencia en el resultado del algoritmo y requieren especial atención.

La Gaussiana  $A_n$  se escoge de dos dimensiones por ser radialmente simétrica, presentando así, un efecto consistente sobre la imagen. Este parámetro define un arco de influencia sobre los píxeles afectados que se ajusta a través de la desviación típica de  $A_n$  con respecto a  $n$ .

Por otro lado,  $\alpha$  se refiere a lo estrictamente radial que debe ser la simetría de los objetos de la imagen para que la transformada devuelva un resultado con elevado número de puntos de interés presentes (Veta et al., 2011). Para muchas aplicaciones, el  $\alpha$  de elección suele ser 2, el efecto de incrementar este parámetro resulta en una gradual atenuación de los puntos de interés (Loy y Zelinsky, 2003).

Además, es posible ajustar el algoritmo de manera que detecte las regiones de cierta intensidad. Para detectar solo los puntos más oscuros, se consideran únicamente los píxeles afectados negativamente (versión "dark" de la función), o si por el contrario, solo se tiene en cuenta los píxeles afectados positivamente, la transformada detectará los puntos más brillantes (versión "bright") (Loy y Zelinsky, 2003). Si ambos puntos son de interés, la función se configura de manera que pueda detectar los

objetos más brillantes y los más oscuros (versión “both”). En el caso de las imágenes HE, para la detección de los núcleos, interesa implementar la transformada en la versión ‘dark’, localizando los puntos más oscuros. En la Figura 3.16. se han calculado las tres versiones del algoritmo. Aunque la imagen *a* y *b* son muy similares, existe un exceso de localización en *b*, pues detecta puntos brillantes en la imagen que no corresponderán a los núcleos. La imagen *c* presenta un exceso de puntos muy evidente.

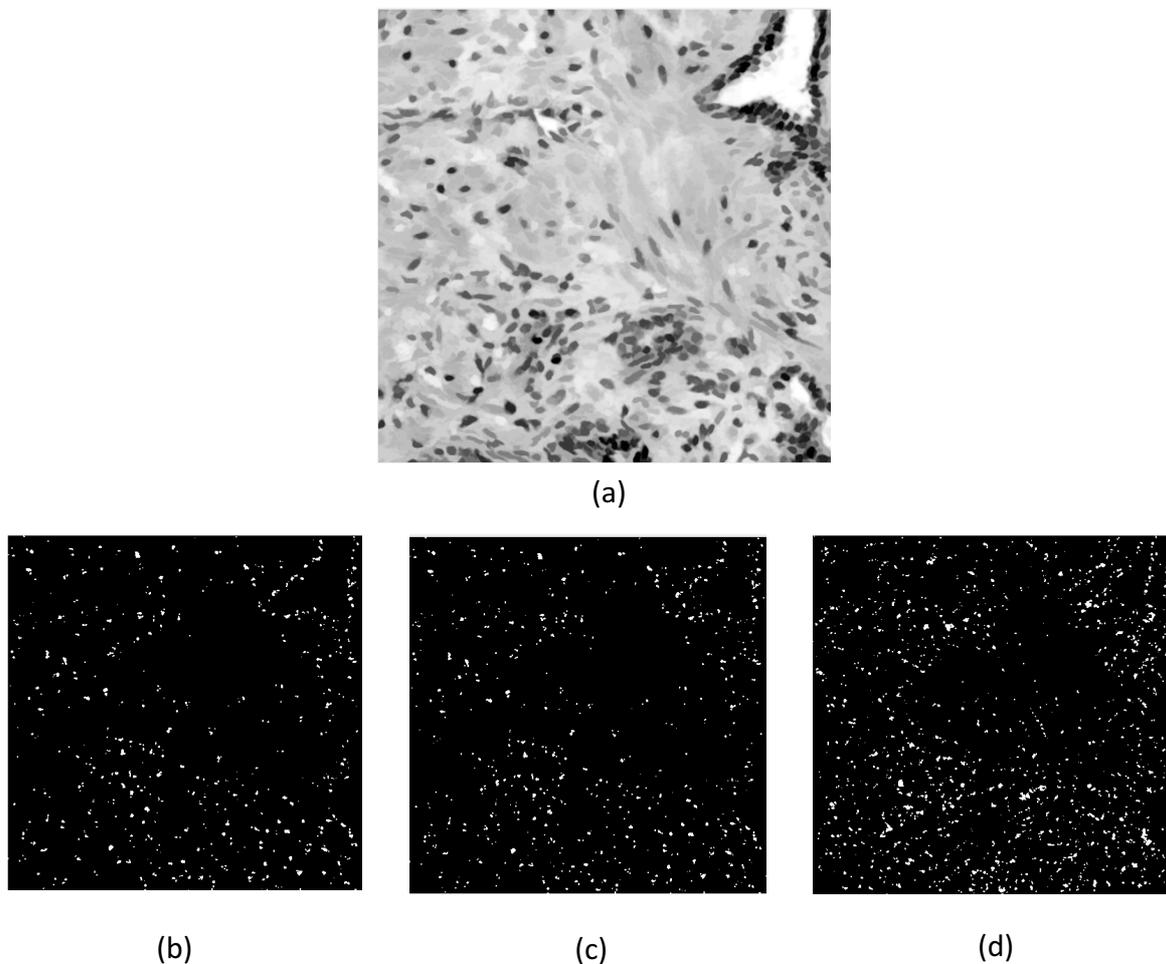


Figura 3.16. Proceso de obtención de marcadores a partir de la transformada de la simetría radial. (a) Entrada a la función: imagen de grises tras deconvolución y operadores. (b) Marcadores: versión “dark”. (c) Marcadores: versión “both”. (d) Marcadores: versión “bright”.

En la Figura 3.1. se muestra también la imagen de entrada requerida para aplicar la transformada de la simetría radial. A diferencia de los dos métodos de detección explicados en los apartados anteriores, para obtener la imagen de entrada en este caso se aplicará una deconvolución de color y una serie de operaciones morfológicas que darán como resultado la imagen en escala de grises de la Figura 3.16 *a*. Este proceso se detallará más tarde en el capítulo 4.

La razón por la que se decide utilizar otro tratamiento distinto para obtener la imagen en escala de grises con respecto a los otros dos algoritmos (transformada de la distancia y función geodistancia) que recurren al *Fuzzy c-means*, se puede ver en la Figura 3.17.

Al probar los resultados de la segmentación de este método, que halla los marcadores con la transformada de la simetría radial, usando como entrada la imagen de grises obtenida a partir del *Fuzzy c-means*, se generaba una sobre segmentación muy excesiva. La deconvolución de color daba mejores resultados, como se ve en la Figura 3.17 a. Aun así, como se verá más adelante, es posible mejorar la segmentación final implementando operadores morfológicos.

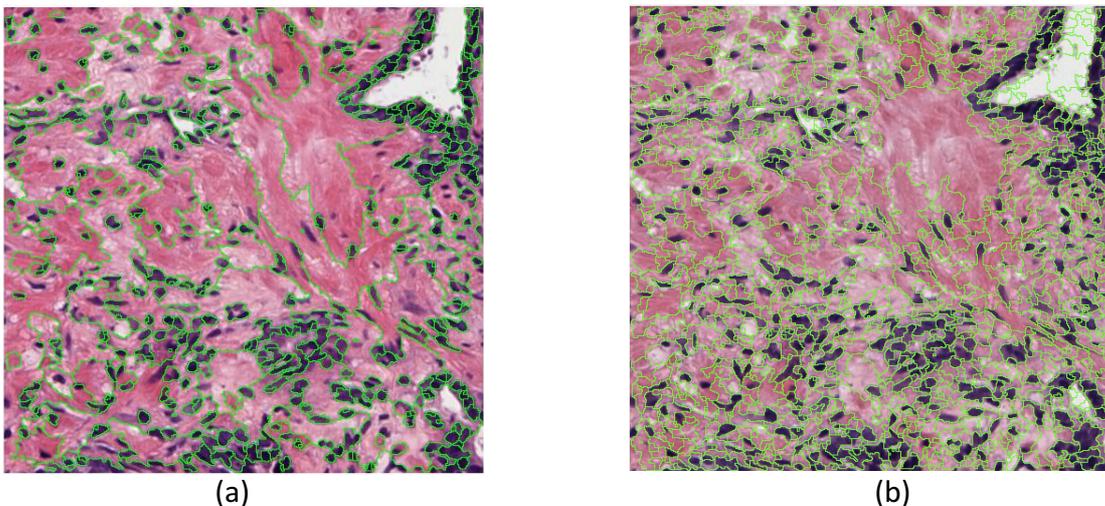


Figura 3.17. Comparación de resultados en la segmentación usando distintas técnicas de conversión a escala de grises. (a) Resultado al usar la deconvolución de color. (b) Resultado al usar el algoritmo *Fuzzy c-means*.

### 3.4. Métodos basados en la clusterización

Los métodos de clusterización pertenecen a la familia de clasificadores no supervisados y se basan en un proceso iterativo que clasifica los puntos según un criterio de homogeneidad intra-clase.

Previamente, se mencionó que dependiendo de la forma en la que realicen la clasificación estos métodos pueden dividirse en dos grupos. En este apartado se estudian dos algoritmos no jerárquicos (*k-means* y *Fuzzy c-means*) y otro algoritmo que se considera jerárquico (*Mean shift*).

El algoritmo *K means* y el algoritmo *Mean Shift*, se utilizarán como métodos de segmentación. En cambio, el algoritmo *Fuzzy c means* se empleará en el proceso de obtención de imágenes de entrada para la segmentación *watershed*. A continuación, se expondrá la teoría en la que se basan estos tres métodos. Los detalles de su aplicación se verán más adelante en el capítulo 4.

### 3.4.1. Algoritmo K-means

El método de clusterización *K-means* es un algoritmo particional simple que divide la imagen en  $K$  clusters o grupos no solapados entre ellos. Los clusters se determinan a partir de sus centroides. El proceso de agrupamiento consiste en asignar iterativamente cada píxel de la imagen al centroide más cercano. Dado que el centroide se selecciona originalmente de manera aleatoria, este se va actualizando hasta que los puntos en los clusters se estabilicen (Wu, 2012).

Si se ahonda en la matemática del método, el algoritmo *k-means* persigue minimizar una función objetivo  $J$  la cual viene representada por la suma de varianzas dentro de los clusters (Piech, 2012).

$$J = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} \|x_{ij} - c_i\|^2 \quad (44)$$

donde  $\|x_{ij} - c_i\|$  es la distancia Euclídea entre un punto  $x_{ij}$  y el centroide  $c_i$ , iterada sobre todos los puntos  $n_i$  del cluster  $k_i$  para todos los  $k$  clusters, de manera que:

$$\sum_i^k n_i = n \quad (45)$$

Para hallar el centroide  $c_i$  simplemente se calcula la media de todos los puntos en un mismo clúster (Piech, 2012).

Es posible dividir el algoritmo *K-means* en los tres pasos siguientes:

1. *Inicialización.* *K-means* actúa iterativamente hasta alcanzar un resultado final óptimo y para ello, como entrada solo necesita el número  $K$  de clusters predefinido por el usuario. Se establecen aleatoriamente unos puntos del conjunto de datos como centroides (figura 3.18 b) y se calcula la distancia del mismo al resto de puntos.
2. *Asignación.* Según los resultados de los cálculos, cada uno de los puntos se asigna al *cluster* más cercano, dividiéndose así en una primera iteración (figura 3.18 c).
3. *Actualización.* Una vez se tienen todos los puntos agrupados, se recalculan los centroides (figura 3.18 d).

Si los centroides actualizados cambian con respecto a los iniciales, se repiten los pasos 2 y 3 reasignando los puntos y obteniendo nuevos centroides (figura 3.18 d y e). Este proceso termina cuando, al actualizar los centroides, estos no se ven modificados, señal de que los clusters han quedado establecidos (Trevino, 2016).

El algoritmo *k-means* presenta un procedimiento simple. El hecho de que la inicialización se dé usando  $K$  puntos iniciales escogidos a priori convierte al método en uno de los menos computacionalmente costosos reduciendo considerablemente el número de operaciones (Wu, 2012). Sin embargo, como cualquier otro método, *k-means* presenta algunas limitaciones que deben de tenerse en cuenta:

- La elección del número de clusters es importante; un valor inapropiado puede resultar en un agrupamiento erróneo o no deseado. Puede ser difícil dar con un número de centroides correcto pero, reconfigurando el parámetro y estudiando los diferentes resultados, es posible obtener un  $k$  óptimo de manera aproximada.
- Por otro lado, el modelo de agrupamiento que sigue este algoritmo no satisface todos los conjuntos de datos dado que se basa en distribuciones esféricas y asume que estos tendrán tamaños similares.

A pesar de presentar ciertas desventajas, este algoritmo es uno de los más populares en cuanto a clusterización y tiene una gran relevancia en la literatura científica. Es económico a nivel computacional y sigue un procedimiento sencillo y asequible presentando una gran variedad de aplicaciones.

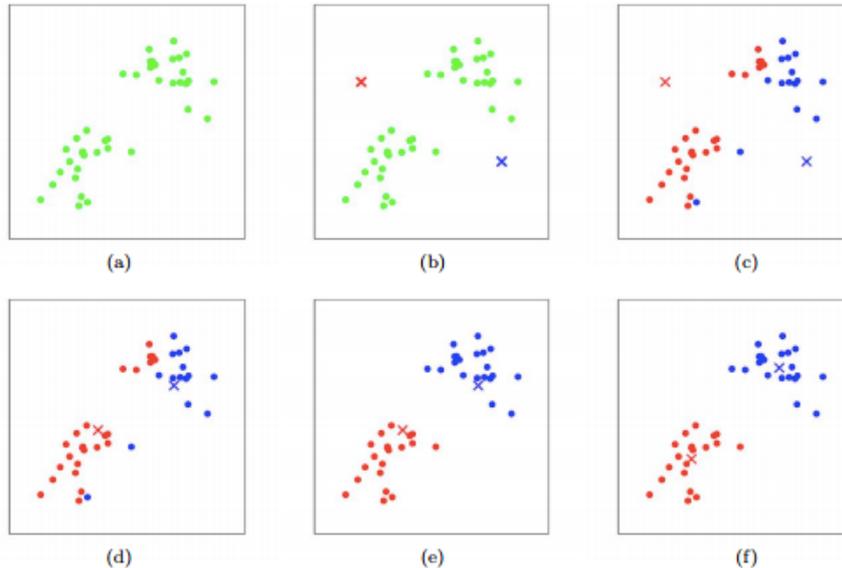


Figura 3.18. Ilustración del algoritmo *K-means* con  $K=2$ . Los puntos verdes simulan los puntos y las cruces los centroides. (a) Conjunto de puntos sin agrupar. (b) Establecimiento inicial de los centroides. (c) Asignación de los puntos a los centroides (d) Actualización de los centroides. (e) Reasignación de los puntos a los nuevos centroides. (f) Segunda actualización de los centroides (Piech, 2012).

Al aplicar el algoritmo *K-means* a la imagen con un número de clases igual a 3, se obtienen los 3 clusters que se observan en la Figura 3.19. La imagen de entrada sería, como se ha comentado en el apartado 3.1., la imagen de conversión del CIELAB (componentes a y b). Claramente se distingue una segmentación de los núcleos en (b), en el capítulo 4 se contará con detalle el tratamiento que se aplica para conseguir la imagen final segmentada.

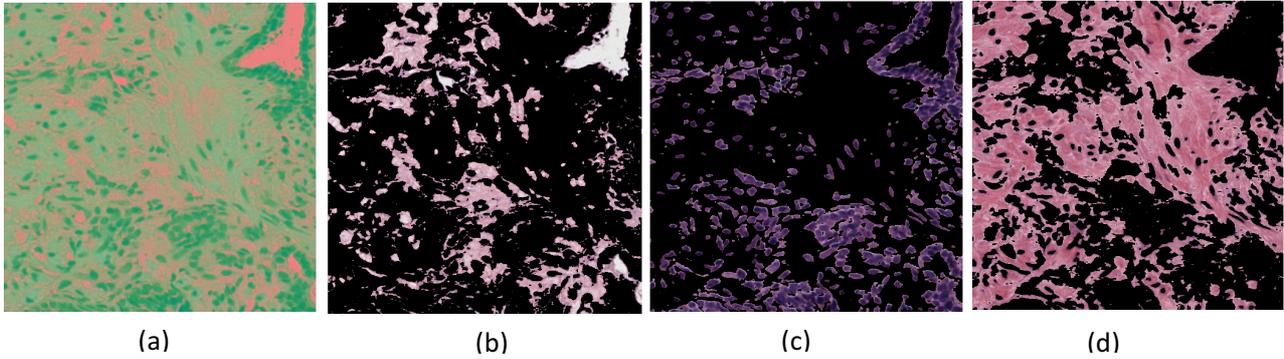


Figura 3.19. Resultado del algoritmo K means con 3 clases. (a) Entrada al algoritmo: componentes a y b del espacio CIELAB. (b) Cluster 1. (c) Cluster 2. (d) Cluster 3.

### 3.4.2. Algoritmo Fuzzy c-means

La clusterización *fuzzy c-means* sigue una dinámica muy similar al algoritmo *k-means* descrito en la sección 3.4.1. — Los datos se separan en clases o clusters representados por sus centroides, los cuales se inician a priori de forma aleatoria (Piech, 2012).

El método *K-means* es un método de agrupamiento no difuso, los datos se asignan a clusters de manera que cada punto pertenece a un solo clúster (Wu, 2012). Alternativamente, el *fuzzy c-means* presenta una partición difusa. Un mismo punto puede ser asignado a varios clusters, pues los datos presentan un grado de pertenencia que será mayor cuanto más cerca se encuentren del centroide.

En este caso, la función objetivo que se busca minimizar incluye el factor que determina la proporción en la que el punto pertenece a cierto cluster,  $w_{ij}$ .

$$J = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_{ij}^m \|x_{ij} - c_i\|^2 \quad (46)$$

donde  $1 \leq m < \infty$  que determina el grado de *fuzzyness* o difusión en un clúster. Un elevado valor de  $m$  indica una mayor difusión y por lo tanto, el grado de pertenencia  $w_{ij}$  disminuye.

Respecto a  $w_{ij}$  cabe destacar que sus valores se establecerán en un rango de 0 a 1, con 1 representando la pertenencia total de un punto a un clúster. Se puede obtener a partir de la siguiente ecuación.

$$w_{ij} = \left( \sum_{k=1}^c \left( \frac{\|x_{ij} - c_i\|}{\|x_{ij} - c_j\|} \right)^{2/(m-1)} \right)^{-1} \quad (47)$$

Si  $m \rightarrow 1$  los clusters serán muy poco difusos o rígidos y el resultado será similar a la partición que se obtiene con *k-means*.

El cálculo del centroide  $c_i$  se obtiene, al igual que en el *k-means*, hallando la media de los puntos de cada clúster. El grado de pertenencia  $w_{ij}$  es introducido de nuevo en la ecuación.

$$c_i = \frac{\sum_{i=1}^n w_{ij}^m (x_{ij})}{\sum_{i=1}^n w_{ij}^m} \quad (48)$$

El procedimiento general que sigue *fuzzy c-means* es prácticamente igual al descrito para el *k-means*. Está formado por tres pasos principales donde se inicializa el algoritmo con el parámetro K establecido, se asignan puntos a distintos clusters, y se actualizan los centroides. La diferencia reside en el grado de pertenencia que posibilita la asignación de un mismo punto a más de un clúster (Peñaranda, 2014).

En la Figura 3.20. se muestran los resultados de aplicar el algoritmo *Fuzzy c-means* con un número de clusters igual a 3. La imagen de entrada es directamente la imagen RGB. Se obtienen entonces tres imágenes correspondientes a los tres clusters y se escoge el que represente mejor los núcleos. En este caso sería la Figura 3.20 b.

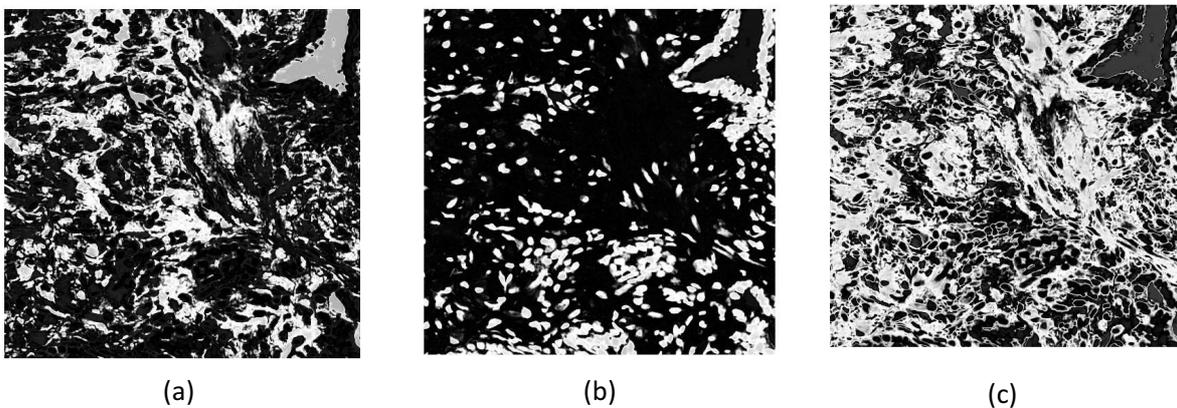


Figura 3.20. Resultado del algoritmo *Fuzzy c-means* con 3 clases. (a) Cluster 1. (b) Cluster 2. (c) Cluster 3.

### 3.4.3. Algoritmo Mean Shift

A diferencia de los otros dos métodos de clasificación descritos en los apartados anteriores, *Mean Shift* no requiere la especificación previa del número de *clusters* o clases. Esto es por qué parte de un número de clases igual al número de puntos y en las sucesivas iteraciones, estos se van agrupando unos con otros formando clases mayores.

Para entender este concepto, en el estudio de los métodos jerárquicos se recurre a los dendogramas, diagramas tipo “árbol” que ilustra la distribución jerárquica de los *clusters* (Figura 3.21).

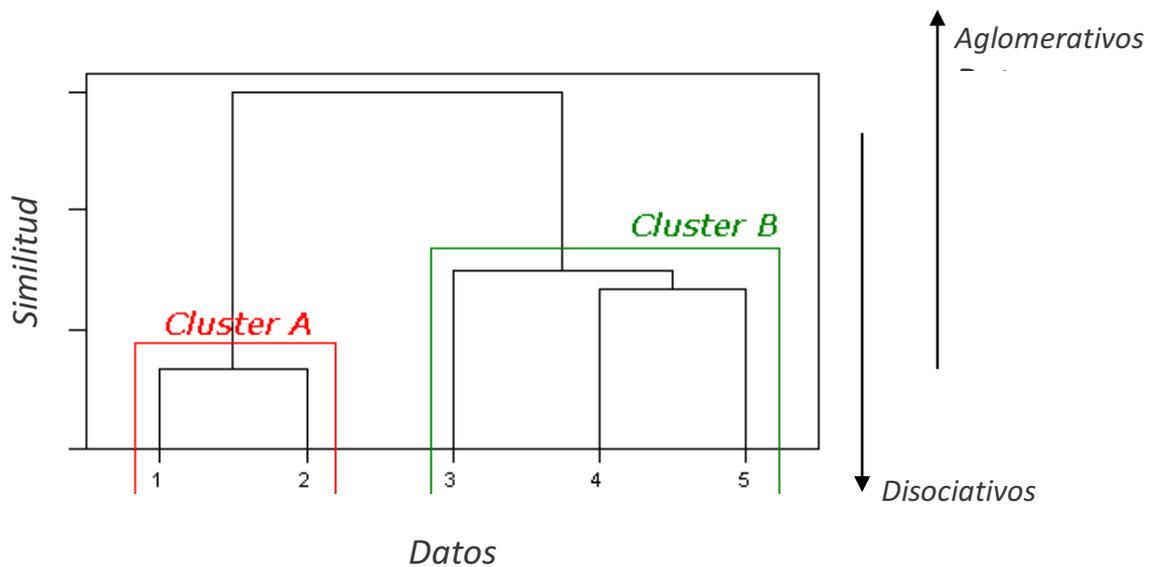


Figura 3.21. Representación de un dendrograma sencillo para la clasificación de datos (1, 2, 3, 4, 5) en dos clusters A y B. Las divisiones aglomerativa y dividida representadas por una flecha hacia arriba y hacia abajo, respectivamente (Adaptado de: Fielding, 2017).

*Mean shift* es un algoritmo iterativo no paramétrico que busca los máximos locales de densidad en una distribución de datos. En la Figura 3.22, en la aplicación del método, se considera el espacio como una función de densidad de probabilidad donde las regiones densas corresponden a los máximos locales.

Para establecer la densidad en un conjunto de datos, se recurre a la técnica *kernel density estimation*. La idea es establecer una ventana o *kernel* sobre cada elemento y sumar el resultado obteniendo una única función donde los picos corresponden a las regiones de mayor densidad (Fukunaga y Hostetler, 1975).

La función de densidad viene dada por un *kernel*  $K$ , su ancho de banda  $h$  (*bandwidth* en inglés) y un conjunto de puntos  $x_i$  de  $d$ -dimensiones.

$$\hat{f}(x) = \frac{1}{nh^d} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x - x_i}{h}\right) \quad (49)$$

El *kernel* gaussiano es uno de los más usados generalmente (Fukunaga y Hostetler, 1975).

$$K(x) = e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (50)$$

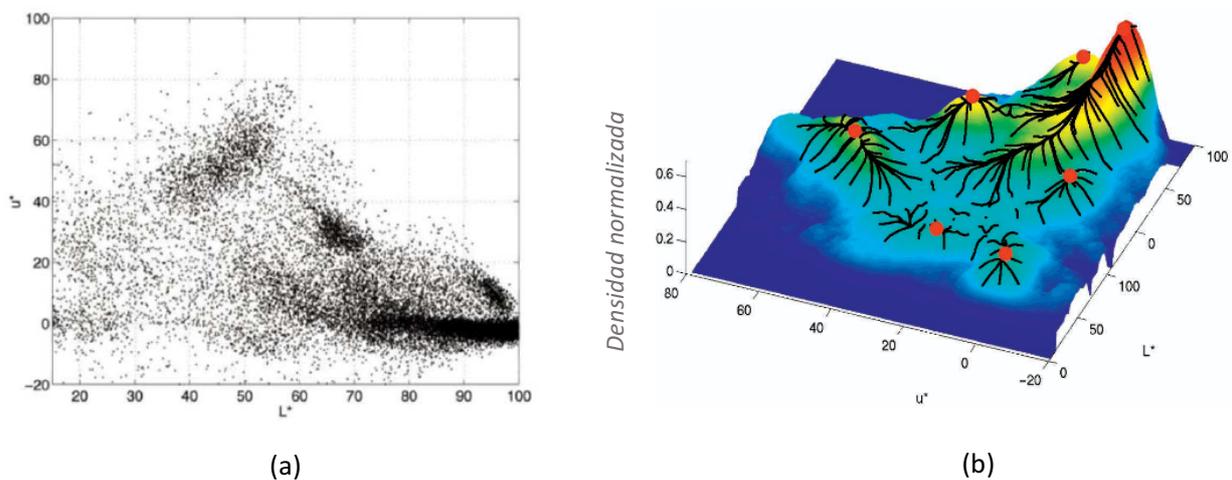


Figura 3.22. Representación de la densidad de puntos en un espacio. (a) Distribución de las muestras a lo largo de los ejes  $u^*$  y  $L^*$ . (b) Ilustración de la densidad de los puntos en (a). (Comaniciu y Meer, 2002).

Para cada conjunto de datos, el algoritmo define una ventana de búsqueda o *kernel* que calcula la media del conjunto. El proceso se puede explicar en una serie de pasos (Comaniciu y Meer, 2002).

1. Se escoge una ventana de búsqueda o *kernel* con una anchura determinada.
2. Se calcula la media de los puntos y se asigna como centro del *kernel*.
3. Se desplaza el *kernel* hacia este centro y se recalcula la media de los puntos en la nueva ubicación.

Los pasos 2 y 3 se repiten hasta que la media del nuevo conjunto de datos converge con la media del conjunto anterior.

*Mean shift* presenta una fuerte dependencia en el tamaño de la ventana. Con *kernels* grandes y anchos, la clusterización es menor, haciendo que una mayor cantidad de puntos pertenezcan a un mismo clúster. En cambio, los *kernels* estrechos cubrirán una menor densidad y ello resultará en un mayor número de clusters o incluso en uno por cada elemento.

Por otra parte, *mean shift* requiere un algoritmo más complejo lo que lo convierte en un método computacionalmente más costoso. Aun así, en comparación con los métodos no jerárquicos, el algoritmo *Mean shift* es un método de clusterización mucho más robusto y eficiente.

Al ser un algoritmo no paramétrico, no se realiza ninguna asunción acerca del número de clusters pues éste se define automáticamente junto con el número de iteraciones necesarias. Además, como se basa en una estimación de la densidad, puede trabajar con todo tipo de clases, no solo esféricas (Fukunaga y Hostetler, 1975).

En la Figura 3.23. se ha ilustrado el resultado al aplicar el algoritmo *Mean Shift* en una imagen de RGB, que sería directamente la imagen de entrada. Se puede ver que se obtienen dos clases: una representada en morado que es la de interés, pues contiene a los núcleos, y otra de color rosa que corresponde al fondo.

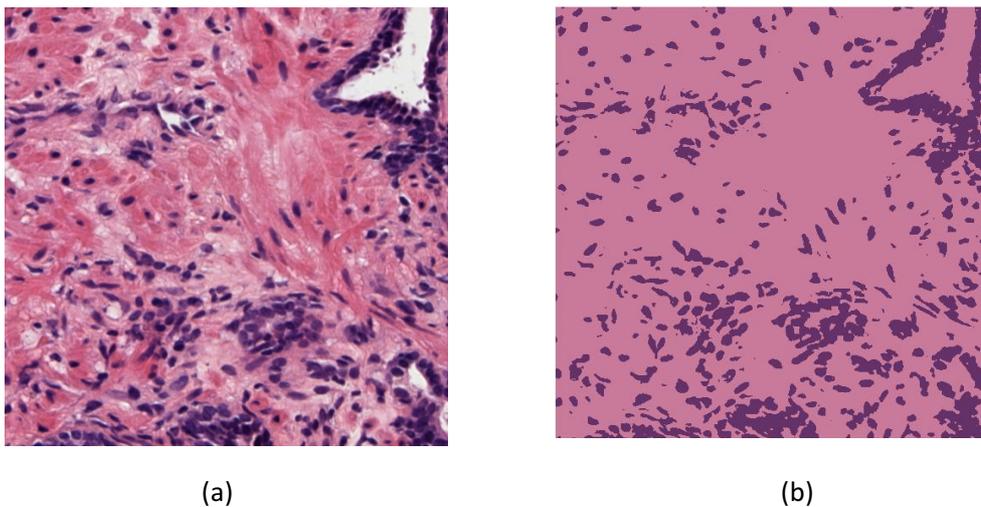


Figura 3.23. Aplicación del algoritmo *Mean Shift*. (a) Entrada a la función: imagen RGB. (b) Representación de las dos clases tras la clusterización.



## CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS PROPUESTOS

En el capítulo 3, se ha ampliado la teoría referente a los distintos algoritmos que se van a implementar para realizar la segmentación de las imágenes. Una vez se ha entendido el funcionamiento de los mismos, se puede proceder a estudiar con detalle su aplicación. Como se verá a continuación, estos se han ido combinando entre ellos para generar una serie de métodos de segmentación completos. En total se han elaborado 5 métodos completos que se presentan en la interfaz gráfica.

A lo largo de este capítulo se describirá cada una de las etapas que conforman estos 5 métodos y se mostrarán los resultados que se van obteniendo en cada fase y al aplicar los distintos algoritmos. Además, también es importante conocer los distintos materiales que se han usado para poder elaborar estos métodos.

### 4.1. Materiales

Para el desarrollo del proyecto se han utilizado una serie de imágenes extraídas de muestras histopatológicas completas de próstata. Estas muestras, que fueron preparadas por el patólogo con una tinción Hematoxilina-Eosina que realzaba el contraste de las estructuras, han sido adquiridas por investigadores del Hospital clínico Universitario de Valencia

Las imágenes originales completas tienen unas dimensiones del orden de millones de píxeles con un tamaño de almacenamiento de hasta decenas de GB. Por esta razón, se ha decidido estudiar secciones que presenten regiones de interés de un tamaño de 512x512 píxeles sobre un zoom óptico de 40 aumentos (40x). Así, las imágenes son más manejables y fáciles de tratar y de estudiar para el objetivo del presente proyecto.

Para la implementación de los distintos algoritmos y el cálculo de los resultados y los parámetros empleados para la validación del método, se ha recurrido a la programación en entorno Matlab® v. R2016b.

El desarrollo de la herramienta de segmentación también se ha elaborado a partir de Matlab®, más en concreto, a partir de la interfaz gráfica *GUIDE* que permite programar de manera más visual y ejecutar programas de ingreso continuo de datos.

### 4.2. Métodos propuestos

Como se comentó previamente, en el proceso de segmentación usando la transformada watershed, esta requiere el apoyo de otros algoritmos que le ofrezcan unos marcadores en los que basarse. Por ello, no solo se han probado los resultados de la segmentación *watershed* si no también la función de

distintos algoritmos de detección y técnicas de pre-procesado. A continuación, etapa por etapa, se muestra la transformación de las imágenes según los métodos escogidos.

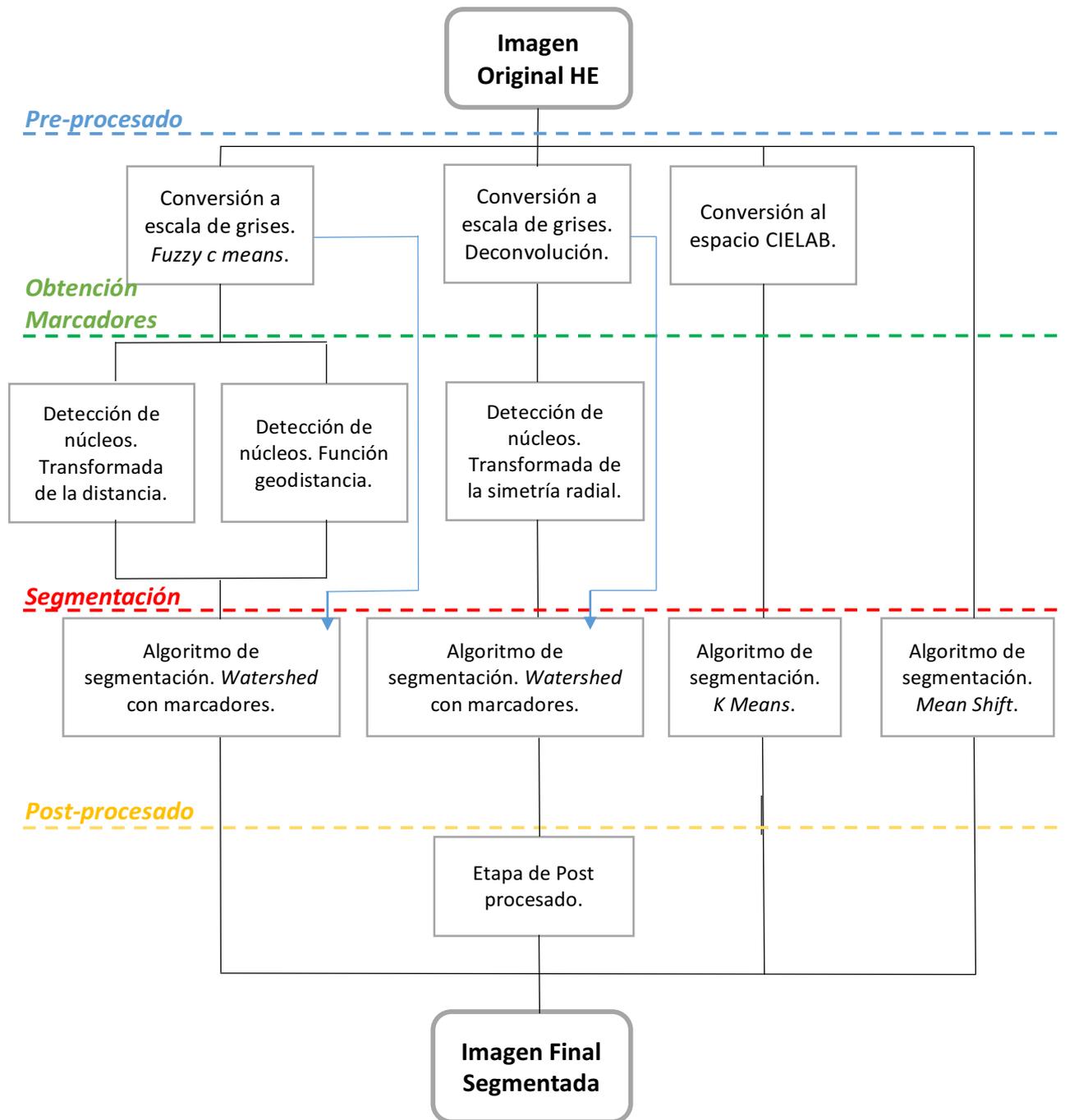
En la herramienta diseñada aparecen cinco formas distintas de realizar la segmentación. Cada una de ellas se considera como un método completo de segmentación, pues se componen a partir de la combinación de varios algoritmos. En la interfaz, se van a encontrar divididas en tres bloques según el algoritmo de segmentación que utilizan (*Watershed*, *K-means* o *Mean shift*) tal y como se muestra en la Figura 4.1.



Figura 4.1. Distribución de las ventanas y comandos en la interfaz gráfica diseñada.

Como se puede observar, dentro del bloque *Watershed Segmentation*, se presentan tres opciones distintas para realizar la segmentación que vienen definidas por el algoritmo de detección de puntos de interés que utilizan (*Distance Transform*, *Geodistance* y *Fast Radial Symmetry Transform*). Los otros dos bloques presentan, como sus nombres indican, por un lado, la posibilidad de realizar la segmentación usando el algoritmo *K-means* y por otro, el algoritmo *Mean shift*. En el Anexo B, se ha añadido un manual de usuario para facilitar el manejo de la herramienta.

Para entender el concepto general se encuentra el Esquema 4.1. Este engloba los tres bloques de métodos mostrados en la Figura 4.1. por etapas, de manera que se visibilice con mayor facilidad el orden en el que se implementan los algoritmos para generar los métodos completos.



Esquema 4.1. Esquema global de los métodos propuestos.

Del Esquema 4.1. es posible deducir que se han desarrollado tres métodos completos que utilizan la transformada *watershed* como algoritmo de segmentación pero que realizan el cálculo de los marcadores con algoritmos de detección de núcleos diferentes. Como se verá en los siguientes apartados, cada uno de los algoritmos de detección tiene una influencia sobre el resultado al combinarlos con la segmentación *watershed*. Los métodos que usan la transformada de la distancia y la función geodistancia para obtener los marcadores siguen una estructura similar, donde la imagen

de entrada, tanto para el algoritmo de obtención de marcadores como para el algoritmo de segmentación, se ha calculado a partir de una conversión a grises usando el algoritmo *Fuzzy c-means*. Sin embargo, el tercer método, que realiza la detección de núcleos con la transformada de la simetría radial, se caracteriza por una aplicar una deconvolución a la imagen HE para obtener las imágenes de entrada y además, presenta una etapa final de post procesado. De esta última se darán más detalles en el apartado 4.2.4.

Respecto a los otros dos métodos que utilizan los algoritmos de clusterización en la etapa de segmentación, presentan una estructura más sencilla puesto que no requieren fases de obtención de marcadores. En el caso del algoritmo *K-means*, el tratamiento aplicado para calcular la imagen de entrada se realiza a partir de una conversión al espacio CIELAB, proceso detallado en el apartado 3.2.1. del capítulo 3. En cambio, para el método del *Mean Shift*, será el único caso en el que la imagen de entrada sea directamente la imagen original de HE en RGB.

#### **4.2.1. Detalle de la etapa de Pre-procesado.**

En primer lugar, en cuatro de los cinco métodos será esencial transformar la imagen original para poder trabajar con ella con más facilidad. Se ha denominado a esta primera fase, la etapa de pre-procesado.

##### Conversión a grises. *Fuzzy c-means*.

Por un lado, dos los métodos que realizan la segmentación *watershed* (transformada de la distancia y función geodistancia), emplean la técnica de clusterización *fuzzy c-means* para convertir la imagen original a escala de grises.

Para ello, es necesario transformar la imagen RGB a un vector formado por tres columnas, cada una representando una componente (R, G y B), y de número de filas igual al número de píxeles de la imagen (512x512). De esta forma, cada elemento del vector representa el valor del píxel en cada una de las componentes.

Las dos entradas a la función serán este vector y el número de clusters, el cual será una variable ajustable por el usuario en la misma interfaz. La función, entonces, redistribuirá los píxeles en tres clusters según la probabilidad de cada píxel de pertenecer a un clúster o a otro.

A la salida de la función, se obtendrán dos vectores, uno que contenga el valor de los centroides de cada clúster para cada una de las componentes y otro conteniendo la probabilidad de pertenencia de los píxeles a cada clúster.

Para el ejemplo de la Figura 4.2. se ha escogido un número de clusters igual a 3 y a partir del vector de probabilidades, es posible visualizar los tres clusters en forma de imagen.

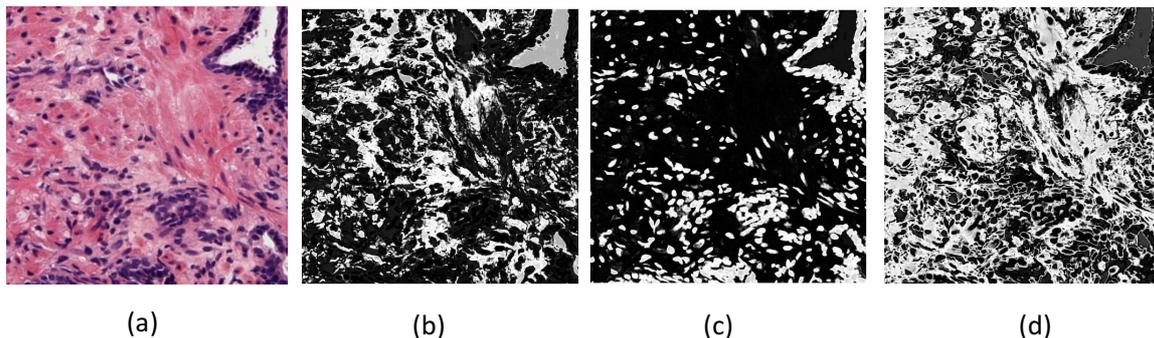


Figura 4.2. Clusterización por *fuzzy c-means*. (a) Imagen original HE. (b), (c) y (d) resultados de aplicar el algoritmo con un número de clusters igual a 3.

Automáticamente, el algoritmo selecciona la imagen *clusterizada* que mejor represente los objetos de interés. Como uno de los parámetros de salida es el vector de centroides, la función halla la intensidad media de los centroides en cada clúster y muestra aquel que presente una media más pequeña, pues este corresponde con el clúster que interesa para la siguiente etapa; el que contiene los núcleos. En este caso sería la imagen c en la que se puede ver cómo, de los 3 clusters, este es en el que mejor se diferencian los núcleos del resto de elementos y del fondo.

#### Conversión a grises. Deconvolución.

La deconvolución se utiliza en el método que recurre a la segmentación *watershed con marcadores*, obteniendo estos con la transformada de la simetría radial.

Se aplica la deconvolución de color sobre la imagen original RGB, a partir de la cual se obtiene una imagen en escala de grises (Figura 4.3). La deconvolución permite obtener la imagen con la tinción de Hematoxilina, que se encarga de teñir los núcleos, separada del resto de tinciones.

La etapa de pre-procesado para las imágenes que se sometan a este método, sigue con una serie de operaciones morfológicas con la intención de eliminar el ruido y estructuras irrelevantes que pueden seguir presentes después de la deconvolución. Las operaciones empleadas son las siguientes:

- Apertura y cierre por reconstrucción con un elemento estructurante en forma de disco de radio 3. De esta forma se eliminan los elementos con un tamaño menor al que cabría esperar para un núcleo y además, no se alterará la forma de los núcleos que se quiere conservar.
- Cierre con un elemento estructurante más pequeño (radio 1). Así se eliminan las pequeñas protuberancias que puedan encontrarse alrededor de los bordes de los núcleos.

El resultado se ilustra en la Figura 4.4. donde se puede apreciar cómo, tras la aplicación de los operadores morfológicos, la forma de los núcleos se ha suavizado y ciertas estructuras de tamaños más pequeños que podían confundirse con objetos de interés, han desaparecido.

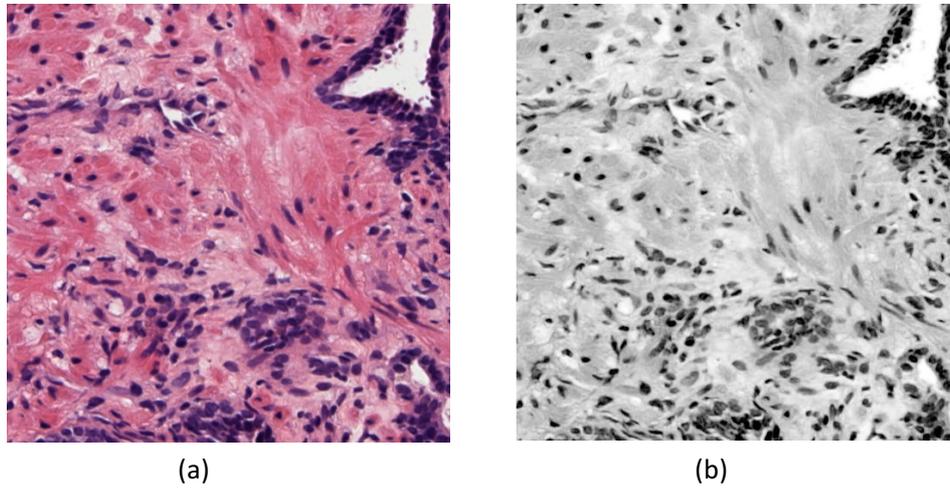


Figura 4.3. Aplicación de la deconvolución de color. (a) Imagen Original HE (b) Deconvolución de la imagen HE obteniendo el canal de Hematoxilina.

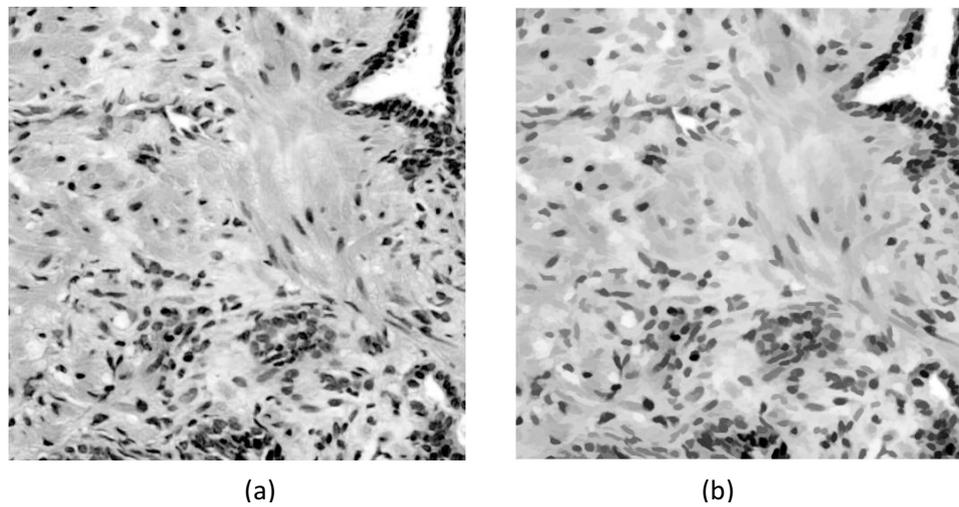


Figura 4.4. Aplicación de los operadores morfológicos. (a) Imagen tras la deconvolución. (b) Resultado final.

## Conversión al Espacio CIELAB

Para desarrollar el método que utiliza la clusterización *K-means* en la etapa de segmentación (Esquema 4.1.), se realiza la transformación de la imagen original RGB al espacio CIELAB (Figura 4.5.) para obtener una imagen de entrada que se adecue a la implementación del algoritmo *K-means*.

A diferencia de los métodos que pertenecen al bloque *Watershed Segmentation*, en este caso, no se necesitan técnicas complementarias como las de detección (que seleccionen los marcadores a utilizar en la transformada) que apoyen a *K-means*; una vez se tiene la imagen concatenando las componentes a y b derivadas del espacio CIELAB (proceso detallado en el apartado 3.1.2 del capítulo 3), ésta será la entrada para la etapa de segmentación que se explicará más adelante.

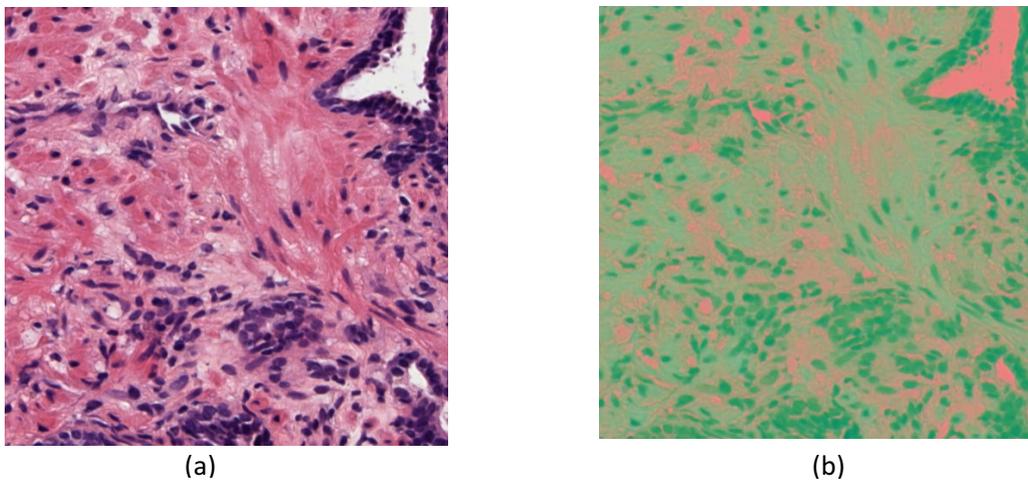


Figura 4.5. Conversión al espacio CIELAB. (a) Imagen en RGB. (b) Imagen concatenando las componentes a y b del espacio CIELAB.

### **4.2.2. Obtención de los Marcadores.**

Como se puede apreciar en el esquema, la etapa de obtención de marcadores, es solo necesaria en los métodos que realizan la segmentación *watershed*. Esto es porqué en el caso de la segmentación de núcleos, aplicar directamente la transformada puede generar muchos mínimos que dará lugar a una sobre segmentación. Por ello se requiere establecer previamente estos mínimos a partir de los algoritmos de detección que localizan los núcleos que se quieren segmentar.

En primer lugar, es importante entender que hay dos tipos de marcadores. Los marcadores internos se encuentran dentro de los objetos de interés y serán calculados con los algoritmos de detección, detallado a continuación. Por otro lado están los marcadores externos, para localizar el fondo, los cuya obtención se explica más adelante.

### Detección de núcleos. Transformada de la distancia.

En el capítulo 3, se mencionaba que la transformada de la distancia se aplica preferentemente sobre imágenes en binario. Por ello, en primer lugar debemos *binarizar* la imagen que se obtuvo durante la etapa de pre-procesado, a partir del *fuzzy c-means* en este caso. Esto se hará aplicando una umbralización de tipo *Otsu*, la cual utiliza el umbral para minimizar la varianza intra-clases de los píxeles blancos y negros (Otsu, 1979).

A continuación, antes de aplicar la transformada, se debe obtener el complementario de la imagen, es decir, su negativo, y utilizar esta como entrada (Figura 4.6 b). Esto es por la forma de actuar de la función, que invertirán el valor de los píxeles en el cálculo de sus métricas respectivas.

Una vez se tiene la imagen de entrada, se implementa la transformada de la distancia y se halla su máximo. Así, se interpretan los centroides o centros de los núcleos como máximos, asignándolos como marcadores internos.

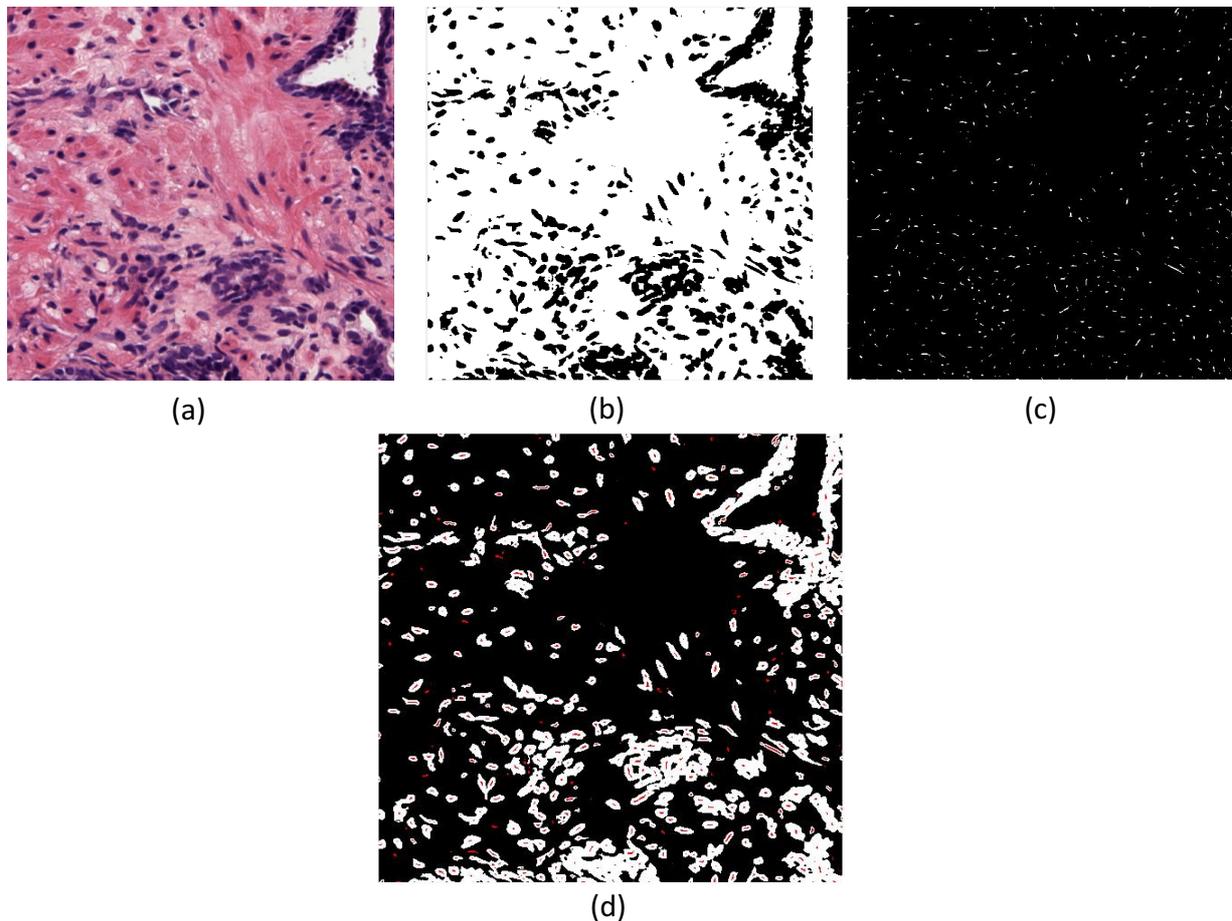


Figura 4.6. Implementación de la transformada de la distancia para obtener los marcadores internos. (a) Imagen original HE (b) Imagen de entrada: negativo de la imagen tras aplicar el *Fuzzy c-means* y la umbralización. (c) Marcadores internos: máximo de la transformada de la distancia. (d) Resultado de los marcadores internos sobre la imagen de grises.

### Detección de núcleos. Función geodistancia.

En este caso no se va a necesitar convertir la imagen de grises obtenida a partir del Fuzzy c-means a binario, pues el algoritmo no lo requiere. A continuación se procede igual que en el método de la transformada de la distancia, la imagen de entrada será la complementaria a la obtenida en la etapa de pre-procesado, se aplica la función y se calcula su máximo para poder determinar los marcadores internos (Figura 4.7 b).

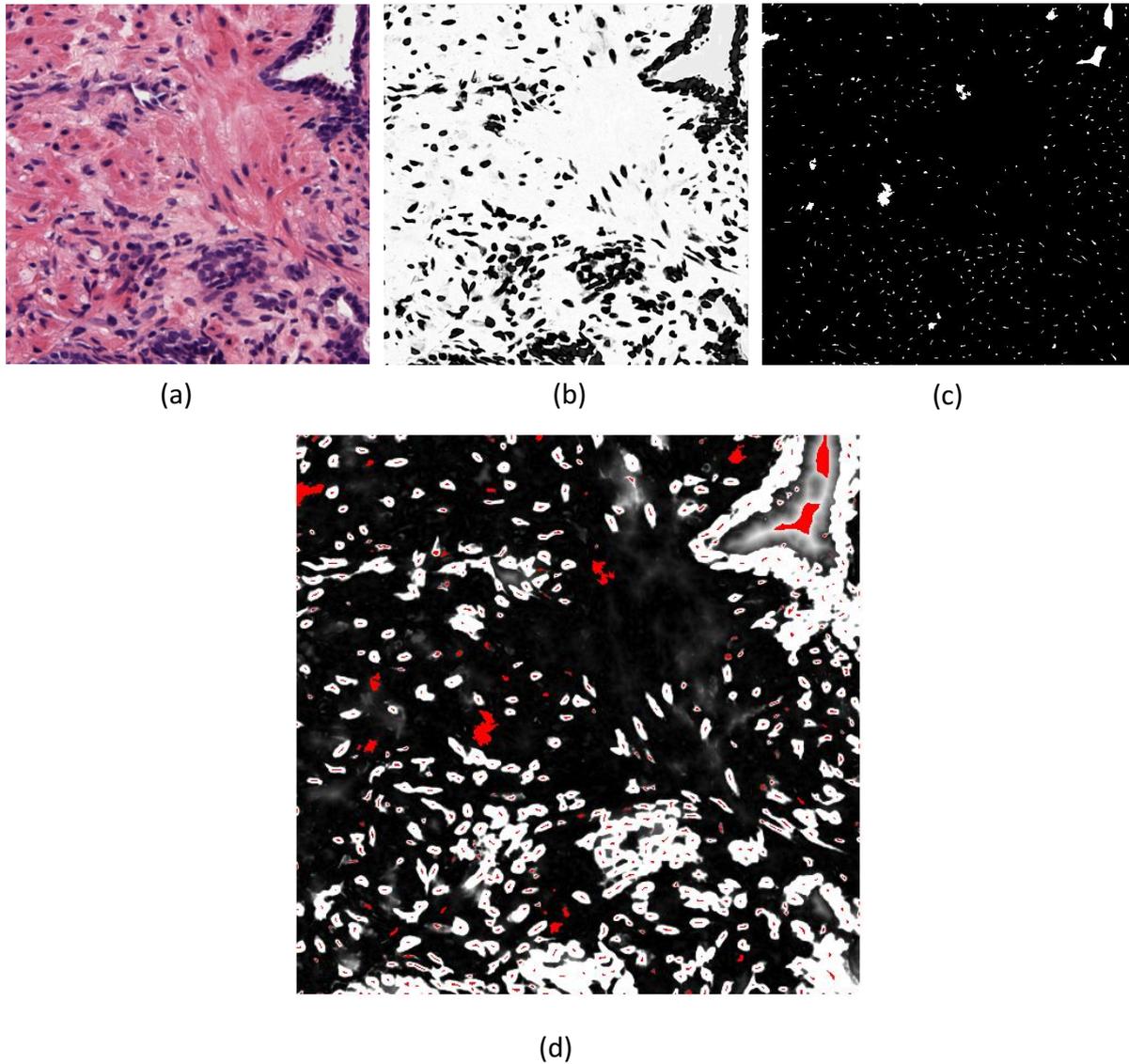


Figura 4.7. Implementación de la función geodistancia para obtener los marcadores internos. (a) Imagen original HE (b) Imagen de entrada: obtenida tras aplicar el *Fuzzy c-means*. (c) Marcadores internos: máximos de la función geodistancia. (d) Resultado de los marcadores internos sobre la imagen de grises.

## Detección de núcleos. Transformada de la simetría radial.

Para implementar la transformada de la simetría radial, se usará como imagen de entrada la obtenida tras la deconvolución y la aplicación de los operadores morfológicos, procesos que se detallaron en la etapa de pre-procesado (sección 4.2.1).

En el capítulo 3 se explicaron una serie de parámetros ajustables que presentaba esta función:

- La rigidez radial  $\alpha$ . Se ha establecido como 2 para la herramienta de segmentación puesto que, en la mayoría de las aplicaciones, este valor suele ser el más óptimo.
- Detección de regiones según la intensidad. En el caso de la segmentación de núcleos, se usa la versión “dark” de la función pues esta localiza los puntos más oscuros que en la imagen de entrada corresponden a los núcleos.
- El radio. Este dependerá del tamaño de los núcleos que se quiera segmentar, es por eso que, para seleccionar el más óptimo, es conveniente probar con varios valores y comparar los resultados. Por ello, en la herramienta existe la opción de ajustar este parámetro manualmente que por defecto se ha establecido en 8. Tras la aplicación de la transformada *watershed*, se puede apreciar de manera más significativa la influencia de este valor en los resultados. En el capítulo 5, algunas de las imágenes han sido segmentadas usando valores de radio distintos de 8, buscando el segmentado óptimo en cada una de ellas. Los distintos valores del radio para cada imagen se concretan en el Anexo A, junto con los resultados de la segmentación de cada una de ellas.

En la figura 4.8. se ilustra el resultado de la implementación de la transformada de la simetría radial junto con sus imágenes de entrada.

## Marcadores externos

Antes de aplicar la transformada, se necesitan los marcadores externos que marquen las zonas de fondo que no son de interés. Dado que se trata con pequeñas secciones de una muestra histológica completa, los núcleos se encuentran distribuidos a lo largo de cada una de las imágenes que se va a segmentar, por ello no es posible aplicar marcadores externos en el fondo. Para abordar este problema, se establece como marcador externo, un marco de unos que delimita toda la imagen.

Una vez obtenidos los marcadores externos, estos se juntan con los marcadores internos en un mismo vector. Todo este vector será una de las entradas de la función de segmentación *watershed*.

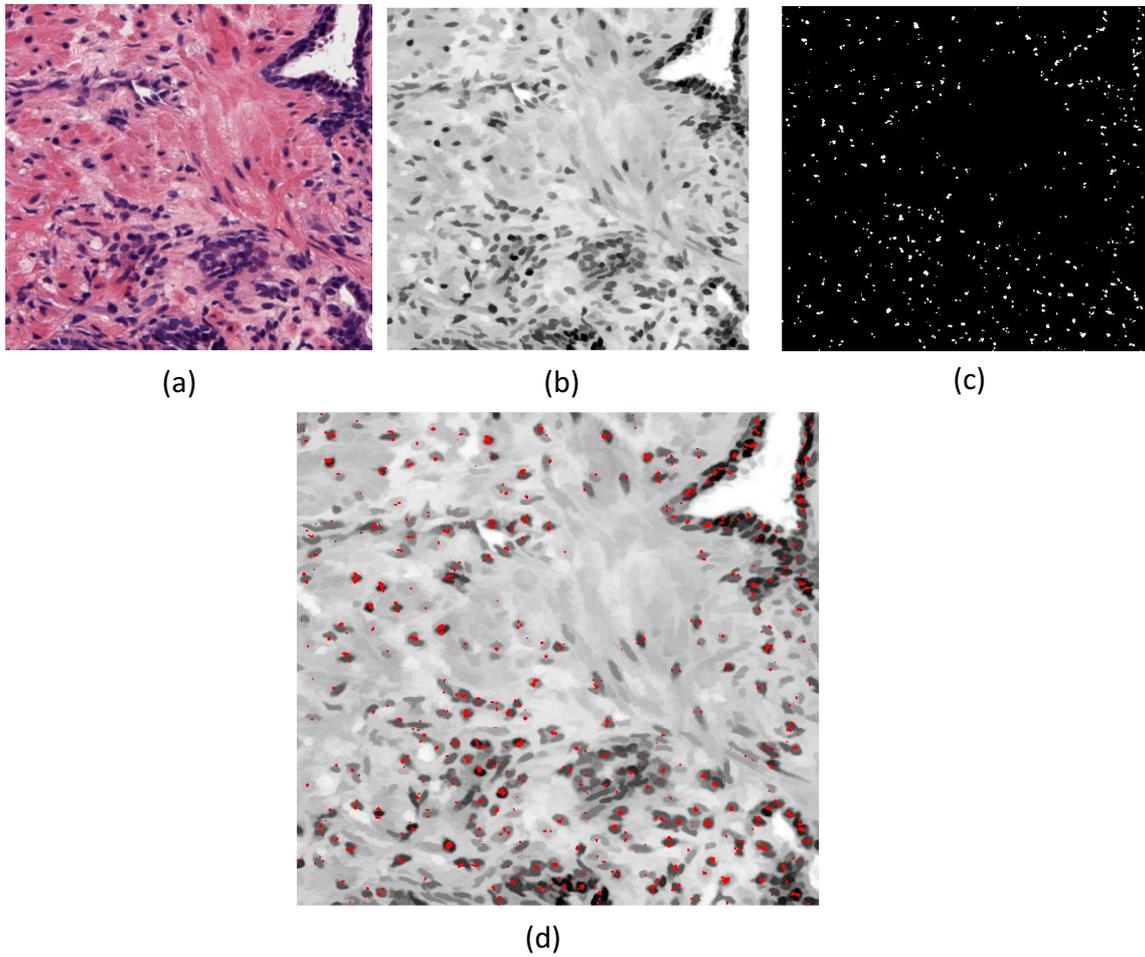


Figura 4.8. Implementación de la transformada de la simetría radial para obtener los marcadores internos. (a) Imagen original HE en RGB (b) Imagen de entrada: deconvolución de (a). (c) Marcadores internos: transformada de la simetría radial. (d) Resultado de los marcadores internos sobre la imagen de grises.

### 4.2.3. Segmentación.

En la etapa de segmentación se implementan las funciones que localizarán y segmentarán las regiones de interés, los núcleos en este caso, del resto de la imagen. Si se observa el Esquema 4.1. se tiene tres formas distintas de realizar la segmentación: la transformada *watershed con marcadores*, el algoritmo *K means* y el algoritmo *Mean shift*.

#### Algoritmo de segmentación. *Watershed con marcadores*.

Una vez se han determinado los marcadores, la segmentación con la transformada *watershed* es mucho más eficiente, pues ahora esta solo tendrá que partir de los mínimos para ir generando regiones que encontrarán sus límites definidos por estos mismos marcadores.

Las entradas del algoritmo *watershed* serán dos: el conjunto de marcadores internos y externos dispuestos en un mismo vector y la imagen gradiente generada a partir de la imagen de grises (Figura 4.9). Se recuerda que esta ha sido obtenido de dos formas: a partir del *Fuzzy c-means* (transformada de la distancia y función geodistancia) y a partir de la deconvolución y el tratamiento con operadores morfológicos (transformada de la simetría radial).

La función partirá de los marcadores internos e irá anexionando píxeles creando regiones delimitadas por la imagen gradiente. Los resultados para los tres métodos se muestran en las Figura 4.10 y 4.11.

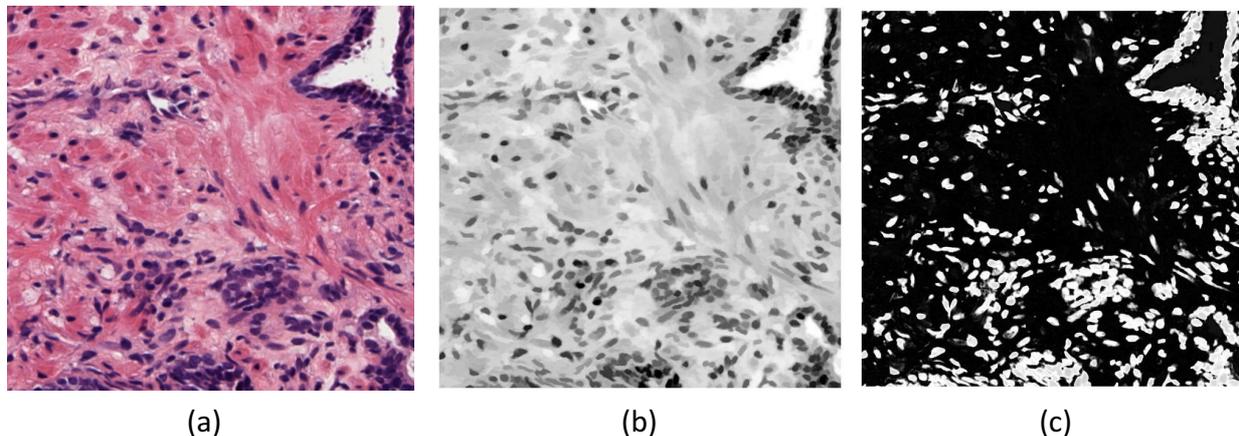


Figura 4.9. Imágenes a partir de las cuales se hallan los gradientes de entrada al *Watershed*. (a) Imagen original HE. (b) Imagen (a) tras la deconvolución y los operadores morfológicos. (c) Imagen (a) tras aplicar el Fuzzy c-means.

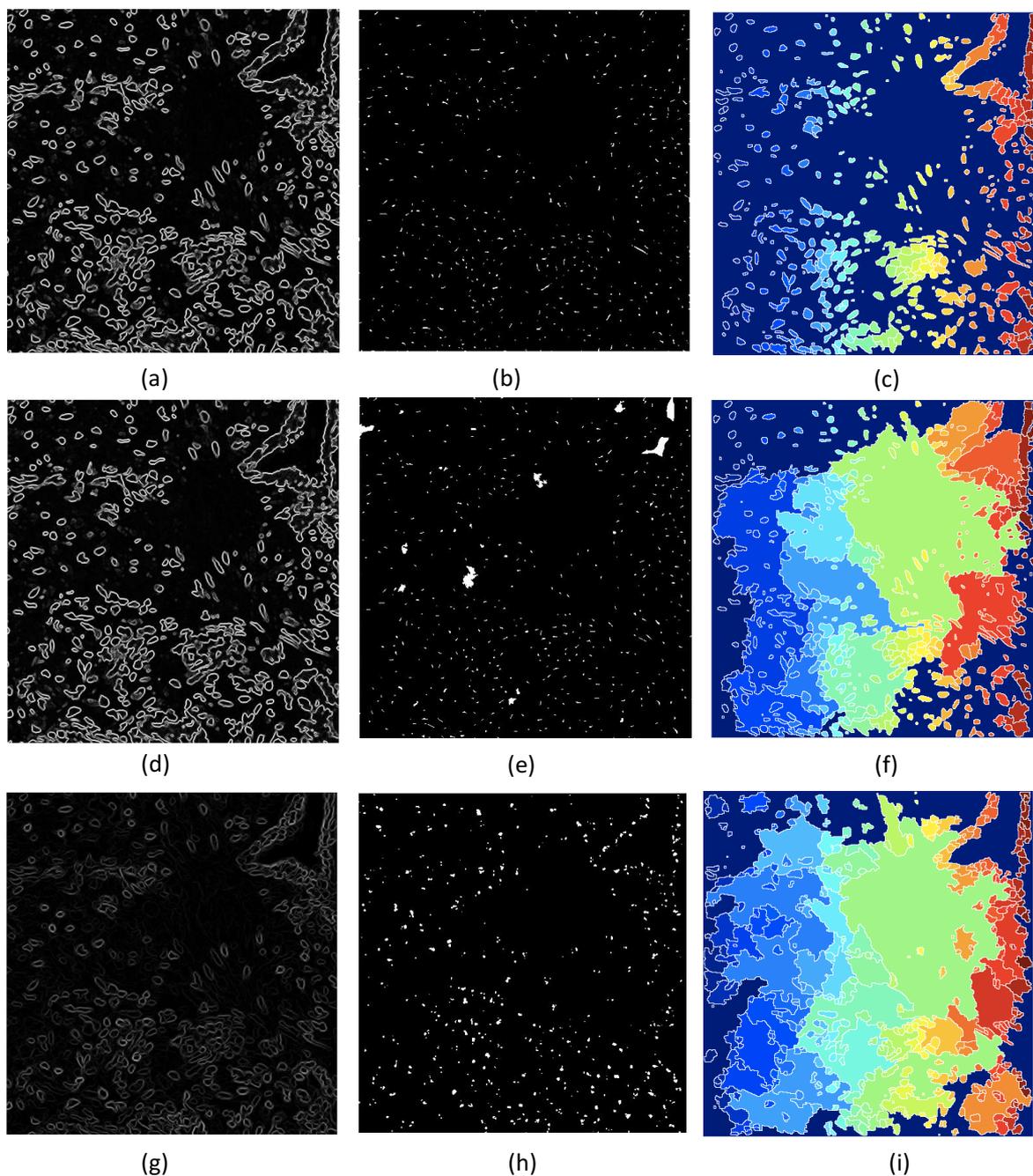


Figura 4.10. Segmentación *watershed*. (a) Imagen Gradiente derivada del Fuzzy c-means. (b) Marcadores. Transformada de la distancia. (c) Crecimiento de regiones al aplicar la función *watershed* con (a) y (b) como entradas. (d) Imagen Gradiente derivada del Fuzzy c-means. (e) Marcadores. Función geodistancia. (f) Crecimiento de regiones al aplicar la función *watershed* con (d) y (e) como entradas. (g) Imagen gradiente derivada de la deconvolución. (h) Marcadores. Transformada de la simetría radial. (i) Crecimiento de regiones al aplicar la función *watershed* con (g) y (h) como entradas.

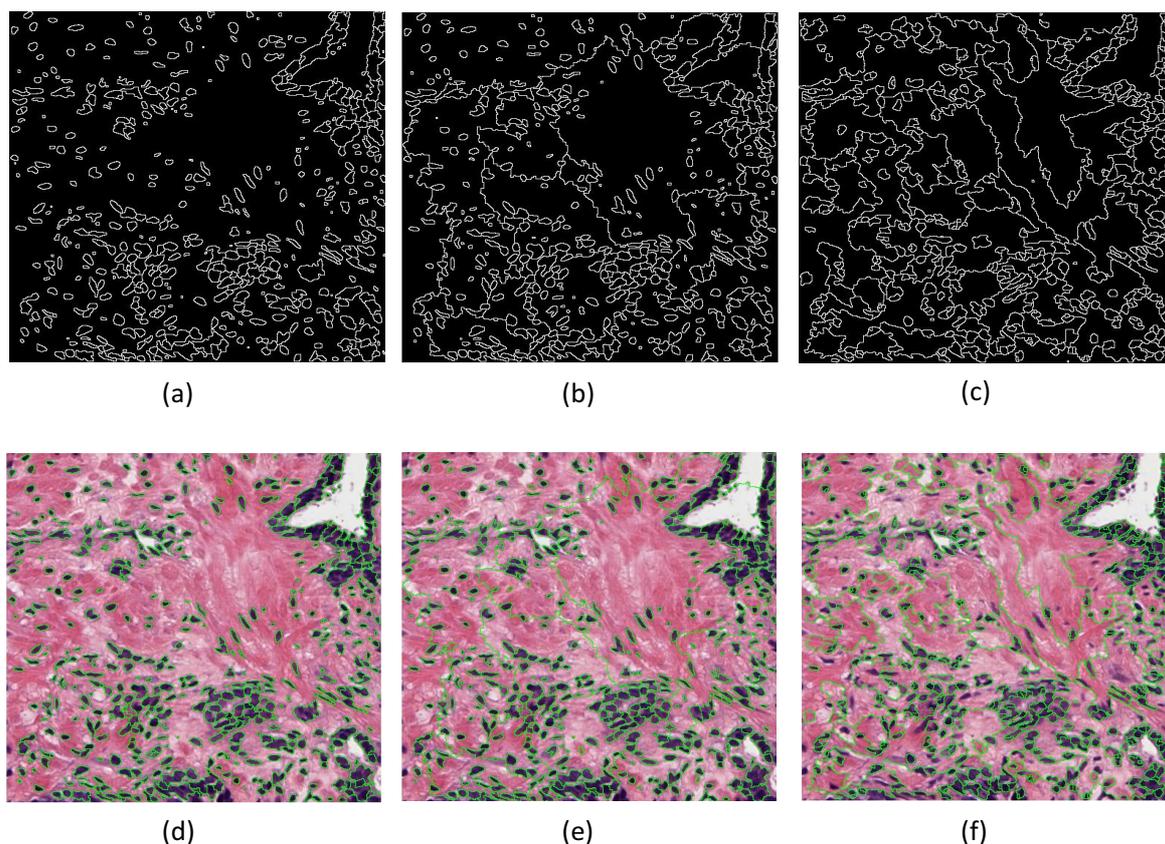


Figura 4.11. Resultados de la segmentación *watershed*. (a) Máscara resultante de la segmentación *watershed* con la transformada de la distancia. (b) Máscara resultante de la segmentación *watershed* con la función geodistancia. (c) Máscara resultante de la segmentación *watershed* con la transformada de la simetría radial. (d) Segmentación final. Máscara (a) superpuesta en la imagen original. (e) Segmentación final. Máscara (b) superpuesta en la imagen original. (f) Segmentación final. Máscara (c) superpuesta en la imagen original.

#### Algoritmo de segmentación. *K-means*.

Para poder segmentar los núcleos, *K-means* no necesita la localización de marcadores y usará como entrada la imagen de las componentes a y b del espacio CIELAB. Para ello se actúa de forma similar que para el *Fuzzy c-means*; se construye un vector con los valores de estas componentes y, este vector junto con el número de clases, serán las entradas a la clusterización.

Se empleará un número de clases igual a 3, las cuales se ven representadas en la Figura 4.12 b. Se obtienen entonces 3 clusters que se reconstruyen en las imágenes c, d y e de la Figura 4.12. La imagen e corresponde al clúster que contiene los núcleos. En ella se observan restos de estroma en los bordes de los núcleos que es necesario eliminar para poder hacer la segmentación correctamente.

Para separarlos por completo del estroma, se recurre a la componente L (luminancia) del espacio CIELAB (Figura 4.12 f). En primer lugar se buscan los índices de los píxeles en b que correspondan a la clase que contiene los núcleos (la clase de color gris) y se localiza la intensidad que tiene cada uno de estos píxeles en la componente L. A continuación, se aplica un umbral *Otsu* que va a binarizar los valores de intensidad de estos píxeles, quedando a 1 los píxeles pertenecientes a los núcleos. Finalmente, se multiplica el resultado de la umbralización por la imagen RGB, se obtiene g. Para acabar, se calculan los bordes de ésta última y, superpuesta a la imagen original, representan la segmentación final de los núcleos (figura 4.12. i).

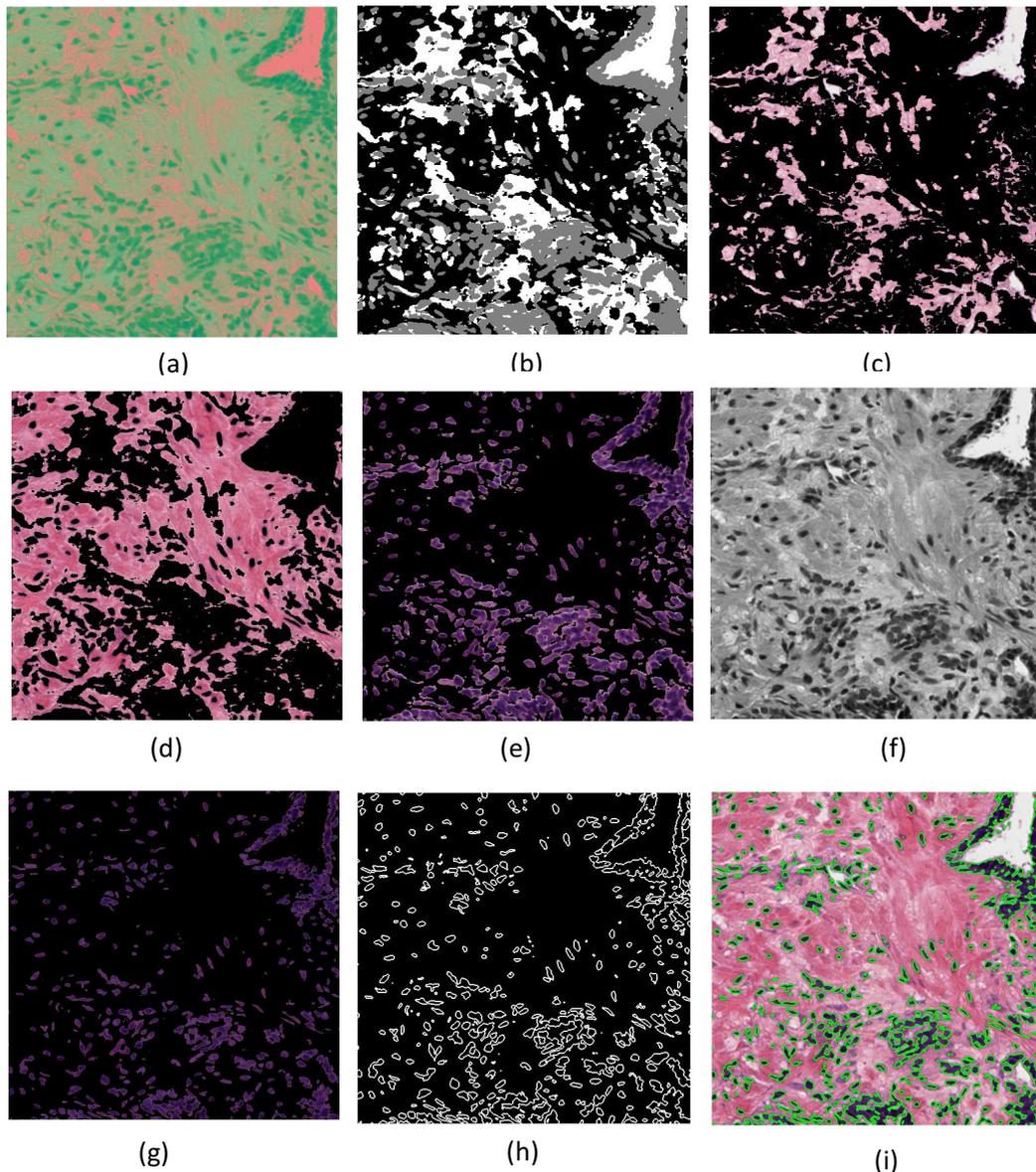


Figura 4.12. Implementación del algoritmo *K-means*. (a) Componentes a y b (espacio CIELAB). (b) Imagen de 3 clases tras aplicar *K-means*. (c) Reconstrucción del clúster 1. (d) Reconstrucción del clúster 2. (e) Reconstrucción del clúster 3. (f) Componente L (espacio CIELAB). (g) Núcleos separados del estroma de (e). Máscara derivada de (g). (h) Segmentación final.

### Algoritmo de segmentación. *Mean Shift*.

El último método de segmentación que aparece en la herramienta es el método basado en el algoritmo *Mean Shift*. Este requiere como entrada la ventana de búsqueda o *bandwidth*, que, en el ejemplo de la Figura 4.12. se establece como 0.2.

Como se comentó en el capítulo 3, el algoritmo *Mean Shift* procede iterativamente y da como resultado una serie de clases y los centros de las mismas. Para este caso, se han obtenido dos clases que el algoritmo ha representado en la Figura 4.13 a asignando a cada píxel de la clase 1, el valor de la intensidad correspondiente al centro de esta misma clase, y a cada píxel de la clase 2, el valor de la intensidad de su centro. El resultado es una imagen con dos clases bien diferenciadas donde se distinguen perfectamente los núcleos del fondo.

Por último se detectan los bordes (Figura 4.13 b) y se procede como en el resto de métodos, superponiendo la máscara a la imagen original para obtener la imagen final segmentada.

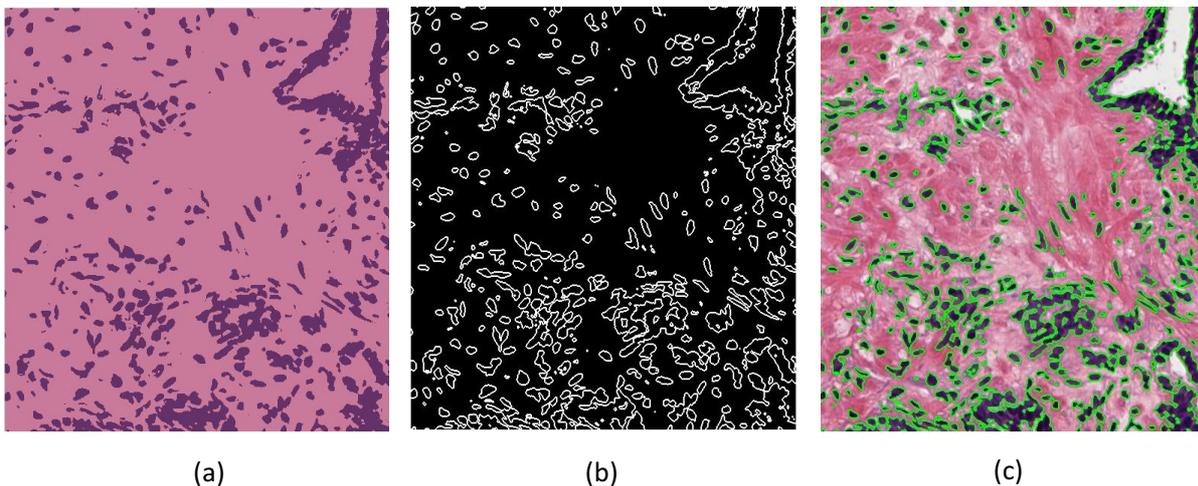


Figura 4.13. Implementación del algoritmo *Mean Shift*. (a) Imagen presentando dos clases tras la clusterización con una ventana de búsqueda de 0.2. (b) Máscara tras aplica el gradiente a (a). (c) Imagen final segmentada.

Es importante entender que el valor de *bandwidth* puede variar considerablemente de una imagen a otra según la disposición y el tamaño de los núcleos que se busca segmentar. En el capítulo 5 las imágenes estudiadas han sido segmentadas con distintos valores de este mismo parámetro, puesto que así lo requieren. Los valores de *bandwidth* para cada imagen se concretan en el Anexo A, junto con los resultados de la segmentación de cada una de ellas.

#### 4.2.4. Detalle de la etapa de post-procesado

El post-procesado se realiza tras la segmentación *watershed*, en el método que emplea la transformada de la simetría radial para hallar los marcadores. Con el fin de mejorar los resultados de la segmentación, se descartarán los objetos que presenten un área demasiado pequeña o demasiado grande como para considerarse núcleos. Además, se tendrá en cuenta su solidez, pues los núcleos son objetos convexos, y también se descartarán aquellos que sean poco sólidos.

En la Figura 4.14 *b* se ilustra el resultado tras el post-procesado de la imagen y se puede observar como se ha conseguido eliminar gran parte de la sobre-segmentación que se había producido con la implementación de la transformada *watershed*.

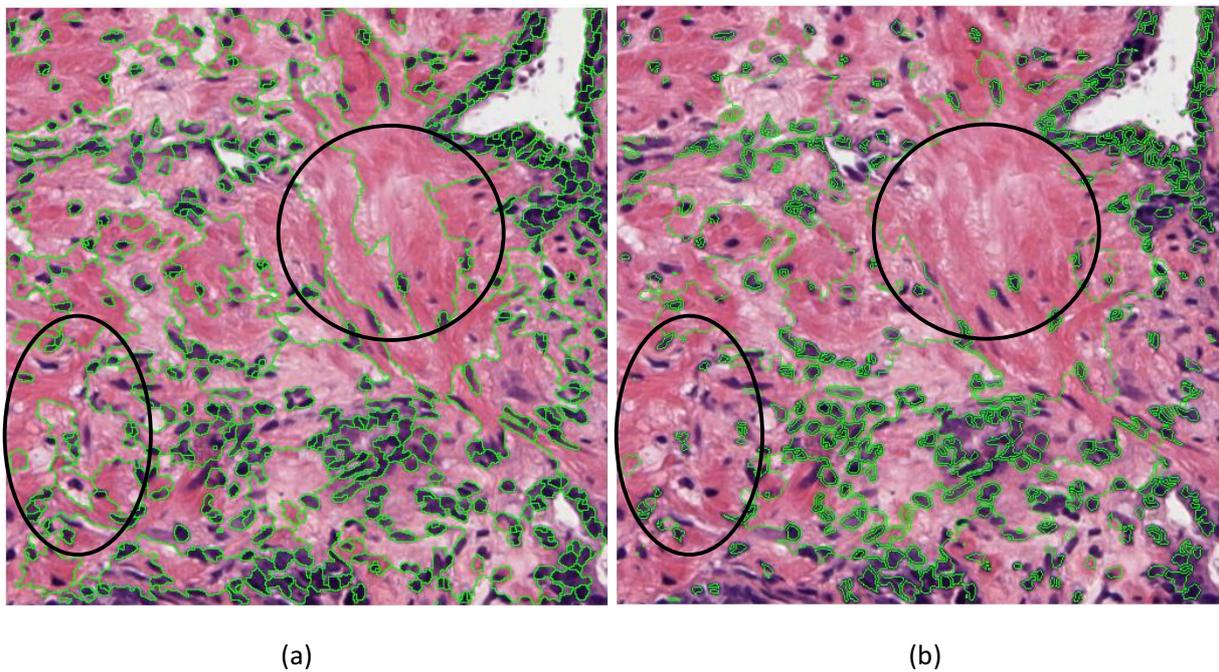


Figura 4.14. Post procesado (a) Imagen segmentada (b) Imagen (a) tras el post procesado.



## CAPÍTULO 5: RESULTADOS

En este capítulo se va a realizar un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos con cada uno de los métodos de segmentación. Para ello, se han estudiado diez de imágenes pertenecientes a tejidos prostáticos, las cuales han sido segmentadas implementando los algoritmos que se han explicado a lo largo de este trabajo.

Para poder extraer conclusiones sobre sus resultados, se han comparado dos máscaras; la obtenida mediante la herramienta diseñada, objeto de este trabajo final de grado, y una máscara de referencia o *ground truth*. Esta última máscara se ha generado con la ayuda de un software de uso libre “QuPath v0.1.2”. Este software permite realizar una primera segmentación automática y modificarla manualmente con las herramientas que ofrece para mejorar los resultados.

Las imágenes finales segmentadas pueden encontrarse adjuntas al Anexo A junto con la imagen original RGB y la segmentación proporcionada por el *ground truth*.

En el diagnóstico médico, tras realizar las pruebas necesarias, se asignan una serie de valores que determinan la relación entre el resultado de la prueba y el verdadero estado del paciente. Si la prueba dio positivo a una enfermedad, pero el paciente no está enfermo, hablamos de un falso positivo, mientras que si la prueba es negativa y acertada, se habla de un verdadero negativo. Coleccionando estos datos, se pueden obtener parámetros interesantes que determinen la probabilidad de clasificar correctamente a un paciente.

En el presente proyecto, se ha aplicado esta misma dinámica para la clasificación de los núcleos en las imágenes. La interpretación de los valores que se van a asignar es:

- **Verdadero Positivo (TP)**. Núcleos clasificados correctamente como núcleos por la herramienta.
- **Falso Positivo (FP)**. Núcleos mal clasificados como núcleos por la herramienta.
- **Falso Negativo (FN)**. Núcleos no clasificados como núcleos de manera errónea por la herramienta.

Existe un cuarto valor, mencionado previamente en el caso de las enfermedades, en el que los píxeles no clasificados como núcleos, resultan no ser núcleos y por lo tanto son verdaderos negativos (VN). Sin embargo, no es posible determinar este valor, pues todo lo que no es núcleo es fondo.

En la Figura 5.1. se ha hecho una representación gráfica de los valores y de cómo se identifican. Suponiendo que se trata de los resultados de la segmentación del *ground truth* (a) y de la herramienta diseñada (b). Los verdaderos positivos corresponderían a los núcleos en verde puesto que se encuentran en ambas imágenes. Los falsos positivos se han coloreado de rojo y estos son los que se han detectado de manera errónea por la herramienta. Finalmente, en azul se muestran los falsos negativos que la herramienta no ha sido capaz de detectar.

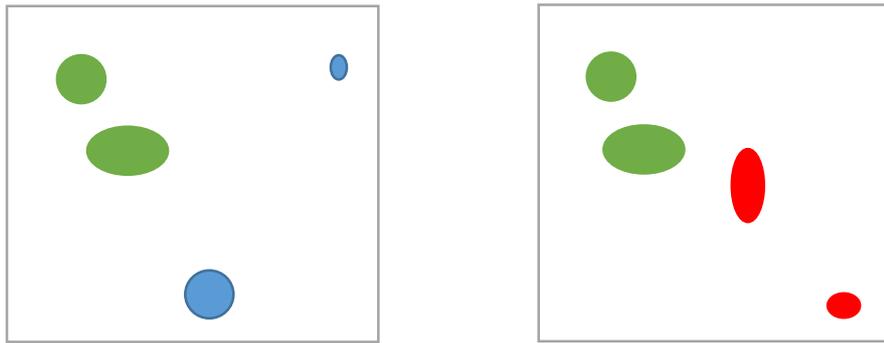


Figura 5.1. Representación de los valores TP, FP y FN. (a) *Ground truth*. (b) Segmentación llevada a cabo por la herramienta.

Una vez hallados estos tres valores, se pueden calcular dos índices capaces de evaluar el comportamiento de la herramienta:

- **Sensibilidad.** Determina la probabilidad de que un núcleo se haya clasificado correctamente. Por lo tanto, hace referencia a la capacidad de la herramienta para detectar con éxito los núcleos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN}$$

- **Valor Predictivo Positivo (PPV).** Determina la probabilidad de que un pixel pertenezcan a un núcleo si la herramienta lo ha clasificado como núcleo. Mide la eficacia real de la herramienta.

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}$$

A continuación, se muestra una serie de tablas en las que se detallan los resultados de la validación. Se ha generado una tabla para cada uno de los valores e índices donde se encuentran listadas las imágenes y su valor correspondiente calculado para cada método de segmentación.

Los métodos que emplean la segmentación *Watershed* reciben el nombre de “Watershed 1, 2 y 3” en las tablas por simplicidad. “Watershed 1” corresponde al método que se apoya en la transformada de la distancia para hallar los marcadores internos, “Watershed 2” al que usa la función geodistancia y “Watershed 3” al que usa la transformada de la simetría radial.

Las tablas 1 y 2 se han obtenido haciendo uso de las fórmulas mencionadas previamente para el cálculo de la Sensibilidad y el Valor Predictivo Positivo a partir de las tablas 4, 5 y 6, mostradas más adelante, donde se presentan los resultados para los distintos parámetros TP, FN y FP.

Cabe mencionar que en el método de segmentación “Watershed 3”, donde se usa la transformada de simetría radial, y en el método *Mean Shift*, se han ajustado en ciertas imágenes los parámetros referentes al radio y la ventana de búsqueda, respectivamente. En el primer caso, se ha buscado el resultado que estableciera un equilibrio entre el número de núcleos bien segmentados y la sobre segmentación. Esto se ha dado en las imágenes 5 y 7 en las que, en lugar de utilizar un radio de valor 8 como en el resto, se ha empleado un radio de 9 y 10 respectivamente.

En el caso del Mean shift, ciertas imágenes requerían un *bandwidth* más pequeño para realizar la segmentación. Los valores junto con los resultados se detallan en el Anexo A.

**Tabla 1. Resultados para PPV.**

	<b>Watershed 1</b>	<b>Watershed 2</b>	<b>Watershed 3</b>	<b>K means</b>	<b>Mean Shift</b>
<b>Imagen 1</b>	0.9017	0.9075	0.9594	0.9373	0.9458
<b>Imagen 2</b>	0.7252	0.9244	0.9145	0.8212	0.8494
<b>Imagen 3</b>	0.8575	0.9541	0.9509	0.8993	0.8484
<b>Imagen 4</b>	0.7579	0.9075	1	0.8560	0.8378
<b>Imagen 5</b>	0.7924	0.8171	0.9804	0.9094	0.8875
<b>Imagen 6</b>	0.6747	0.7994	0.9755	0.7790	0.8116
<b>Imagen 7</b>	0.7869	0.8502	0.9777	0.8587	0.7617
<b>Imagen 8</b>	0.8967	0.9130	0.9436	0.9624	0.9469
<b>Imagen 9</b>	0.7033	0.8283	0.9336	0.8150	0.7994
<b>Imagen 10</b>	0.8977	0.9223	0.9544	0.9558	0.9379
<b>MEDIA</b>	<b>0.7994</b>	<b>0.88238</b>	<b>0.9538</b>	<b>0.87941</b>	<b>0.86264</b>
<b>Desv. típica</b>	<b>0.08511</b>	<b>0.05355</b>	<b>0.02518</b>	<b>0.06321</b>	<b>0.06505</b>

Respecto a los resultados que se muestran en la tabla 1 para PPV, cabe mencionar los valores obtenidos en el método “Watershed 3” los cuales son considerablemente más altos que el resto en prácticamente todas las imágenes, destacando la imagen 4 con un 100% de precisión. Dado que para todas las imágenes ha obtenido valores por encima del 0.9, el método de la transformada de la simetría radial logra el valor medio más alto (0.9538) con bastante diferencia con respecto al segundo mejor; el método “Watershed 2” con un PPV de 0.88238. Esto indica que el método “Watershed 3” presenta una calidad de respuesta muy elevada, realizando una serie de segmentaciones que corresponden en gran medida con la que establece el *ground truth*.

El método que peores resultados presenta es el *watershed* con la transformada de la distancia, “Watershed 1” en la tabla. Obtiene valores por debajo de 0.75 para ciertas imágenes y ninguna de ellas supera el 91% en precisión. Esto se debe a que el método no ha sido capaz de realizar las segmentaciones correctamente pues, si nos fijamos en la Tabla 4, y lo comparamos con el resto de métodos, “Watershed 1” presenta un número bastante elevado de falsos positivos en la mayoría de las imágenes disminuyendo el valor de PPV.

**Tabla 2. Resultados para la Sensibilidad.**

	<b>Watershed 1</b>	<b>Watershed 2</b>	<b>Watershed 3</b>	<b>K means</b>	<b>Mean Shift</b>
<b>Imagen 1</b>	0.9198	0.9515	0.8641	0.8747	0.8820
<b>Imagen 2</b>	0.9691	0.9676	0.9545	0.9909	0.9849
<b>Imagen 3</b>	0.9571	0.9426	0.9373	0.9928	0.9974
<b>Imagen 4</b>	0.9763	0.9515	0.3852	0.9968	0.9968
<b>Imagen 5</b>	0.9891	0.9889	0.6494	0.9929	0.9965
<b>Imagen 6</b>	0.9859	0.9880	0.8840	0.9966	0.9966
<b>Imagen 7</b>	1	1	0.8595	1	1
<b>Imagen 8</b>	0.9834	0.9796	0.8827	0.9471	0.9701
<b>Imagen 9</b>	0.9786	0.9801	0.9369	1	1
<b>Imagen 10</b>	0.9715	0.9681	0.9197	0.9759	0.9814
<b>MEDIA</b>	<b>0.97308</b>	<b>0.97179</b>	<b>0.91087</b>	<b>0.97677</b>	<b>0.98057</b>
<b>Desv. típica</b>	<b>0.02212</b>	<b>0.01882</b>	<b>0.17782</b>	<b>0.03928</b>	<b>0.03598</b>

No obstante, si se hace referencia a los cálculos para la Sensibilidad en la Tabla 2, “Watershed 3” resulta en el valor medio más bajo para la Sensibilidad. Cabe destacar los resultados para las imágenes 4 y 5, que se encuentran muy por debajo de la media. Es posible que en estas imágenes, al intentar establecer un equilibrio entre núcleos correctamente segmentados y sobre-segmentación en la elección del radio, se hayan dejado muchos núcleos sin segmentar; según la Tabla 6, el valor de TP es de apenas 100 núcleos para la imagen 4 mientras que llega a ser de 315 para los métodos de clusterización.

En la Tabla 2, son especialmente interesantes los resultados obtenidos en cada uno de los métodos para la imagen 7. Todos ellos, excepto “Watershed 3”, presentan una sensibilidad del 100%, lo cual quiere decir que, en este caso, los métodos han sido capaces de detectar los núcleos con éxito.

De esta tabla también se sabe que el método *Mean shift* es el mejor, en términos generales, en la detección de núcleos, pues presenta un valor medio de sensibilidad de 0.98, alcanzando el 100% en dos de las imágenes segmentadas (imágenes 7 y 9). Se podría decir que se trata de un algoritmo

robusto para la detección de objetos de interés. Con valores algo inferiores, le sigue el método *K means* que también presenta una elevada sensibilidad (0.97677) y un 100% en las imágenes 7 y 9.

Finalmente, en la Tabla 3 se ha calculado una media entre ambos valores, PPV y sensibilidad, para poder concluir cuál de los métodos presenta unos resultados más balanceados en base a los dos parámetros calculados.

**Tabla 3. Valores medios (PPV y Sensibilidad).**

Watershed 1	Watershed 2	Watershed 3	K means	Mean Shift
0.88624	0.927085	0.893165	0.92809	0.921605

Se puede observar como el método que mejores resultados presenta es *K means* (0.92809), sin embargo, es preciso mencionar que el método Watershed con geodistancia (0.927085) y el método Mean shift (0.921605) obtienen valores similares, siendo el método de la transformada de la distancia, “Watershed 1”, el que peores resultados proporciona (0.88624).

A continuación se muestran las tablas mencionadas previamente a partir de las cuales se ha calculado la sensibilidad y el PPV.

**Tabla 4. Resultados para FP.**

	Watershed 1	Watershed 2	Watershed 3	K means	Mean Shift
<b>Imagen 1</b>	35	32	21	21	18
<b>Imagen 2</b>	119	22	55	71	58
<b>Imagen 3</b>	63	15	37	46	69
<b>Imagen 4</b>	92	32	0	53	61
<b>Imagen 5</b>	71	60	4	28	36
<b>Imagen 6</b>	135	62	9	82	68
<b>Imagen 7</b>	62	34	6	40	71
<b>Imagen 8</b>	41	32	31	14	20
<b>Imagen 9</b>	116	51	37	64	70
<b>Imagen 10</b>	35	23	23	15	21

**Tabla 5. Resultados para FN.**

	<b>Watershed 1</b>	<b>Watershed 2</b>	<b>Watershed 3</b>	<b>K means</b>	<b>Mean Shift</b>
<b>Imagen 1</b>	28	16	78	45	42
<b>Imagen 2</b>	10	9	28	3	5
<b>Imagen 3</b>	17	19	48	3	1
<b>Imagen 4</b>	7	16	158	1	1
<b>Imagen 5</b>	3	3	108	2	1
<b>Imagen 6</b>	4	3	47(8)	1	1
<b>Imagen 7</b>	0	0	43	0	0
<b>Imagen 8</b>	6	7	69	20	11
<b>Imagen 9</b>	6	5	35	0	0
<b>Imagen 10</b>	9	9	42	8	6

**Tabla 6. Resultados para TP.**

	<b>Watershed 1</b>	<b>Watershed 2</b>	<b>Watershed 3</b>	<b>K means</b>	<b>Mean Shift</b>
<b>Imagen 1</b>	321	314	496	314	314
<b>Imagen 2</b>	314	269	588	326	327
<b>Imagen 3</b>	379	312	717	411	386
<b>Imagen 4</b>	288	314	99	315	315
<b>Imagen 5</b>	271	268	200	281	284
<b>Imagen 6</b>	280	247	358	289	293
<b>Imagen 7</b>	229	193	263	243	227
<b>Imagen 8</b>	356	336	519	358	357
<b>Imagen 9</b>	275	246	520	282	279
<b>Imagen 10</b>	307	273	481	324	317

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

En el presente trabajo Fin de grado, se han presentado distintos algoritmos para llevar a cabo la segmentación automática de núcleos en una serie de imágenes histológicas seccionadas de una muestra histopatológica de la próstata.

Se han seguido dos líneas para la elección y el desarrollo de los métodos de segmentación. Por un lado, se han implementado algoritmos basados en la clusterización de la imagen, y por otro lado, algoritmos que realizan la segmentación a partir de la transformada *watershed* con marcadores.

A través de una validación con el cálculo de una serie de parámetros, se ha determinado que el algoritmo *K means* junto con el método *watershed* haciendo uso de la función geodistancia para calcular sus marcadores, presentan una eficacia y una calidad de respuesta elevada, con un valor medio de 0.92809 y 0.927085 respectivamente, realizando una segmentación de los núcleos, en gran medida, exitosa. No obstante, el resto de métodos obtienen resultados interesantes y los cuales podrían explotarse para futuras aplicaciones si se realizara un estudio más riguroso de los mismos.

La segmentación nuclear, junto con otras herramientas para el análisis histopatológico, son campos por lo general muy poco explorados y la mayoría de las técnicas se encuentran en fases experimentales. Los distintos algoritmos y técnicas implementados a lo largo del trabajo, han resultado ser en gran medida satisfactorios en el objetivo de segmentar las imágenes, sin embargo, todavía se requiere una fuerte investigación capaz de explotar todo su potencial.

Como se vio en la introducción, el cáncer de próstata presenta una prevalencia muy elevada que aumenta con la edad. Esta situación se agrava con el continuo envejecimiento de la población y los factores externos producto de la globalización. Es por eso que el desarrollo de herramientas que agilicen y optimicen el diagnóstico basado en la imagen necesita ser definitivamente impulsado. La segmentación de núcleos en tejidos prostáticos es una de las claves para alcanzar este objetivo. Estas herramientas promueven el análisis automático que se busca implantar en el diagnóstico basado en la imagen médica. Actualmente, este diagnóstico se basa en el análisis visual de propiedades y elementos del tejido a nivel cualitativo, que se perciben e interpretan por el patólogo encargado de realizar el diagnóstico. Con la implantación de las técnicas de segmentación nuclear y la aparición de otras nuevas, se avanza hacia un análisis cuantitativo que incorpora estadísticas y análisis matemáticos, trabajando con el valor de los píxeles de las imágenes.

En el capítulo 1 se comentó que este trabajo fin de grado pretende ser el punto de partida para desarrollar una interfaz capaz de clasificar las muestras prostáticas según el grado de diferenciación tumoral de manera automática, llevado a cabo por el proyecto SICAP. Segmentar correctamente los núcleos, elemento clave a nivel tumoral, junto con una segmentación de las glándulas, el lumen, el citoplasma y otros elementos relevantes, aportan información sobre su forma y disposición para finalmente conseguir generar una base para extractores de características y clasificadores. Además de

esta principal línea de futuro, se plantean otros objetivos a corto y largo plazo que podría seguir este trabajo:

- La exploración de nuevas técnicas de pre-procesado de imágenes HE capaces de resaltar los elementos característicos y reducir el problema de la variabilidad de color que puede presentar dicha tinción y entorpece la segmentación.
- El estudio con más detalle de los efectos que tienen los parámetros de las distintas metodologías de segmentación de manera que se puedan ajustar correctamente según los requisitos de cada imagen.
- A través de rigurosos estudios y con el enorme avance que se está viviendo en la actualidad en el uso de *Machine Learning* se hará posible la búsqueda de nuevos algoritmos que sean lo más precisos posible y la exploración de nuevas técnicas de segmentación. También se podrían aplicar técnicas de *Deep Learning* para afrontar el problema de la segmentación de núcleos.
- Adoptar la misma línea de trabajo en la investigación de otros cánceres o enfermedades cuyo estudio se realice también mediante el análisis de imágenes histopatológicas, como sucede con el cáncer de pulmón, el cáncer de colon o el cáncer de mama. Así, sería posible desarrollar herramientas de análisis automático para estos tumores o incluso una única herramienta capaz de clasificar distintos tipos de cánceres.

## Bibliografía

Abeln, M. (2017). *Color Spaces, Part 4: Lab*. [online] Therefractedlight.blogspot.com.es.: <http://therefractedlight.blogspot.com.es/2012/02/color-spaces-part-4-lab.html> [Acceso 21/04/2017].

Usmdpcc.com. (2017). *About Prostate Cancer. Prevention*. [online] <http://www.usmdpcc.com/about-prostate-cancer.php> [Acceso: 8/04/2017]

Ash, J., Morton, D. & Scott, S. (2013). *Histology: The Big Picture*. Estados Unidos: Mc Graw Hill Medical, Preface xi.

Ashraf A., Safaai B. & Zaki N. (2011). *Research Review for Digital Image Segmentation Techniques*. UAE University: Journal of Computer Science & Information Technology Vol.3: 99-106.

Ballerini L. (2017). Mathematical Morphology Lecture 14. Digital Image Processing. [online]. Slideplayer.com: <http://slideplayer.com/slide/7469034/> [Acceso: 26/04/2017]

Beucher, S. & Meyer, F. (1993). *The morphological approach to segmentation: the watershed transformation*. New York: Mathematical Morphology in Image Processing, E. R. Dougherty, Ed. Marcel Dekker, ch. 12, pp. 433–481.

Bueno M. G. (2007) *Gestión, Procesado y Análisis de Imágenes Biomédicas*. Cuenca: Ediciones de la Universidad de Castilla La-Mancha, Ciencia y Técnica n. 52: pp.69-72.

Burger W. & Burge M. (2009). *Principles of Digital Image Processing. Fundamental Techniques*. Undergraduate Topics in Computer Science. London: Springer-Verlag London, pp. 1-3, 8-10.

Seom.org. (2017). *Cáncer de próstata*. [online]. <http://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/prostata?start=1#content> [Acceso 5/04/2017].

The MathWorks, Inc. (2014). *Color based Segmentation using K-means clustering*. <https://es.mathworks.com/help/images/examples/color-based-segmentation-using-k-means-clustering.html> [Acceso 3/05/2017].

Comaniciu, D. & Meer, P. (2002). *Mean Shift: A Robust Approach Toward Feature Space Analysis*. In IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol.24 n.5, pp.603-619.

Cooper B., Mintz S. & Palumbo W. (2013). *Characterization of biomaterials: 4 Assays for determining cell differentiation in biomaterials*. Woodhead publishing series in biomaterials.

Epstein J. & Netto G. (2008). *Biopsy Interpretation of the Prostate*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 6-7.

Epstein J. and Hutchins G. (1984). *Granulomatous prostatitis: distinction among allergic, nonspecific, and post-transurethral resection lesions*. Hum Pathol Vol.15, p. 818.

Epstein J. (2013) *The Gleason Grading System: A Complete Guide for Pathologist and Clinicians*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1-7.

Epstein JI *et al.* (2015). *A contemporary prostate cancer grading system: A validated alternative to the Gleason score*. Eur Urol.

Fielding, A. (2017). *Cluster Analysis, Dendrograms. Clustering and Classification Methods for Biologists*. [online] Alanfielding.co.uk.: <http://www.alanfielding.co.uk/multivar/dend.htm> [Acceso: 28/04/2017].

Friel N., & Molchanov I. (1998). *Distances between grey-scale images*. Dordrecht: Mathematical Morphology and its Applications to Image and Signal Processing, pp. 283–290.

Fukunaga & Hostetler (1975). *The Estimation of the Gradient of a Density Function, with Applications in Pattern Recognition*. IEEE Transactions on Information Theory vol. 21, pp 32-40

Granado de la Orden S., Saá Requejo C. & Quintás Viqueira A. (2006). *Situación epidemiológica del cáncer de próstata en España*. Madrid: Actas Urol Esp n.30, pp 574-582.

Hafiane A., Bunyak F. & Palaniappan K. (2008). *Clustering Initiated Multiphase Active Contours and Robust Separation of Nuclei Groups for Tissue Segmentation*. IEEE

Hafiane A., Zavidovique B. & Chaudhuri S. (2005). *A modified FCM with optimal Peano scans for image segmentation*. Genova, In IEEE ICIP.

Hahn H. (2003). *Interactive Watershed Transform: A hierarchical method for efficient interactive and automated segmentation of multidimensional grayscale image*. Semantic scholar.org: <https://www.semanticscholar.org/paper/IWT-Interactive-Watershed-Transform-A-hierarchical-Hahn> [Acceso 10/04/2017].

Hoffmann G. (2013). *CIE Lab Color Space*. Germany, Docs-hoffmann.de: <http://docs-hoffmann.de/cielab03022003.pdf> [Acceso 3/04/2017].

Humphrey P. (2017) *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. [online] Nature.com: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v17/n3/full/3800054a.html> [Acceso: 10/06/2017].

Irshad H., Veillard A., Roux L. & Racoceanu D. (2014) *Methods for nuclei detection, Segmentation and Classification in Digital Histopathology: Review, Current Status and Future Potential*. IEEE Reviews in Biomedical Engineering Vol.7: 97-114.

Jack W. & Tom F. (2014) *Urología General*. Mexico: Mc Graw Hill Education LANGE, p.350-355.

Jayaraman S., Esakkirajan S. & Veerakumar T. (2009). *Digital Image Processing*. New Delhi: Tata McGraw Hill Education, p. 21.

Kårsnäs, A. (2014). *Image Analysis Methods and Tools for Digital Histopathology Applications Relevant to Breast Cancer Diagnosis*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology n.1128: 129. ISBN: 978-91-554-8889-5.

Kwast H. et al. (2003). *Guidelines for processing and reporting of prostatic needle biopsies*. The Netherlands, Clin Pathol n.56, pp. 336–340.

La Serna N. & Román U. (2009). *Técnicas de Segmentación en Procesamiento Digital de Imágenes*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Revista de Ingeniería de Sistemas e Informática Vol.6, pp. 9-16.

Lopez I. (2016). *Método Otsu. Segmentación por Umbralización*. [online] <http://myslide.es/documents/metodo-de-Otsu-segmentacion-por-umbralizacion.html> [Acceso: 12/04/2017]

Loy G. & Zelinsky A. (2003). *A Fast Radial Symmetry Transform for detecting Points of Interest*. Australian National University, Australia: In IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence Vol.25, pp. 959-973.

McNeal J. (1998) *Normal and pathologic anatomy of prostate* . Urology Vol.17, p. 11.

Mescher A. (2013). *Junqueira's Basic histology. Text & Atlas*. Mc Graw Hill Education LANGE.

Meyer F. and Beucher S., (1992). *Morphological Segmentation*. Academic Press: Journal of Visual Communication and Image representation, Vol. 1, n° 1, pp. 21-46.

Mosquera-López C., Agaian S., Velez-Hoyos A. & Thompson I. (2015). *Computer-Aided Prostate Cancer Diagnosis From Digitized Histopathology: A Review on Texture-Based Systems*. In IEEE Rev. in Biomed. Eng.

ImageJ. (2017). *MorphoLibJ. Morphological Filters*. [online] <https://imagej.net/MorphoLibJ> [Acceso: 26/04/2017].

Esteban A., Naranjo V., Peñaranda F., Morales S., Ferrández M. & Sales M. (2017). *Detección de núcleos en imágenes histológicas de próstata*. Universidad Politécnica de Valencia, Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia.

Nickel J. (1999). *Textbook of Prostatitis*. United Kingdom: Isis Medical Media, pp.33-37.

Nielsen B., Albreghsten F. & Danielsen H. (2012) *Automatic Segmentation of Cell Nuclei in Feulgen-Stained Histological Sections of Prostate Cancer and Quantitative Evaluation of Segmentation Results*. Journal of the International Society for Advancement of Cytometry.

Nielsen B., Albreghsten F. & Danielsen H. (2008). *Satistical Nuclear Texture Analysis in Cancer Research: A Review of Methods and Applications*. Critical Reviews in Oncogenesis Vol. 18, pp. 89-94.

Oberley T., Zhong W. & Szweda L. (2000). *Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium*. Wiley-Liss, Inc. The Prostate n.44, pp 144-155.

Otsu, N., (1979). *A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*. In IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. 9, No. 1, pp. 62-66.

Pantanowitz L. (2010). *Digital Images and the Future of Digital Pathology*. *Journal of Pathologists Informatics*. Ncbi.nlm.nih.gov: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2941968/> [Acceso: 30/04/2017]

Peñaranda F. (2014). *Estudio sobre la Segmentación Automática de Muestras Histológicas medidas con Espectroscopía Infrarroja*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia: Trabajo Fin de Máster.

Piech C. (2012). *K means*. Stanford University, Stanford.edu: <http://stanford.edu/~cpiech/cs221/handouts/kmeans.html> [Acceso: 12/05/2017]

Rajal B. & Zhou M. (2012). *Prostate Biopsy Interpretation: An Illustrated Guide*. New York: Springer Heidelberg, pp.1-6, 15-17.

Roerdink J. & Meijster A. (2001). *The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies*. University of Groningen: IOS Press, Fundamenta Informaticae vol. 41, pp. 187-228.

Ruifrok AC, Johnston DA. (2001). *Quantification of histological staining by color deconvolution*. Anal Quant Cytol Histol n.23, pp. 291-299.

Suvarna S., Layton C. & Bancroft J. (2013) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. United Kingdom: Churchill Livingstone ELSEVIER, p. 69.

Trevino A. (2016). *Introduction to K-means Clustering*. Datascience.com: <https://www.datascience.com/blog/introduction-to-k-means-clustering-algorithm-learn-datascience-tutorials> [Acceso: 12/05/2017]

Veta M., Huisman A., Viergever M., van Diest P. & Pluim J. (2011). *Marker-controlled Watershed Segmentation of Nuclei in H&E Stained Breast Cancer Biopsy Images*. University Medical Center Utrecht, Netherlands.

Cancer.org. (2017). *What Tests Can Detect Prostate Cancer Early?*. [online] <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/early-detection/tests.html> [Acceso 5/04/2017].

Wu J. (2012). *Advances in K-means Clustering. A Data Mining Thinking*. Springer-Verlag Nerlin Heidelberg, pp. 1-4, 7-9.

Xing F. & Yang L. (2016). *Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review*. PubMed.gov: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742143> [Acceso 23/05/2017].

Zhang Y. (2009). *Image Segmentation in the Last 40 Years*. Encyclopedia of Information Science and Technology, pp. 1818-1819.

Zhou H., Yuan Y. & Shi C. (2009). *Object tracking using SIFT features and Mean shift*. In Computer Vision and Image Understanding n.113. Elsevier Inc. pp. 345-352.



# **PRESUPUESTO**



# ÍNDICE

- 1. Presupuesto parcial I.....75
- 2. Presupuesto parcial II.....75
- 3. Presupuesto parcial III.....76
- 4. Presupuesto parcial IV.....76
- 5. Presupuesto Total.....77



## Presupuesto

A continuación se detalla el cálculo del presupuesto total al que equivale este trabajo. Este se ha dividido en cuatro presupuestos parciales que desglosan los gastos en distintas áreas. Los presupuestos parciales son los siguientes:

- Presupuesto parcial I. Obtención de las imágenes histológicas.
- Presupuesto parcial II. Personal necesario para la elaboración del proyecto.
- Presupuesto parcial III. Hardware empleado.
- Presupuesto parcial IV. Software empleado.

### 1. Presupuesto parcial I. Obtención de imágenes histológicas.

Para este primer presupuesto parcial se ha tenido en cuenta por un lado el coste de obtener una muestra histológica de la próstata. Este incluye la realización de la prueba y el tratamiento de la biopsia para poder observarla en el microscopio. Separadamente, se ha considerado el coste de la digitalización de las muestras ya que en muchas ocasiones se recurre a un laboratorio externo para realizar el escaneado. Puesto que en el trabajo se realiza el estudio sobre 10 imágenes proveniente de una serie de muestras, el número máximo de muestras sería 10.

Tabla I. Presupuesto parcial I.

Actividad	Coste (€)	Cantidad (u)	Importe (€)
Obtención muestra histológica	600	1	600
Digitalización de las muestras	10	10	100
<b>TOTAL</b>			700

### 2. Presupuesto parcial II. Personal necesario para la elaboración del proyecto.

Este segundo presupuesto hace referencia a los gastos en recursos humanos. En este trabajo participan principalmente 3 personas: el tutor y el cotutor del TFG, encargados de supervisar todo el desarrollo y el alumno que se encarga de la realización.

Tabla II. Presupuesto parcial II.

Personal	Coste (€/h)	Cantidad (u)	Importe (€)
Tutor TFG: Profesor	29,5€/h	30 h	885
Cotutor TFG: Postdoctorado	17,2€/h	30 h	516
Alumno TFG: Ingeniero.	12,5€/h		3750
-Diseño de la herramienta		220 h	
-Redacción de documentación		80 h	
<b>TOTAL</b>			5151

### 3. Presupuesto parcial III. Hardware empleado.

A continuación se detalla el gasto que suponen los recursos de Hardware necesarios. Estos son esencialmente de carácter tecnológico, pues todo el proyecto se ha realizado con un ordenador portátil. Este no ha sido obtenido exclusivamente para el desarrollo del trabajo por lo tanto habrá que tener en cuenta la vida útil del ordenador (Periodo de amortización) y el intervalo de tiempo en el que se ha utilizado (Intervalo amortizado).

Tabla III. Presupuesto parcial III.

Hardware	Coste (€)	Cantidad (u)	Periodo de amortización (años)	Intervalo amortizado (meses)	Importe (€)
Ordenador portátil - MacBook Air 11 pulgadas. - 1.6 GHz Intel Core i5. - 4 GB de memoria DDR3, 1600 MHz.	1000	1	4	9	187,5
<b>TOTAL</b>					187,5

### 4. Presupuesto parcial IV. Software empleado.

Al igual que en el presupuesto parcial III, para calcular los gastos en cuanto a los recursos de software utilizados, es necesario contar con el periodo de amortización y el intervalo de tiempo en el que estos han sido utilizados.

Tabla IV. Presupuesto parcial IV.

Software	Coste (€)	Cantidad (u)	Periodo de amortización (años)	Intervalo amortizado (meses)	Importe (€)
Microsoft Office. -Microsoft Word v.15.21.1 -Microsoft Excel v.15.21.1	100	1	1	9	75
Versión del Software del ordenador: OS X 10.10.5	0	1	1	9	0
Matlab R2016b ®	105	1	1	9	78,75
<b>TOTAL</b>					153,75

## 5. Presupuesto Total

En primer lugar se obtiene el total de la suma de todos los presupuestos parciales detallados anteriormente.

Tabla V. Suma de presupuestos parciales.

<b>Capítulo</b>	<b>Importe (€)</b>
Capítulo 1 Obtención de imágenes histológicas	700
Capítulo 2 Personal necesario para el desarrollo	5151
Capítulo 3 Hardware empleado	187,5
Capítulo 4 Software empleado	153,75
<b>TOTAL</b>	<b>6192,25</b>

Una vez se conoce el total de esta suma, es preciso añadir un 13% de gastos generales y un 6% de beneficio industrial. Por último, a este valor se le añade el 21% de IVA.

Tabla VI. Presupuesto Total.

<b>Añadidos</b>	<b>Importe (€)</b>
13% de gastos generales	804,99
6% de beneficio industrial	371,53
Suma total	7368,77
21% de IVA	1547,44
<b>PRESUPUESTO TOTAL</b>	<b>8916,21</b>

El coste total del desarrollo de este proyecto asciende a OCHO MIL NOVECIENTOS DIECISÉIS EUROS CON VEINTIÚN CÉNTIMOS.



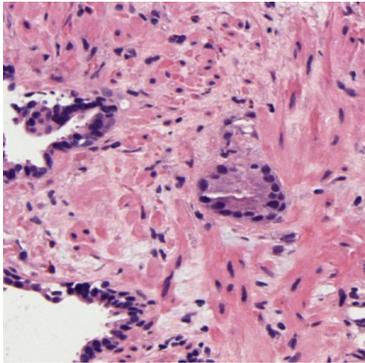
# **ANEXOS**



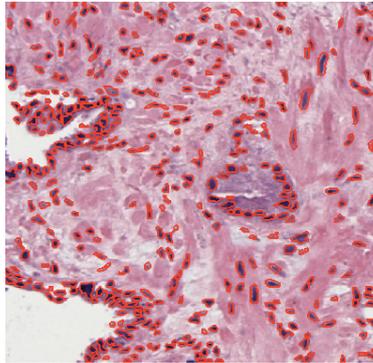
## ANEXO A. Resultados de la segmentación en las imágenes validadas.

### *Segmentación Watershed. Transformada de la distancia.*

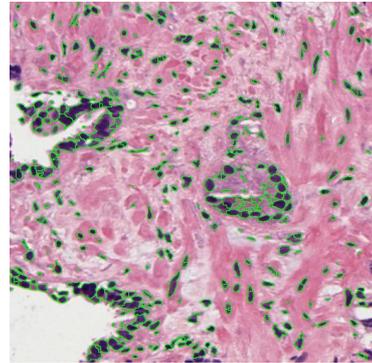
#### Imagen 1



Original

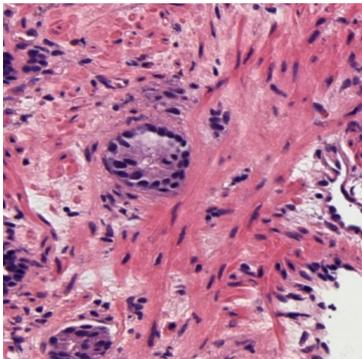


Ground truth

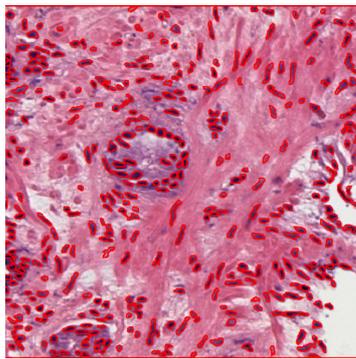


Segmentada

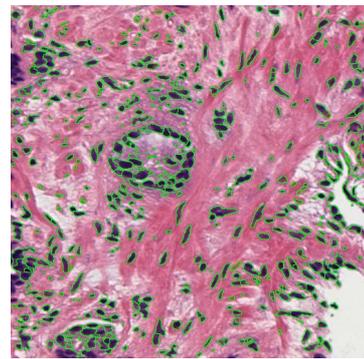
#### Imagen 2



Original

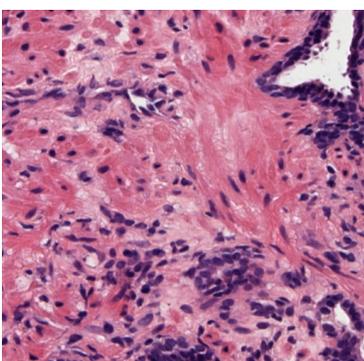


Ground truth

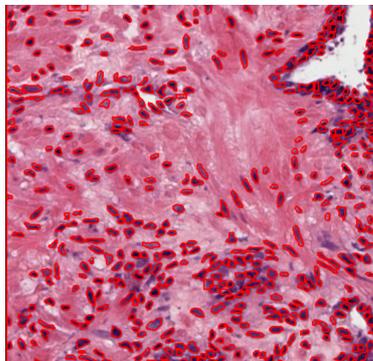


Segmentada

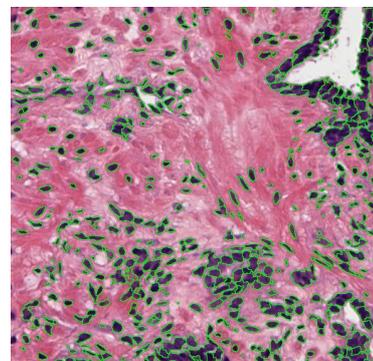
#### Imagen 3



Original

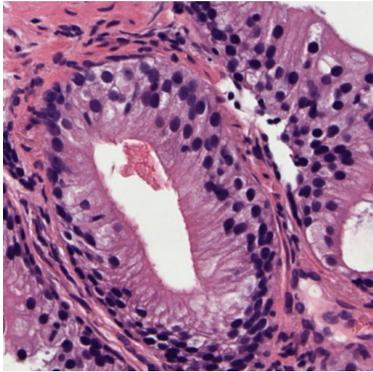


Ground truth

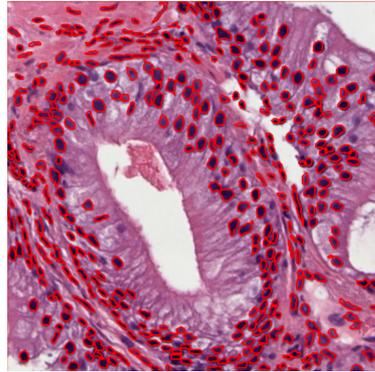


Segmentada

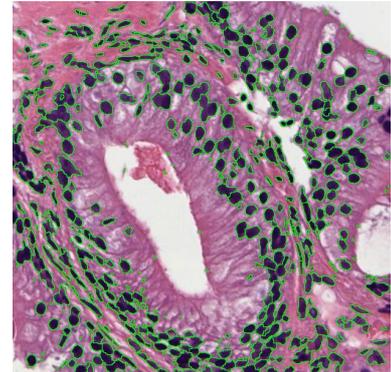
Imagen 4



Original

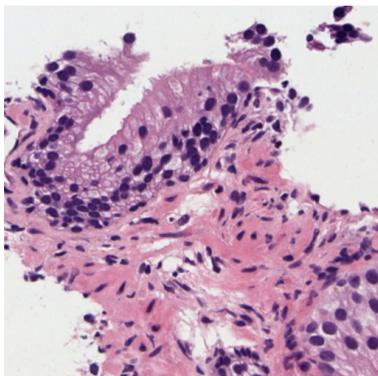


Ground truth

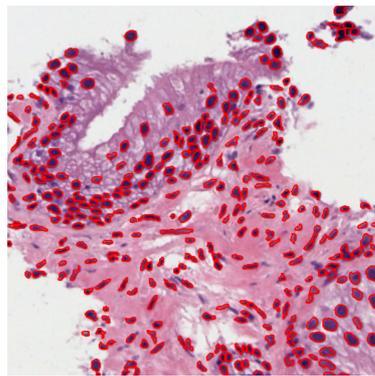


Segmentada

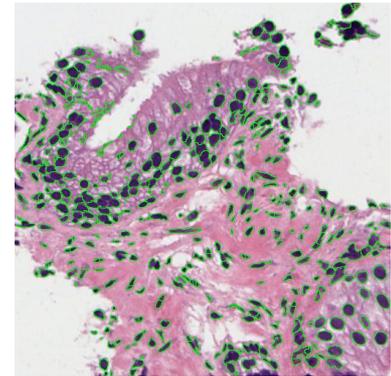
Imagen 5



Original

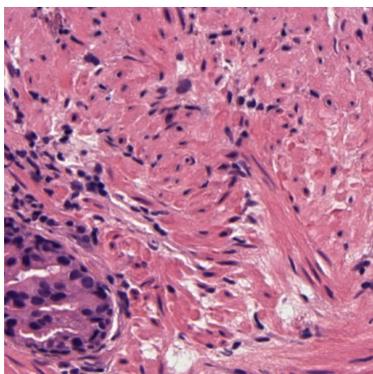


Ground truth

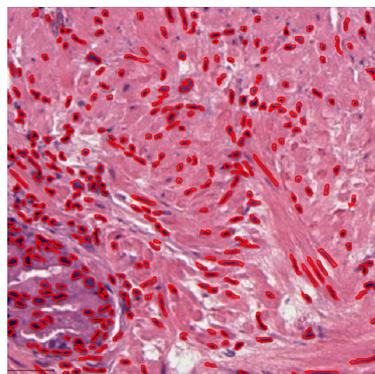


Segmentada

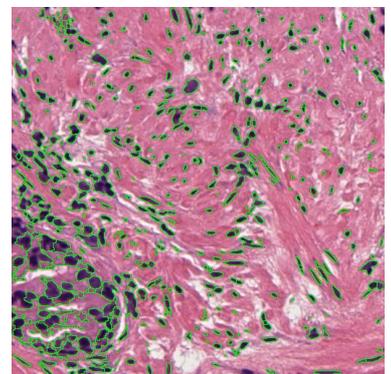
Imagen 6



Original

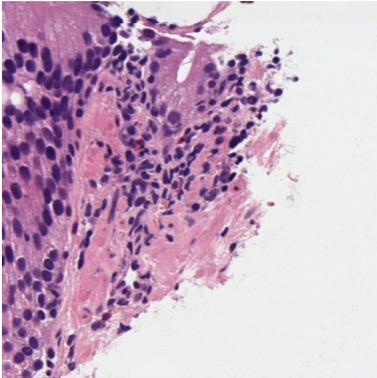


Ground truth

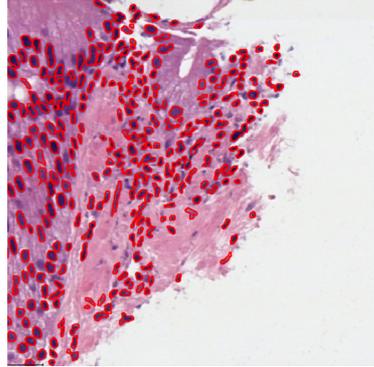


Segmentada

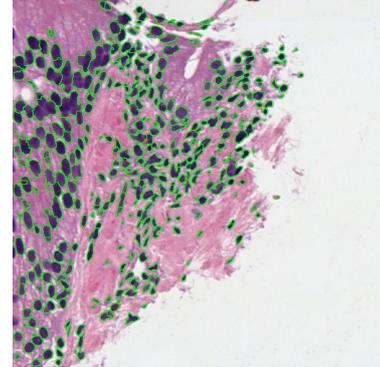
Imagen 7



Original

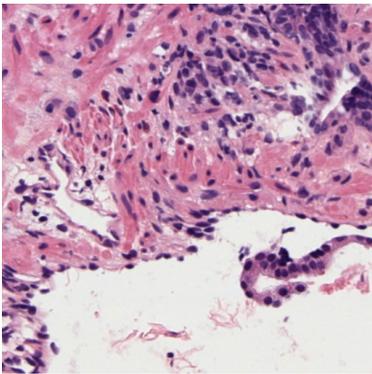


Ground truth

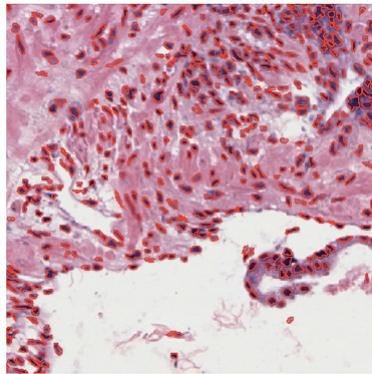


Segmentada

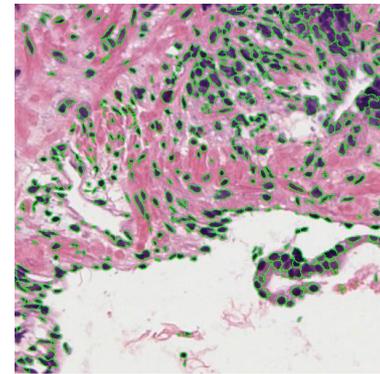
Imagen 8



Original

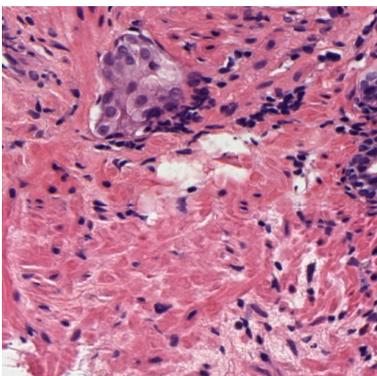


Ground truth

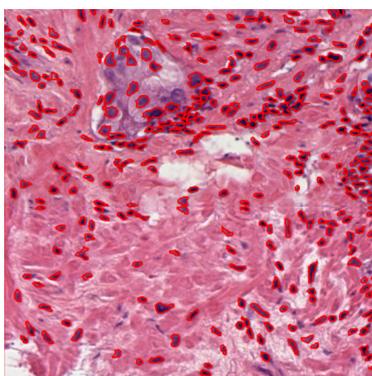


Segmentada

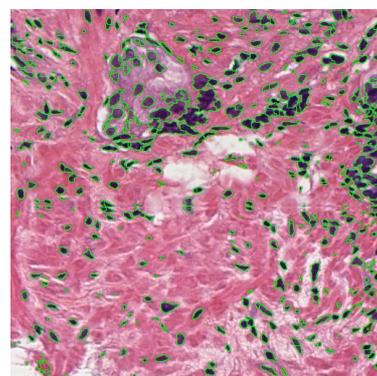
Imagen 9



Original

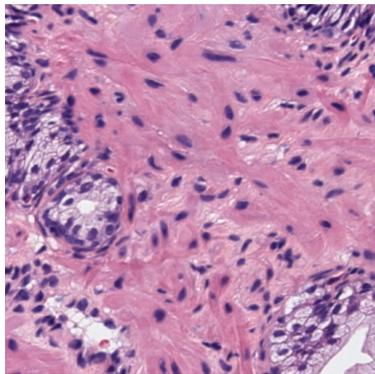


Ground truth

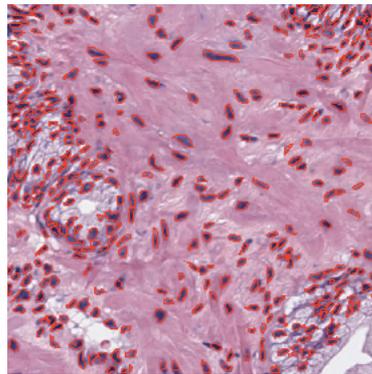


Segmentada

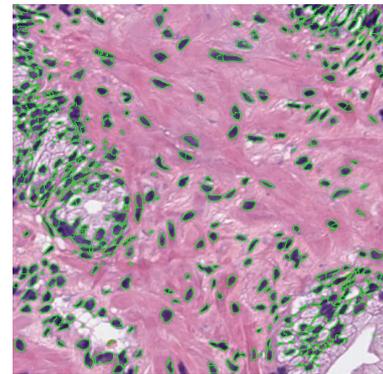
Imagen 10



Original



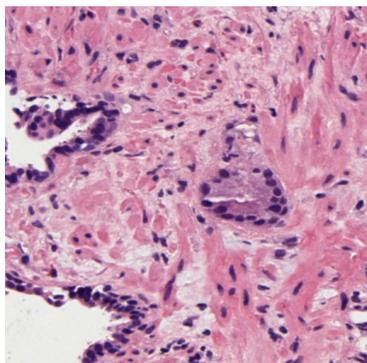
Ground truth



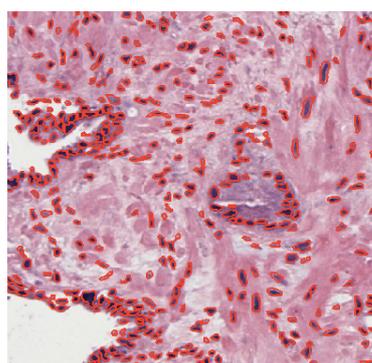
Segmentada

***Segmentación Watershed. Función Geodistancia.***

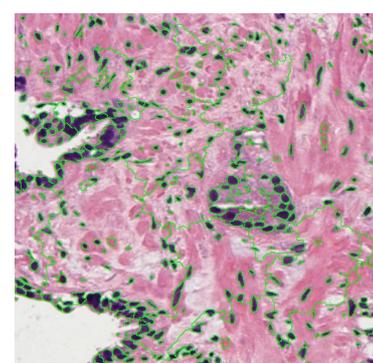
Imagen 1



Original

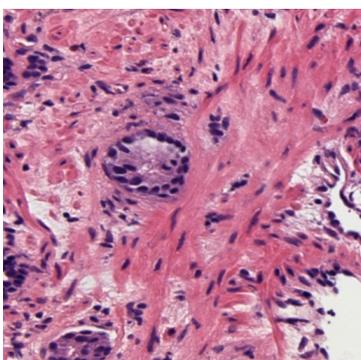


Ground truth

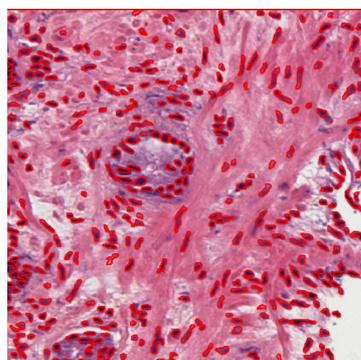


Segmentada

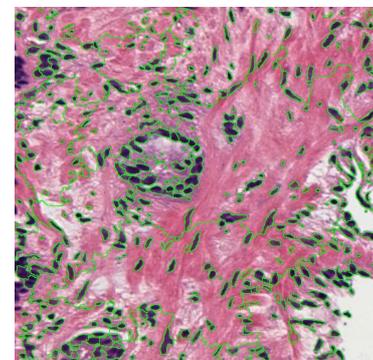
Imagen 2



Original

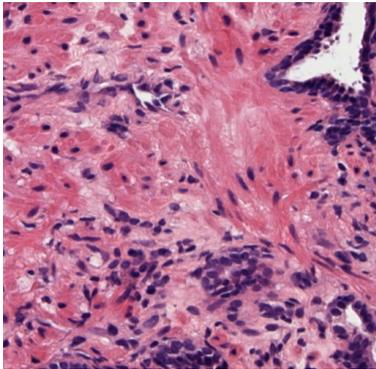


Ground truth

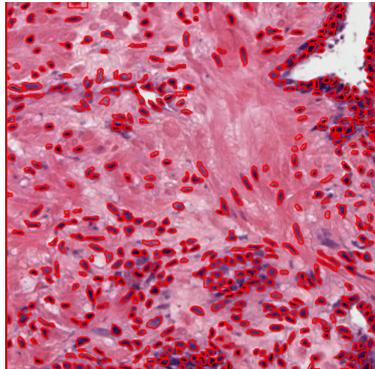


Segmentada

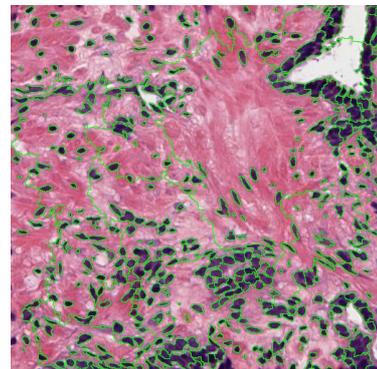
Imagen 3



Original

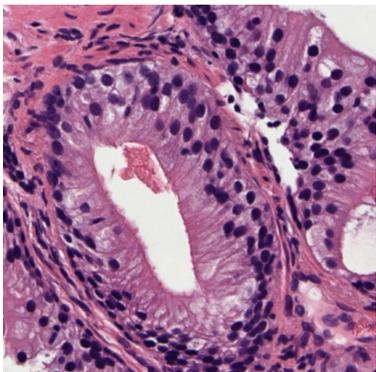


Ground truth

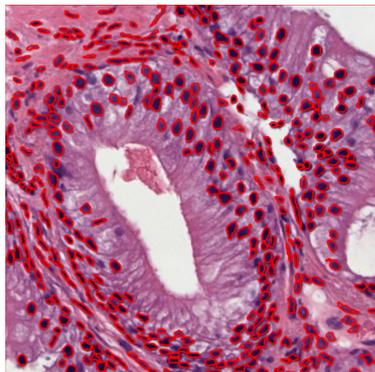


Segmentada

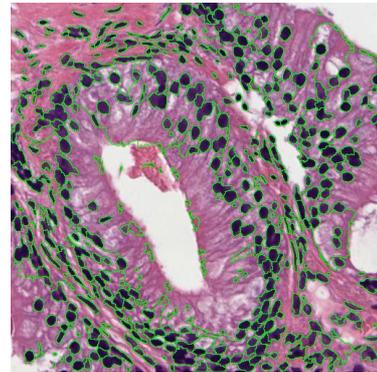
Imagen 4



Original

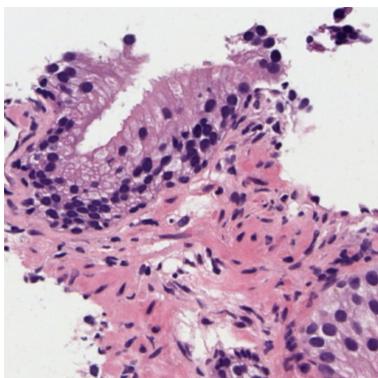


Ground truth

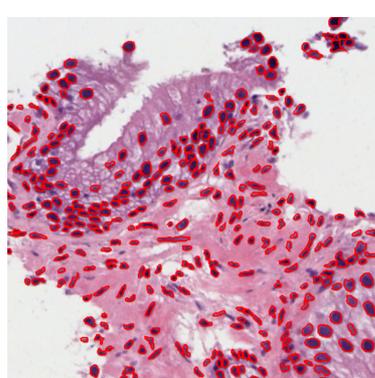


Segmentada

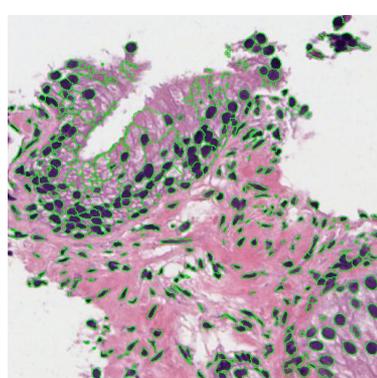
Imagen 5



Original

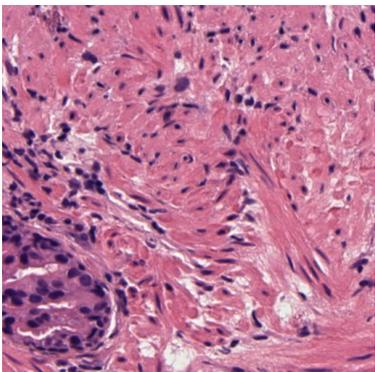


Ground truth

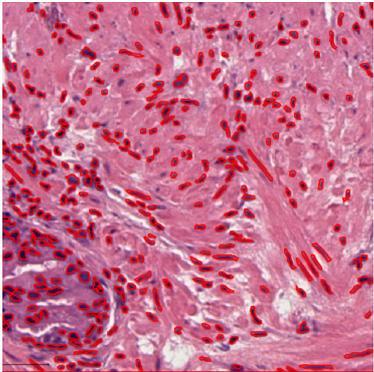


Segmentada

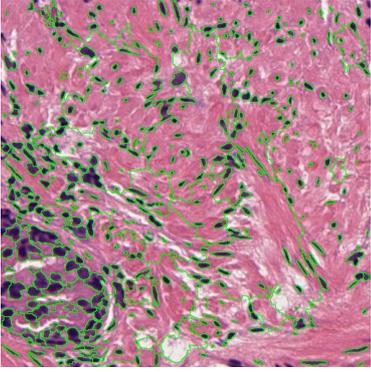
Imagen 6



Original

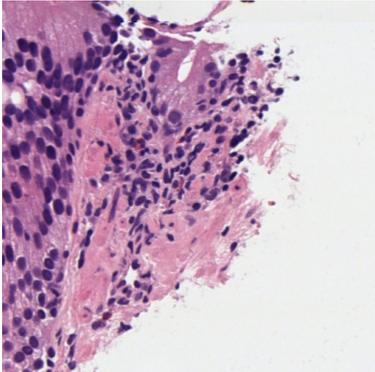


Ground truth

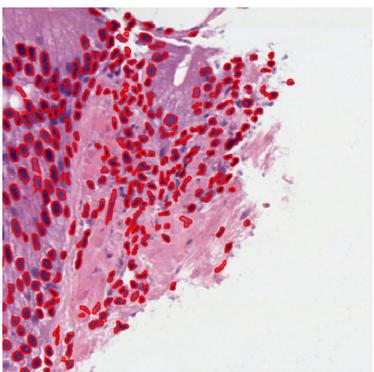


Segmentada

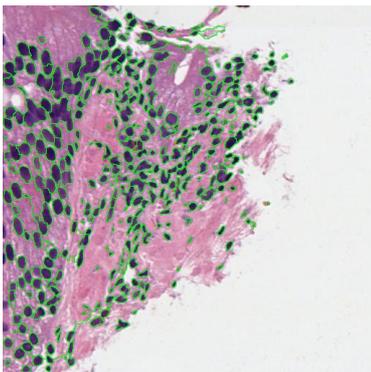
Imagen 7



Original

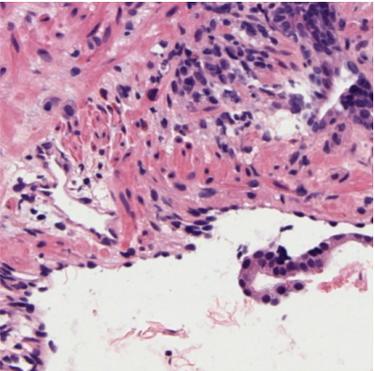


Ground truth

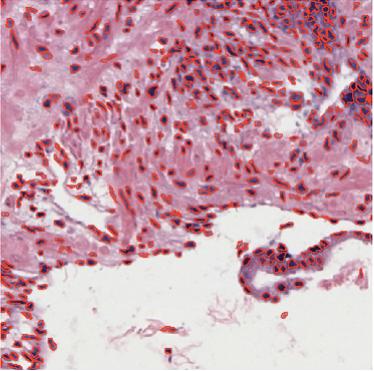


Segmentada

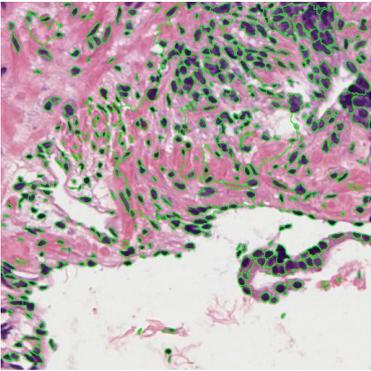
Imagen 8



Original

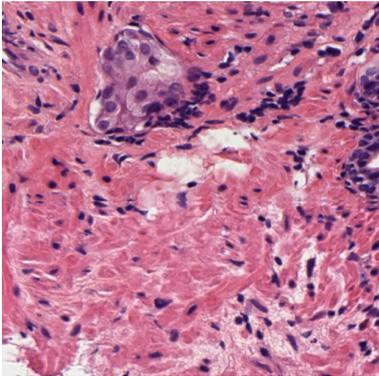


Ground truth

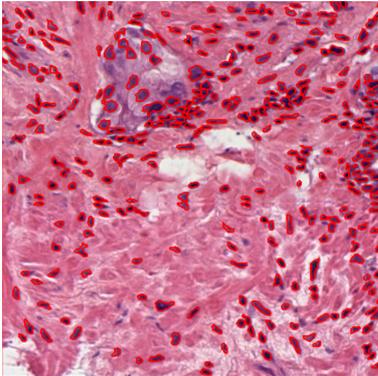


Segmentada

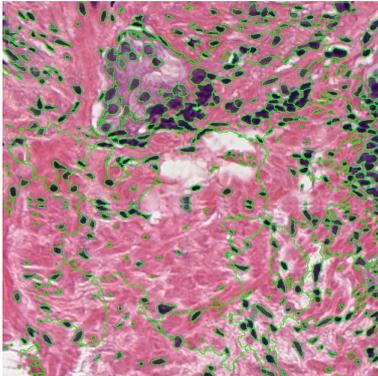
Imagen 9



Original

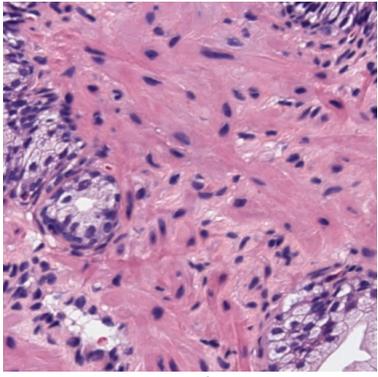


Ground truth

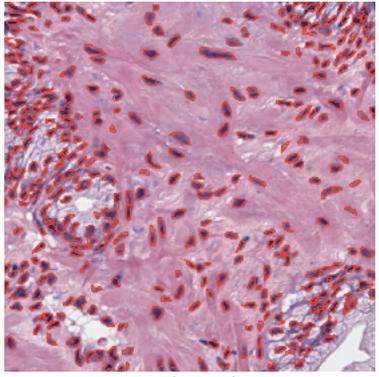


Segmentada

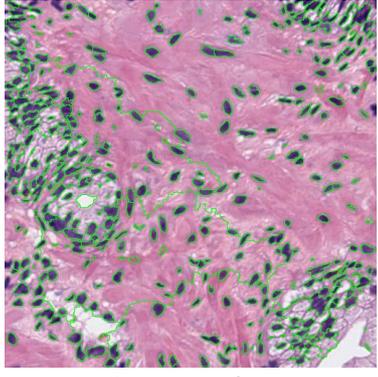
Imagen 10



Original



Ground truth

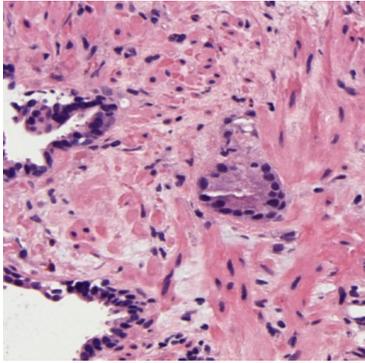


Segmentada

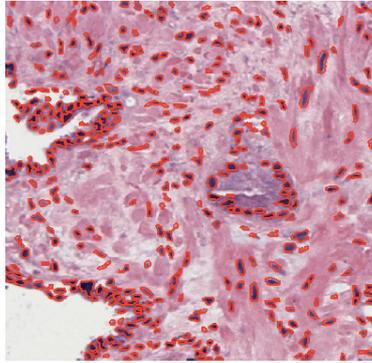
***Segmentación Watershed. Transformada de la simetría radial.***

En este método es posible ajustar el radio manualmente en la interfaz y se usaron distintos valores en las imágenes buscando los mejores resultados.

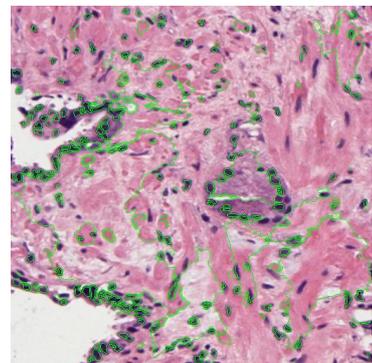
Imagen 1 (Radio 8)



Original

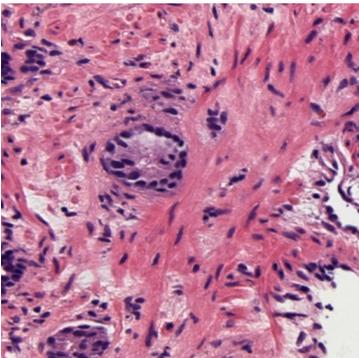


Ground truth

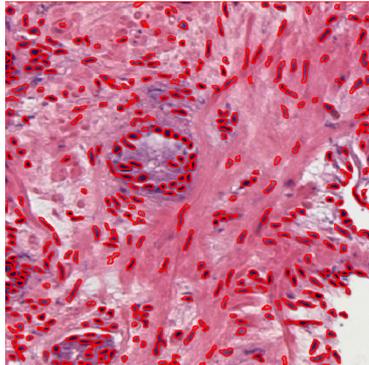


Segmentada

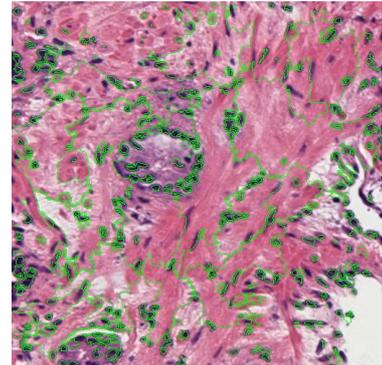
Imagen 2 (Radio 8)



Original

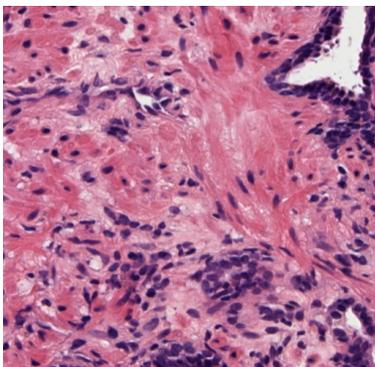


Ground truth

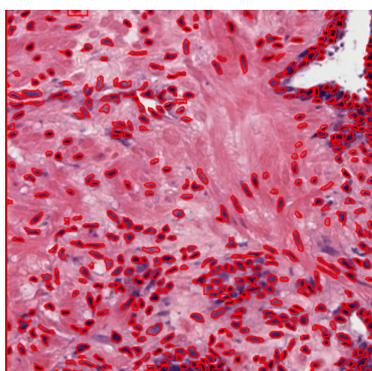


Segmentada

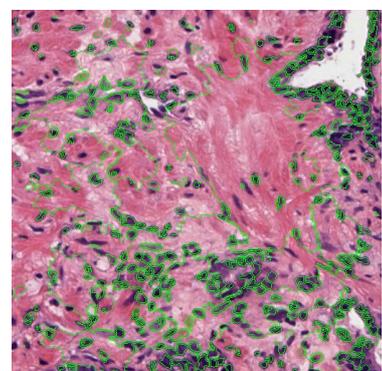
Imagen 3 (Radio 8)



Original

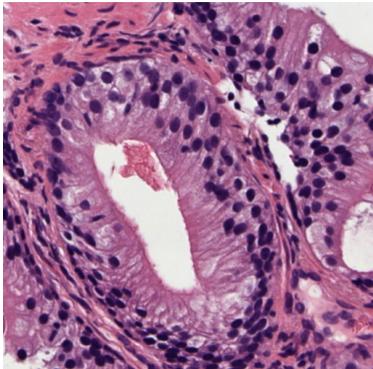


Ground truth

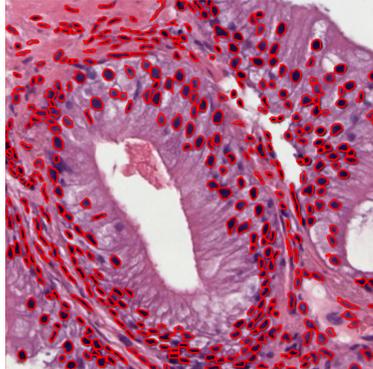


Segmentada

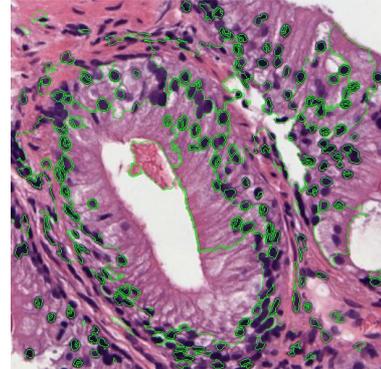
Imagen 4 (Radio 9)



Original

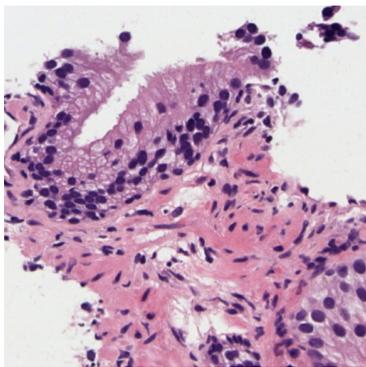


Ground truth

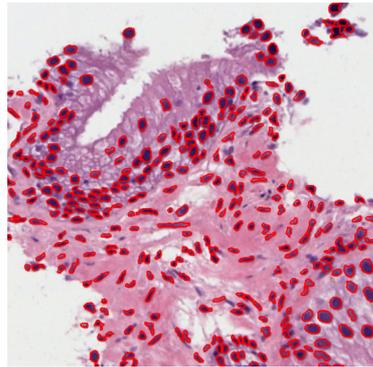


Segmentada

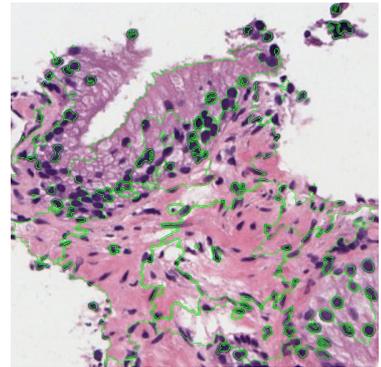
Imagen 5 (Radio 12)



Original

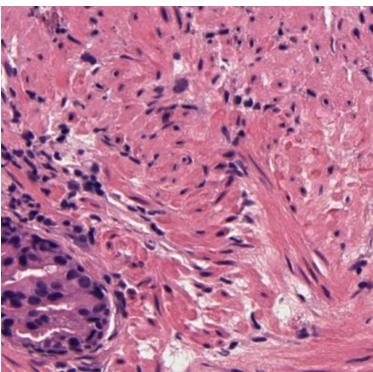


Ground truth

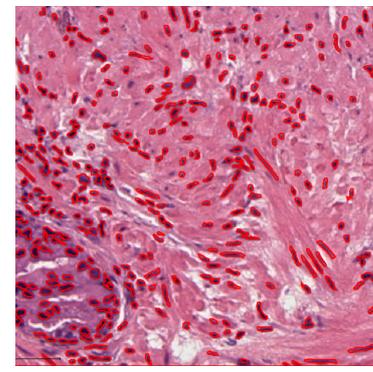


Segmentada

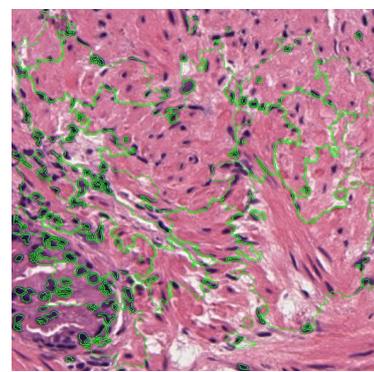
Imagen 6 (Radio 8)



Original

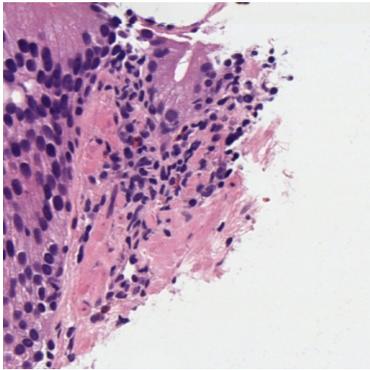


Ground truth

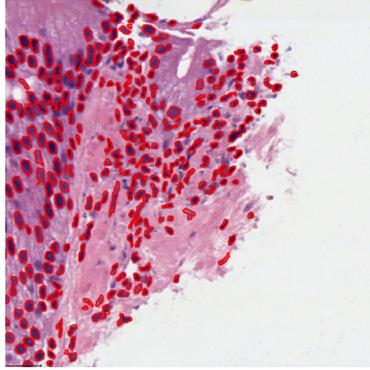


Segmentada

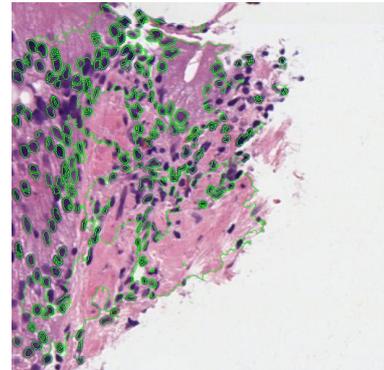
Imagen 7 (Radio 8)



Original

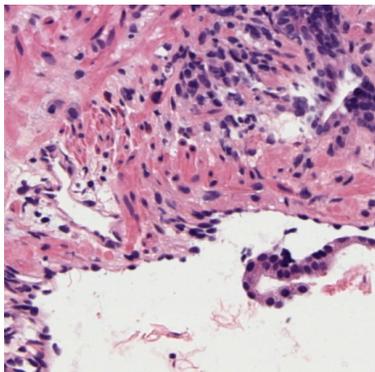


Ground truth

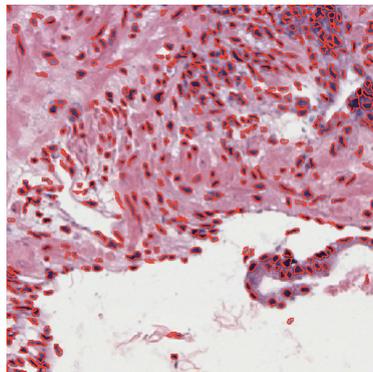


Segmentada

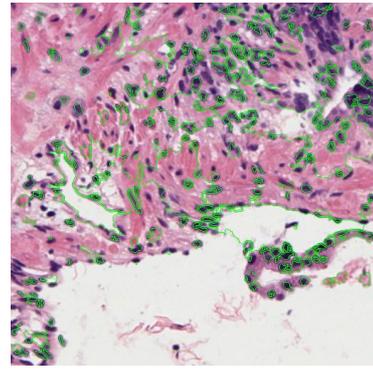
Imagen 8 (Radio 8)



Original

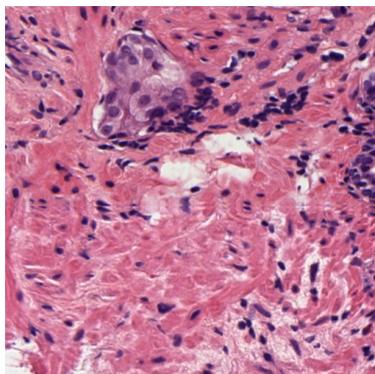


Ground truth

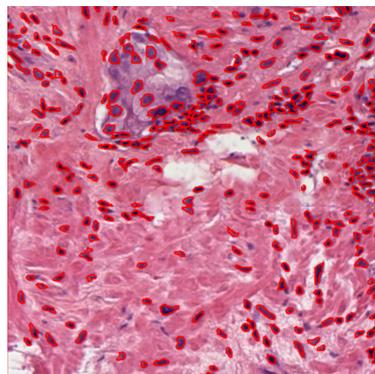


Segmentada

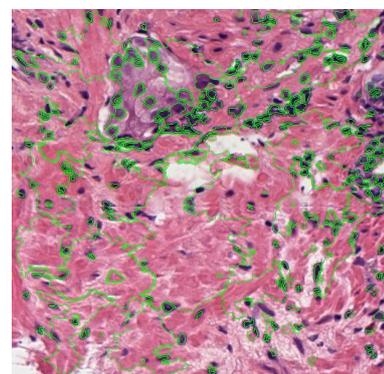
Imagen 9 (Radio 8)



Original

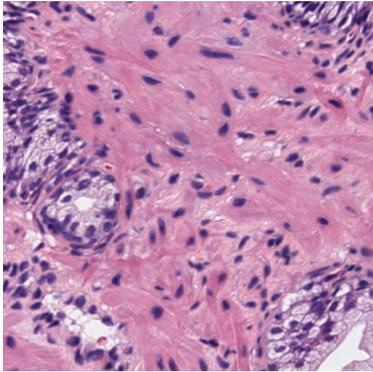


Ground truth

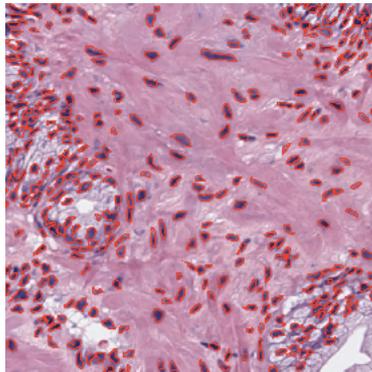


Segmentada

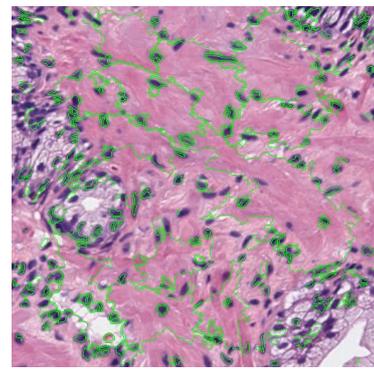
Imagen 10(Radio 8)



Original



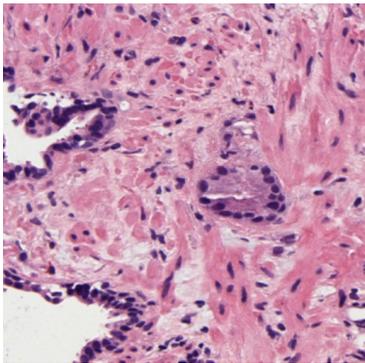
Ground truth



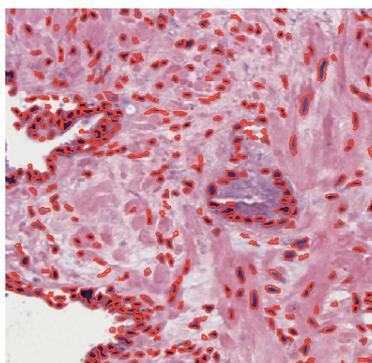
Segmentada

***Algoritmo K-means.***

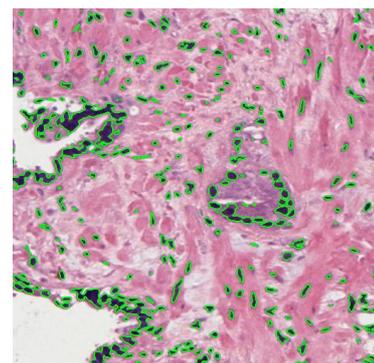
Imagen 1



Original

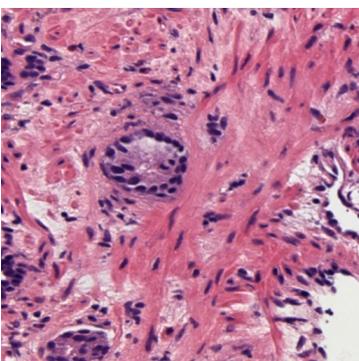


Ground truth

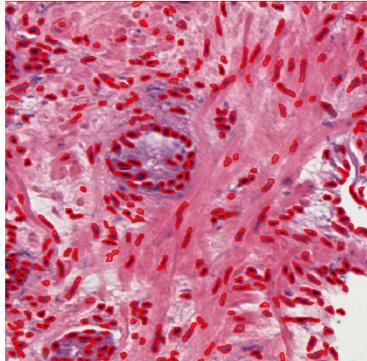


Segmentada

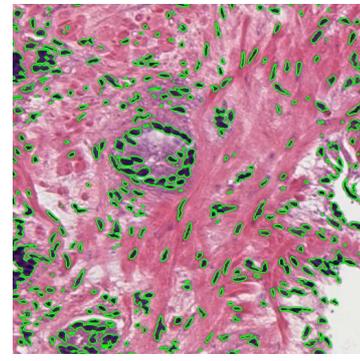
Imagen 2



Original

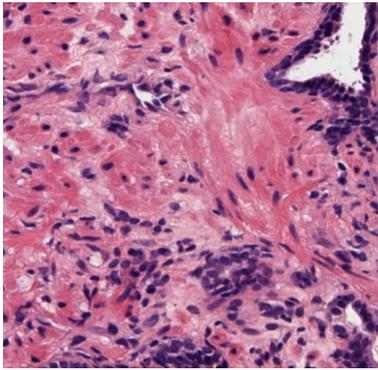


Ground truth

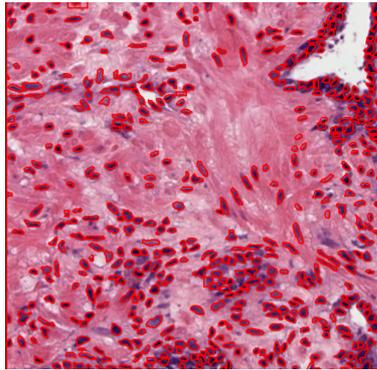


Segmentada

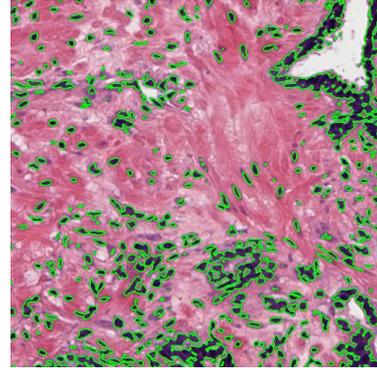
Imagen 3



Original

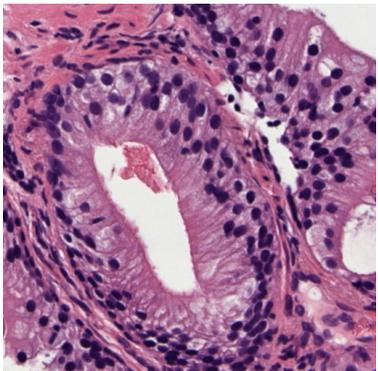


Ground truth

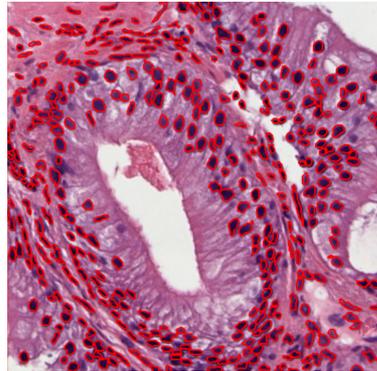


Segmentada

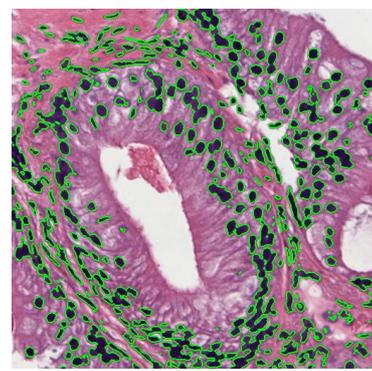
Imagen 4



Original

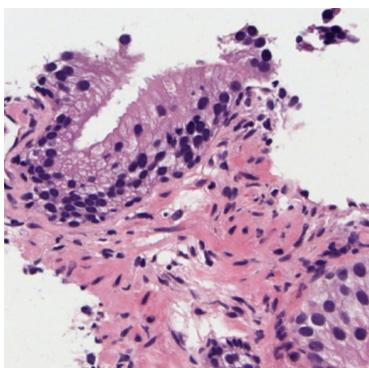


Ground truth

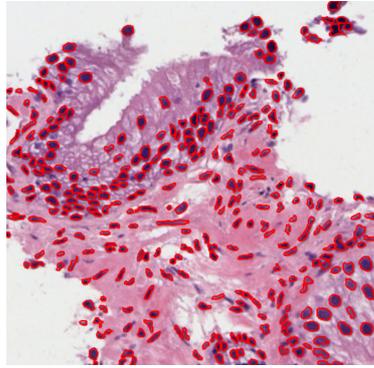


Segmentada

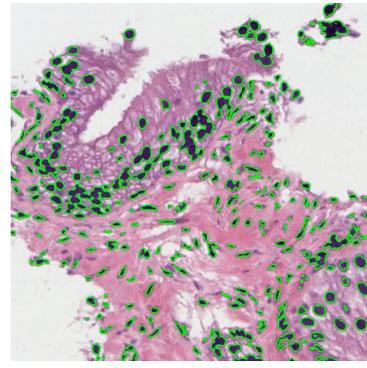
Imagen 5



Original

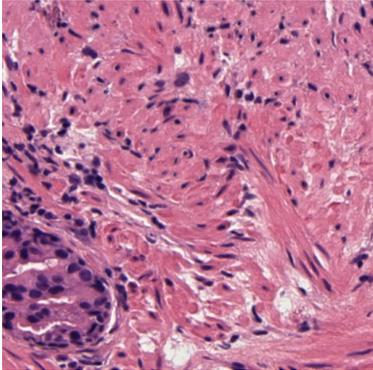


Ground truth

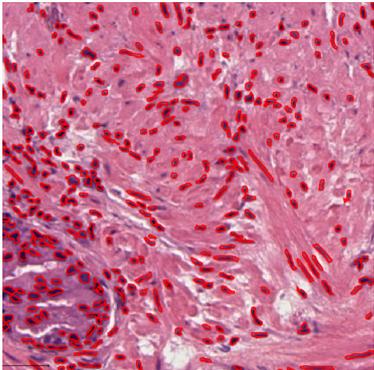


Segmentada

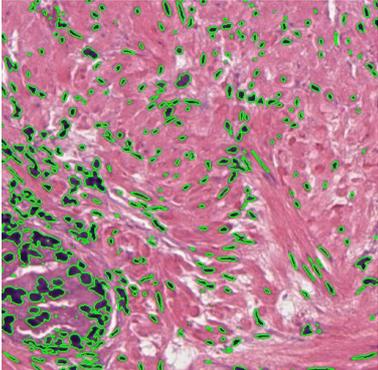
Imagen 6



Original

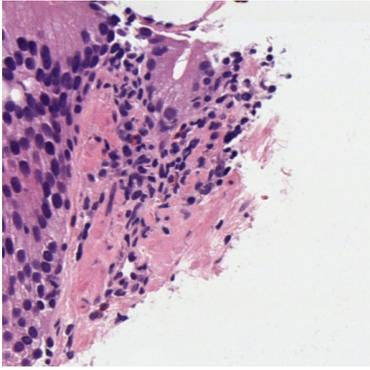


Ground truth

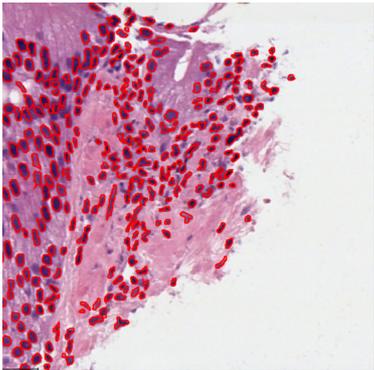


Segmentada

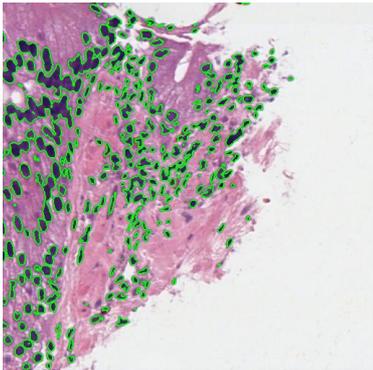
Imagen 7



Original

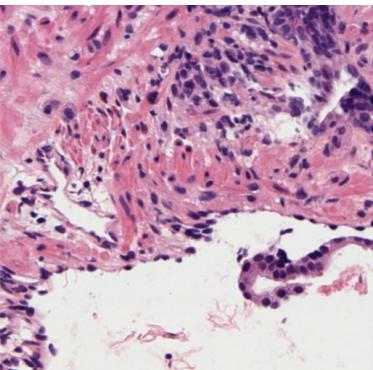


Ground truth

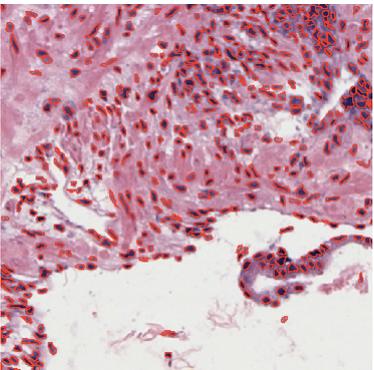


Segmentada

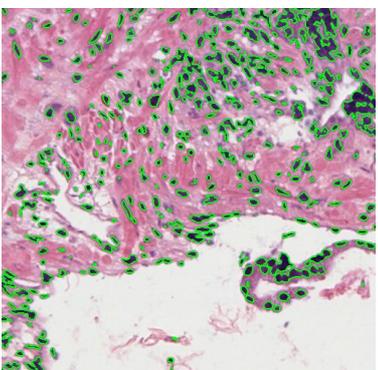
Imagen 8



Original

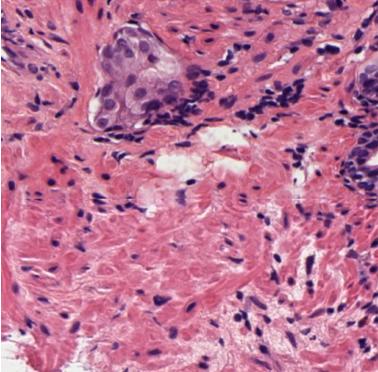


Ground truth

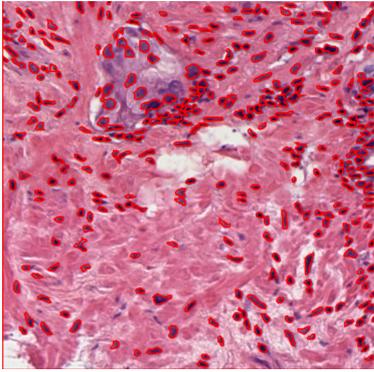


Segmentada

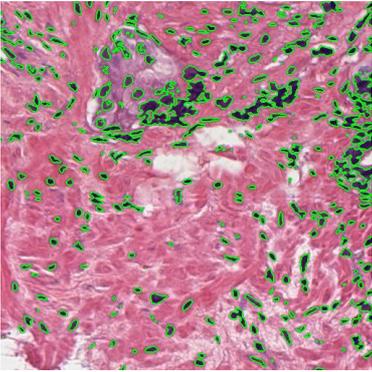
Imagen 9



Original

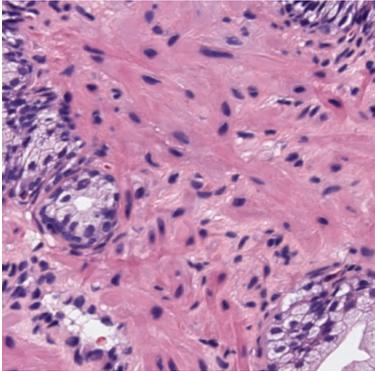


Ground truth

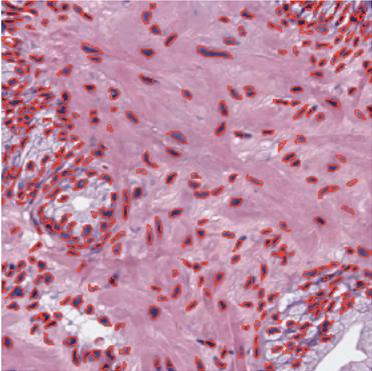


Segmentada

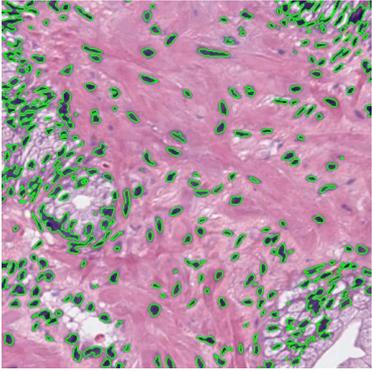
Imagen 10



Original



Ground truth

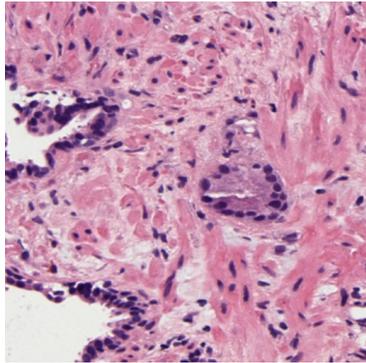


Segmentada

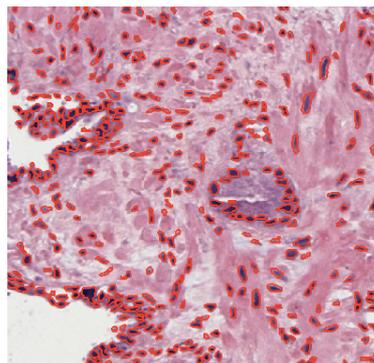
### ***Algoritmo Mean Shift.***

En la interfaz es posible ajustar la ventana de búsqueda (Bandwidth) para optimizar la segmentación. En la mayoría de estas imágenes, se dieron buenos resultados con un valor de 0.2. Sin embargo, en algunas se tuvo que cambiar dicho valor.

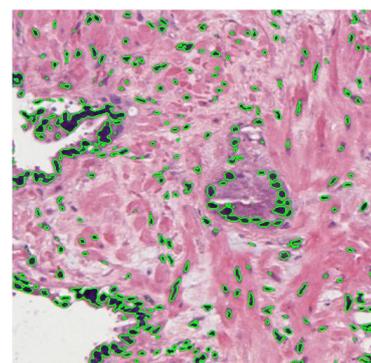
Imagen 1 (Bandwidth 0.1)



Original

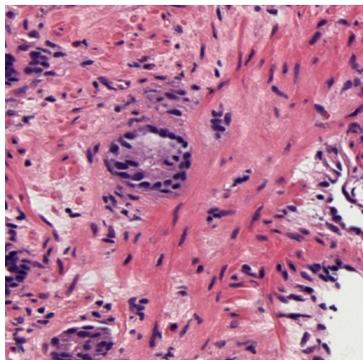


Ground truth

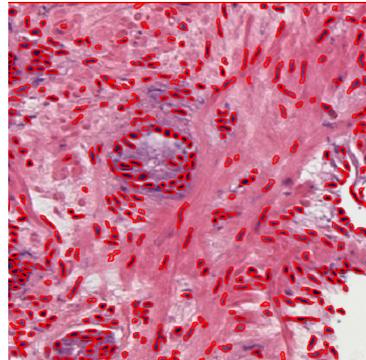


Segmentada

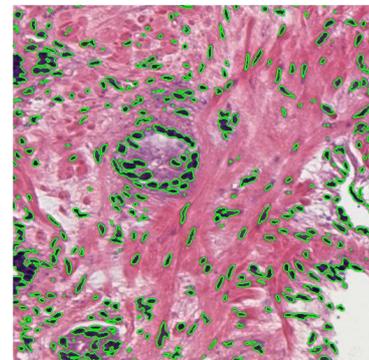
Imagen 2 (Bandwidth 0.1)



Original

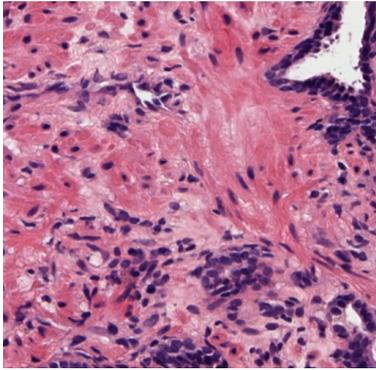


Ground truth

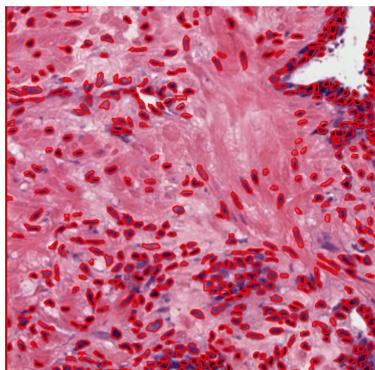


Segmentada

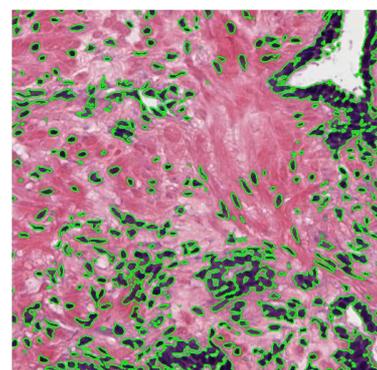
Imagen 3



Original

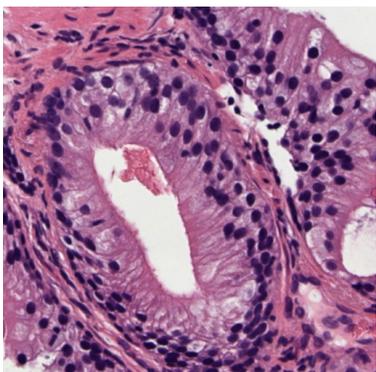


Ground truth

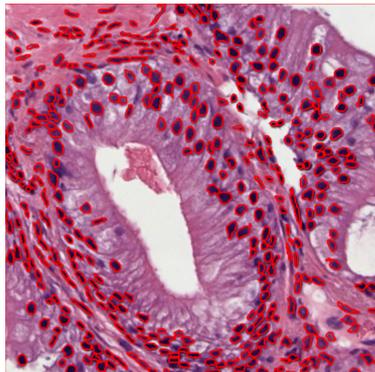


Segmentada

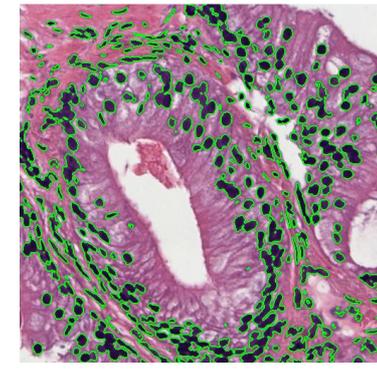
Imagen 4



Original

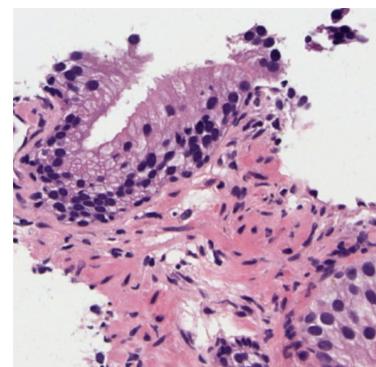


Ground truth

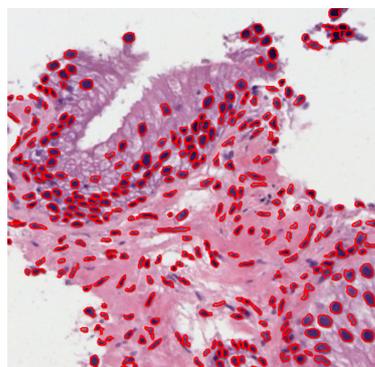


Segmentada

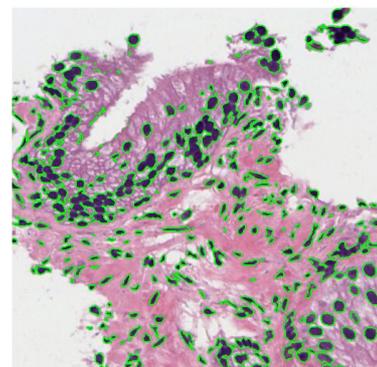
Imagen 5



Original

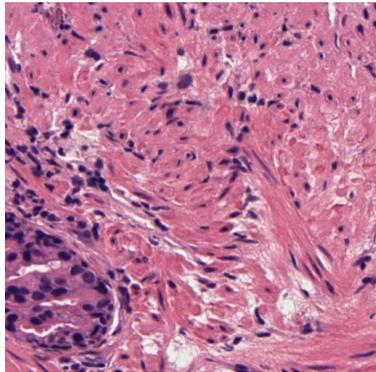


Ground truth

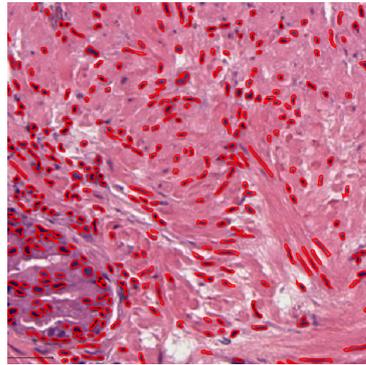


Segmentada

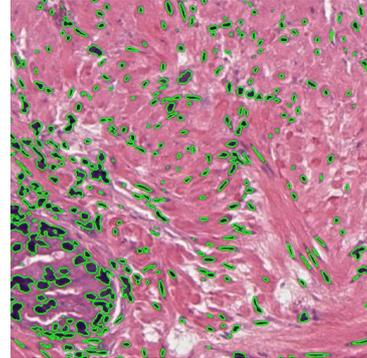
Imagen 6



Original

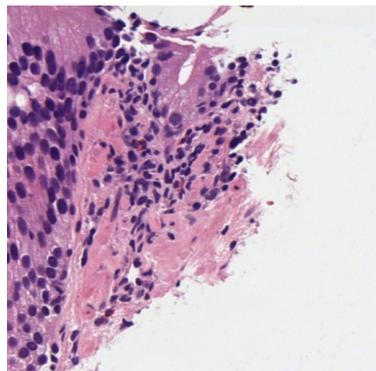


Ground truth

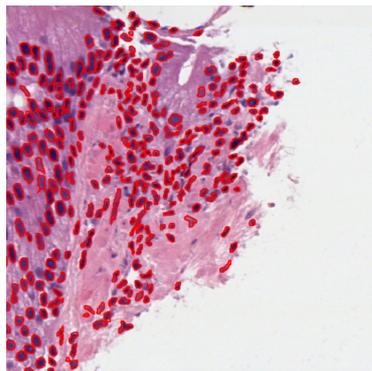


Segmentada

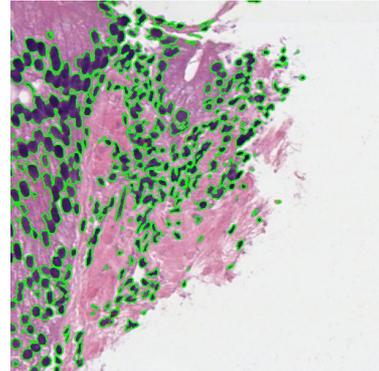
Imagen 7



Original

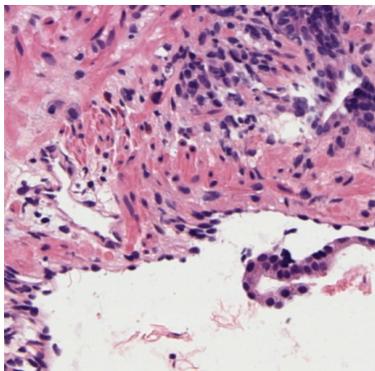


Ground truth

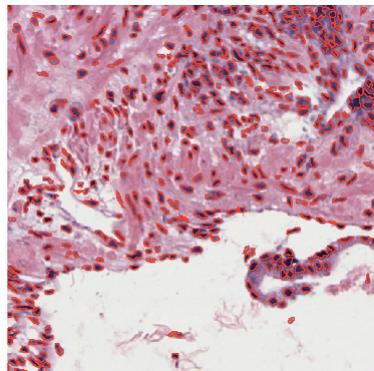


Segmentada

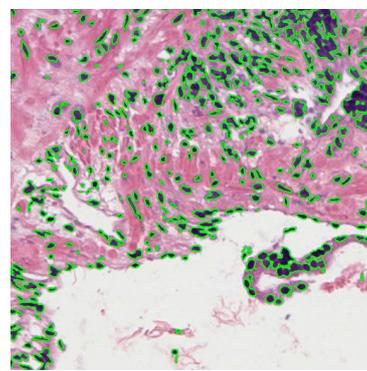
Imagen 8



Original

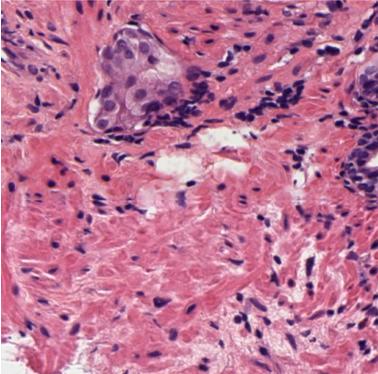


Ground truth

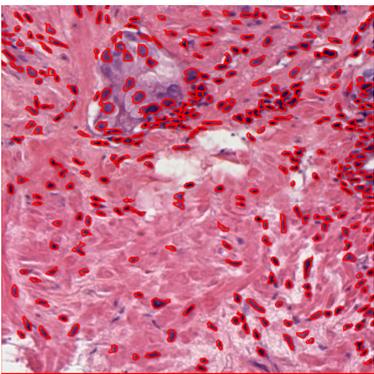


Segmentada

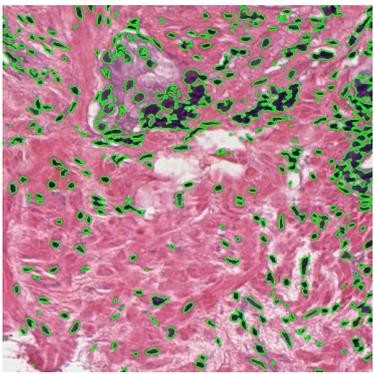
Imagen 9 (Bandwidth: 0.1)



Original

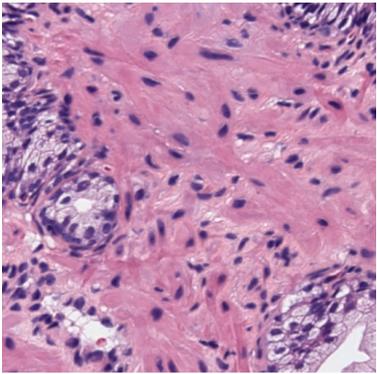


Ground truth

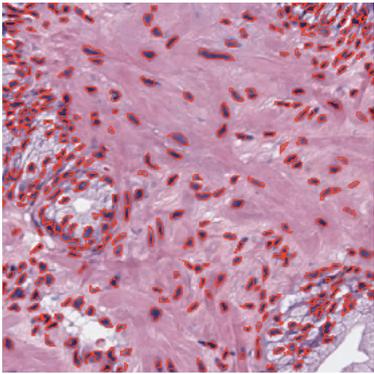


Segmentada

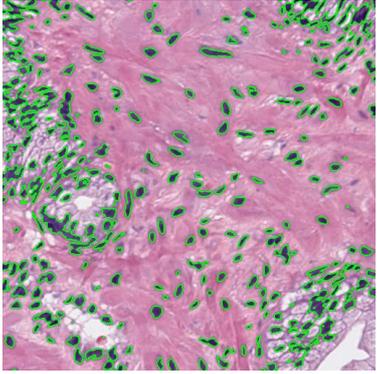
Imagen 10



Original



Ground truth

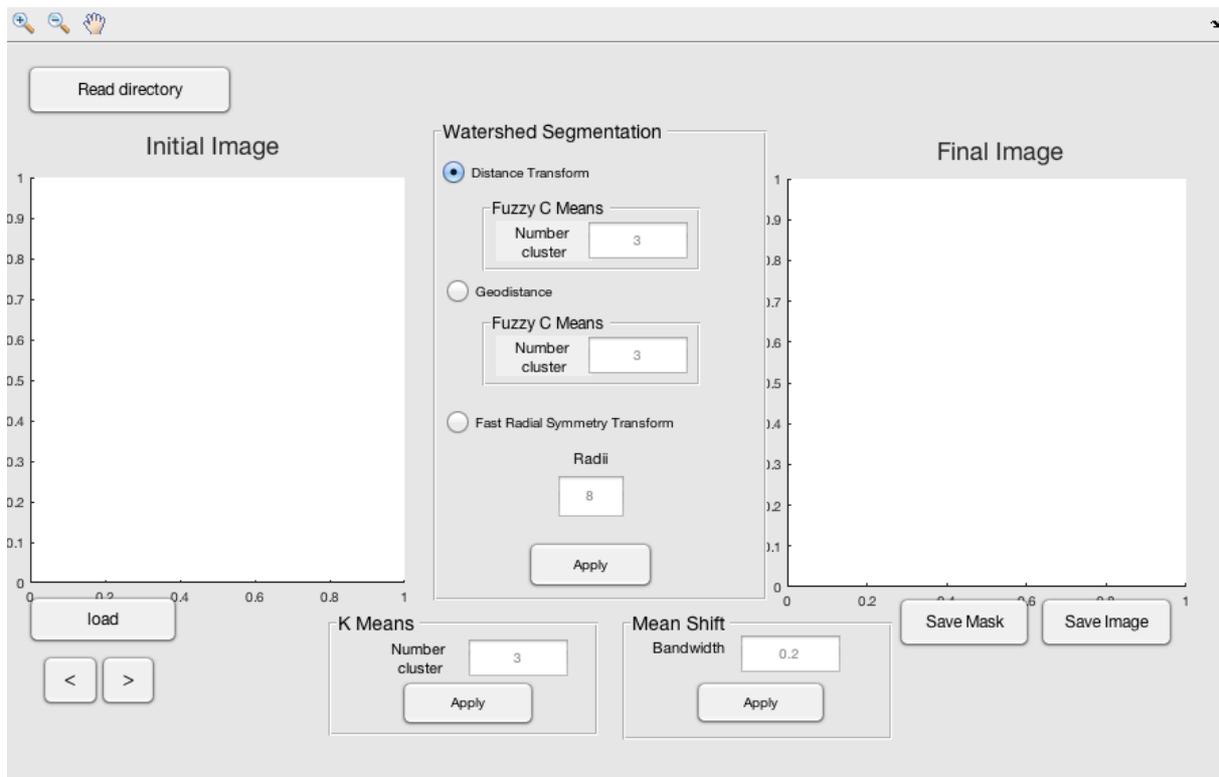


Segmentada

## ANEXO B. Manual de usuario de la interfaz gráfica.

En este manual de usuario se describe la forma de interactuar con la interfaz gráfica que se ha desarrollado con la ayuda de la herramienta *GUIDE*, en el entorno Matlab®. Esta permite generar una aplicación que reúne todos los programas y funciones incluidos en un solo archivo *.m*, de manera que, desde una misma ventana es posible realizar todas las ejecuciones que se quieran ofrecer al usuario.

La interfaz se ha diseñado con la finalidad de presentar una serie de métodos para realizar la segmentación de imágenes histológicas. Su presentación se ilustra en la siguiente figura:



La ventana presenta dos regiones, una para cargar la imagen original (“Initial Image”) y otra que mostrará el resultado final de la imagen tras la segmentación (“Final Image”). Se encuentra dividida principalmente en tres bloques, cada uno correspondiente a un tipo de segmentación: *Watershed*, *K means* y *Mean shift*. Cada método presenta la posibilidad de ajustar los parámetros que se consideran que pueden afectar al resultado final.

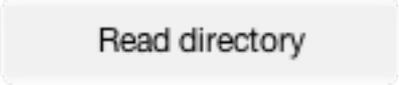
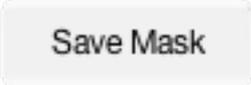
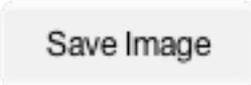
El bloque “Watershed segmentation” muestra tres opciones distintas de segmentado, usando la transformada de la distancia “Distance Transform”, la función geodistancia “Geodistance” y la transformada de la simetría radial “Fast Radial Symmetry Transform”.

Las dos primeras opciones permiten ajustar el número de clusters (“number cluster”) que se quiere utilizar para la implementación del algoritmo *Fuzzy c-means*, encargado de convertir la imagen a escala de grises. En esta aplicación, el número predeterminado de clusters es 3. Para la transformada de la simetría radial, es posible ajustar el tamaño del radio de los objetos de interés (“Radii”), se predetermina como 8 pero varía mucho de una imagen a otro.

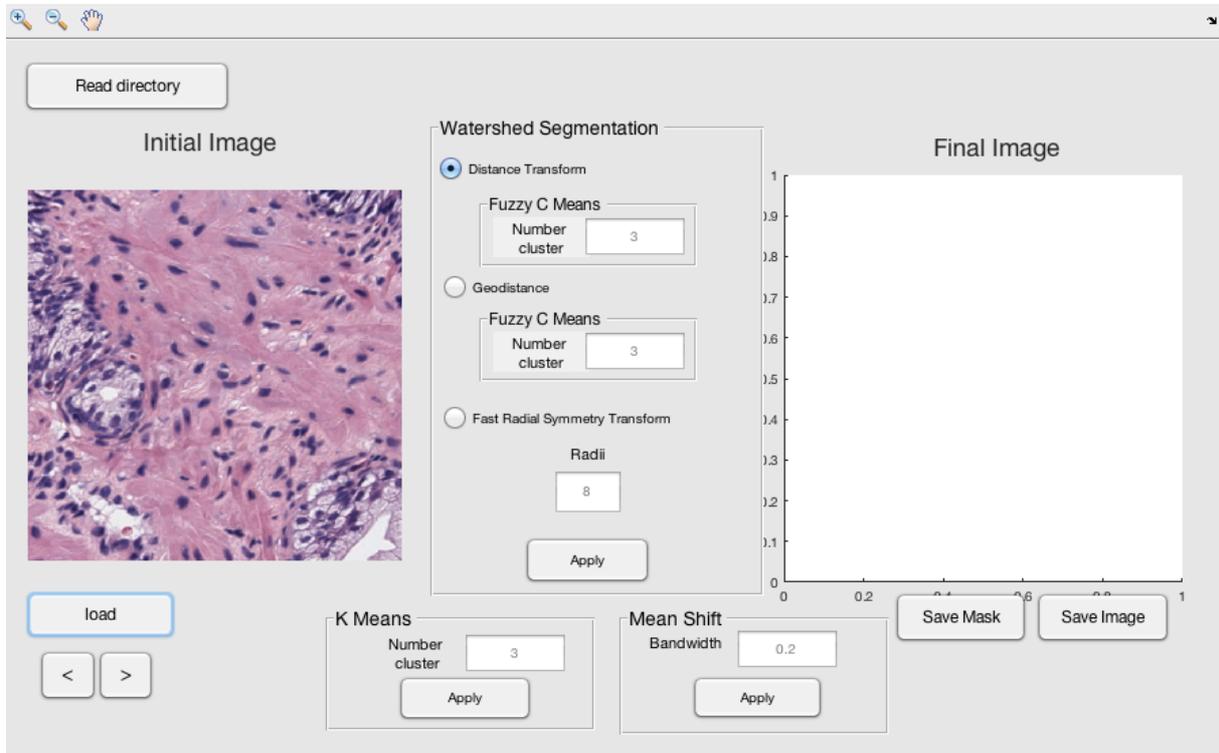
En el bloque dedicado a la segmentación *K-means*, el parámetro que se ajusta es el número de clases o clusters que se quiere emplear para la implementación de este mismo algoritmo. Al igual que con el *Fuzzy c-means*, se suele recurrir a un número de clases igual a 3.

Por último, para el algoritmo *Mean shift*, la ventana de búsqueda es el parámetro ajustable por el usuario, denominado *Bandwidth* en la aplicación. El valor predeterminado para este parámetro es de 0.2.

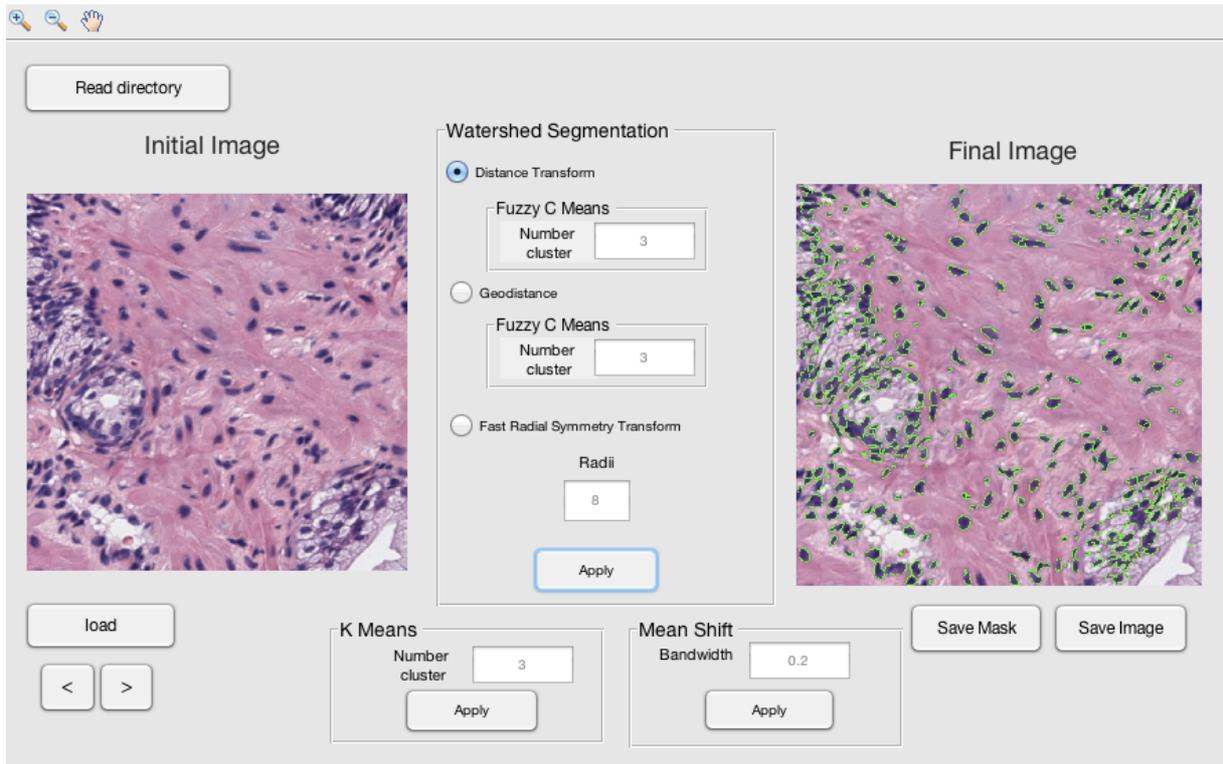
La ventana muestra una serie de botones cuyas funciones se detallan en la siguiente tabla:

BOTÓN	FUNCIÓN
	<i>Cargar una imagen</i>
	<i>Cargar un directorio de imágenes</i>
	<i>Recorrer el directorio hacia la derecha</i>
	<i>Recorrer el directorio hacia la izquierda</i>
	<i>Ejecutar el algoritmo de segmentación</i>
	<i>Guardar máscara</i>
	<i>Guardar imagen final segmentada</i>

Para realizar la segmentación sobre una imagen, en primer lugar se tiene que cargar y para ello utilizaremos el botón de *load* o *Read directory*, dependiendo de si se quiere segmentar solo una imagen o bien un directorio de imágenes. A continuación en el recuadro “Initial Image” se mostrará la imagen que se quiere segmentar:



Una vez cargada la imagen, se selecciona el método que se quiere implementar, en este caso se encuentra marcada la opción “Distance Transform”. Se presiona el botón *Apply* para ejecutar el algoritmo y automáticamente aparece la imagen final segmentada en el segundo recuadro.



A la izquierda en la parte superior de la interfaz se encuentran una serie de iconos a través de los cuales se puede interactuar con las imágenes:



*Ampliar la imagen*



*Reducir la imagen*



*Desplazarse por la imagen*

Finalmente, con los botones de *Save Mask* y *Save Image* es posible guardar la máscara binaria resultado de la segmentación y la segmentación superpuesta sobre la imagen original respectivamente. Utilizando estos botones, aparece una ventana que permite darle un nombre a la imagen y guardarla en la carpeta deseada.

## **ANEXO C. Publicaciones.**

El pasado mes de Mayo se envió una comunicación de congreso directamente relacionada con este trabajo Fin de Grado. Dicha comunicación ha sido aceptada para su presentación:

**Título:** *Detección de núcleos en imágenes histológicas de próstata.*

**Autores:** A. E. Esteban, V. Naranjo, F. Peñaranda, S. Morales, M. C. Ferrández y M. Ángeles Sales.

**Congreso:** XXXII Simposium Nacional de la Unión Científica Internacional de Radio.  
Sesión especial: Procesado de imagen para aplicaciones médicas.

**Lugar y Fecha:** 6-8 de Septiembre de 2017, Cartagena, España.



# Deteccción de núcleos en imágenes histológicas de próstata

A. E. Esteban<sup>(1)</sup>, V. Naranjo<sup>(1)</sup>, F. Peñaranda<sup>(1)</sup>, S. Morales<sup>(1)</sup>, M. C. Ferrández<sup>(1)</sup>, M. Ángeles Sales<sup>(2)</sup>  
{ngeesav, vnaranjo}@i3b.upv.es.

<sup>(1)</sup> Instituto de Investigación e Innovación en Bioingeniería, I3B, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, Valencia 46022, Spain.

<sup>(2)</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain.

**Abstract-** This paper proposes four methods for nuclei segmentation in histological images of prostate cancer. The images are obtained from scanned prostate biopsies of x40 zoom. Regions of interest of 512x512 pixels were extracted at maximum resolution to be processed. The first method segments the image using a KMeans classifier. The other three methods makes use of marker-controlled watershed. They basically differ in how the markers are obtained. In addition, quantitative results are provided to determine the goodness of each method by comparing with a ground truth obtained from QuPath platform. The best method is the marker-controlled watershed based on geodistance to choose the markers, which obtains an average sensitivity and predictive positive value of 0,9291.

## I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes entre los varones. En 2014 se diagnosticaron 32.641 nuevos casos en España, alrededor del 75% de los pacientes eran mayores de 65 años, con un riesgo del 30% de padecer este tipo de cáncer en varones mayores de 50 años, según la asociación española contra el cáncer. Según datos de 2015 del Instituto de Salud Carlos III, es la tercera causa de mortalidad en España en cuanto cáncer en los hombres se refiere.

La mayoría de los cánceres de próstata se detectan mediante la búsqueda de biomarcadores específicos en sangre (Antígeno Prostático Específico, PSA) o examen rectal (DRE). Sin embargo, la biopsia de próstata es a día de hoy la prueba más determinante para el diagnóstico del cáncer de próstata.

Con la aparición de la tecnología WSI (Whole-Slide Image), las muestras histológicas se digitalizan para favorecer su estudio por parte de los patólogos. Y es, bajo esta circunstancia, cuando aparece la motivación de facilitar el diagnóstico a los profesionales sanitarios mediante el procesado automático de estas imágenes.

A la hora de determinar la existencia de cáncer y su grado, la histología intenta determinar la estructura intrínseca del tejido: glándulas (tamaño de la glándula, tamaño del lumen, forma, agrupamientos, ...) y núcleos (dónde se encuentran, densidad en cada una de las partes del tejido, etcétera).

La segmentación de las glándulas y la obtención de sus características ha promovido diversos estudios. Estos estudios siguen tres líneas diferenciadas: el uso del método *level-sets* [1-3], el crecimiento de regiones [4,5] y el de

asociación núcleos-lumen [6]. Pero ya sea por un método u otro, es imprescindible la segmentación de núcleos.

Así pues, en este trabajo se proponen varios métodos para la segmentación de los núcleos presentes en las imágenes histológicas. Posteriormente se validarán y compararán los distintos procedimientos para poder concluir con cuál se obtienen mejores resultados y de esta forma emplearlo en posteriores estudios con el objetivo de ayudar en el diagnóstico.

## II. METODOLOGÍA

Para el presente trabajo se han empleado imágenes con unas dimensiones del orden de millones de píxeles y con un tamaño de almacenamiento que va desde 300MB hasta varias decenas de GB. Es por esto por lo que se han extraído regiones de interés más pequeñas y de fácil tratamiento, siendo el tamaño escogido de 512x512 píxeles sobre un zoom óptico de 40 aumentos (x40).

Estas muestras han sido preparadas por el patólogo empleando una tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para poder aumentar el contraste y poder diferenciar las distintas estructuras presentes en los tejidos.

La Hematoxilina reacciona con las histonas de los núcleos haciendo que estos se tiñan de azul mientras que la Eosina se utiliza como contratinción, tiñendo el resto de estructuras de tonos que varían desde anaranjados y rojos hasta rosas y púrpuras [7].

En los siguientes apartados se explican los métodos empleados para la segmentación de núcleos. Se dividen en dos grupos: en el primero de ellos se emplea un clasificador Kmeans; en el segundo se emplea la transformada watershed con marcadores sobre la imagen de gradiente escogiendo tres tipos de marcadores distintos como semillas.

Al final de este apartado, cuando se haya explicado todos los métodos, se mostrarán los resultados obtenidos de una misma imagen para cada uno de los métodos en la Figura 4.

### A. Clasificador K-Means

Antes de emplear el clasificador Kmeans se realiza un preprocesado de la imagen. En nuestro caso, se estudiará este método realizando dos preprocesados distintos.

Los dos preprocesados que se realizan son: la transformación de la imagen RGB al espacio de color Lab (Figura 1.b) y la deconvolución de color determinada para imágenes HE [8] (Figura 1.c).

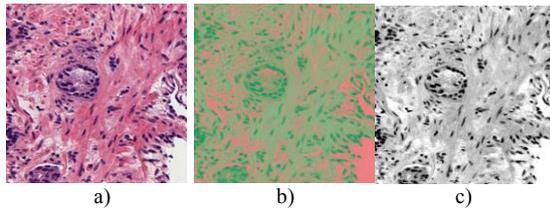


Fig. 1. Pre-procesado. Imagen Original (a). Imagen en el espacio de color Lab - Valores de las componentes a y b (b). Deconvolución de color - canal H (Hematoxilina) (c).

Una vez preprocesada la imagen, se realiza la clusterización con el método "KMeans" [9], siendo éste un método iterativo que permite asignar a cada observación el clúster que se encuentra más próximo en términos del centroide (media). Para el caso de la deconvolución, la imagen de grises que se clusteriza es la componente de Hematoxilina (H). En cambio, si se ha realizado la transformación al espacio de color Lab, las características usadas para clasificar son las componentes 'a' y 'b' (que son las dos capas de crominancia que indican el color característico) proporcionados por dicha transformación.

Seguidamente se realiza el clustering para 4 grupos ( $K = 4$ ) escogiendo el clúster correspondiente a los tonos azules de mayor valor (los núcleos tienen esta tonalidad), siendo éste el resultado final.

### B. Transformada Watershed con marcadores

La transformada watershed es una técnica de segmentación para imágenes de grises [10]. Es un algoritmo muy eficaz siempre que los mínimos de la imagen representen los objetos de interés y los máximos sean las fronteras de separación entre objetos. Por eso la imagen de entrada a este método suele ser una imagen gradiente.

Pero la transformada watershed clásica presenta el inconveniente de la sobresegmentación debido a la existencia de numerosos mínimos locales. Es por ello que se usa la transformada watershed con marcadores.

Para el empleo de esta técnica se usan semillas a partir de las cuales se genera la denominada inundación, sustituyendo estas semillas a los mínimos de la imagen. En la Figura 3 se puede observar un ejemplo de generación de semillas para una misma imagen a evaluar empleando los tres métodos diferentes para la selección de marcadores.

Así pues, se detallan tres métodos, los cuales hacen uso de la transformada watershed con marcadores, pero difieren en los marcadores usados, originando resultados distintos que se evaluarán en el siguiente apartado.

Una vez seleccionados los marcadores, por uno de los tres métodos, se aplica la transformada watershed sobre la imagen gradiente de la componente Hematoxilina (H) de la imagen original.

#### 1. Watershed con transformada distancia

Se aplica la deconvolución de color a la imagen histológica y se procede a ejecutar el método Kmeans sobre la componente H, obteniendo la máscara perteneciente a las tonalidades azules como se ha indicado en el procedimiento anterior.

A continuación, se emplea la transformada de la distancia que trabaja asignando a cada píxel el valor de la distancia al borde más cercano (al píxel negro más cercano). Al aplicar la

transformada sobre una imagen se crea un mapa de distancia en el que los centroides de los núcleos o células corresponden con los picos o máximos locales [11]. Aunque existen distintas métricas que se utilizan para calcular esta distancia, en este trabajo se usa la distancia euclídea.

#### 2. Watershed con Geodistancia

En este procedimiento, la componente de Hematoxilina (H) se clusteriza usando "Fuzzy c-means" [12]. Esta técnica de agrupamiento permite indicar para cada elemento el grado de pertenencia a un clúster o a otro, pudiendo representarlo con una imagen en escala de grises como se muestra en la Figura 2. Es también denominado agrupamiento borroso.

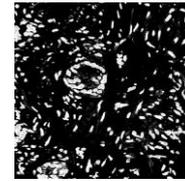


Fig. 2. Clustering.

A continuación se obtienen las semillas realizando la suma acumulativa de la distancia para valores mayores que el valor del píxel, siendo el elemento actual un valor calculado de manera iterativa aditiva entre los valores mínimos y máximos de la imagen resultante del clustering, según el siguiente algoritmo:

---

#### Algorithm: Geodistance

---

**Data:** Image deconvolution clustered,  $im_{in}$

**Result:** Image Geodistance,  $im_{out}$

initialization:

$b \leftarrow \max(im_{in});$

$a \leftarrow \min(im_{in});$

geodistance:

**for**  $k \leftarrow a$  **to**  $b$  **do**

$im_{out} \leftarrow im_{out} + \text{dist}(im_{in} \geq k);$

**end**

---

#### 3. Watershed con fast radial symmetry

En este proceso se utiliza la transformada de la simetría radial, siendo un operador basado en el gradiente capaz de detectar puntos que presentan una simetría radial elevada [13]. Dado que los núcleos pueden considerarse como objetos simétricamente radiales, este algoritmo es bastante adecuado para su localización.

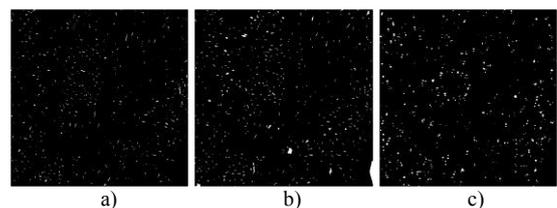
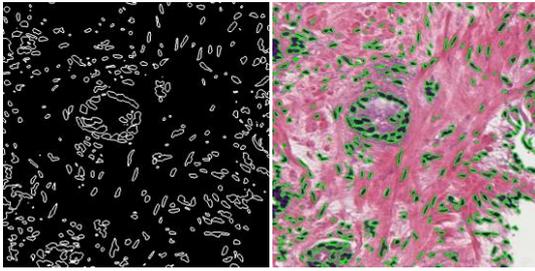


Fig. 3. Semillas generadas. Transformada de la distancia (a). Geodistancia (b). Fast radial symmetry(c).

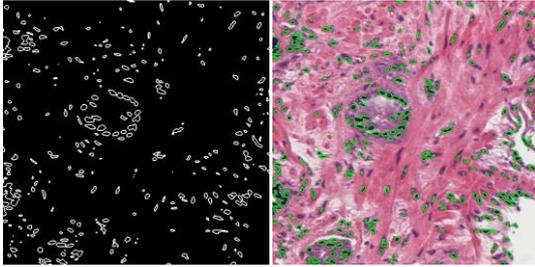
## RESULTADOS

En la siguiente figura se muestran los resultados de los diferentes métodos presentados sobre una misma imagen:

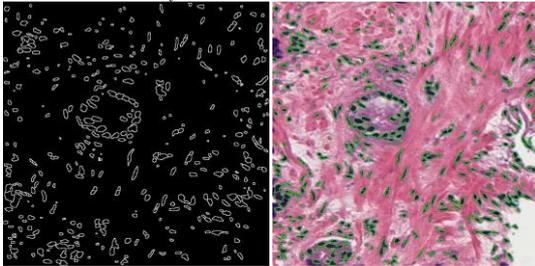
- *Kmeans Lab:*



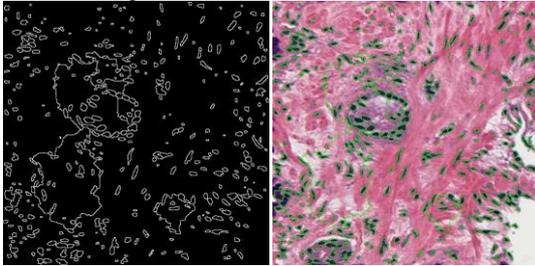
- *Kmeans deconvolucion color:*



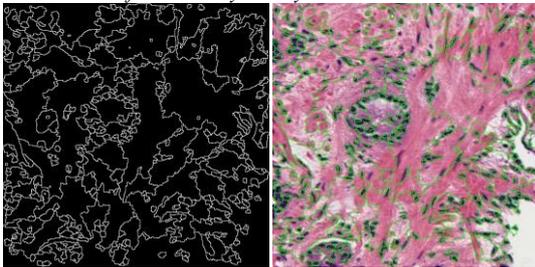
- *Watershed con transformada distancia:*



- *Watershed con geodistancia:*



- *Watershed con fast radial symmetry:*



a)

b)

Fig. 4. Resultado de los métodos. Máscara de la segmentación (a). Imagen segmentada (b).

Para poder estudiar la bondad de los resultados se ha generado un “ground truth” de 5 imágenes con la ayuda del software de uso libre “QuPath v0.1.2” (<https://qupath.github.io/>). Con este software se realiza una primera segmentación y, a continuación, con las herramientas que dispone se modifica manualmente hasta obtener una segmentación exacta de cada una de las imágenes.

De esta manera, para poder comparar los métodos se obtienen los valores de TPR (true positive rate o sensibilidad) y de PPV (positive predictive value) de cada imagen para los distintos métodos explicados.

TPR hace referencia a la capacidad de la prueba para realizar las detecciones correctamente. Y PPV indica la proporción de los resultados positivos que son verdaderamente positivos. Y para obtenerlos es necesario conocer los valores de TP (True Positive), FN (False Negative) y FP (False Positive). Obteniéndose de la siguiente manera:

$$TPR = TP / (TP + FN)$$

$$PPV = TP / (TP + FP)$$

Como se puede ver en la Tabla I, el método de KMeans con la transformada al espacio de color Lab es el que mejores resultados obtiene en cuanto a TPR (0.9690).

Cabe resaltar los casos de las imágenes 3 y 4 para el método “watershed fast radial symmetry”. En estos casos, el valor de TPR es muy bajo debido a la deficiente generación de las semillas.

TABLA I  
True Positive Rate (TPR)

	KmeansDeconv	KmeansLab	W_TransDistance	W_Geodistance	W_FastaRadial
Imagen 1	0,8589	0,9878	0,9642	0,9748	0,9739
Imagen 2	0,6584	0,8747	0,8575	0,9080	0,8747
Imagen 3	0,9360	0,9968	0,9671	0,9705	0,3790
Imagen 4	0,8873	0,9929	0,9822	0,9858	0,0310
Imagen 5	0,7487	0,9928	0,9570	0,9558	0,9628
Media	0,8179	0,9690	0,9456	0,9590	0,6443
Desviación	0,1007	0,0472	0,0448	0,0272	0,3767

No obstante, “watershed fast radial symmetry” proporciona los mejores resultados de precisión (PPV), llegando a obtener resultados del 100% y logrando un valor medio de 0.9855, como se puede observar en la Tabla II. Esto muestra la calidad de la respuesta del método, indicando que las segmentaciones realizadas, ya sean muchas o pocas, se corresponden en gran medida a las establecidas en el ground truth.

TABLA II  
Positive Predictive Rate (PPV)

	KmeansDeconv	KmeansLab	W_TransDistance	W_Geodistance	W_FastaRadial
Imagen 1	0,9061	0,8223	0,8777	0,8757	1,0000
Imagen 2	0,9637	0,9373	0,9485	0,9547	0,9373
Imagen 3	0,9388	0,8564	0,8874	0,8862	1,0000
Imagen 4	0,9078	0,9094	0,8846	0,8711	1,0000
Imagen 5	0,9077	0,8996	0,9212	0,9084	0,9904
Media	0,9248	0,8850	0,9039	0,8992	0,9855
Desviación	0,0230	0,0407	0,0269	0,0306	0,0244

Además, en la Tabla III se muestra el resultado de la media de los valores medios de TPR y PPV de cada método, que se usa para determinar qué método obtiene unos resultados más balanceados en base a los dos parámetros calculados. Como se puede observar, el método que mejor resultado proporciona es watershed con geodistancia

(0.9291), aunque los métodos de Kmeans con transformada a espacio de color Lab (0.9270) y watershed con transformada distancia (0.9247) obtienen valores algo inferiores, siendo la versión de obtención de marcadores con la transformada Fasta Radial Symmetry la que peores resultados globales obtiene.

TABLA III  
Valores medios

	KmeansDeconv	KmeansLab	W_TransDistance	W_Geodistanc	W_FastaRadial
Valores medios	0,8713	0,9270	0,9247	0,9291	0,8149

### III. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han implementado diversos métodos para la segmentación de núcleos en imágenes histológicas. Inicialmente, estas imágenes son de gran tamaño y de muy difícil procesamiento, por lo que se ha optado en fragmentarlas en otras más pequeñas (512x512 píxeles) sobre las que se trabaja. El objetivo futuro es extrapolar los resultados de cada una de estas imágenes para realizar un estudio conjunto y facilitar el diagnóstico a los patólogos en la determinación de cáncer de próstata.

Los métodos presentados siguen dos líneas: una línea en la que se pretende obtener los núcleos a partir de la clusterización de la imagen y una segunda línea que obtiene marcadores que se emplean para utilizar la transformada de watershed como segmentación.

Para validar los resultados de estos métodos, se ha empleado la herramienta "QuPath v0.1.2" que, tras una primera segmentación automática, permite corregir, modificar, añadir o eliminar de manera manual los resultados que proporciona.

Dado los resultados obtenidos, el método watershed con geodistancia (media TPR = 0.9590, media PPV = 0.8992) instan a testear más ampliamente este método para demostrar su validez antes de abordar el siguiente objetivo, la segmentación de criptas.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad bajo el proyecto SICAP (DPI2016-77869-C2-1-R).

### REFERENCIAS

- [1] S. Naik, S. Doyle, A. Madabhushi, J. E. Tomaszewski, and M. D. Feldman, "Automated gland segmentation and Gleason grading of prostate histology by integratin glow-, high-level and domain specic information," MIAAB workshop, Piscataway, NJ,2007.
- [2] J. Xu, P. Monaco, and A. Madabhushi, "Markov random field driven region-based active contour model (MaRACel): Application to medical image segmentation," in Proceedings of the 13th International Conference on Medical Image Computing and Computer-assisted Intervention: Part III, MICCAI 2010, pp. 197-204, 2010.
- [3] J. Xu, R. Sparks, A. Janowczyk, J. E. Tomaszewski, M. D. Feldman, and A. Madabhushi, "High-throughput prostate cancer gland detection, segmentation, and classification from digitized needle core biopsies," in Proceedings of the 2010 International Conference on Prostate Cancer Imaging: Computer-aided Diagnosis, Prognosis, and Intervention, pp. 77-88, 2010.
- [4] J. Monaco, et al., "High-throughput detection of prostate cancer in histological sections using probabilistic pairwise Markov models," Medical Image Analysis, vol. 14, pp. 617-629, 2010.

- [5] Y. Peng, Y. Jiang, L. Eisengart, M. Healy, F. Straus, and X. Yang, "Segmentation of prostatic glands in histology images," in IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, pp. 2091-2094, 2011.
- [6] K. Nguyen, "Contributions to computer-aided diagnosis of prostate cancer in histopathology", 2013.
- [7] M. Jaffe, W. Hammond, P. Tolias and T. Arinze, "Characterization of biomaterials – Assays for determining cell differentiation in biomaterials". Ed. Woodhead publishing series in biomaterials, 2012.
- [8] A. C. Ruifrok, D. A. Johnston, "Quantification of histochemical staining by color deconvolution", Anal Quant Cytol Histol 23: 291-299, 2001.
- [9] J. B. MacQueen, "Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability", Berkeley, University of California Press, 1:281-297, 1967.
- [10] S. Beucher, F. Meyer, "The morphological approach to segmentation: the watershed transformation", in: Mathematical Morphology in Image Processing, E. R. Dougherty, pp. 433-481, 1992.
- [11] F. Xing, L. Yang, "Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review", IEEE Reviews in biomedical engineering, vol. 9, 2016.
- [12] J.C. Bezdek, R. Ehrlich, W. Full, "FCM: the fuzzy c-means clustering algorithm", Computers & Geosciences Vol. 10, No. 2-3, pp. 191-203, 1984.
- [13] G. Loy, A. Zelinsky, "A Fast Radial Symmetry Transform for Detecting Points of Interest", IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence, vol. 25, no. 8, 2003.