



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIEROS DE
TELECOMUNICACIÓN

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de
Telecomunicación
Universitat Politècnica de València

Automatización del análisis de la imagen de una gota de sangre coagulada

Proyecto Final de Carrera

Ingeniería técnica superior en telecomunicación

Autor: Jordi Siscar Escivá

Director: Valery Naranjo Ornedo

Valencia, septiembre de 2014

Resumen

En el presente proyecto se analizan imágenes de gotas de sangre coaguladas. Las gotas se obtienen realizando una incisión en el dedo. Se aplica la gota sobre un cristal portaobjetos creando varias marcas en el cristal. La muestra se visualiza en un microscopio con cámara acoplada que captura las imágenes. Los artículos estudiados sobre el análisis indican que la gota ideal debería ser roja en su totalidad. En aquellas personas con una grave enfermedad se observa la aparición de manchas blancas en la gota de sangre. Se calcula la cantidad de color blanco que presenta la gota y se compara con una gota ideal. El rendimiento del método propuesto es analizado para distintas imágenes de entrada. La finalidad es determinar si las muestras de sangre seca pueden resultar útiles en la determinación de estados de salud, o la evolución de un tratamiento médico.

Palabras clave: Sangre, gota, salud, microscopio, coagulada, tratamiento, marcador, enfermedad.

Agradecimientos

A Valery Naranjo Ornedo por ayudarme en un proyecto nuevo y por atenderme siempre con una sonrisa. Le agradezco que me transmitiese su pasión por el tratamiento digital de imágenes.

A Ana Jiménez Belenguer del departamento de Biotecnología en el Área Microbiología, por permitirme analizar muestras en el laboratorio y enseñarme el funcionamiento del microscopio.

A Rosa María López Monís por facilitarme imágenes de muestras de gotas de sangre coagulada.

A mi familia por su apoyo incondicional. Ellos me han facilitado la oportunidad de obtener unos estudios superiores.

A mis compañeros y profesores. Con ellos descubrí la pasión por aprender.

A Àngela Bertomeu Pi por mostrarme mis errores y fomentar mi desarrollo personal.

Índice general

Índice general	5
Índice de figuras	7
1. Introducción.....	10
1.1 Motivación	11
1.1.1 La sangre	11
1.1.2 Material necesario y toma de muestras	12
1.1.3 Manchas blancas	16
1.1.4 Normal vs anormal	17
1.2 Estado del arte en análisis de imágenes de gotas de sangre.....	19
1.2.1 Historia.....	19
1.2.2 Situación actual.	22
1.3 Objetivos.....	23
1.3.1 Región de interés	24
1.3.2 Segmentación	26
1.3.3 Obtención de características.....	27
1.3.4 Exportar a Excel.....	28
1.3.5 Proceso transparente al usuario.	28
2. Metodología.....	29
2.1 Espacios de color	30
2.1.1Espacio RGB	30
2.1.2 Espacio Lab	31
2.1.3 Obtención de una imagen de grises mediante el análisis de componentes principales	33
2.2 Métodos utilizados.....	35
2.2.1 Método del valor umbral. Otsu	35

2.3 Operaciones morfológicas	38
2.3.1 Apertura de imágenes.....	39
2.4 Separar gota y fondo.....	41
2.5 Detección de manchas blancas	43
2.5.1 Procesado de la imagen mediante interfaz gráfica	44
3. Resultados.....	46
3.1 Comparación normal vs anormal.....	49
3.1.1 Imágenes en campo oscuro.....	49
3.1.1 Imágenes en campo claro.....	52
3.2 Puntos débiles	59
3.3 Exportar a Excel.....	60
3.4 Análisis mediante una interfaz gráfica.....	61
4. Líneas futuras	64
4.1 Análisis de la mancha blanca con mayor área	65
4.2 Análisis de las redes de fibrina e interconexión de las manchas	66
4.3 Determinar la posición de las zonas blancas.....	67
4.4 Patrones de coagulación.....	68
5. Conclusiones.....	69
6. Bibliografía y referencias	70

Índice de figuras

1. Introducción

1.1 Imagen del microscopio utilizado (a) y un ejemplo del autor visualizando muestras (b)

1.2 Resultado de aplicar la gota de sangre sobre un cristal portaobjetos

1.3 Muestra visualizada en toda su extensión (a) y con un acercamiento mayor (b)

1.4 Imagen de una gota de sangre con un patrón normal (a) y anormal (b) tomada mediante un microscopio de campo oscuro

1.5 Imagen de una gota de sangre con un patrón normal o sano (a) y con un patrón anormal o enfermo (b) tomada con un microscopio de campo claro

1.6 Progresión de la evolución de una gota de sangre desde un patrón normal(a) hacia un patrón anormal (c) pasando por un punto intermedio (b).

1.7 Toda la gota coagulada sobre un fondo blanco

1.8 Detalle de una región de la gota sin fondo

1.9 Detalle de una región de la gota con fondo

1.10 Una región de la gota enventanada, dentro de un círculo negro.

1.11 Posibles patrones particulares que pueden darse en una gota de sangre coagulada

2. Método

2.1 Representación tridimensional del espacio RGB

2.2 Imagen de una gota de sangre (a) descompuesta en sus componentes del espacio RGB: la componente roja (b), la componente verde (c) y la componente azul (d)

Automatización del análisis de la imagen de una gota de sangre coagulada

2.3 Imagen de una gota de sangre (a) descompuesta en sus componentes del espacio CIE LAB: la luminancia (b), el eje rojo verde (c) y el eje azul-amarillo (d)

2.4 Imagen en escala de grises con su histograma a la derecha.

2.5 Máscara obtenida con el método de otsu (a) y el resultado de aplicar una operación de apertura de valor mil (b)

2.6 Resultado de aplicar una operación de apertura de valor mil (a) y el efecto que se produce al realizar un cierre de valor mil (b)

2.7 Primer paso en el proceso de separar gota y fondo.

2.8 Segundo paso en el proceso de separar gota y fondo

2.9 Tercer paso en el proceso de separar gota y fondo

2.10 Imagen de una gota de sangre (a) y la máscara que marca en color blanco las manchas de la gota (b)

2.11 Entorno de desarrollo de interfaces gráficas de usuario (GUI)

2.12 Ejemplo del aspecto de la interfaz gráfica (GUI) diseñada

3. Resultados

3.1 Imagen de una gota de sangre coagulada (a) y sus manchas marcadas en color verde (b)

3.2 Imagen de una gota de sangre coagulada (a) y el eje rojo-verde del espacio Lab (b)

3.3 Máscara que marca con color blanco la gota (a) y la superposición de dicha máscara sobre la imagen original (b)

3.4 Gota con un patrón normal (a) y otra gota con patrón anormal (b). Muestras tomadas en campo oscuro

3.5 Máscara del patrón normal (a) y del patrón anormal (b)

3.6 Máscara transpuesta del patrón normal (a) y máscara del patrón anormal (b).

3.7 Gota con un patrón normal (a) y otra gota con patrón anormal (b). Muestras tomadas en campo claro

3.8 Se toma la luminancia como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.9 Se toma la componente roja como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.10 Se toma la componente verde como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.11 Se toma la componente azul como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.12 Se toma el eje "a" como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.13 Se toma el eje "b" como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.14 Detalle de la pérdida de información cuando se obtiene la máscara (b) que marca toda la gota de sangre (a)

3.15 Hoja de cálculo en la que se almacenan los resultados obtenidos

3.16 Gráfico de barras comparando los ratios para diferentes imágenes de entrada

3.17 Interfaz gráfica para el procesado automático de las imágenes

3.18 Interfaz gráfica después de haber procesado una imagen

4. Líneas Futuras

4.1 Objetos de mayor área que han sido detectados en las imágenes de campo oscuro para un patrón normal (a) y anormal (b)

4.2 Ejemplo de una gota donde se aprecia la red de fibrina (a). Ejemplo de una gota con la red de fibrina rota (b)

1. Introducción

El presente proyecto final de carrera (PFC) tiene como finalidad estudiar y procesar imágenes de gotas de sangre seca. El estudio de este tipo de imágenes resulta novedoso y establece el inicio para poder desarrollar futuras investigaciones, a fin de determinar si el estudio de gotas de sangre seca puede ser útil en el ámbito médico. Para llevar a cabo una investigación en este campo, se ve necesario disponer de un grupo multidisciplinar de profesionales y la colaboración de otros laboratorios de la Universitat Politècnica de València. El punto de partida es la motivación que lleva al autor a desarrollar el proyecto. Posteriormente el estado del arte es necesario para fijar los objetivos. La parte central del proyecto es la metodología empleada y los resultados obtenidos. Se finaliza delimitando una línea a seguir para el desarrollo de futuros proyectos y las conclusiones obtenidas.

En este capítulo introductorio se desarrollan tres puntos:

- Punto 1: Identificar los factores que han influido para querer desarrollar el proyecto.
- Punto 2: Historia y situación actual del análisis de gotas de sangre coaguladas.
- Punto 3: Objetivos del proyecto e hipótesis que se desean validar.

1.1 Motivación

La principal motivación del autor es la de extraer características de imágenes obtenidas con un microscopio y seguir una línea de investigación tratando de determinar si este análisis simple, barato y rápido puede aportar información sobre el estado de salud de una persona, o las distintas patologías que se padecen. El análisis de gotas de sangre seca toma el nombre de test Bolen o test H.L.B.O (Aguirre, 2011), es inespecífico y no sirve aún para diagnosticar enfermedades. Al ser un test inespecífico las gotas de sangre seca informan del estado de salud global del paciente. Los profesionales en esta técnica la utilizan para validar si el tratamiento aplicado al paciente es correcto y conduce la coagulación de la gota de sangre hacia el estado deseado. Idealmente la gota debe ser roja en su totalidad y no presentar manchas blancas, por lo tanto si ante un tratamiento las manchas blancas disminuyen o desaparecen se considera el tratamiento favorable. En investigaciones posteriores se puede hacer un estudio de este análisis cualitativo de la sangre, estudiar cómo coagula la sangre, si se presentan patrones, la cohesión de la gota, la aparición de manchas blancas, la uniformidad del contorno. En este proyecto se proporcionarán herramientas para la realización de dicho estudio en el futuro.

1.1.1 La sangre

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo, sirve de sostén (Arenas, 2010), cohesión o separación de los elementos que componen los órganos. Es un tejido especializado que contiene componentes de fase líquida y componentes de fase sólida. La parte líquida se llama plasma, contiene agua, sales minerales, hormonas, azúcares, grasas y proteínas. Corresponde con un 55% del volumen total. Su parte sólida contiene glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Los glóbulos rojos transportan oxígeno a cualquier tejido y órgano. Además llevan el dióxido de carbono de vuelta a los pulmones para ser espirado. Los glóbulos blancos forman parte del sistema inmunológico y actúan como defensa del cuerpo. Las arterias llevan la sangre oxigenada la que ha pasado por los pulmones. Las venas llevan la sangre desde el resto del cuerpo hasta el corazón y los pulmones para que vuelva a ser oxigenada. La médula ósea es un material esponjoso que tenemos dentro de los huesos y es la que se encarga de producir nuevas células

sanguíneas. Toda la sangre está compuesta por los mismos elementos básicos aunque no toda es igual. La presencia o ausencia de ciertos antígenos determina el grupo sanguíneo.

Resulta de gran interés para la medicina realizar análisis cuantitativos de la sangre. Se mide la cantidad de glóbulos blancos, glóbulos rojos, proteínas, grasas, hormonas, enzimas. En la sangre pueden presentarse alteraciones celulares, sean morfológicas, funcionales o bioquímicas que alteren la coagulación de la misma. Puede darse el caso que dos individuos tengan la misma cantidad de elementos básicos y que en cambio la coagulación de la sangre en ambos sea distinta por la calidad de esos elementos básicos. Los factores que pueden afectar a la coagulación son: la contaminación por macromoléculas y péptidos, carencia o exceso de nutrientes, o acumulación de radicales libres. Este estudio puede ayudar a determinar si un tratamiento presenta una mejoría notable, normal o leve viendo si la calidad de la sangre ha sufrido alguna degradación. La degradación de la calidad de la sangre lleva a la aparición de manchas blancas, al aumento de su tamaño, a la conexión de las mismas, a la pérdida de la forma circular de la gota y a la aparición de patrones.

1.1.2 Material necesario y toma de muestras

Las imágenes que se analizan han de ser obtenidas con un microscopio. El microscopio ha de cumplir las siguientes características: (Aguirre, 2011)

- Cabeza Binocular.
- Instalación de luz transparente.
- Factores de ampliación de 40X, 100X, 200X.
- Posibilidad de incorporar una cámara.
- Campo claro y/o campo oscuro.

A fin de profundizar en la toma de las muestras, se realizaron pruebas en el laboratorio de microbiología de la escuela de ingenieros agrónomos (E.T.S.I.A.M.N.), de la Universitat Politècnica de valencia bajo la supervisión de Ana Jiménez Belenguer. En el laboratorio se disponía de un microscopio Olympus BX41 con una cámara acoplada (figura 1.1). La cámara acoplada al microscopio, con la que se han obtenido las

primeras muestras, es una cámara de 2 Mpx que guarda las imágenes en una tarjeta de memoria, con formato propietario.



(a)



(b)

Figura 1.1 Imagen del microscopio utilizado (a) y un ejemplo del autor visualizando muestras (b)

El procedimiento para la obtención de unas muestras correctas es el siguiente:

- Presionar la yema del dedo durante 3 segundos, y realizar un pinchazo con una lanceta. Las lancetas se usan para evaluar la glucemia en diabéticos.
- Dejar la sangre unos 15 segundos y a continuación presionar hasta obtener una gota.
- Tomar el cristal porta y dejarlo caer sobre la gota. Esperar dos segundos y retirar. A continuación dejar caer de nuevo el cristal porta, en una nueva posición sobre el pinchazo. Así se crean los círculos de menor tamaño (figura 1.2).

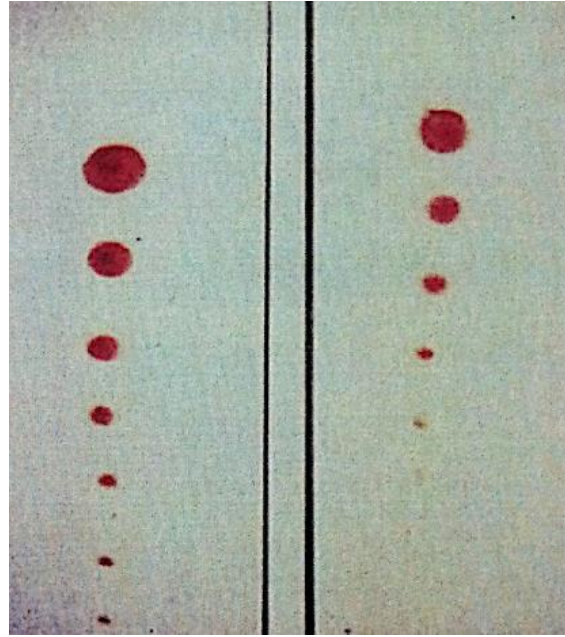


Figura 1.2 Resultado de aplicar la gota de sangre sobre un cristal portaobjetos

Esta técnica resulta de interés porque, es muy poco invasiva para el paciente, ya que tan solo tiene que someterse a un pinchazo en su dedo índice. Otro punto a destacar es el hecho de que, una vez se ha tomado la muestra y se ha coagulado la sangre, esta muestra puede ser almacenada durante más de un año. Así en la próxima visita del paciente, se obtiene una nueva muestra, y se compara la gota nueva con la de la última visita, obteniendo marcadores objetivos del estado de salud del paciente. Cabe destacar que una vez secas las muestras, pueden ser enviadas a otros lugares para llevar a cabo su estudio. Las muestras no necesitan refrigeración, tan solo deben ser tratadas con la delicadeza que supone transportar un trozo de vidrio. Puede darse el caso que, las tomas no se obtengan de la manera más correcta. Por esta razón se definen:

Errores en las tomas

Existen errores comunes que se cometen cuando se toman las muestras

1. Si se ejerce demasiada presión del cristal porta sobre la gota se observa en el borde una gran doble costa, como si se tratasen de dos bordes.
2. Si no se ejerce la presión correcta del cristal porta sobre la gota entonces se observará una muestra hiper coagulada y agrietada.
3. Cuando se ejerce la presión del cristal porta, con un cierto ángulo, aparecerán distintos patrones en cada capa.

Una vez definido el método para obtener las muestras y los posibles errores que se pueden cometer, se tomaron cuatro muestras a cuatro voluntarios y se analizaron con el microscopio obteniendo un total de 36 imágenes (figura 1.3). El microscopio Olympus BX41 (figura 1.1) incluye la posibilidad de visualizar las muestras en campo claro, campo oscuro, polarización y contraste de fases. En este caso las primeras muestras fueron tomadas en campo claro. A continuación se muestran dos ejemplos de muestras obtenidas.

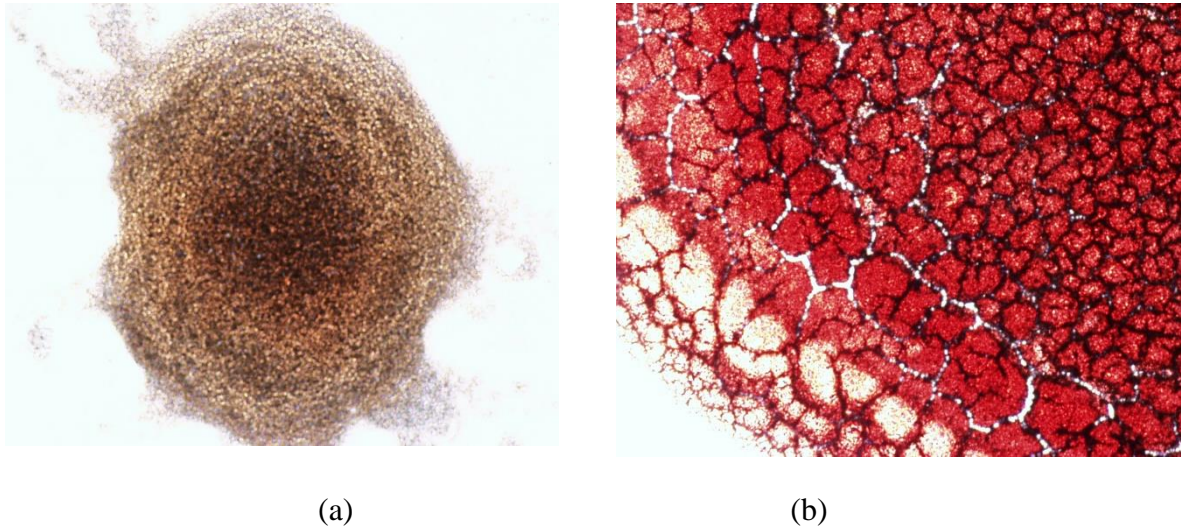


Figura 1.3 Muestra visualizada en toda su extensión (a) y con un acercamiento mayor (b)

Se deposita la gota sobre el cristal porta objetos tocando el cristal seis u ocho veces hasta que la sangre depositada en el cristal sea mínima (figura 1.2). Como resultado obtendremos de seis a ocho imágenes o capas de cada cristal, todas de forma circular y con tamaño decreciente. La resolución de la cámara, presenta un sesgo importante cuando se pretenden analizar las muestras, ya que la visualización de la muestra con cierto alejamiento provoca la pérdida de la información del color.

En resumen, el material necesario para desarrollar la investigación es:

- Microscopio con cámara acoplada.
- Cristales porta.
- Lancetas para realizar la incisión.
- Ordenador con el programa Matlab para procesar las muestras.

1.1.3 Manchas blancas

En toda la bibliografía (Hawk, Thoma, & Inkley, 1951), (Aguirre, 2011), (Vaughn, Metzner, & Annan, 1952), (Bolen H. L., 1952) se converge hacia la premisa que, más blanco es peor. Este punto lleva a que se centren todos los esfuerzos en hallar las manchas blancas y en la necesidad de cuantificar cuánto de blanco hay en la gota. Mediante el método que se introduce en el proyecto, se obtiene una imagen en blanco y negro en la que los objetos blancos, tienen valor uno (blanco) y el resto tiene valor cero (negro). Analizando esta imagen obtendremos las características de la gota, por lo que la obtención de ésta primera imagen es crucial para el correcto funcionamiento del método.

En el análisis de las escasas imágenes disponibles, se encontró un punto conflictivo ya que el borde de la gota también tiende a ser blanco. La primera solución fue umbralizar una componente de color, usando un valor relativamente bajo. Ante irregularidades en los bordes esta solución se planteaba poco robusta. En el apartado de metodología, se explica la solución que se adoptó finalmente para separar la gota del fondo.

Una vez se obtiene la máscara en la que se delimitan las manchas blancas, el siguiente paso consiste en extraer características. MATLAB[®], el programa con el que se ha realizado el proyecto, cuenta con herramientas muy robustas y librerías dedicadas única y exclusivamente al tratamiento digital de imagen. Como resultan importantes todas y cada una de las manchas, el primer parámetro que se calculó fue el número de manchas blancas. Existe una gran diferencia si tenemos pocas manchas pero de gran tamaño o muchas manchas de muy poco tamaño. Así que el segundo parámetro que se prevé interesante es el tamaño o el área de las manchas blancas.

Con estos dos parámetros ya se podría estudiar la evolución de una misma gota de sangre a través del tiempo. Es posible que una gota vaya aumentando el número de manchas blancas y en cambio vaya reduciendo paulatinamente el área de las mismas. Cabe destacar que la distribución de las manchas blancas en la gota de sangre es un punto de interés. Se debe estudiar si las gotas se encuentran por toda la gota de sangre o si por el contrario, se encuentran concentradas en el centro de la gota. En este punto surgen varias dificultades:

- Dificultad tecnológica
 - Las muestras de las gotas se han tomado haciendo uso de un microscopio de alta potencia y de una cámara especial acoplada al microscopio de 2 MPx. Si se quiere analizar toda la gota de sangre se pierde resolución y resulta casi imposible analizar las manchas blancas.
- Dificultad analítica
 - La poca cantidad de imágenes que se dispone hace difícil evaluar el modo más idóneo de evaluar las manchas blancas.

1.1.4 Normal vs anormal

De nuevo en la bibliografía consultada existe un punto en común:

“Se identifica una gota como normal o sana cuando su coloración es roja, brillante, uniforme, y sin la existencia o una presencia mínima de manchas blancas.”

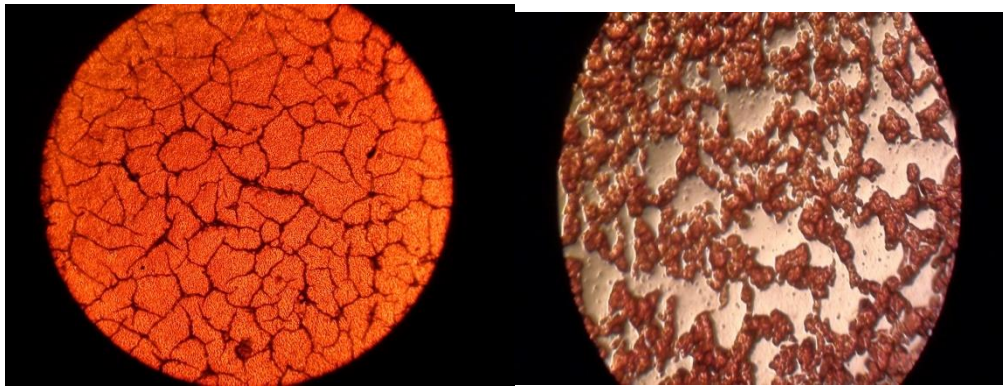
El instituto (Onairos) nos facilita la siguiente definición:

“La gota de sangre, en un estado normal, se presenta en forma circular, de color rojo compacto, sin decoloraciones, masas blancas, ni lagunas, y con una red oscura de fibrina fina que la cubre en forma de velo perfectamente adaptado al tejido sanguíneo.”

Del mismo modo:

“El empeoramiento de la salud de la persona conlleva una rotura de la red de fibrina y la aparición de manchas blancas. Cuanto mayor sea el tamaño de las manchas, peor será el estado de salud. La unión de manchas las hace más grandes y en consecuencia empeora el estado de salud. “

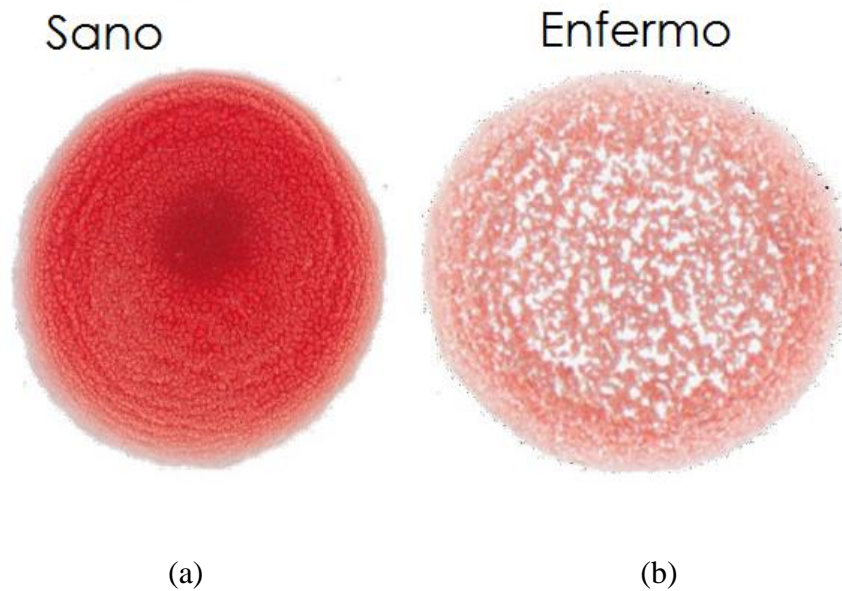
A continuación, en las figuras 1.4 y 1.5 se presentan varios ejemplos de patrones normales o sanos frente a patrones anormales o de pacientes enfermos. La imagen de la figura 1.4 ha sido tomada con un microscopio de campo oscuro y en la figura 1.5 se ha utilizado un microscopio de campo claro.



(a)

(b)

Figura 1.4 Imagen de una gota de sangre con un patrón normal (a) y anormal (b) tomada mediante un microscopio de campo oscuro



(a)

(b)

Figura 1.5 Imagen de una gota de sangre con un patrón normal o sano (a) y con un patrón anormal o enfermo (b) tomada con un microscopio de campo claro

Con estas imágenes se pretende ilustrar la importancia de la aparición de una mancha blanca. Resultaría interesante caracterizar todas y cada una de ellas. El presente proyecto se centrará en determinar el ratio rojo blanco de la gota y el número de manchas que aparecen. La principal motivación es la de poder determinar el estado de salud de una persona visualizando su sangre. Además existe la posibilidad de evaluar el estado de salud de un paciente mediante la transición de un patrón a otro.

1.2 Estado del arte en análisis de imágenes de gotas de sangre.

La medicina actual realiza análisis cuantitativos de la sangre. A las muestras que se le extraen al paciente se le aplican anticoagulantes, tintes y distintos productos químicos con el fin de determinar la cantidad o concentración de ciertos elementos presentes en la sangre. En la técnica del análisis de la gota coagulada, la sangre no se ve alterada por ningún agente externo, se analiza en el microscopio y se intenta interpretar lo que se observa. Existen dos grandes obstáculos a los que se enfrenta la técnica del análisis de la gota coagulada. Se dispone de poca documentación científica y no existen grupos de imágenes que puedan ser relacionadas con pacientes que presenten la misma patología. A continuación se presenta la historia de este análisis y el estado actual del mismo.

1.2.1 Historia

La técnica del análisis de la gota coagulada se llama test H.L.B. o también test Bolen. Las siglas corresponden a los nombres de tres doctores: Dr Henri Heitan, Dr Philippe de LaGarde y el Dr H Leonard Bolen.

En 1942 el médico H. Leonard Bolen presenta esta técnica (Bolen H. L., November 1950). Se busca determinar si los individuos afectados con leucemia, enfermedad cardiovascular y enfermedad tiroidea presentan una coagulación de la sangre normal. De este modo aparece lo que se denomina como “Bolen blood test” o test de Bolen.

En el 1951 desde el departamento de cirugía y medicina de la universidad de St. Louis se presenta un artículo llamado “An Evaluation of the Bolen Test as a Screening Test for Malignancy” (Hawk, Thoma, & Inkley, 1951). En este artículo, se explica que el estudio de la coagulación de la sangre resulta acertado en el 91.4% de los casos de cáncer. Además en el estudio se observa que cuanto más avanzado está el cáncer, más manchas blancas aparecen sobre la gota de sangre roja. Parece razonable pensar en una reducción de las manchas blancas ante una mejoría del paciente. Por consiguiente, un tratamiento eficaz contra el cáncer debería reducir el número y el área de las manchas bancas.

Ese éxito lleva al investigador a estudiar a 857 individuos. Se define como un patrón normal una gota densa y oscura. En el patrón canceroso se rompe el diseño compacto cerca del área central de la gota. Cuando se encuentra el cáncer en un estado avanzado, la rotura del diseño se extiende hasta casi el borde de la gota. En todos los 195 pacientes sanos se observaba un patrón normal o negativo. En el 87% de los 157 pacientes con cáncer, se observaba un patrón anormal o positivo. Es decir, existe una alta probabilidad que la coagulación de la gota de sangre en pacientes con cáncer siga un patrón anormal. Este gran hallazgo hizo que después se introdujesen 505 nuevos pacientes con variedad de diagnósticos. De todos ellos 439 presentaban un patrón normal o negativo y 66 un patrón anormal o positivo. Al añadir el diagnóstico clínico se obtiene la siguiente tabla:

Tabla 1.1 Aparición de patrones normales o anormales según el diagnóstico de algunas enfermedades

Diagnóstico	Número total	Patrón anormal	Patrón normal
Enfermedad cardiovascular	29	2	27
Enfermedad gastro-intestinal	42	2	40
Artritis	13	2	11
Arterioesclerosis	28	0	28
Diabetes Mellitus	3	0	3
Sífilis	20	1	19
Dermatitis	14	2	12
Enfermedad tiroidea	12	0	12
Hipertensión	10	0	10

No existe correlación entre las enfermedades estudiadas y la presencia de un patrón anormal o positivo.

En la tabla se observa como el hecho de padecer una enfermedad grave no condiciona necesariamente la degradación de la gota de sangre hacia un patrón anormal. Esto quiere decir que un paciente enfermo, puede presentar un patrón aparentemente normal en la coagulación de su sangre. De todos modos otros investigadores como el Dr. Oswald Young indican que en el caso de las enfermedades, la degradación no es tan fácilmente observable a simple vista como en el caso del cáncer, sino que en el caso de las enfermedades ha de hacerse un estudio de la gota con más detalle.

El estudio (Hawk, Thoma, & Inkley, 1951) concluye que un patrón anormal no indica necesariamente la presencia de una enfermedad, aunque la probabilidad de la presencia de cáncer es bastante alta. Se muestra (figura 1.6) la progresión de una gota de sangre con un patrón normal (a) hacia un patrón anormal (c).

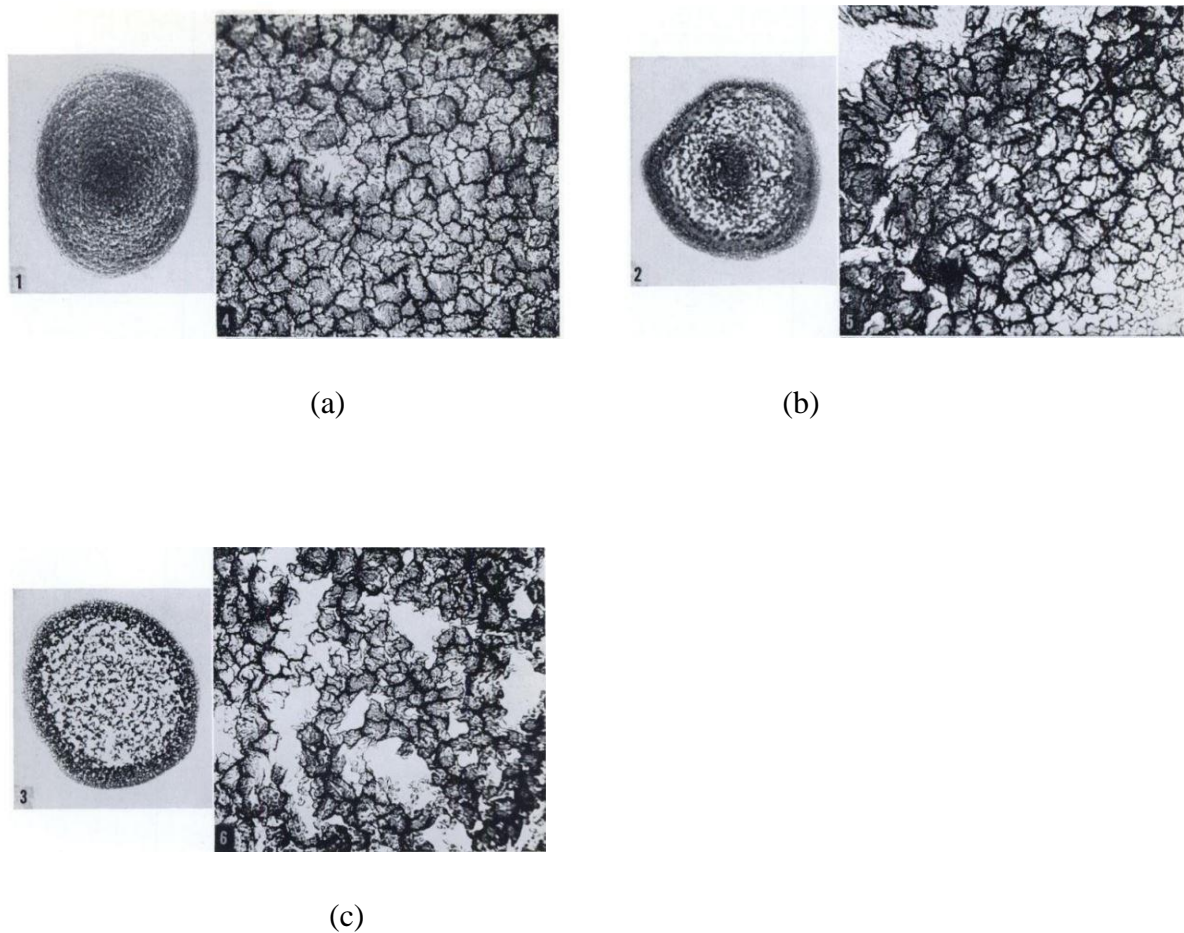


Figura 1.6 Progresión de la evolución de una gota de sangre desde un patrón normal(a) hacia un patrón anormal (c) pasando por un punto intermedio (b)

Más tarde H. Leonard Bolen publica un artículo llamado “The blood pattern in pre-symptomatic malignancy of the gastrointestinal tract” (Bolen H. L., 1952). Un cáncer en el sistema digestivo tiene tendencia a permanecer oculto o asintomático, hasta que se ha extendido y se vuelve difícil de extirpar. Se pretende reducir el tiempo que tarda el paciente entre que presenta síntomas y una posible intervención quirúrgica.

Este test puede ser realizado en una pequeña consulta y resulta inocuo para el paciente, además es barato y puede llevarse a cabo durante las inspecciones rutinarias. El test debe ser repetido frecuentemente, para evaluar los resultados de la terapia. En el artículo

se indica cómo otros autores han estudiado este test y se ha visto eficaz determinando la presencia del cáncer en cerca del 90% de los casos.

Posteriormente el dr Heitan y el dr Lagarde continúan investigando esta técnica para la detección del cáncer. En los años 1970 el científico Robert W. Bradford profundizó en el estudio de este análisis y sentó la base teórica y científica de este método. En sus investigaciones determina que no solo el cáncer altera la forma en la que una gota de sangre coagula, sino que otras patologías pueden producir alteraciones en la misma. Publica el libro: *Oxidology the Study of Reactive Oxygen Species (Ros) and Their Metabolism in Health and Disease* (Bradford & Allen, 1997) en el que se describen más de 35 alteraciones en la morfología de una gota de sangre coagulada. Bradford puntualiza que el test no diagnostica enfermedades sino que ofrece información sobre factores de riesgo. El análisis descubre y analiza las configuraciones morfológicas vistas microscópicamente en gotas de sangre coagulada. Desafortunadamente no se ha podido consultar la bibliografía citada.

1.2.2 Situación actual.

Esta técnica no es aceptada, estudiada o utilizada por los organismos médicos oficiales. En España existen pocos profesionales que investiguen esta técnica, Fernando Guirado, Rosa López Monís, D. Jorge Ollandel, Onairos Business Health S.L y Carlos Cid Cruz. En la biblioteca nacional de medicina de los Estados Unidos (Pubmed) no se encuentran más de los cuatro estudios citados (Bolen H. L., November 1950) (Bolen H. L., 1952) (Hawk, Thoma, & Inkley, 1951) (Vaughn, Metzner, & Annan, 1952). Del mismo modo que se necesitan estudios para determinar que un análisis médico funciona, también se deben estudios para considerarlo ineficaz. En el presente proyecto se presenta un método de diagnóstico poco estudiado, y que hace uso de imágenes obtenidas con microscopio. Estas imágenes resultan interesantes y se pueden extraer muchas características de las mismas.

1.3 Objetivos

El principal objetivo es desarrollar una aplicación que permita estudiar imágenes de gotas de sangre coagulada, segmentarlas y extraer características de las regiones de interés. Para ello se obtendrá, al final del proceso, una imagen en binaria que contiene las manchas blancas y un archivo Excel .xls, donde se exportan los datos obtenidos en la extracción de características.

Al inicio del proyecto, se pretendían abarcar unos objetivos ambiciosos, ya que del estudio de las imágenes se pueden obtener muchos datos. A raíz de determinar cuál era el estado del arte, gran parte de los objetivos iniciales se trasladan al apartado de líneas futuras del proyecto. Sobre dichos objetivos, se pueden desarrollar nuevos proyectos y futuras investigaciones, tomando como base el estudio de las gotas de sangre secas coaguladas sobre un cristal porta objetos.

Al margen de las características que se pueden obtener de las imágenes, se plantean los siguientes objetivos:

- Definir la región de interés.
- Segmentar la región a fin de detectar las manchas blancas.
- Obtener las características más relevantes de las manchas blancas.
- Exportar los datos obtenidos a un fichero Excel.
- Realizar todo este proceso con una herramienta en la que el usuario tenga una interacción mínima.

Inicialmente, se pensó en caracterizar todos y cada uno de los objetos presentes en el interior de la gota y extraer características de cada uno de ellas. Extrayendo características de cada mancha, se generaba un volumen muy grande de datos que a priori, no se tenía constancia que fuesen a ser de utilidad. Por esa razón se pasó a un estudio más general, a estudiar todas las manchas de la gota y establecer un valor para el ratio blanco rojo de la gota. Se escogió esta característica porque ya había sido estudiada y resultaba efectiva en un gran porcentaje de los casos de cáncer. La nueva visión requería redefinir los objetivos.

Automatización del análisis de la imagen de una gota de sangre coagulada

- Establecer y familiarizarse con un protocolo de captura de imágenes.
- Obtener imágenes para definir el método de procesado y extracción de características.
- Separar la gota del fondo.
- Calcular el ratio blanco rojo que presenta la gota sin considerar el fondo.
- Exportar las imágenes calculadas que definen la posición de las manchas blancas.
- Exportar los valores de los ratios a un fichero Excel.
- Realizar todo este proceso sin requerir mucha interacción por parte del usuario.

Idealmente y después del estudio de muestras tomadas a pacientes, se busca definir un umbral a partir del cual, si se está por encima se pueda considerar una gota como cancerosa o enferma. Del mismo modo cuando se esté por debajo del umbral podría considerarse una gota como sana.

1.3.1 Región de interés

Con la finalidad de centrar los esfuerzos en aquello que puede resultar útil, se opta por centrar la región de interés en toda la gota de sangre. Por este motivo, un punto crucial del proyecto es el de determinar con la suficiente exactitud la separación entre la gota y el fondo. Esta elección no es fruto del azar, se centra el estudio en toda la gota de sangre debido a los estudios científicos aportados en el apartado del estado del arte. Se analizarán imágenes similares a las que analizó el Dr. Bolen (Hawk, Thoma, & Inkley, 1951). En los estudios citados, el análisis de la gota de sangre coagulada se presenta como un buen marcador cuando se trata de determinar si el paciente tiene cáncer. Lo que se analiza en la gota es la presencia de muchas manchas blancas. El ratio rojo blanco, puede resultar interesante en el diagnóstico de estados graves de salud.

Las imágenes de gotas coaguladas se presentan en distintos formatos (figuras 1.7-1.10), por lo que se hace difícil definir una región de interés válida para todos los casos.

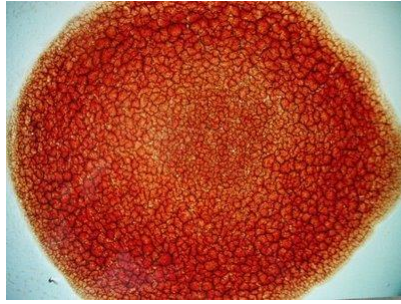


Figura 1.7 Toda la gota coagulada sobre un fondo blanco

En la figura 1.7 la zona roja es la zona de interés. La determinación de la zona de interés es sencilla, pero como contrapartida no se observan las manchas blancas con detalle.

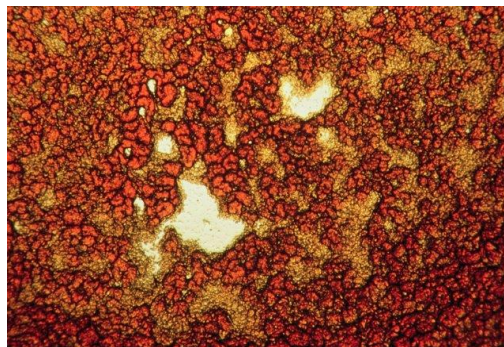


Figura 1.8 Detalle de una región de la gota sin fondo

En la figura 1.8 se observa una región de la gota, en este caso todo resulta de interés y se determinan las características de las manchas blancas, con el método descrito en el proyecto.



Figura 1.9 Detalle de una región de la gota con fondo

La figura 1.9 es similar a la figura 1.7 pero se aprecian mejor las manchas blancas ya que se ha producido un acercamiento sobre la gota.

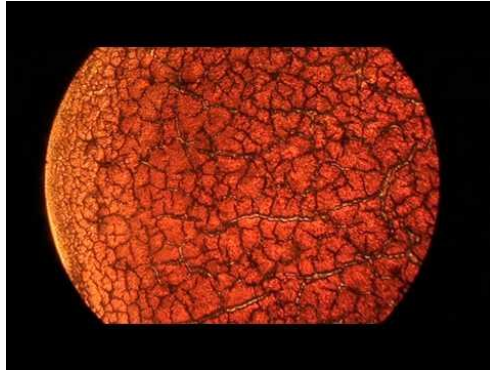


Figura 1.10 Una región de la gota enventanada, dentro de un círculo negro

En la figura 1.10 la muestra ha sido tomada con un microscopio de campo oscuro y la gota aparece dentro de un halo negro.

Estas diferencias pueden venir por distintos factores:

- Uso de microscopios diferentes.
- Visualización mediante técnicas de campo claro o campo oscuro.
- Uso de distintas cámaras en la captación de las imágenes del microscopio.

Se analizará la zona roja y se busca determinar si presenta manchas blancas. Una dificultad añadida es saber diferenciar entre mancha blanca y el fondo sobre el que está la gota. El fondo presenta un color muy similar al de una mancha blanca. Cabe destacar que una incorrecta toma de las muestras puede hacer que en la coagulación se formen huecos y sean confundidos con manchas.

La situación ideal será aquella en la que tengamos imágenes como las de la figura 1.7 y 1.9. En el presente proyecto es importante ver la gota en su totalidad y que se aprecie el fondo de la misma. De todos modos el método desarrollado debe ser robusto y funcionar con independencia del formato de las imágenes que se le presenten. Es problemático el hecho que en la región de interés haya una iluminación no uniforme. En el apartado 3.2 se entra con más detalle en los puntos débiles que presenta el proyecto.

1.3.2 Segmentación

Debido a la naturaleza de las imágenes, el método utilizado para segmentar será el método del valor umbral o método de Otsu, ya que este método se aplica para imágenes en que la diferencia de color sea notable. En el apartado de metodología del proyecto se

explica con profundidad el funcionamiento del método de Otsu. Este tipo de segmentación es utilizada en imágenes en las que los objetos que forman la imagen y el fondo están claramente diferenciados, como es el caso de separar un texto de una fotografía o el escaneado de un libro o un documento. Los objetos que se analizan son grandes objetos rojos sobre un fondo claro, así que la segmentación por el método de Otsu ofrece un procesamiento rápido y preciso de las imágenes.

Se pretende separar los distintos objetos que aparecen en la imagen del fondo de la misma. Las técnicas y herramientas de las que se dispone son muy variadas. Se decide optar por una u otra técnica según el tipo de imágenes y el objetivo que se persigue. Se distingue entre:

- Método del valor umbral: los píxeles se clasifican atendiendo únicamente a su nivel de gris.
- Detección de regiones: los píxeles con características similares se agrupan en regiones, siendo cada región un objeto diferente.
- Detección de fronteras: se realiza una búsqueda de los píxeles que corresponden a fronteras que separan dos objetos diferentes. Una vez detectados, la segmentación es sencilla.

1.3.3 Obtención de características

El planteamiento es obtener características de las manchas blancas. Las características obtenidas deben ayudar a la determinación de si se trata de una gota normal o sana o si por el contrario se está analizando una gota enferma o anormal. Otro punto que se quiere abarcar es que las características extraídas permitan ayudar en el estudio de la evolución de un tratamiento. El estudio de muchas gotas puede llevar a establecer unas características base que se refieran a un patrón normal. Saber si una serie de imágenes que se corresponden con un mismo paciente, se van acercando a las características base del patrón normal o si por el contrario, se acerca a un patrón de alguna patología. Se estudian las siguientes características de las manchas blancas.

- Número.
- Área.
- Perímetro.

- Excentricidad.
- Distancia al centro de la imagen.
- Ratio Blanco/Rojo de toda la región de interés.

Estas características se obtienen en base a las máscaras obtenidas durante el proceso de segmentación de la imagen.

1.3.4 Exportar a Excel.

Las imágenes que se analizan en el proyecto son imágenes obtenidas con un microscopio y por consiguiente, los resultados obtenidos serán estudiados por profesionales médicos o profesionales no técnicos. La información ha de ser presentada en un formato conocido y fácil de manejar. Muchos profesionales médicos desconocen el programa MATLAB[®] pero en cambio sí que están familiarizados con programas ofimáticos. Esta es la razón por la cual los resultados que se obtengan se exportan en un documento Excel (.xls). MATLAB[®] ofrece potentes funciones que facilitan la tarea de exportación. Una vez exportado el profesional puede hacer otro estudio paralelo, haciendo uso de las herramientas que incorpora el propio programa de Microsoft[®].

1.3.5 Proceso transparente al usuario.

Es latente el hecho que los resultados han de ser fáciles de entender para profesionales médicos. Otro punto muy importante es que para obtener los resultados, el proceso que haya de llevarse a cabo, no cuente con complicados comandos que hayan de ser ejecutados en consola, ni interfaces en otros idiomas. El modo en el que se ha encarado el proceso, es un modo transparente al usuario, esto significa que el proceso se ejecuta sin que el usuario tenga que introducir ningún parámetro, tan solo especificar la carpeta de la que se leerán las imágenes. Otro modo de hacer al usuario transparente al proceso es mediante una interfaz de usuario. En el punto 2.5.1 del proyecto se explica cómo se ha realizado la interfaz para que el usuario pueda procesar las imágenes. Más adelante en el punto 3.4 del proyecto se detalla el funcionamiento de la interfaz y se muestra un ejemplo.

2. Metodología

Para realizar el PFC, se han desarrollado los objetivos mencionados y se ha recopilado el resultado en la presente memoria. El desarrollo de la metodología se divide en 5 puntos.

- Punto 1: Explicación teórica de los espacios de color que servirán después como imágenes de entrada para el método utilizado.
- Punto 2: Explicación teórica sobre los métodos y técnicas que han sido utilizadas, a fin de llevar a cabo la detección de manchas blancas.
- Punto 3: Explicación teórica de las operaciones morfológicas que utiliza el método.
- Punto 4: Método utilizado para la delimitación del fondo.
- Punto 5: Método utilizado para marcar las manchas blancas.

2.1 Espacios de color

A continuación se explican dos espacios de color, que son los que van a proporcionar las imágenes de entrada para el desarrollo del método. El primer paso es entender que información aporta cada espacio de color. En el punto 3 de resultados, se estudiará qué espacio de color responde mejor al método utilizado en la detección de manchas blancas y la separación del fondo de la gota.

2.1.1 Espacio RGB

Una imagen en el espacio RGB es una matriz de píxeles $M \times N \times 3$ o lo que es lo mismo, tres matrices $M \times N$ donde $M \times N$ es el tamaño de la imagen. La primera de esas tres matrices corresponde con la componente roja (R), la segunda de ellas con la componente verde (G) y la tercera la componente azul (B). Una imagen RGB son tres imágenes en escala de grises, en las que cada pixel de la imagen, puede ser representado con un número de bits. Cada pixel tendrá entonces tres valores. Si cada componente del espacio RGB, es una imagen de 8 bits entonces la imagen RGB tendría una profundidad de 24 bits, y una cantidad de posibles colores de $(2^8)^3=16777.216$ (Gonzalez, Woods, & Eddins, 2009).

El espacio RGB se basa en la mezcla aditiva de luces y gráficamente se representa el espacio RGB como un cubo de color (figura 2.1), donde los vértices del cubo son los colores primarios y secundarios. Cada componente del espacio indica la luz que emite dicho color en la imagen.

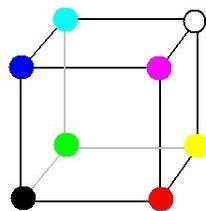


Figura 2.1 Representación tridimensional del espacio RGB

Para ilustrar cómo es el espacio RGB de la imagen de una gota de sangre se propone transformar la imagen (a) de la figura 2.2 al espacio RGB. Dicha figura contiene las tres componentes del espacio RGB.

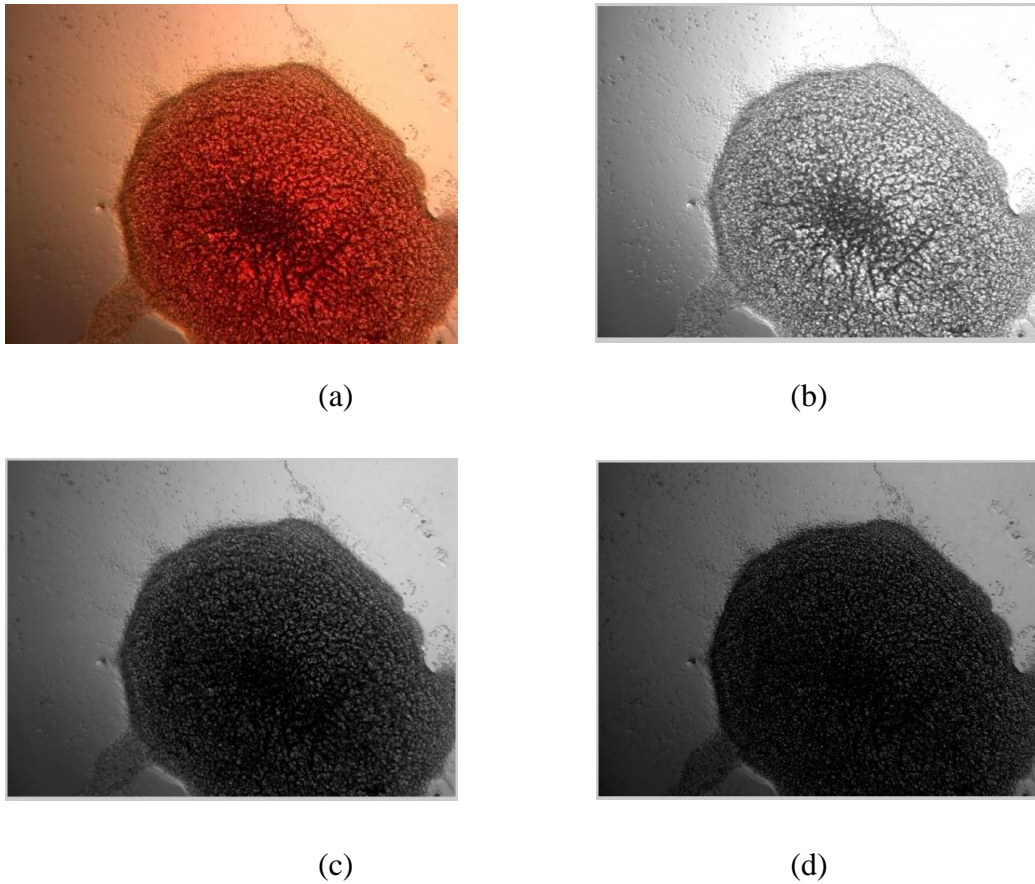


Figura 2.2 Imagen de una gota de sangre (a) descompuesta en sus componentes del espacio RGB: la componente roja (b), la componente verde (c) y la componente azul (d)

2.1.2 Espacio CIE LAB

Es un espacio de color, definido por una comisión internacional conocida como CIE que se encarga de fijar estándares para aspectos relacionados con la iluminación, colorimetría y fotometría. En 1976 se define el espacio CIE LAB. Es un espacio formado por tres componentes, la luminancia (L), el eje rojo-verde (a) y el eje azul-amarillo (b). Para definir las tres componentes del espacio Lab se debe fijar el punto de blanco de referencia (X_n, Y_n, Z_n). La conversión del espacio RGB al espacio Lab resulta complicado de definir ya que el modelo de color en el espacio RGB depende del

dispositivo utilizado. En cambio sí que se puede definir la conversión del espacio XYZ al espacio Lab. Las transformaciones se realizan sobre el punto de blanco de referencia (X_n, Y_n, Z_n) y las tres componentes toman los valores.

$$L = 116 * f(Y / Y_n) - 16 \quad (2.5)$$

$$a = 500 [f(X / X_n) - f(Y / Y_n)] \quad (2.6)$$

$$b = 200 [f(Y / Y_n) - f(Z / Z_n)] \quad (2.7)$$

Donde la función está definida por partes para evitar una asíntota en $t=0$

$$f(t) \begin{cases} t^{1/3} & t > (6 / 29)^3 \\ \frac{1}{3} * (29 / 6)^2 * t + \frac{4}{29} & \text{Re sto} \end{cases} \quad (2.8)$$

Es considerado como uno de los modelos de color más precisos, porque comprende todo el espectro de color incluso colores fuera del rango de la visión humana. Es un espacio muy utilizado en programas de edición de imágenes, o cuando surge la necesidad de especificar un color con mucha precisión. Para pasar de un espacio de color al espacio CIE LAB es necesario el uso de una transformada de color. En MATLAB[®] se encuentran funciones que calculan la transformada de color como “makecform” y posteriormente se aplica dicha transformación a la imagen con la función “aplycform” (mathworks).

Para ilustrar cómo es el espacio CIE LAB de la imagen de una gota de sangre se propone transformar la imagen (a) de la figura 2.3 al espacio CIE LAB. Dicha figura contiene las tres componentes del espacio CIE LAB.

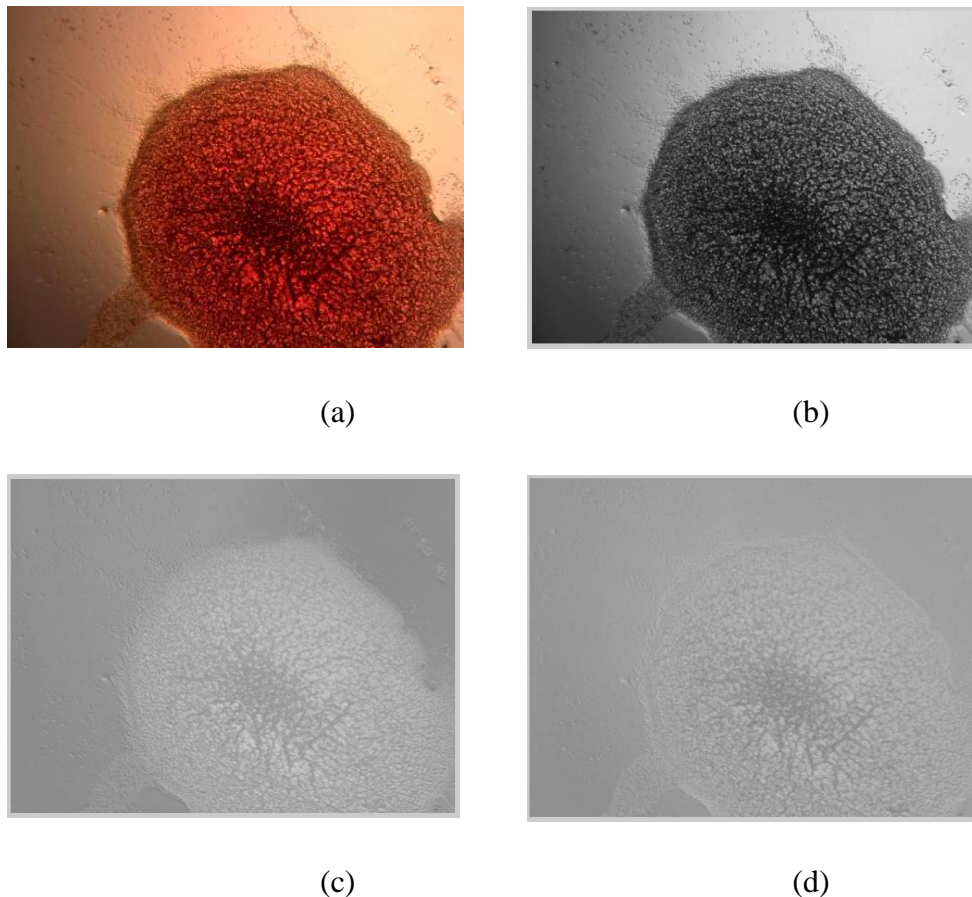


Figura 2.3 Imagen de una gota de sangre (a) descompuesta en sus componentes del espacio CIE LAB: la luminancia (b), el eje rojo verde (c) y el eje azul-amarillo (d)

2.1.3 Obtención de una imagen de grises mediante el análisis de componentes principales

Cuando se utiliza una sola componente de color en el procesamiento de la imagen original se está perdiendo información, ya que solo se utiliza una componente de las tres disponibles. Para considerar todas las características disponibles, se requiere de una combinación lineal de todas las componentes de color.

$$C = \alpha_R R + \alpha_G G + \alpha_B B \quad (2.1)$$

El valor de los pesos α_R , α_G , α_B determinará la combinación óptima. El proceso para obtener dichos pesos óptimos empieza con considerar un píxel “i” arbitrario. Cada píxel se considera como un vector de tres componentes (R_i , G_i , B_i). El siguiente paso es calcular los valores medios de cada componente.

$$\bar{R} = \frac{1}{N} \sum_i R_i \quad \bar{G} = \frac{1}{N} \sum_i G_i \quad \bar{B} = \frac{1}{N} \sum_i B_i \quad (2.2)$$

Se calcularán todas covarianzas y autocovarianzas para construir la matriz tridimensional de covarianzas. La matriz de covarianza también se llama matriz de dispersión.

$$C_{br} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (B_i - \bar{B})(R_i - \bar{R}) \quad (2.3)$$

$$\begin{pmatrix} c_{rr} & c_{rg} & c_{rb} \\ c_{gr} & c_{gg} & c_{gb} \\ c_{br} & c_{bg} & c_{bb} \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

Para obtener las características más importantes de la matriz de covarianza se calculan los autovectores y los autovalores de dicha matriz. La tarea posterior al cálculo es la de tomar el autovalor más grande y ver el autovector asociado. Dicho autovector consta de tres componentes que serán los valores de los pesos α_R , α_G , α_B . Usando dichos pesos se combinan linealmente las componentes de color y se obtiene una imagen en escala de grises, que contiene información de todo el espacio de color.

2.2 Métodos utilizados

2.2.1 Método del valor umbral. Otsu

Una herramienta central en aplicaciones de segmentación de imágenes es el método del valor umbral (Gonzalez, Woods, & Eddins, 2009). Es simple de implementar y rápido. El objetivo del método de Otsu es el de separar o extraer objetos y fondo. El resultado es una imagen binaria en la que cada píxel vale o cero o uno. Como punto de partida se toma el histograma de la imagen. El histograma indica la distribución de la intensidad de los píxeles en la imagen. Si en la imagen se diferencian dos zonas, una clara y otra oscura, esto se traduce en un histograma donde se aprecian también dos regiones. Los picos del histograma indican la presencia de zonas homogéneas, los valles establecen los umbrales de separación. Idealmente la imagen presentaría un valle profundo entre dos picos, cada pico representaría el fondo y los objetos respectivamente. En la realidad se pueden encontrar valles planos y/o enmascarados por ruido, consecuentemente, resulta más difícil para el método determinar una separación entre picos de manera automática. En el proyecto se trabaja con imágenes en las que la separación entre objetos y fondo es bastante clara como ilustra la figura 2.4. El que el umbral se denomina t y el nivel de gris i .

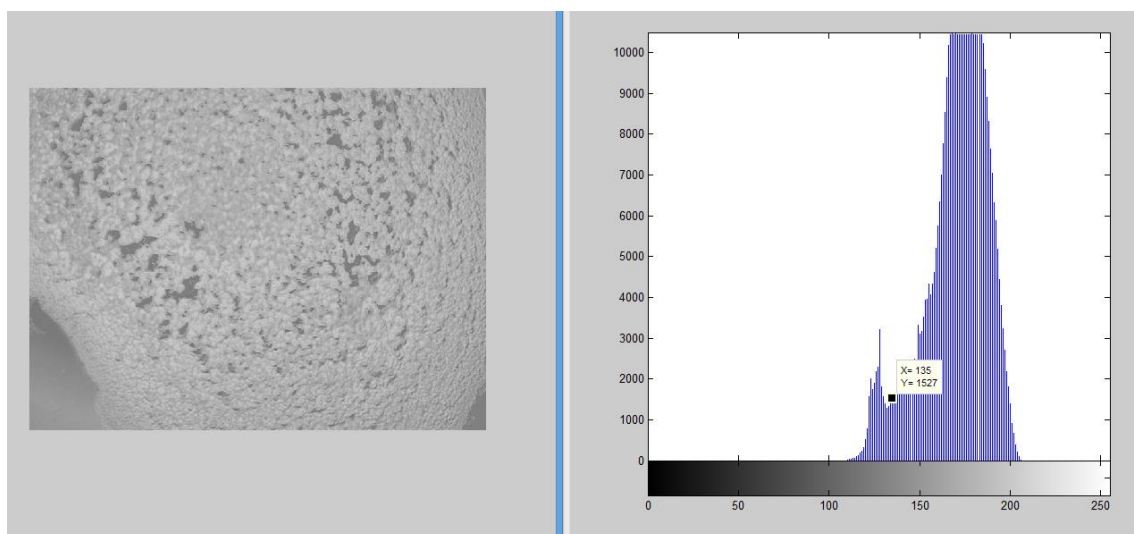


Figura 2.4 Imagen en escala de grises con su histograma a la derecha.

Consideremos que la imagen que se presenta en la figura 2.4 presenta L niveles de gris. Ahora se supone que se separan los píxeles en dos clases, la clase 1 y la clase 2. Una clase para objetos y otra para el fondo (IEEE, 1979). Se fija el umbral en el nivel t. El primer paso es el cálculo de las probabilidades de cada clase y sus respectivos valores medios.

$$q_1(t) = \sum_{l=0}^t P(l) \quad (2.9) \quad \mu_1(t) = \frac{1}{q_1(t)} \sum_{l=0}^t l P(l) \quad (2.11)$$

$$q_2(t) = \sum_{l=t+1}^{L-1} P(l) \quad (2.10) \quad \mu_2(t) = \frac{1}{q_2(t)} \sum_{l=t+1}^{L-1} l P(l) \quad (2.12)$$

Se calculan las varianzas de ambas clases

$$\sigma_1^2(t) = \frac{1}{q_1(t)} \sum_{l=0}^t (l - \mu_1(t))^2 P(l) \quad (2.13)$$

$$\sigma_2^2(t) = \frac{1}{q_2(t)} \sum_{l=t+1}^{L-1} (l - \mu_2(t))^2 P(l) \quad (2.14)$$

Para evaluar el rendimiento del método se debe definir un discriminante lineal, en este caso la separabilidad entre clases (λ) que es el cociente (2.15) entre la varianza de clases (σ_B^2) y la varianza interna (σ_w^2).

$$\lambda = \frac{\sigma_B^2(t)}{\sigma_w^2(t)} = \frac{q_1(t)(\mu_1(t) - \mu_T)^2 + q_2(t)(\mu_2(t) - \mu_T)^2}{q_1(t)\sigma_1^2(t) + q_2(t)\sigma_2^2(t)} \quad (2.15)$$

Ahora se debe resolver un problema de optimización y tratar de encontrar un valor para el umbral (t) tal que maximice la separabilidad entre clases (λ). El umbral óptimo que maximiza λ es el mismo que maximiza σ_B^2 . Además siempre se cumple que la varianza total ($\sigma_T^2 = \sigma_w^2 + \sigma_B^2$) se mantiene constante.

$$\sigma_B^2(t^*) = \max_{1 \leq t < L-1} \sigma_B^2(t) \quad (2.16)$$

$$\begin{aligned} \sigma_B^2(t) &= q_1(t)(\mu_1(t) - \mu_T)^2 + q_2(t)(\mu_2(t) - \mu_T)^2 = \\ &= q_1(t)q_2(t)(\mu_1(t) - \mu_2(t))^2 \end{aligned} \quad (2.17)$$

La selección del umbral automático en un histograma de niveles de gris se ha abordado desde el punto de vista del análisis discriminante. De hecho el umbral óptimo (t) es el que maximiza el discriminante lineal. Los píxeles por encima del nivel t se corresponderán con la gota y los píxeles por debajo se corresponderán con el fondo. Los principales problemas de este método, suelen ser la presencia de un fondo no uniforme o el ruido en la imagen. En las imágenes que se obtienen con un microscopio no suelen ser imágenes ruidosas, pero si puede haber cambios de iluminación en el fondo, lo cual conduzca a tener un fondo no uniforme.

El método de Otsu, trata al histograma normalizado como una función densidad de probabilidad discreta. Se divide el histograma en dos partes, se calcula media y varianza para cada parte de manera iterativa. La iteración se detiene cuando se maximiza el valor de la varianza que hay entre las dos clases o zonas. Como el histograma está normalizado, se obtiene un valor del umbral entre 0 y 1. Si se pretende utilizar este umbral, en una imagen en escala de grises se deberá multiplicar por 255.

En el presente proyecto se exploraron varias posibilidades, entre ellas la de escoger a priori un umbral global. Los umbrales globales escogidos a priori, solamente son útiles cuando en el histograma se ven dos zonas claramente diferenciadas y además dichas zonas se repiten en todas las imágenes. De todos modos si se diferencian dos zonas, el programa decidirá correctamente un umbral que separe las dos zonas de manera automática, no sería necesario que lo introdujese el usuario. Otra posible opción en la que se trabajó fue implementar un entorno gráfico, como una “guide” de MATLAB[®]. En la “guide” se implementó una barra deslizante, mediante la cual poder escoger el umbral, de manera manual. Finalmente se optó por hacer uso de una de las funciones que proporciona la librería de MATLAB[®]. La función “graythresh” fija un umbral sobre el histograma de la imagen aplicando el método de Otsu de manera automática.

2.3 Operaciones morfológicas

Las operaciones de dilatación y erosión son fundamentales en el procesado morfológico de imágenes. Muchos algoritmos están basados en estas operaciones. En una operación morfológica, se toma un pixel y alrededor de éste se hace un procesado no lineal basado en operaciones de máximos y mínimos.

La dilatación es una operación que hace crecer o engorda los objetos presentes en una imagen binaria. El modo en que estos objetos engordan es controlado por un elemento estructurante. Se suelen emplear elementos estructurantes que sean simétricos. La dilatación además de engordar los objetos, si hay objetos cercanos puede unirlos, reduce y elimina agujeros además los entrantes estrechos son rellenados. En el cálculo de la dilatación se desplaza el elemento estructurante transpuesto y se calcula el supremo de los píxeles bajo el mismo.

$$Y = \delta_B (X) = \sup\{X_b, b \in B\} = \{B_x, x \in X\} \quad (2.18)$$

$$\delta_B (X) = X \oplus B \quad (2.19)$$

La erosión es una operación que encoge o adelgaza los objetos presentes en una imagen binaria. Es la operación dual a la dilatación. El modo en que estos objetos adelgazan es controlado por un elemento estructurante. La erosión además de adelgazar los objetos si hay objetos pequeños pueden desaparecer y los salientes estrechos son eliminados. En el cálculo de la erosión se desplaza el elemento estructurante y se calcula el ínfimo de los píxeles bajo el mismo.

$$Y = \varepsilon_B (X) = \inf\{X_b, b \in B^*\} = \{z, B_z \in X\} \quad (2.20)$$

$$\varepsilon_b (X) = X - B \quad (2.21)$$

Los elementos estructurantes son matrices de ceros y unos que pueden adoptar forma de diamante, disco, línea o rectángulo. Según la forma del elemento estructurante la operación morfológica tiene un efecto u otro. En MATLAB[®] se pueden construir los elementos estructurantes haciendo uso de la función “strel”, que recibe como parámetro la forma deseada del elemento estructurante. Las posibles formas van desde el cuadrado (square) hasta el disco (disk).

2.3.1 Apertura de imágenes.

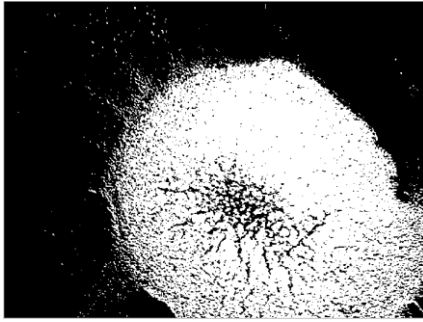
La operación de apertura es una combinación de las operaciones de dilatación y erosión (Gonzalez, Woods, & Eddins, 2009). Para realizar una apertura primero se realiza una erosión y a continuación una dilatación. Se puede decir que la apertura es la dilatación de una erosión (2.22).

$$\varphi_B(X) = \varepsilon_B(\delta_B(X)) \quad (2.22)$$

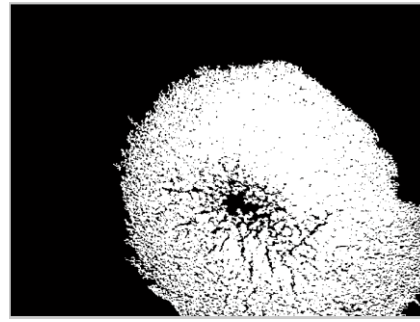
La apertura elimina salientes estrechos y objetos más pequeños que el elemento estructurante, también suaviza contornos, rompe pequeñas uniones y elimina pequeñas protuberancias. Es una operación útil para simplificar detalles y eliminar huecos.

La librería de MATLAB[®] contiene funciones ya programadas que realizan operaciones morfológicas, no obstante, estas operaciones se realizan sobre imágenes en blanco y negro, imágenes binarias que solo tienen valor cero o uno. En el presente proyecto se aplica la apertura sobre una imagen en escala de grises, perteneciente a un espacio de color. La imagen que se obtiene será umbralizada mediante Otsu. Cabe recordar que el método de Otsu ofrece como resultado una imagen en blanco y negro. MATLAB[®] cuenta con funciones que realizan operaciones morfológicas de apertura pero sobre imágenes binarias, que son las que se obtienen después de umbralizar con Otsu. Estas funciones se incluyen en MATLAB[®] y son fácilmente reconocibles porque empiezan por “bw”, que es la abreviatura de imagen en blanco y negro. En concreto resulta de interés el uso de la función “bwareaopen”.

Para mostrar el efecto de realizar operaciones de apertura sobre imágenes binarias, se utilizará como ejemplo una imagen de una gota de sangre coagulada. Se presenta en la figura 2.5 el resultado de aplicar una operación de apertura sobre una máscara obtenida con el método del valor umbral. El valor mil de la apertura es elevado para que se conserven los objetos grandes. Nótese que se ha actuado sobre el fondo de la imagen eliminando los objetos pequeños del mismo.



(a)

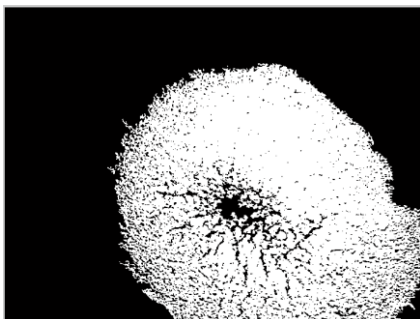


(b)

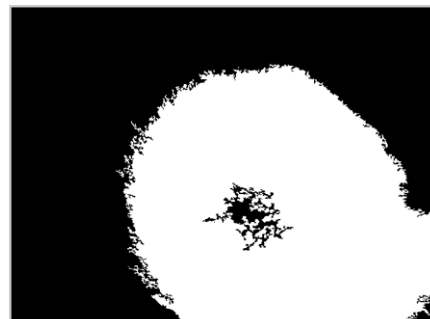
Figura 2.5 Máscara obtenida con el método de otsu (a) y el resultado de aplicar una operación de apertura de valor mil (b)

Apertura de la imagen complementaria.

Realizar una apertura sobre la imagen complementaria permitirá rellenar los huecos que hayan podido quedar en el interior de la gota (figura 2.6). La apertura de la imagen complementaria es un cierre de la misma.



(a)



(b)

Figura 2.6 Resultado de aplicar una operación de apertura de valor mil (a) y el efecto que se produce al realizar un cierre de valor mil (b)

2.4 Separar gota y fondo.

No se puede pretender detectar las manchas blancas presentes en la gota si antes no se ha separado correctamente el fondo y la gota. Se ha experimentado con diferentes métodos, diferentes entradas y se han analizado los resultados obtenidos. Existen distintos obstáculos cuando se procede a la separación del borde y gota, el obstáculo principal es la iluminación no uniforme. Además otro punto a tener en cuenta, es el hecho que las manchas que buscamos detectar y el borde tienen el mismo color, similar al blanco. Si no se separa correctamente el borde se puede llegar a la confusión de considerar el fondo como una mancha blanca. No es admisible considerar el fondo en el cómputo del ratio blanco rojo de la gota de sangre. De manera intuitiva, si se pierden todas las manchas blancas se obtiene una imagen de la que de manera automática, se puede separar gota y fondo. El procedimiento que se aplicará será: realizar una apertura a la imagen con la finalidad de abrir las manchas y que se fusionen con la gota. La apertura de la imagen implica el uso de una operación morfológica de erosión, seguida por una dilatación. La apertura está pensada para la eliminación de pequeños huecos. Parece que la gota presente huecos en su interior. Mediante esta abstracción, se pretende abarcar el problema de cómo identificar toda la gota. El operador morfológico de apertura de imágenes resulta interesante si lo que se pretende es rellenar dichos huecos. Si se pretende obtener un procesado rápido y eficiente, resulta inadmisibles realizar esta operación morfológica a todas las componentes de todos los espacios de color estudiados, que son más de cinco. Con determinar la separación fondo gota en una de las imágenes en escala de grises, serviría para todas las demás.

Para ilustrar el procedimiento se hará uso de tres diagramas que mediante tres pasos explican el método para separar gota y fondo. En el primer paso (figura 2.7) del proceso se parte de la imagen en color de la gota de sangre. La imagen en color se transforma al espacio CIE LAB obteniéndose tres imágenes en escala de grises. En el proceso descrito tan solo se escoge el eje rojo verde del espacio CIE LAB y se le aplica el método de Otsu.

Automatización del análisis de la imagen de una gota de sangre coagulada

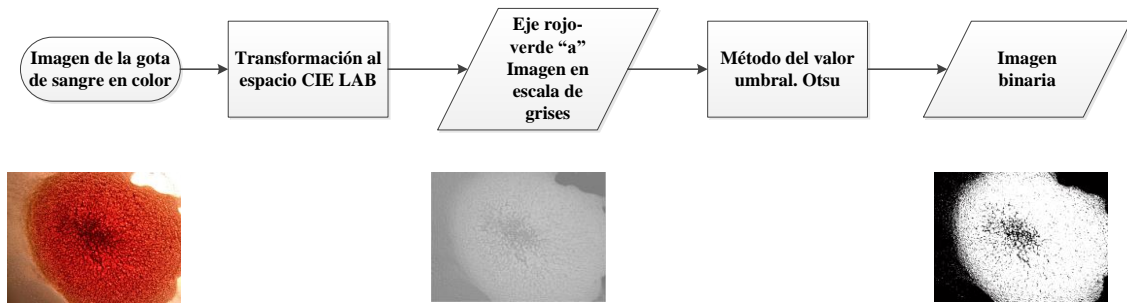


Figura 2.7 Primer paso en el proceso de separar gota y fondo

En el segundo paso del proceso a la imagen binaria se le realizan dos operaciones morfológicas, una apertura seguida de un cierre.

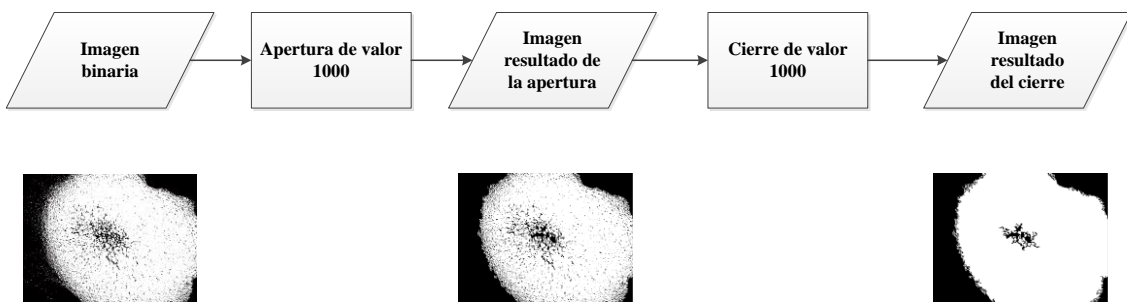


Figura 2.8 Segundo paso en el proceso de separar gota y fondo

El tercer y último paso del proceso (figura 2.9) empieza con la imagen resultado del cierre a la cual se le rellenan los huecos. Una vez rellenos los huecos ya se tiene una imagen que se denomina máscara gota-fondo porque marca con blanco o valor uno la gota de sangre.

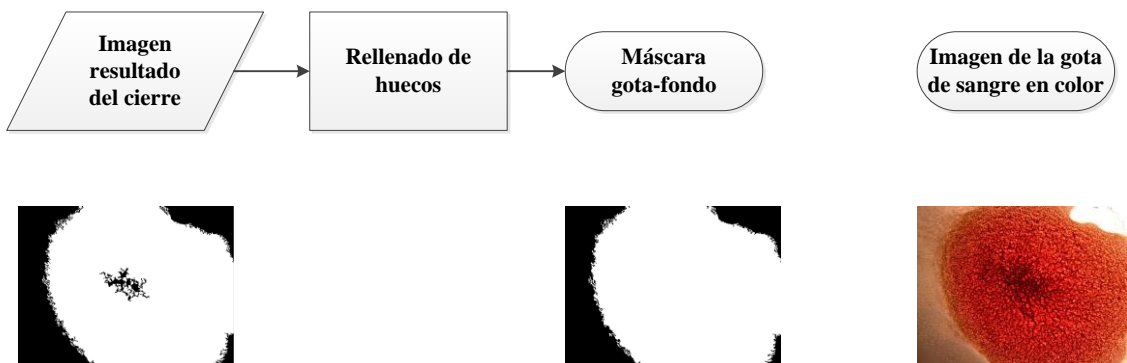


Figura 2.9 Tercer paso en el proceso de separar gota y fondo

2.5 Detección de manchas blancas

Una vez se ha definido con exactitud la gota, es decir la región de interés, el paso ulterior es la detección de las manchas blancas presentes en la gota. En el punto anterior, el punto 2.4, se explica el proceso para obtener la máscara que separa gota y fondo. La detección de manchas blancas se resume a aplicar el método del valor umbral a la imagen, pero solamente sobre el interior de la gota de sangre dejando fuera el fondo de la misma. Para aplicar el método de Otsu (Gonzalez, Woods, & Eddins, 2009) basta con llamar a la función de MATLAB® “graythresh”. Se obtiene un nivel umbral que es el que se usará para pasar la imagen de entrada en escala de grises, a una imagen de blanco y negro. La imagen en blanco y negro, también llamada imagen binaria, marcará con valor uno o color blanco un pico del histograma y con valor cero o negro el otro pico del histograma. En las imágenes que se analizan en el PFC, el resultado de aplicar el valor umbral es una imagen, donde las manchas blancas tienen valor uno o color blanco y el resto de la imagen valor cero o negro. En la figura 2.10 se halla la máscara que marca las manchas blancas de la imagen analizada.

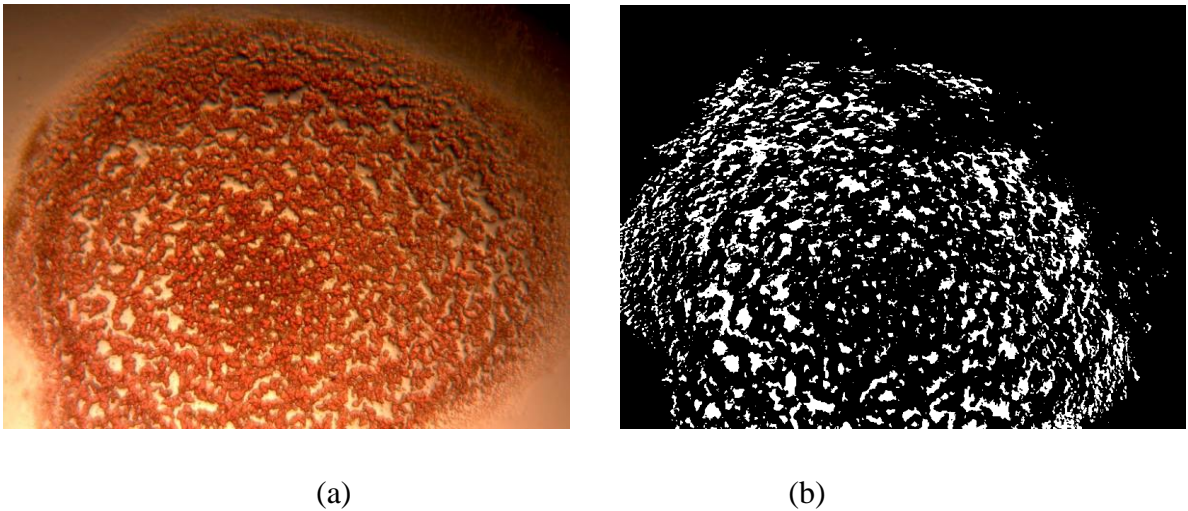


Figura 2.10 Imagen de una gota de sangre (a) y la máscara que marca en color blanco las manchas de la gota (b)

A partir de la máscara obtener el área que existe de blanco consiste en sumar todos los píxeles de esta máscara (figura 2.10). La máscara solo puede tener valor o cero o uno, así que si al valor máximo, que es uno, se le resta el valor de la máscara, el resultado

será la obtención de una máscara que marca todo aquello de color rojo en la gota. Esta nueva imagen binaria obtenida, permite calcular la cantidad de rojo presente en la gota sumando todos los píxeles con valor uno. La relación entre la cantidad de blanco y de rojo es lo que en los resultados se llamará ratio. En la representación de las imágenes resultado, se hará uso de la función “imoverlay” (Eddins, 2012) que permite solapar la máscara sobre la imagen original. En este solape la máscara adopta un color, por ejemplo verde y de este modo se puede determinar visualmente si dicha máscara está detectando correctamente las manchas blancas.

2.5.1 Procesado de la imagen mediante interfaz gráfica

El programa MATLAB[®] dispone de una herramienta llamada GUI Builder (Graphical user interface builder), que ayuda en la tarea de la creación e implementación de interfaces gráficas (GUI). Mediante esta herramienta, se puede elegir dónde situar los menús desplegables, botones, barras deslizantes, así como zonas dónde dibujar resultados. Para abrir esta herramienta, basta con teclear “guide” en la línea de comandos de MATLAB[®] y aparecerá una ventana como la de la figura 2.11.

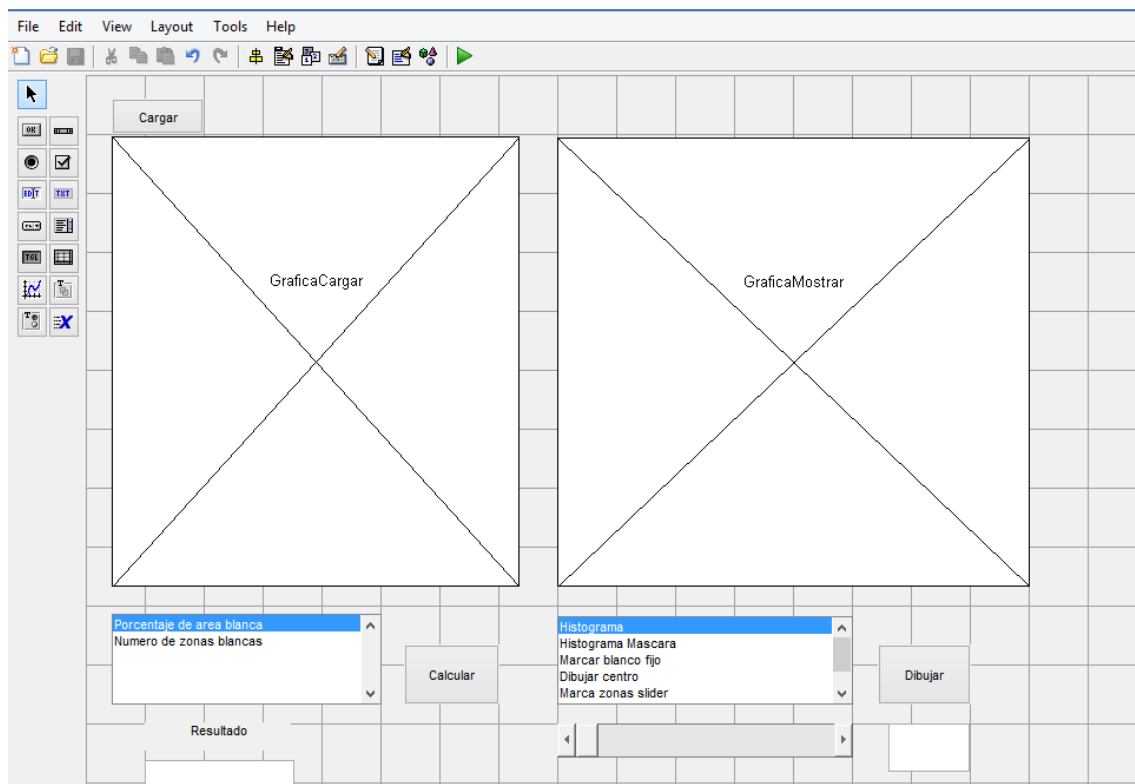


Figura 2.11 Entorno de desarrollo de interfaces gráficas de usuario (GUI)

Una vez creada la interfaz, se generan dos archivos. Un archivo .fig que contiene la información de los objetos de la interfaz. Un segundo archivo .m, que contiene el código con las variables y acciones que realizará la interfaz. Cuando se añade un nuevo botón en la interfaz (GUI), automáticamente en el archivo .m se crea la función “callback” asociada a dicho botón. Al pulsar el botón, se ejecutará aquello que indique su “callback”. Existe una estructura llamada “handles”, que es dónde se guardan los datos de los objetos. En las listas o menús existen variables almacenadas dentro de la estructura “handles”, que informan al programador la opción de la lista o del menú que está seleccionada.

La interfaz diseñada en el presente proyecto, cuenta con un botón cargar (figura 2.12), el cual al ser pulsado, permite al usuario seleccionar una imagen que será dibujada en la parte izquierda de la interfaz. La parte inferior cuenta con dos listas, una para indicar cálculos a realizar y la otra lista para realizar operaciones con la imagen. Una vez seleccionada en la lista la opción deseada, la operación será realizada al pulsar los botones correspondientes. El resultado de la operación indicada será dibujado en la parte derecha de la interfaz (figura 2.12). También se ha implementado una barra deslizante para poder seleccionar un umbral global sobre la imagen cargada.

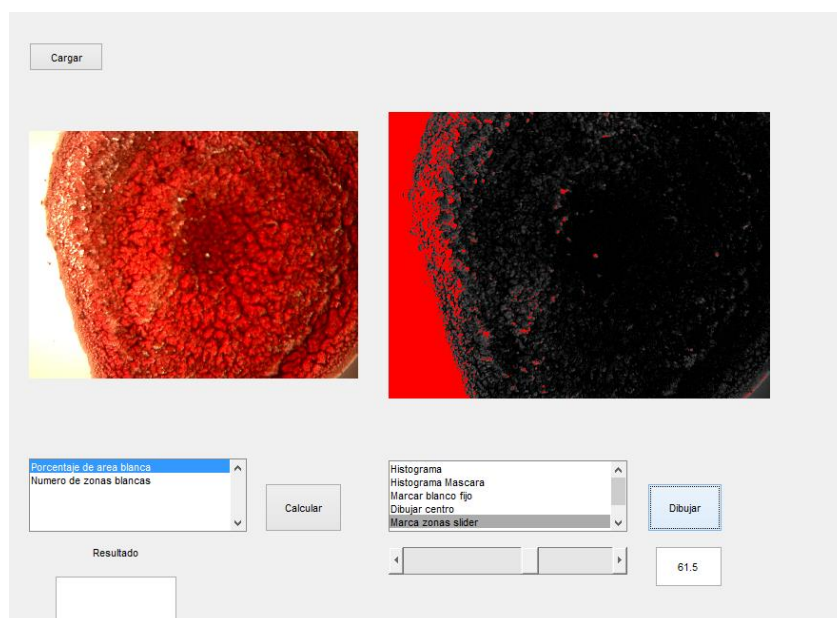


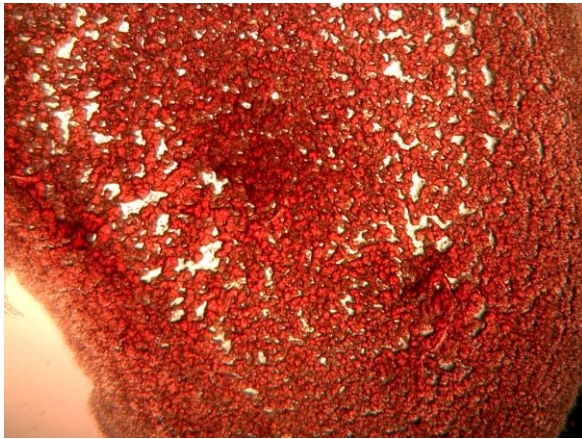
Figura 2.12 Ejemplo del aspecto de la interfaz gráfica (GUI) diseñada

3. Resultados

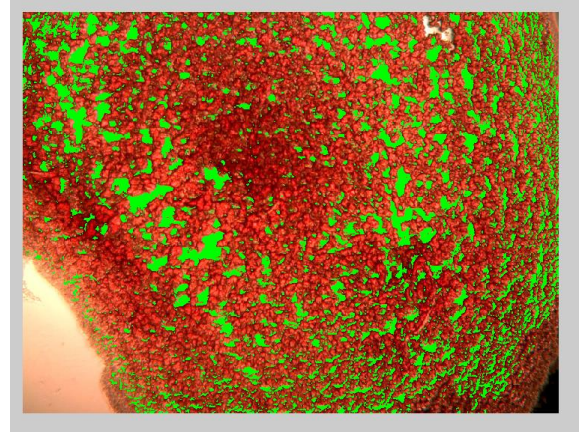
Después de describir los métodos que se han utilizado en el PFC, se han recopilado los resultados desglosados de la presente memoria en los siguientes puntos:

- Punto 1: Comparación en la detección automática de manchas blancas, para un patrón normal y para un patrón anormal.
- Punto 2: Puntos débiles del método.
- Punto 3: Exportación de los resultados a una hoja de cálculo.
- Punto 4: Implementación de una interfaz gráfica para la detección automática de manchas blancas.

En el apartado de resultados, se presenta cómo se han tratado de alcanzar los objetivos propuestos y el nivel de eficacia obtenido. Según los objetivos del proyecto, el resultado esperado de procesar la imagen de la gota de sangre, es la obtención de una imagen que marque en color blanco las manchas presentes en la gota. Para que resulte más gráfica la representación de los resultados, se ha decidido pintar en color verde la máscara que se ha obtenido, sobre la imagen original (Eddins, 2012). Haciendo uso de la máscara que marca las manchas blancas, se obtiene la relación blanco rojo. Se busca estudiar si se puede definir un umbral, de este ratio, a partir del cual considerar un patrón presente en la gota como normal. Este ratio también puede resultar interesante en la determinación de la evolución de un tratamiento. Queda por determinar si el hecho que entre dos muestras a un mismo paciente, el ratio disminuya o aumente, tiene correlación con el estado de salud.



(a)



(b)

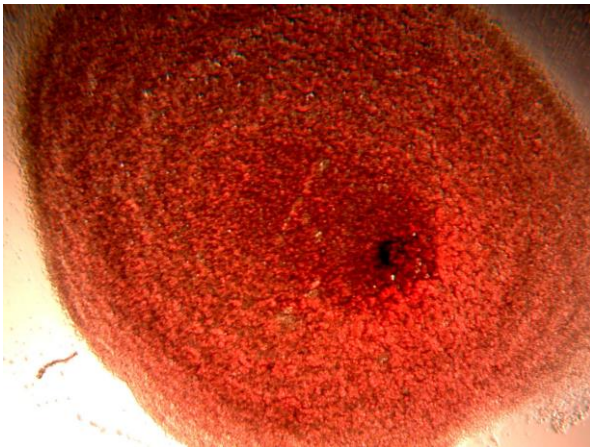
Figura 3.1 Imagen de una gota de sangre coagulada (a) y sus manchas marcadas en color verde (b)

La máscara resultado ha sido dibujada en verde sobre la imagen original. En este caso, se observa que objetivamente se han alcanzado los objetivos que se pretendía. La imagen presenta una cantidad importante de manchas blancas. Las manchas que tengan un solo pixel, también computarán como objeto. El ratio blanco rojo de la gota y el número de objetos o manchas que tiene la gota es:

Ratio= 20.88

Número de objetos= 3291

El resultado que se muestra (figura 3.1), es el resultado final. Para separar la gota del fondo se precisa de resultados intermedios, como son la máscara que delimita la gota. El procedimiento para obtener estas máscaras, se encuentra detallado en el punto 2.4. Para ilustrar la separación entre gota y fondo, se pasará a procesar la imagen de la figura 3.2.



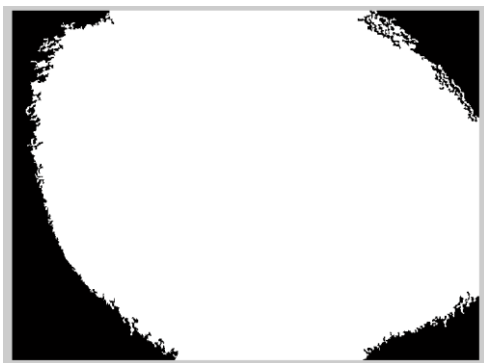
(a)



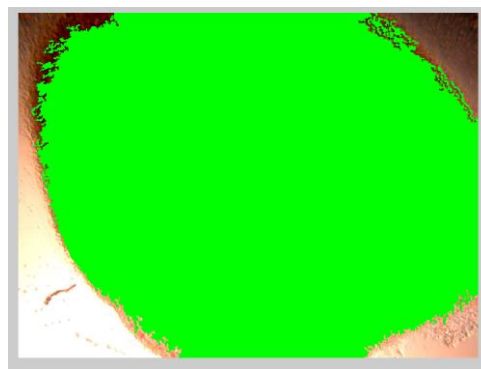
(b)

Figura 3.2 Imagen de una gota de sangre coagulada (a) y el eje rojo-verde del espacio Lab (b)

El procesado de esta imagen, mediante operaciones de apertura, nos lleva a obtener la máscara de la gota. La máscara (figura 3.3) delimita lo que es gota en color blanco y marca en color negro lo que es fondo. Al solaparse con la imagen original se aprecia mejor como prácticamente, se ha seleccionado toda la gota.



(a)



(b)

Figura 3.3 Máscara que marca con color blanco la gota (a) y la superposición de dicha máscara sobre la imagen original (b)

3.1 Comparación normal vs anormal.

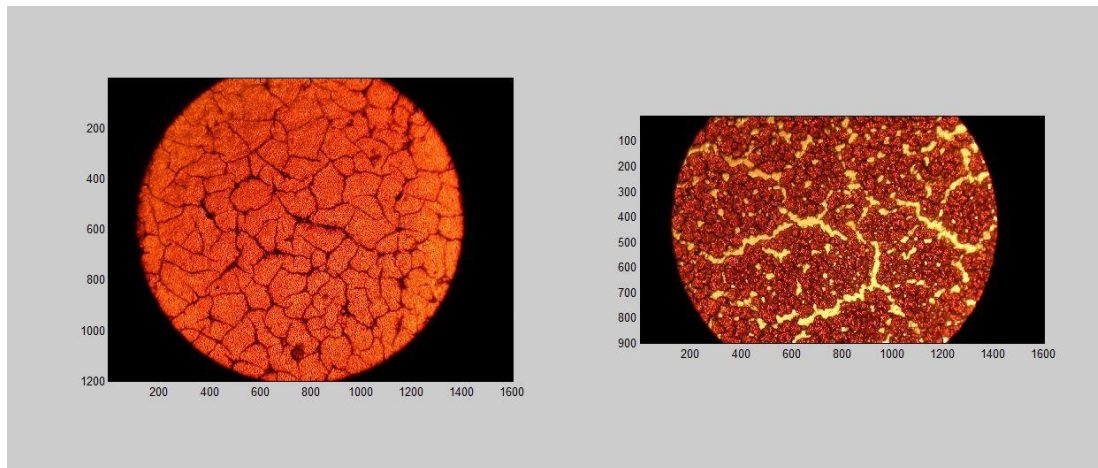
En el punto 1.2 se habla del estado del arte del análisis de gotas de sangre donde se reconocen patrones normales o sanos y patrones anormales o enfermos. Se analizarán parejas de imágenes de gotas coaguladas. Como referencia, se toman dos tipos de imágenes:

- Imagen con poca cantidad de rojo, la cual se cree que corresponde con un patrón normal.
- Imagen con una cantidad apreciable de blanco, la cual se cree que corresponde con un patrón anormal o positivo.

Cuanta más cantidad de manchas blancas y de mayor tamaño, se considerará que la gota se corresponde con un patrón anormal.

3.1.1 Imágenes en campo oscuro.

Para la comparación, resulta importante que ambas imágenes sean similares. Ambas están inventanadas por un círculo de color negro. El círculo ha sido eliminado en el análisis mediante un umbral fijo. La aparición de este halo negro, es debido al uso de una especie de diafragma en la captura de imágenes usando el microscopio en su opción de campo oscuro. En la figura 3.4 se presentan las dos imágenes a comparar. A la izquierda, en la figura 3.4 la gota coagulada con un patrón normal y a la derecha, una gota coagulada con un patrón anormal.

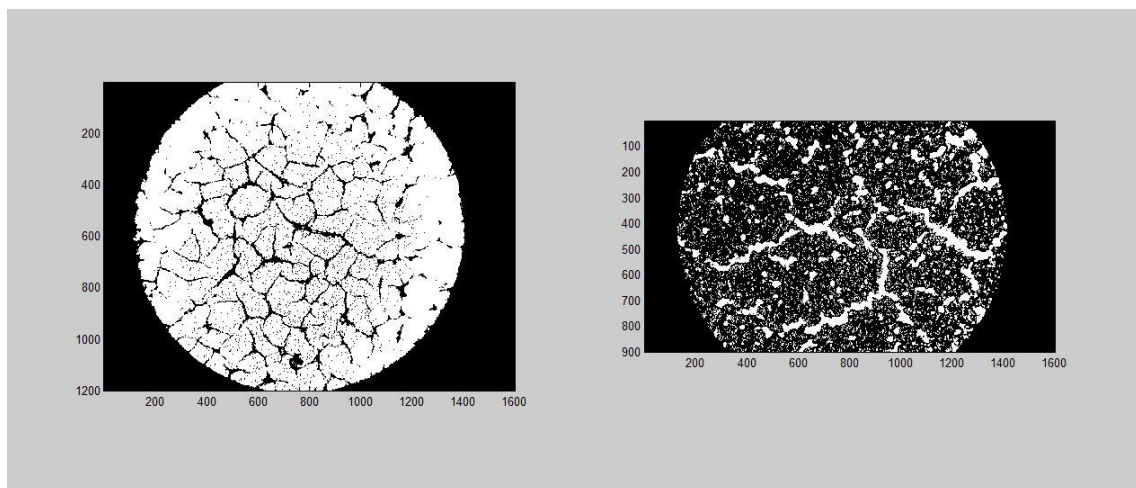


(a)

(b)

Figura 3.4 Gota con un patrón normal (a) y otra gota con patrón anormal (b). Muestras tomadas en campo oscuro

Se analizará solamente lo que haya contenido dentro del círculo negro. A la luminancia de la imagen se le aplica un umbral automático mediante el método de Otsu. Se obtiene una imagen (figura 3.5) con dos posibles valores: Valor uno para aquello blanco y valor cero para aquello rojo.

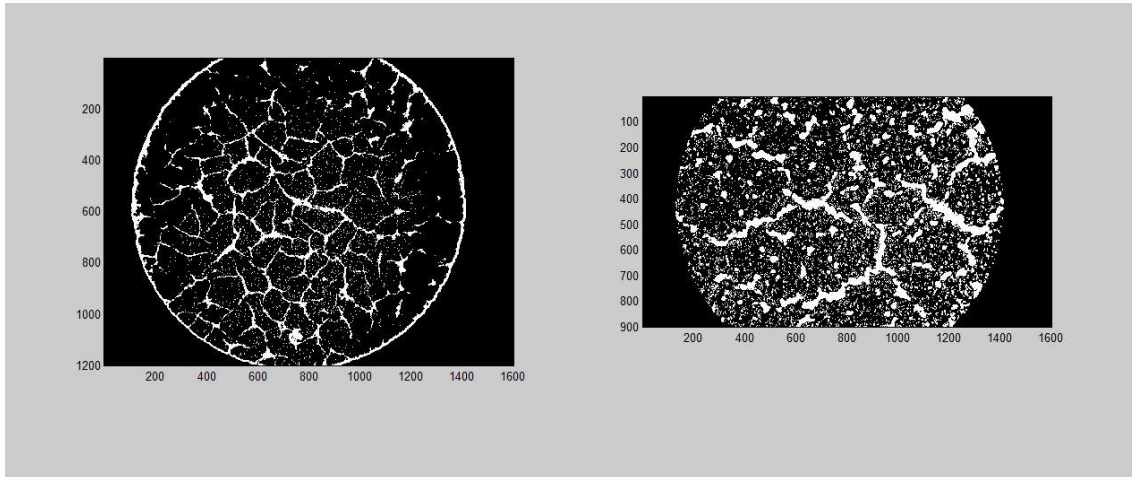


(a)

(b)

Figura 3.5 Máscara del patrón normal (a) y del patrón anormal (b)

Después de aplicar el método, se ve que en la primera imagen, la de la izquierda (figura 3.5), el programa ha decidido asignar el valor uno a aquello que presenta color rojo. Como se quiere que lo blanco, tenga valor uno, tomamos la imagen complementaria (figura 3.6).



(a)

(b)

Figura 3.6 Máscara transpuesta del patrón normal (a) y máscara del patrón anormal (b)

Tanto de la primera como de la segunda máscara (figura 3.6), se suman todos sus valores para obtener el área de la máscara. El área de la máscara, se corresponderá con el área de las manchas blancas de la imagen. El resultado obtenido se relaciona con el área del color rojo y se obtienen los siguientes ratios.

Ratio Normal= 15.8488

Ratio Anormal= 39.0235

Se destaca el hecho que en el patrón normal no aparecen manchas blancas y en cambio se tiene un ratio blanco rojo del 15%. El análisis de este tipo de imágenes ha resultado sencillo, por el hecho de estar enventanadas dentro de un círculo negro y no presentan fondo. Al ya haber una delimitación clara de la gota en sí no es necesario realizar las operaciones morfológicas de apertura. De todos modos, es posible que dentro de la ventana se observe parte del fondo. En ese caso, la manera de proceder sería eliminar el halo negro y posteriormente con operaciones de apertura, eliminar el fondo. El caso mencionado es un caso particular y no ha sido estudiado, debido a las pocas imágenes que se disponían de gotas de sangre tomadas en campo oscuro.

3.1.1 Imágenes en campo claro.

La mayor parte de las imágenes con las que se ha trabajado y las de mayor resolución eran las imágenes tomadas en campo claro. En el análisis de los resultados se estudia la eficacia en determinar las manchas blancas de la gota, bajo diferentes imágenes de entrada. Se analizará la pareja de imágenes de la figura 3.7, considerando que la imagen de la izquierda se corresponde con un patrón normal o negativo y la imagen de la derecha con un patrón anormal o positivo.

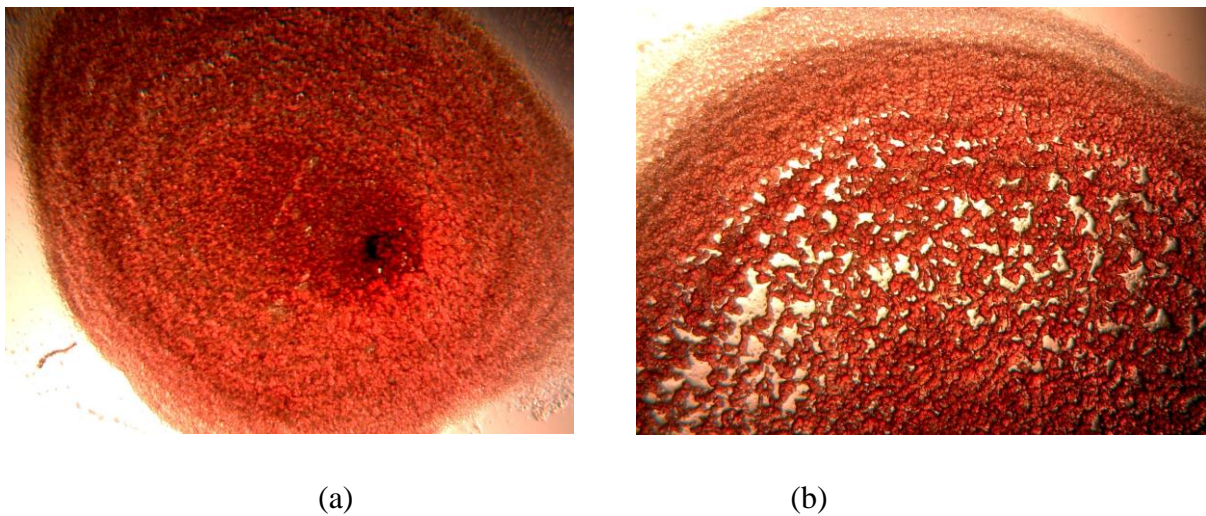
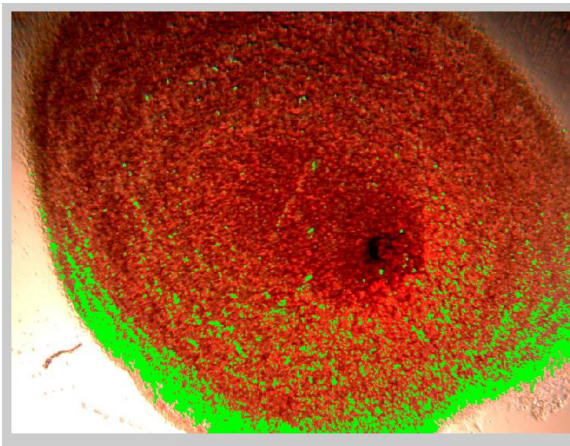


Figura 3.7 Gota con un patrón normal (a) y otra gota con patrón anormal (b). Muestras tomadas en campo claro

Ambas imágenes serán transformadas a los dos espacios de color bajo estudio, posteriormente se aplicará la metodología explicada en el punto 2. Debajo de cada imagen se indican los resultados obtenidos tanto para el ratio blanco rojo como para el número de objetos. Se comentan los resultados y con qué imágenes de entrada se obtiene mayor precisión.

3.1.1.1 Luminancia

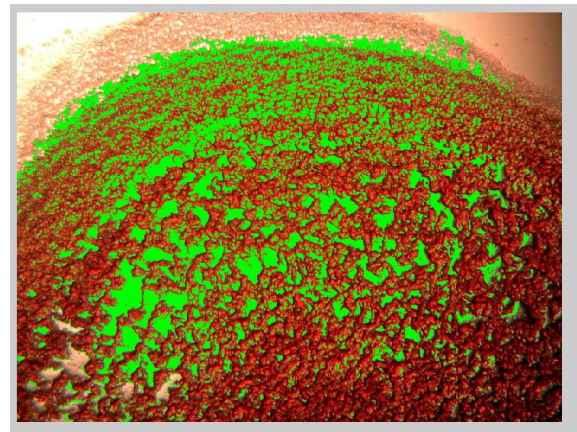
El ojo humano presenta superficies fotosensibles especializadas en detectar la luz de una imagen. La luminancia de una imagen trae consigo mucha información. El ojo humano es más sensible a los detalles de luminosidad que a los de color. En los resultados (figura 3.8) se aprecia que cuando se utiliza la luminancia como entrada se detecta hasta el más mínimo punto blanco. El ratio obtenido para el patrón normal es elevado. Se está detectando como blanco la decoloración de la gota, cuando se acerca al borde.



Ratio= 9.367

Numero de objetos= 1970

(a)



Ratio= 25,458

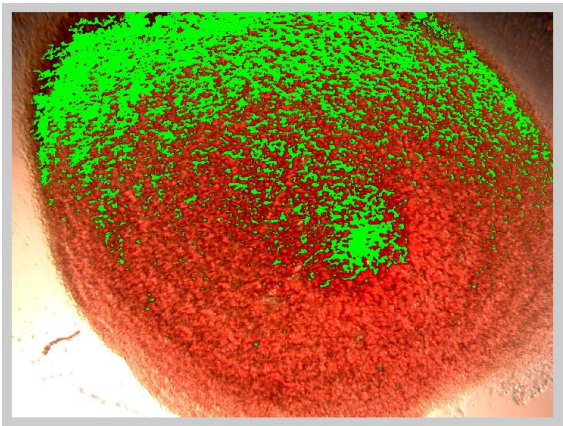
Numero de objetos= 4170

(b)

Figura 3.8 Se toma la luminancia como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.1.1.2 Componente roja

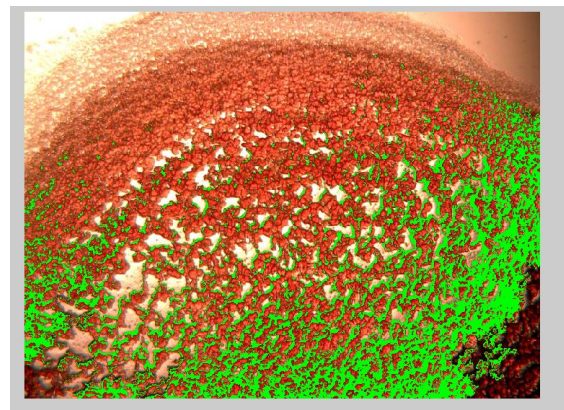
La mayor parte de la imagen es roja, así que se prevé que la componente roja del espacio RGB, no será una imagen de entrada correcta. A partir de los resultados obtenidos, se descarta esta entrada. A priori, se observa en la figura 3.9, que ambas imágenes tienen una cantidad de blanco muy dispar, y en cambio, el método interpreta que son similares. Los ratios entre ambas imágenes son similares, el método del valor umbral no proporciona los resultados deseados cuando la entrada es la componente roja.



Ratio= 22.731

Numero de objetos= 1306

(a)



Ratio= 20.483

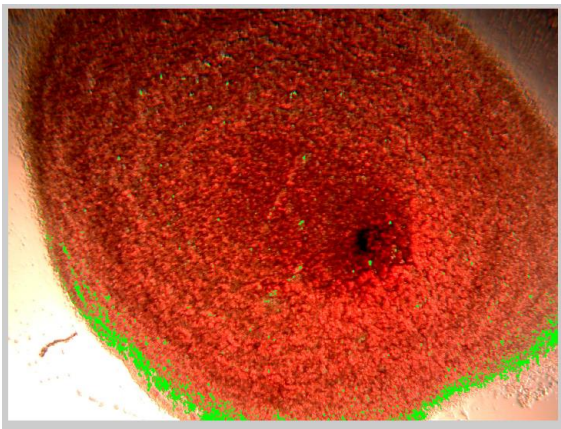
Numero de objetos= 1789

(b)

Figura 3.9 Se toma la componente roja como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.1.1.3 Componente verde

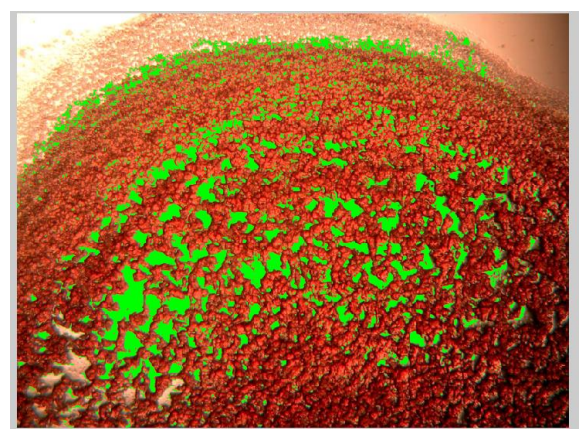
La naturaleza de las imágenes sugiere que la componente verde será una buena entrada. ¿Por qué resulta interesante la componente verde en una imagen que es prácticamente roja y blanca? Porque este hecho, condiciona que los objetos se hallen muy diferenciados, y al método del valor umbral le resulte fácil separar en el histograma los dos picos de máxima varianza. Efectivamente, la componente verde es una entrada correcta, para detectar las manchas blancas presentes en la gota. En la figura 3.10 se ve como la detección que aparece en el borde es menor que en la luminancia.



Ratio= 1.838

Numero de objetos= 654

(a)



Ratio= 11.438

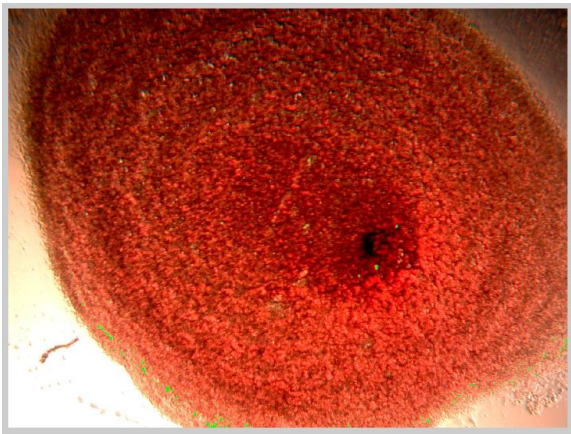
Numero de objetos= 2774

(b)

Figura 3.10 Se toma la componente verde como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.1.1.4 Componente azul

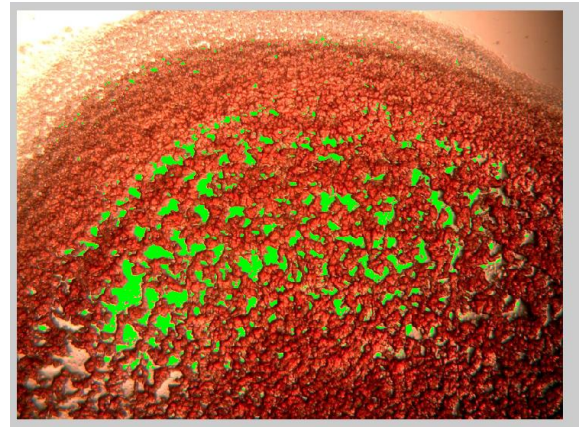
Siguiendo con el razonamiento del punto anterior, la componente azul es también una imagen de entrada de notable interés. Es mucho más conservadora y detecta manchas blancas fácilmente observables. Las manchas de la parte inferior izquierda de la imagen (b) en la figura 3.11 no han sido detectadas. Este fallo se comete en la separación de la gota y el fondo produciendo una exclusión de ciertas manchas blancas. Dicho fallo se comenta en el punto 2 de los resultados. Que se detecten pocos objetos, es un modo de cometer pocos errores cuando se extraigan características posteriormente. Parece que el análisis de la componente azul, sea con la que se obtiene una mayor precisión.



Ratio= 0.105

Numero de objetos= 149

(a)



Ratio= 5.300

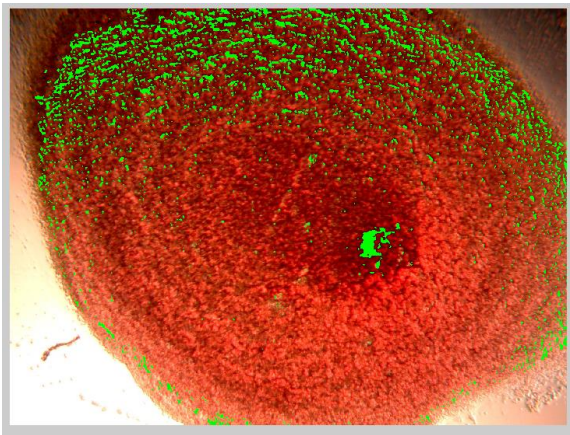
Numero de objetos= 889

(b)

Figura 3.11 Se toma la componente azul como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.1.1.5 Eje "a"

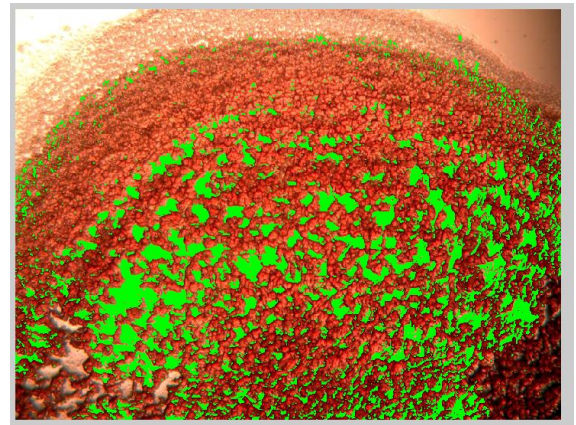
El eje "a" indica la posición de la luminancia entre el rojo y el verde. Como la imagen presenta poco verde y mucho rojo, el resultado obtenido es bastante detallado aunque no del todo satisfactorio. En algunos casos resulta incluso excesivo. La diferencia entre el ratio del patrón normal y el anormal es notable (figura 3.12) aunque el número de objetos sea similar. De nuevo, en el patrón normal se detectan más de dos mil objetos, y en cambio la imagen no presenta manchas.



Ratio= 7.047

Numero de objetos= 2270

(a)



Ratio= 25.165

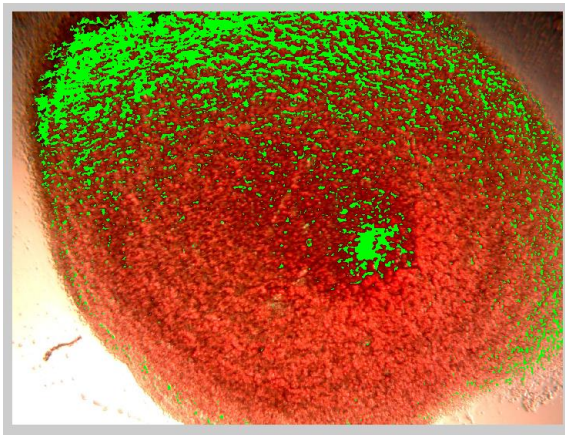
Numero de objetos= 2442

(b)

Figura 3.12 Se toma el eje "a" como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.1.1.6 Eje b

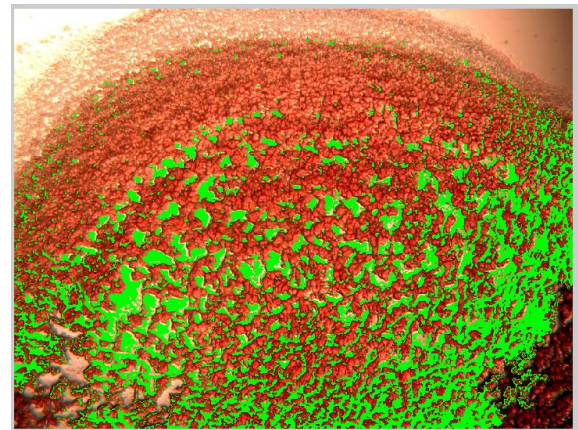
El eje “a” indica la posición de la luminancia entre el azul y el amarillo. Las imágenes analizadas no presentan tonalidades ni azules ni amarillas, aplicar el método sobre este eje se prevé de poca utilidad. El resultado obtenido no es satisfactorio, porque en el caso del patrón normal, se detectan muchas manchas blancas (figura 3.13) y no se corresponde con la realidad. Se puede rechazar esta entrada como una fuente fiable.



Ratio= 17.423

Numero de objetos= 2180

(a)



Ratio= 32.895

Numero de objetos= 2299

(b)

Figura 3.13 Se toma el eje “b” como entrada y se marcan las manchas blancas para el patrón normal (a) y el patrón anormal (b)

3.2 Puntos débiles

En la obtención de la máscara de la gota, es posible que haya una pérdida de información. En las imágenes en las que no se observa fondo, si intenta separar el fondo de la gota, el resultado no es el esperado. El punto débil, el punto crítico del método es la obtención de la máscara de la gota o lo que es lo mismo, la separación de la gota y el fondo. En el caso de encontrarnos con imágenes que no presentan fondo, el método resultaría aún más sencillo ya que se debería omitir el paso de obtención la máscara de la gota y se procedería directamente, a aplicar el método del valor umbral. La posible solución de esta debilidad, puede ser abordada mediante el uso de dos métodos diferentes para cada caso.

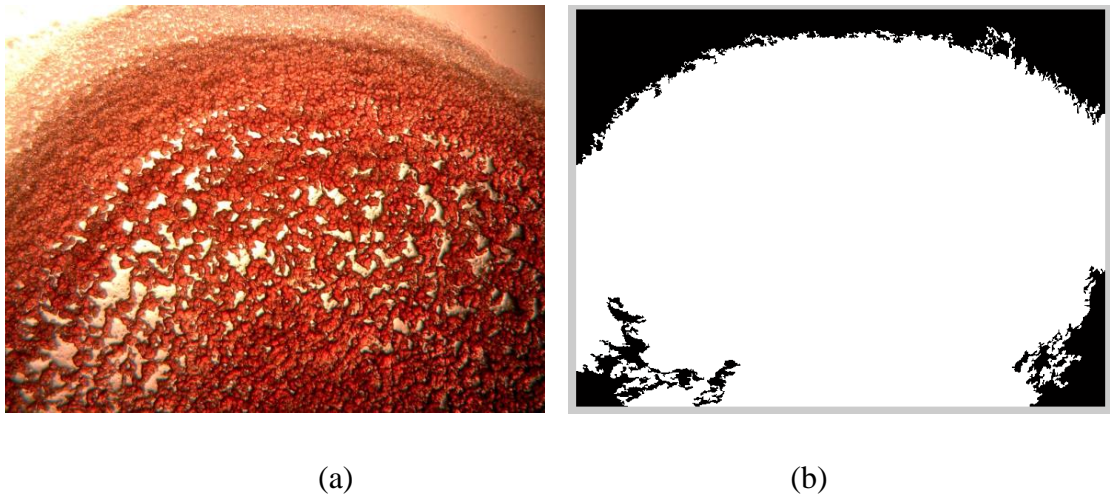


Figura 3.14 Detalle de la pérdida de información cuando se obtiene la máscara (b) que marca toda la gota de sangre (a)

Se observa claramente como la pérdida de información ha tenido lugar en la parte inferior izquierda de la gota (figura 3.14). Este hecho es debido a la iluminación no uniforme de la imagen y provoca que no se tengan en cuenta una cantidad notable de manchas blancas.

3.3 Exportar a Excel

Nombre	Ratio lumi	Ratio R	Ratio G	Ratio B	Ratio LAB(a)	Ratio LAB(b)	Objetos Lum	Objetos Red	Objetos Gre	Objetos Blue	Objetos LAB	Objetos LAB
gota_005	21,1402324	8,81047482	9,48405638	1,66476045	27,2067729	19,9700201	1973	1839	1037	310	1682	2279
gota_006	25,4577247	20,482835	11,4382029	5,3001053	25,1646097	32,8950593	4170	1789	2774	889	2442	2299
gota_008	17,6559984	21,5122196	7,78426978	4,5102714	20,884264	45,6627666	5836	3699	2204	950	3291	3256
gota_009	11,2997023	12,7822199	2,38296347	0,20479355	9,6179682	17,5785523	5433	2776	2189	359	3520	3457
gota_011	9,36656254	22,731387	1,83796307	0,10531914	7,04657862	17,4227858	1970	1306	654	149	2270	2180

Figura 3.15 Hoja de cálculo en la que se almacenan los resultados obtenidos

Cuando se procesan todas las imágenes de una carpeta, se guardan todos los resultados en una hoja de cálculo (figura 3.15). En las primeras columnas, se encuentran los valores obtenidos del ratio blanco rojo para el método tomando diferentes imágenes de entrada. En las columnas posteriores, se indican los valores del número de objetos que tiene cada gota. Con estos datos puede hacerse un procesado posterior y establecer por ejemplo, un ratio medio a partir de las dos entradas que hayan resultado más veraces. De las dos entradas que se han considerado mejores, se puede establecer una comparación (figura 3.16) de los ratios que se obtienen con cada una de las entradas.

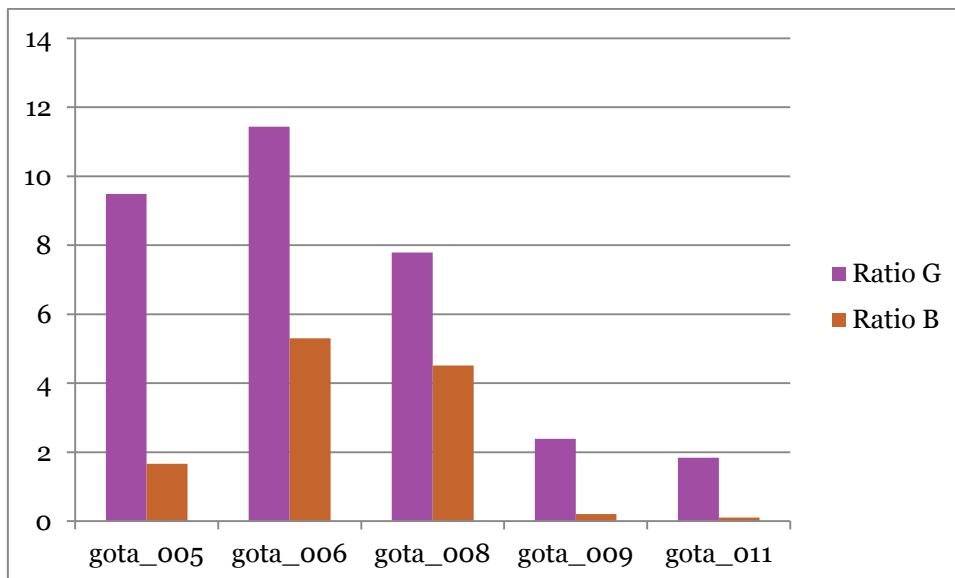


Figura 3.16 Gráfico de barras comparando los ratios para diferentes imágenes de entrada

3.4 Análisis mediante una interfaz gráfica

Al inicio de la ejecución, la interfaz presenta el aspecto que se muestra en la figura 3.17. El primer paso es pulsar el botón cargar para leer imágenes en formato .jpg. Al pulsar aparece una ventana de diálogo para seleccionar una imagen. Las imágenes pueden presentar distintas resoluciones.

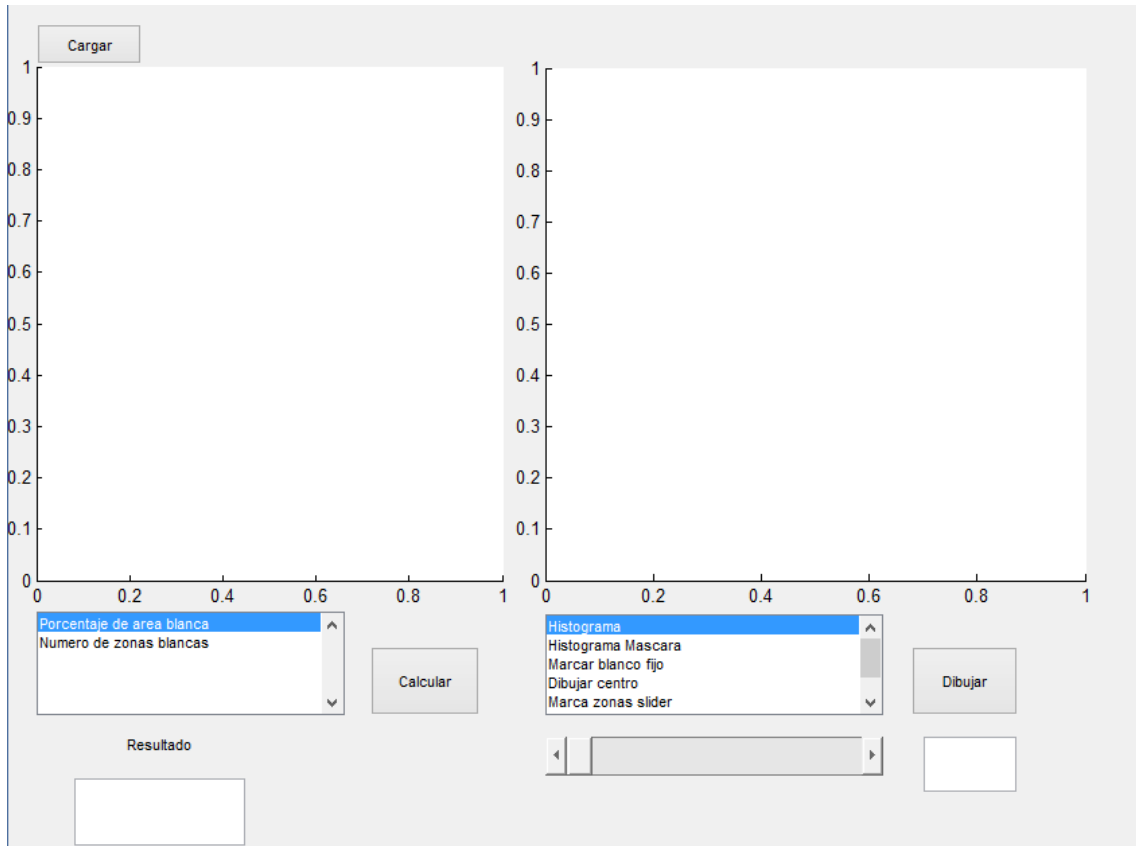


Figura 3.17 Interfaz gráfica para el procesado automático de las imágenes

Automatización del análisis de la imagen de una gota de sangre coagulada

Una vez cargada la imagen (figura 3.18), se muestra en la parte izquierda de la pantalla. Ahora ya se pueden realizar los cálculos que fije el usuario.

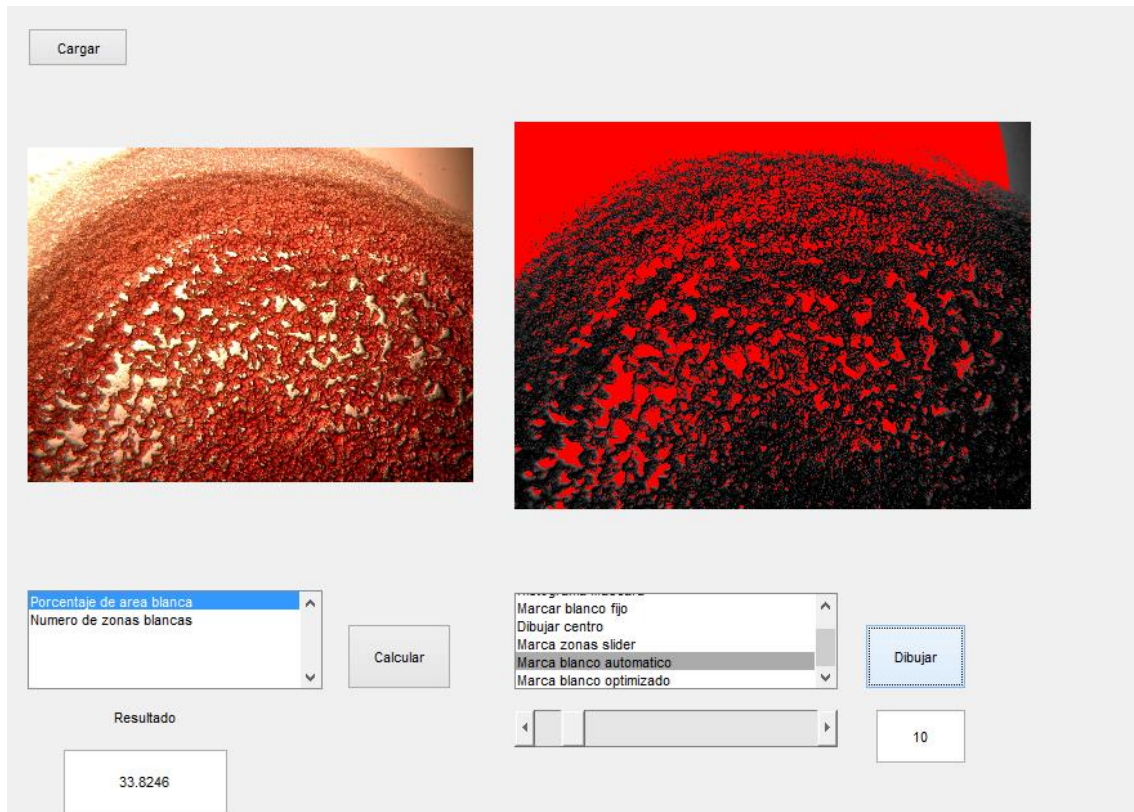


Figura 3.18 Interfaz gráfica después de haber procesado una imagen

La interfaz fue la primera opción barajada para la automatización del análisis las imágenes de gotas de sangre. Posteriormente se opta por ofrecer una solución más automática y con una intervención mínima por parte del usuario. Cuando se implementa la interfaz aún no se ha avanzado en la separación de gota y fondo. Esta es la razón por la que en la parte derecha de la figura 3.18, se observa cómo se está detectando el fondo de la imagen y se está interpretando como mancha blanca.

En la lista de la izquierda (figura 3.18) se definen cálculos como como el porcentaje de área blanca o el número de zonas blancas. En la lista de la derecha (figura 3.18) se pueden seleccionar las siguientes opciones que se activarán al pulsar el botón dibujar:

- Histograma
 - Dibuja el histograma de una componente fijada a priori.
- Histograma Mascara
 - Representa el histograma de la componente roja multiplicada por un umbral global.
- Marcar blanco fijo
 - Mediante un umbral global fijado a priori, calcula una máscara y la marca en rojo sobre la imagen original.
- Dibujar centro
 - Calcula el centro de la imagen y dibuja un rombo verde en el mismo.
- Marca zonas slider
 - Selección del umbral global mediante un slider, que permite 20 posibles valores.
- Marca blanco automático
 - Obtiene la máscara que definen las manchas blancas y se marca lo calculado en color rojo, sobre la imagen original.
- Marca blanco optimizado
 - Obtiene la máscara que definen las manchas blancas, mediante un método optimizado y se marca lo calculado en color rojo sobre la imagen original.

La interfaz se encuentra aún en desarrollo y puede ser ampliada en futuros proyectos.

4. Líneas futuras

A continuación se van a definir características que resulten interesantes para futuras investigaciones. La ausencia de imágenes variadas y de calidad es el punto más conflictivo. Establecer una base de datos ayudaría a evaluar la fiabilidad del método. Cabe destacar que la colaboración con el departamento de microbiología de la facultad de agrónomos es un nexo fundamental para el desarrollo del proyecto.

Es posible que este análisis de la coagulación de una gota pueda resultar importante en la determinación de factores de riesgo, o si existe alguna relación con algunas enfermedades. Resultaría atractivo tomar muchas muestras de pacientes con las mismas patologías. Después de la toma de muestras, otro punto crucial es la adquisición de las imágenes. Ver toda la gota en una imagen es lo que se busca en el presente proyecto. Aunque es posible que en un futuro se vea que existen otros puntos a estudiar, y se haga necesario el análisis de imágenes en detalle. Por ello, si se pretende establecer una buena base de datos, se cree conveniente tomar imágenes de toda la gota y también de regiones en detalle.

El presente proyecto, se centra en el análisis de dos características de las manchas blancas. Otras características susceptibles de ser analizadas son:

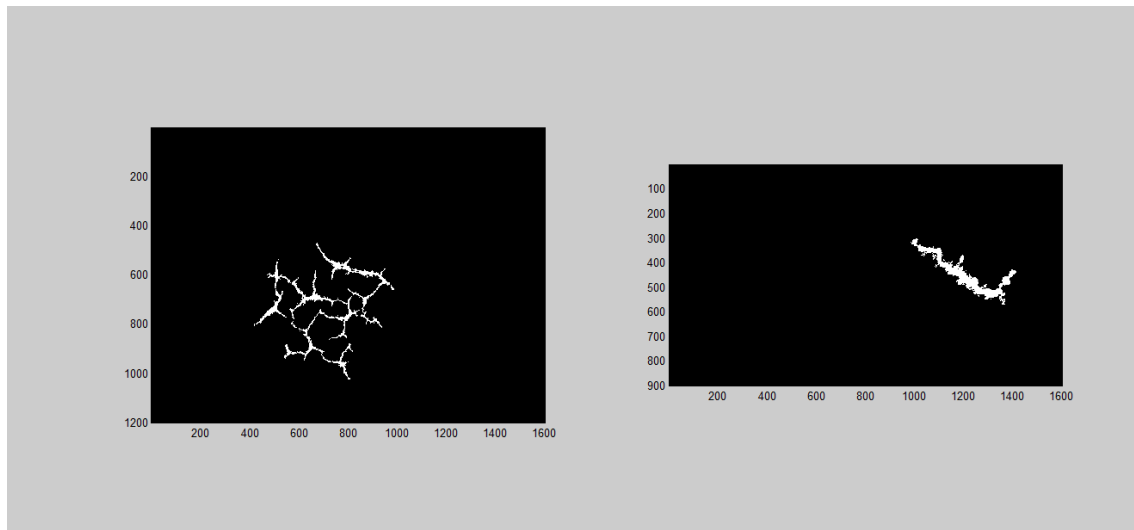
- Determinar si hay manchas concentradas en regiones o esparcidas por toda la gota.
- Coloración de los bordes.
- Formas irregulares.
- Manchas unidas tomando forma de rama de árbol.

De una gota de sangre se obtiene una muestra, esa muestra a su vez consta de cinco a ocho gotas de tamaño decreciente que se denominan capas. Se propone calcular si en las últimas capas encontramos manchas blancas y las siguientes características.

- Tamaño y circularidad.
- Gran número de manchas pequeñas y su posición.

4.1 Análisis de la mancha blanca con mayor área

Analizar la mancha blanca más grande presente en la gota de sangre puede resultar efectivo si se busca simplificar en análisis. Una imagen puede llegar a tener dos mil manchas blancas. Muchas de ellas pueden tratarse de ruido, manchas pequeñas o manchas que resultan de interés. Se pretende pasar de analizar todas las manchas blancas, a analizar sólo la de mayor tamaño. Cuando lo que se procura es determinar el estado de salud o la evolución del tratamiento de un paciente, resulta vital que se cometan el menor número posible de errores. Se eligen las imágenes de la figura 3.4. Se procesa la máscara para obtener los objetos que tienen un tamaño igual al área máxima o difieran en cien píxels.



(a)

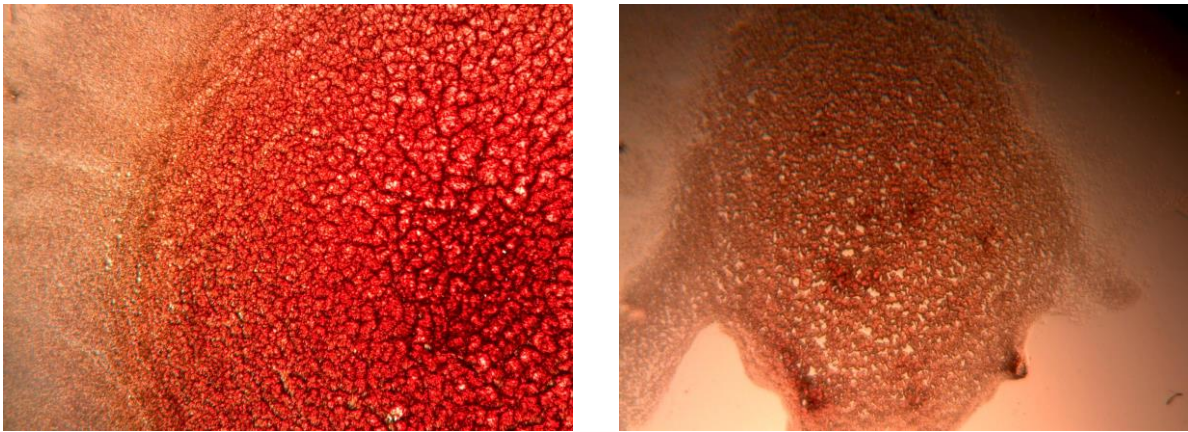
(b)

Figura 4.1 Objetos de mayor área que han sido detectados en las imágenes de campo oscuro para un patrón normal (a) y anormal (b)

En el caso de la imagen izquierda (figura 4.1), se corresponde con un patrón normal en el que las manchas blancas son ausentes y en cambio, el método del valor umbral detecta la zona negra que hay en el interior de la gota. Puede dar lugar a malinterpretación ya que en realidad no se trata de una mancha blanca.

4.2 Análisis de las redes de fibrina e interconexión de las manchas

La red de fibrina es la red que cohesionan y une las áreas rojas. A la izquierda, en la figura 4.2, se observa como desde el centro hasta los bordes se va desarrollando una especie de red, de un color rojo más oscuro. Es importante determinar si existe dicha red y su grosor. En la imagen de la derecha (figura 4.2) se ha roto dicha red y empiezan a aparecer las manchas blancas.



(a)

(b)

Figura 4.2 Ejemplo de una gota donde se aprecia la red de fibrina (a). Ejemplo de una gota con la red de fibrina rota (b)

Una vez se ha roto la red de fibrina, la gota empieza paulatinamente a perder cohesión. La rotura de esa cohesión hace que las manchas blancas se vayan uniendo y haciéndose más grandes. Es posible que ante una mejoría, las manchas se hagan más pequeñas y pierdan la conexión de las unas con las otras. Es importante saber si en la gota tenemos manchas blancas interconectadas entre sí que tengan valores de área elevados, o si por el contrario, las manchas son pequeñas y están diseminadas por toda la gota.

4.3 Determinar la posición de las zonas blancas

La posición en la que se halle la mancha también podría resultar de interés. Inicialmente se planteó abordar la determinación de la posición, midiendo directamente la distancia del objeto al centro de la imagen. La medida que se hubiera obtenido serían una cantidad de píxeles. La misma imagen, con menos resolución, tendría otra distancia referenciando el mismo objeto. Así que surgió la necesidad de establecer una medida relativa, una medida que no dependiese de la resolución de la imagen, que fuese relativa a la misma.

Se establece que la distancia desde el borde al centro de la imagen se fija como el cien por cien de la distancia. A continuación, se mide la distancia desde cada mancha blanca hasta el centro. El cálculo de la distancia mancha blanca respecto distancia al borde de la imagen es inmediato. Cabe destacar que esta medida se realiza sobre los centroides de las manchas blancas. Finalmente se descartó este cálculo en los resultados, porque aunque no requiere un alto grado de dificultad, sí se genera un gran volumen de datos. Se incluye en las líneas futuras para ser implementado en nuevos proyectos.

4.4 Patrones de coagulación.

La documentación existente es mínima o casi nula. Atendiendo a la bibliografía aportada por Rosa Lopez Monís, existen una serie de patrones que pueden aparecer en la gota de sangre coagulada:

- Manchas blancas circulares en el centro de la gota sobre un fondo negro.
- Borde de la gota irregular se asemeja a la forma de una medusa.
- Rayas blancas finas que confluyen hacia el centro.
- Anillos concéntricos muy marcados.
- Falta de circularidad de la gota.

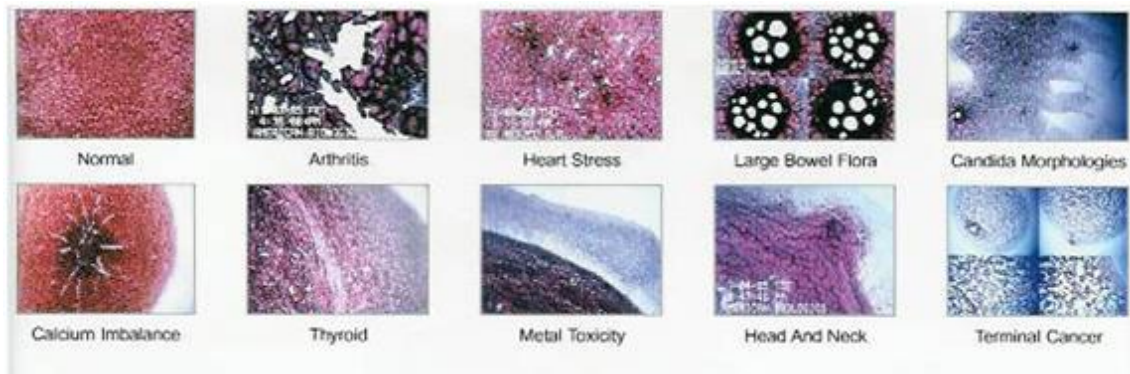


Figura 1.11 Posibles patrones particulares que pueden darse en una gota de sangre coagulada

Falta por precisar si existe una relación entre la aparición de estos patrones y la incidencia de enfermedades o factores de riesgo. Por ejemplo, estudiamos un patrón y obtenemos:

- Manchas blancas de baja excentricidad.
- Distancias relativas al borde similares.
- Zonas blancas de poca área y mucho perímetro.

Se deduce que se estaría estudiando un patrón del tipo rayas blancas finas que confluyen hacia el centro. El establecer una base de datos de imágenes que presenten este patrón mencionado, resulta clave si se quiere fijar las características que presenta un patrón determinado.

5. Conclusiones

Las imágenes de gotas de sangre coaguladas no son unas imágenes fáciles de conseguir. Se requiere de un microscopio y de una técnica específica para la obtención de las muestras. Afortunadamente, la Universitat Politècnica cuenta con laboratorios donde es posible obtener imágenes en un microscopio. Todas las imágenes presentan una naturaleza similar, el fondo es blanco, la gota es roja y las manchas en el interior de la gota son blancas. A su vez cada imagen tiene unas características singulares, haciendo que el análisis de las imágenes, sea un instrumento didáctico donde se aplican conceptos de tratamiento digital de imágenes. En el proyecto se abordan conceptos como la segmentación de imágenes, los espacios de color y las operaciones morfológicas, sin duda pilares básicos del tratamiento digital de imágenes. Una vez separada la gota del fondo, se detectan las gotas blancas de la gota de sangre. Este análisis puede llevarse a cabo de forma paralela junto con una investigación. Es ambicioso llevar a cabo la investigación con pacientes enfermos y mediante el método científico, tratar de determinar si existen patrones que se repiten entre los pacientes de una misma enfermedad. Otro punto clave en la utilidad del análisis, es el hecho de poder establecer una correlación entre la coagulación de la sangre y la evolución de un tratamiento. El presente proyecto ha expuesto la automatización del análisis de unas imágenes poco estudiadas y ha establecido una línea de investigación, para el desarrollo de futuros proyectos.

6. Bibliografía y referencias

- Aguirre, F. G. (2011). *TEST H.L.B.O.* EDICIONES ALBORES.
- Arenas, C. E. (2010). *Biología celular e histología médica tejido conjuntivo*.
Obtenido de facmed.unam.mx:
http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/tejido_conjuntivo.pdf
- Bolen, H. L. (1952). The blood pattern in pre-symptomatic malignancy of the gastrointestinal tract. *The American Journal of Digestive Diseases*.
- Bolen, H. L. (November 1950). Diagnostic value of the blood pattern in cancer. *The American Journal of Surgery*, Volume 80 Issue 5 Pages 505–513.
- Bradford, R. W., & Allen, H. W. (1997). *Oxidology the Study of Reactive Oxygen Species (Ros) and Their Metabolism in Health and Disease*. Bradford Foundation.
- Eddins, S. (2012). *mathworks.com*. Retrieved from
<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/10502-image-overlay/content/imoverlay.m>
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E., & Eddins, S. L. (2009). *Digital Image Processing Using MATLAB, 2nd ed.* Gatesmark Publishing.
- Hawk, B. O., Thoma, G. E., & Inkley, J. J. (1951). An Evaluation of the Bolen Test as a Screening Test for Malignancy. *American Association for Cancer Research*.
- Health, U. N. (n.d.). *Pubmed*. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=blood+pattern+bolen>
- IEEE. (1979). *IEEE TRANSACTIONS ON SYSTEMS, MAN, AND CYBERNETICS, VOL. SMC-9, NO. 1*. Retrieved from ieeexplore.ieee.org:
<http://web-ext.u-aizu.ac.jp/course/bmclass/documents/otsu1979.pdf>

- mathworks. (n.d.). *www.mathworks.es*. Retrieved from <http://www.mathworks.es/es/help/images/convertng-color-data-between-color-spaces.html>
- Onairos. (s.f.). *Onairos.es*. Obtenido de https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.onairos.eu%2Fmodules%2Fplblog%2Ffrontent%2Farticulos%2FInvestigacion_Interpretacion_del_estudio_microscopico_de_la_sangre_Trino_Soriano.doc&ei=l4P_U_37CsPA0Q
- Vaughn, A. M., Metzner, W. R., & Annan, C. M. (1952). An evaluation of the bolen blood pattern test for detecting cancer. *The American Journal of Surgery*.