

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas**

**Facultad de Ingeniería Eléctrica**

**Centro de Estudios de Electrónica y Tecnologías de la Información**



## **TRABAJO DE DIPLOMA**

**Título: Búsqueda de marcadores en imágenes de  
microscopía de eritrocitos utilizando transformada  
*Radon*.**

**Autor: Aniel González Betancourt**

**Tutor: Dr. C. Rubén Orozco Morales**

**Santa Clara**

**2014**

**"Año 56 del Triunfo de la Revolución"**

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas**

**Facultad de Ingeniería Eléctrica**

**Centro de Estudios de Electrónica y Tecnologías de la Información**



## **TRABAJO DE DIPLOMA**

**Título: Búsqueda de marcadores en imágenes de  
microscopía de eritrocitos utilizando transformada  
*Radon*.**

**Autor: Aniel González Betancourt**

**Tutor: Dr. C. Rubén Orozco Morales**

Profesor Auxiliar, CEETI, [rmorales@uclv.edu.cu](mailto:rmorales@uclv.edu.cu)

**Santa Clara**

**2014**

**"Año 56 del Triunfo de la Revolución"**



Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de Ingeniería en Biomédica, autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

---

Firma del Autor

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

---

Firma del Tutor

---

Firma del Jefe de Departamento  
donde se defiende el trabajo

---

Firma del Responsable de  
Información Científico-Técnica

## PENSAMIENTO

*Jamás habría tenido éxito en la vida si no hubiera yo prestado a la cosa más nimia de que me ocupé, la misma atención y el cuidado que he prestado a la más importante.*

*Charles Dickens*

## **DEDICATORIA**

A mis padres y mi hermano.

A mi tío Elio, el primer ingeniero en la familia.

A mi novia y sus padres.

A todos ellos va dedicada esta tesis por su amor y comprensión, por estar siempre presentes durante toda la carrera, en los momentos alegres y en los que necesitaba de fuerzas para continuar.

A todos aquellos que de una manera u otra me han ayudado durante estos cinco años y con los cuales compartí experiencias maravillosas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y toda mi familia en general por su apoyo incondicional.

A mi novia y su familia por todo su cariño y preocupación.

A mis compañeros de aula, con los cuales he compartido durante la carrera gratos recuerdos.

A todos los profesores que contribuyeron a mi preparación como ingeniero, en especial a mi tutor por permitirme trabajar junto a él, brindándome todo su apoyo y dedicación.

## TAREA TÉCNICA

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre el tema búsqueda de marcadores en imágenes de eritrocitos de sangre humana.
2. Implementar programas de computación en el software *Matlab* para la búsqueda de marcadores en imágenes de eritrocitos, basado en la propiedad de la transformada *Radon* de detectar parámetros de forma.
3. Implementar en *Matlab* un algoritmo que marque en una imagen de microscopía cada uno de los eritrocitos aglomerados y no aglomerados como independientes.
4. Evaluar el método propuesto mediante el cálculo de índices estadísticos tomando como referencia *ground-truth* determinados por especialistas.
5. Comparar el método propuesto con un método basado en morfología matemática estadísticamente.

---

Firma del Autor

---

Firma del Tutor

## RESUMEN

En el análisis de eritrocitos sobre frotis de sangre humana se hace necesario procesar grandes cantidades de imágenes para la clasificación y el conteo diferencial. Uno de los primeros pasos para el reconocimiento de patrones (detección del parásito) es una buena segmentación de la imagen para poder analizar cada uno de los objetos presentes en la misma. La transformada de *watershed* es una herramienta morfológica que permite segmentar objetos complejos, pero su éxito depende de encontrar marcadores que definan cada uno de los componentes como independientes.

El presente trabajo se realiza con el objetivo de encontrar marcadores en imágenes de microscopía celular de glóbulos rojos. Para ello, la búsqueda de marcadores se realiza basada en la propiedad de la transformada *Radon* de detectar parámetros de forma y su comportamiento ante estructuras circulares; implementándose tres variantes que dependen de la técnica que se aplique para obtener una imagen binaria y una imagen gradiente. La función creada para efectuar el algoritmo descrito, al pasarle como argumento las imágenes mencionadas anteriormente, permite obtener a la salida una imagen marcador.

Mediante una comparación cuantitativa, a través del cálculo de índices estadísticos se determina cómo el método propuesto se comporta de forma satisfactoria y es poco costoso computacionalmente.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>PENSAMIENTO .....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>TAREA TÉCNICA.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO .....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES. ....</b>	<b>5</b>
1.1 INTRODUCCIÓN .....	5
1.2 TÉCNICAS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES EN IMÁGENES DE MICROSCOPIA CELULAR.....	6
1.3 ESPACIO DE COLOR Y CONVERSIÓN A GRIS .....	6
1.4 PROCESAMIENTO INICIAL DE LA IMAGEN .....	9
1.4.1 Suavizado .....	9
1.4.2 Corrección de iluminación.....	11
1.4.3 Realce .....	12
1.5 SEGMENTACIÓN.....	13
1.5.1 Detección de bordes.....	14
1.6 TRANSFORMADA <i>RADON</i> .....	15
1.6.1 Transformada <i>Radon</i> directa .....	15
1.6.2 Filtrado adaptado .....	18
1.6.3 Transformada <i>Radon</i> reversa.....	20
1.6.4 Aplicaciones de la transformada <i>Radon</i> .....	22
1.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN ESTADÍSTICA .....	22
1.8 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO.....	23

<b>CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 INTRODUCCIÓN .....	24
2.2 IMÁGENES A UTILIZAR.....	24
2.3 SOFTWARE Y HARDWARE UTILIZADO .....	25
2.4 DISEÑO DEL EXPERIMENTO .....	25
2.4.1 Transformada <i>Radon</i> directa en <i>Matlab</i> .....	26
2.4.2 Implementación del filtro adaptado.....	27
2.4.3 Transformada <i>Radon</i> reversa en <i>Matlab</i> .....	29
2.4.4 Umbralado y detección de marcadores.....	31
2.5 VARIANTES DESARROLLADAS .....	34
2.6 MEDIDAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACIÓN.....	37
2.7 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO.....	39
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
3.1 INTRODUCCIÓN .....	40
3.2 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE WELLNER (VARIANTE 1). .....	40
3.3 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE NIBLACK (VARIANTE 2).....	42
3.4 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE WHITE (VARIANTE 3).....	43
3.5 COMPARACIÓN ENTRE LAS VARIANTES DESARROLLADAS Y EL MÉTODO DE MM. ....	44
3.5.1 Índices estadísticos para cada imagen. ....	44
3.5.2 Valor medio y desviación estándar de los índices. ....	49
3.5.3 Comparación de los índices de forma global.....	51
3.5.4 Costo computacional .....	52
3.6 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO.....	53
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>54</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
---------------------	-----------

## INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por un parásito del género *Plasmodium*. Dicha enfermedad puede ser causada por diferentes especies de *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* o *Plasmodium knowlesi*, siendo las tres primeras reportadas en el continente americano. Es la primera enfermedad de importancia entre las debilitantes. Entre el año 2000 y el 2012 fueron salvadas 3.3 millones de vidas y decreció el número de muertes mundialmente en un 45%, y en África un 9% de acuerdo con el Reporte Mundial de Malaria en 2013. Sin embargo, por causa de la malaria murieron un estimado de 627 000 en el año 2012, principalmente niños menores de 5 años en la zona Subsahariana de África [1].

Existen dos técnicas clásicas usadas para el diagnóstico de la enfermedad de la malaria. La que generalmente es usada es el diagnóstico clínico basado en los síntomas tales como fiebre alta, dolor de cabeza, escalofríos severos y molestias en el cuerpo. Sin embargo, estos síntomas no son específicos de malaria, por lo que la fiabilidad del diagnóstico clínico es muy baja. La segunda técnica es el diagnóstico mediante la microscopía óptica de extendidos delgados de sangre periférica, pero el mismo requiere un examinador experto para tomar las muestras y analizarlas. Mientras que las muestras sean bien preparadas y examinadas el diagnóstico es muy fiable, permitiendo la determinación del tipo de malaria, el estado de maduración del parásito y el grado de infección [2].

Para la observación de las imágenes uno de los teñidos usados es el *Giemsa*, sobre una muestra del extendido delgado de sangre periférica en el portaobjeto del microscopio. El proceso de teñido colorea suavemente los glóbulos rojos y en gran medida el parásito, los glóbulos blancos, las plaquetas y artefactos. En el diagnóstico de la enfermedad la presencia del parásito es reconocible por sus características físicas además de por la apariencia de los glóbulos rojos que son infectados. Los métodos de reconocimiento manual suelen llevar mucho tiempo y esfuerzo por parte del analista, especialmente en situaciones donde se requiera el análisis de muchas muestras. Gracias a los avances computacionales se pueden realizar algoritmos que permitan llevar a cabo este engorroso trabajo de forma automática por una máquina, lo cual no tiene el inconveniente de cansarse tras el análisis de varias muestras.

El conteo de las células y la detección de parásito por un software computacional es tema de estudio en los últimos años. Por esto es necesaria la búsqueda de métodos rápidos y eficientes que detecten la presencia de estos, previniendo un falso diagnóstico. Después de obtener las imágenes (la Fig. 1 muestra dos de las imágenes que serán utilizadas en el desarrollo del trabajo) uno de los primeros pasos para el reconocimiento de patrones (detección del parásito) es una buena segmentación de la imagen para poder analizar cada uno de los objetos presentes en la misma.

Los métodos propuestos hasta el momento son variables, pero debido a las características de las imágenes es necesaria la implementación de uno que separe todas las células, incluso las aglomeradas. La transformada *watershed* es una herramienta de procesamiento morfológico que permite segmentar imágenes [3], [4]. Esta transformada se adapta a los diferentes tipos de imágenes siendo capaz de distinguir objetos sumamente complejos que no pueden ser procesados correctamente mediante algoritmos convencionales. El éxito de la transformada *watershed* depende fundamentalmente de la existencia de marcadores unívocos para cada uno de los objetos de interés y de un gradiente que permita la adecuada aplicación de los algoritmos de inundación.

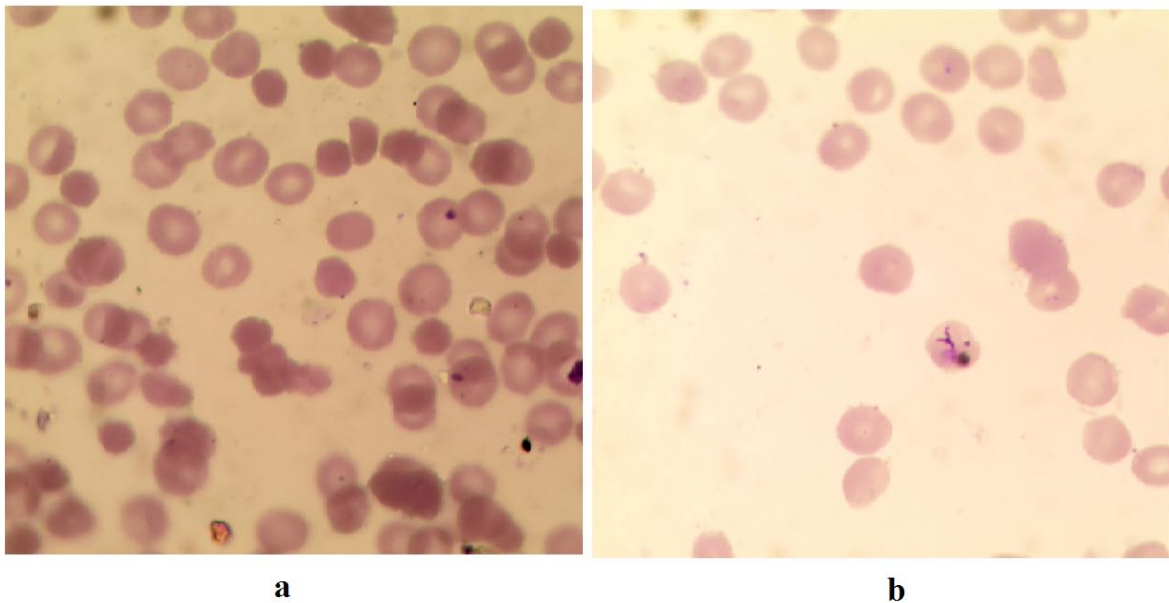


Fig. 1: Ejemplo de dos imágenes de microscopía celular de glóbulos rojos.

Los marcadores deben tener ciertas características: existir uno y sólo uno dentro de cada objeto; ser completos en su interior, sin agujeros, ya que deben actuar de mínimos para la

inundación de la imagen; su tamaño debe ser menor que el del objeto a segmentar y suficientemente grande para evitar que inhomogeneidades del mismo impidan la inundación completa de la región correspondiente al objeto [5]. En la Fig. 2 se muestra una imagen con las células marcadas de forma manual como ejemplo de una imagen marcador.

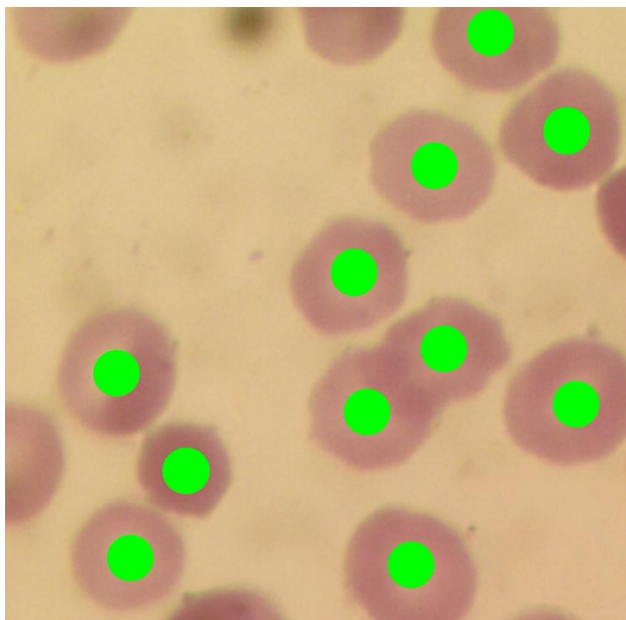


Fig. 2: Imagen marcada manualmente.

La búsqueda de marcadores ha sido propuesta por diferentes vías. La morfología matemática ha sido empleada en ello por ser un método automático de fácil implementación y bajo costo computacional [6], existiendo otras vías en las cuales se obtienen marcadores mediante la determinación de parámetros de forma. Para ello, la transformada de *Hough* ha sido ampliamente usada, aunque recientemente se ha demostrado que la transformada *Radon* es equivalente y de menor costo computacional [7], [8], [9].

Con esta tesis se pretende obtener marcadores mediante la transformada *Radon*, que permitan con su utilización obtener una buena segmentación de eritrocitos en imágenes de extendidos delgados de sangre periférica teñida con *Giemsa*.

Por lo que, para este trabajo se proponen los siguientes objetivos:

**Objetivo general**

Buscar marcadores de eritrocitos en imágenes de extendidos delgados de sangre periférica teñida con *Giemsa* que definan cada célula como objetos independientes, aplicando la transformada *Radon*.

**Objetivos específicos**

- Investigar variantes de extracción de marcadores.
- Implementar un algoritmo que permita la extracción de marcadores mediante la transformada *Radon* en imágenes microscópicas de extendidos de sangre periférica en lámina delgada.
- Comparar estadísticamente los resultados del método propuesto con otro ya implementado, mediante la cuantificación objetiva de métricas que determinen: exactitud, sensibilidad, especificidad, predictividad positiva y medida-F; a partir de *ground-truth* determinados por expertos de las imágenes a analizar.

## **CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES.**

### **1.1 INTRODUCCIÓN**

El Procesamiento Digital de Imágenes (PDI) es el conjunto de técnicas computacionales que se aplican con el objetivo de mejorar la calidad o facilitar la búsqueda de información en imágenes. Su objetivo fundamental es obtener, a partir de una imagen origen, otra final cuyo resultado sea más adecuado para una aplicación específica mejorando ciertas características de la misma que posibilite efectuar operaciones del procesado sobre ella.

Por otra parte, el Análisis Digital de Imágenes (ADI) está relacionado con la extracción de mediciones útiles, datos o información de la imagen utilizando también técnicas computacionales, proporcionando una descripción menos compleja de la escena.

En general, la combinación del PDI y el ADI permite alterar la información visual para obtener mejores resultados o para aislar algunas características particulares de las imágenes. El impacto de esta disciplina ha sido enorme y afecta áreas como la medicina, las telecomunicaciones, el control de procesos industriales y el entretenimiento. La alteración de los valores de intensidad o de formas por medio de una computadora permite efectuar con gran facilidad operaciones de filtrado, realce, mejoramiento, transformaciones geométricas, etc. Además han aparecido diferentes técnicas para variados objetivos a lograr, como la segmentación y la detección de marcadores.

La determinación de marcadores en imágenes puede ser muy útil tanto en imaginología médica como en fotografía convencional. La imposición automática de marcadores en imágenes médicas es una de las cuestiones propuestas en los últimos años por muchos trabajos, por su gran aplicación en el procesamiento digital, pero no existe un algoritmo global. Los diversos estudios realizados hasta el momento no solucionan de manera eficiente los problemas existentes, y dependen en gran medida del tipo de imágenes y de la calidad con que fueron tomadas.

El presente capítulo muestra los fundamentos teóricos sobre búsqueda de marcadores en imágenes de microscopía celular de glóbulos rojos. Primeramente, en el epígrafe 1.2 se abordaran dos métodos para la búsqueda de marcadores empleadas en otras investigaciones. El epígrafe 1.3 menciona algunas variantes de la conversión de color a escala grises por la



importancia que puede tener la misma en el resultado de la segmentación. El epígrafe 1.4 se abordan algunas técnicas de procesamiento morfológico que son utilizadas para un preprocesamiento inicial de la imagen. El epígrafe 1.5 muestra las variantes de segmentación empleadas y la detección de bordes. En el epígrafe 1.6 se explica la teoría de la transformada *Radon* en la determinación de parámetros de forma. El epígrafe 1.7 aborda los métodos de evaluación estadísticas que serán utilizados y en 1.8 se realizan las conclusiones del capítulo.

## 1.2 TÉCNICAS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES EN IMÁGENES DE MICROSCOPIA CELULAR.

La búsqueda de marcadores mediante PDI de microscopía celular de glóbulos rojos es un tema de estudio muy amplio. No existe un algoritmo que de manera global marque todos los eritrocitos como objetos independientes debido a las diferentes características que pueden presentar las imágenes así como las células que las componen. Del análisis de la literatura revisada se encuentran dos variantes de búsqueda de marcadores basados en morfología matemática (MM), los cuales se mencionan a continuación y se explican detalladamente en las bibliografías propuestas.

1. Variante 1: Extracción de marcadores usando reconstrucción para construir domos en la imagen, el cual se aplica como el ejemplo de la ayuda del *Matlab*, que se encuentra siguiendo el camino: *Image Processing Toolbox\Demos\Image Segmentation\Marker-Controlled Watershed Segmentation*.
2. Variante 2: Extracción de marcadores utilizando la transformada de distancia [6].

B. Tek [9] propone la búsqueda de marcadores aplicando la transformada *Radon*. Basado en las técnicas que plantea en su trabajo y en la demostración de Peng [10] de cómo aplicando la transformada *Radon* son resaltadas las estructuras cilíndricas por encima de las demás. En este capítulo se propone un algoritmo de detección de marcadores basado en la transformada *Radon*.

## 1.3 ESPACIO DE COLOR Y CONVERSIÓN A GRIS

El espacio RGB es el espacio de color más extendido y el que utiliza la gran mayoría de las cámaras de video y fotográficas para construir una imagen de color. El espacio RGB se

representa como un cubo donde un color viene definido por la mezcla de valores de intensidad de tres colores primarios, roja, verde y azul, Fig. 1.1. Un color viene descrito por una tupla de 3 coordenadas en el cubo. Si la imagen a color utiliza 24 bits por píxel (8 bits por cada color primario), el color negro se representa por  $(r=0, g=0, b=0)$  y el color blanco por  $(r=255, g=255, b=255)$ . La gama acromática de escala de grises está representada por la diagonal del cubo entre los vértices negro y blanco.

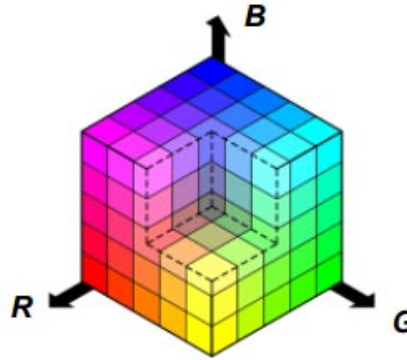


Fig. 1.1: Espacio de color RGB representado en un cubo.

El RGB no es el único espacio de color existente, en la literatura se pueden encontrar otros como CIELAB, HSV, HSL, YIQ (NTSC), YCbCr, etc. Para el desarrollo de este trabajo es necesario que las imágenes estén representadas en escala de grises, debido a que los algoritmos desarrollados trabajan con este tipo de imágenes. La conversión de color a gris por un determinado algoritmo debe considerar diferentes criterios que preserven la apariencia visual de la imagen a color, planteados por Haritha and Reddy [11].

De acuerdo a estos criterios, varios métodos de conversión de RGB a escala de gris son propuestos, los cuales pueden ser divididos en tres principales características: mapeo global, mapeo local y mapeo local- global [12], [13]. Ejemplos de mapeo global son la función de *Matlab* *rgb2gray* y el plano luminancia de los espacios de colores clásicos mencionados anteriormente.

Varios autores proponen trabajar con el plano verde del espacio de color RGB [14], [15]. Otros proponen el trabajo con el espacio de color HSV, o el HSL adaptado al HSI propuesto por González and Woods, [5], [16], [17], [18], planteando que el tinte, la saturación y la intensidad son independientes uno del otro. Mandal [16] también usa los espacios YCbCr y NTSC. En esta tesis se valora el desempeño de los algoritmos de

marcado utilizando la conversión a escala de grises basándose en espacio de color CIELab y el método Decolorize [19].

El espacio de color CIELab se deriva del espacio de color XYZ utilizando una relación no lineal y permitiendo cuantificar estas diferencias visuales entre diferentes colores [20], [21], [22]. En 1976 la CIE introduce el espacio de color  $L^*a^*b^*$  derivado de los valores tri-estímulos CIE-XYZ que permiten tener en cuenta las características de iluminación de la imagen [23]. Para la conversión del espacio de color RGB al  $L^*a^*b^*$  se hace primero al espacio de color CIE-XYZ [24] de acuerdo con la ecuación (1) y después al espacio  $L^*a^*b^*$  [20].

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.412453 & 0.357580 & 0.180423 \\ 0.212671 & 0.715160 & 0.072169 \\ 0.019334 & 0.119193 & 0.950227 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

La transformación de un cubo RGB llenado completamente con puntos no llena el espacio  $L^*a^*b^*$ , pero produce una variedad de colores cuya forma depende de los colores primarios y del punto blanco. La Fig. 1.2 muestra una representación del espacio de color CIE- $L^*a^*b^*$  compuesto por planos  $L^*$  de luminancia constante espaciados  $\Delta L^* = 5$  unidades. Las líneas en cada plano representan las constantes  $a^*$  o  $b^*$  espaciadas 20 unidades.

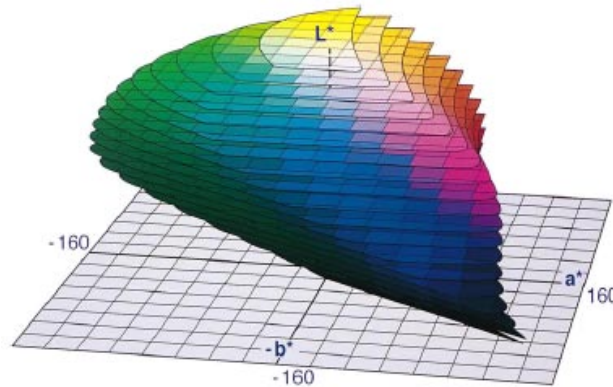


Fig. 1.2: Espacio de color CIE- $L^*a^*b^*$ .

En 2007 Grundland y Dodgson [19] proponen el algoritmo '*Decolorize*', donde una imagen depende de un algoritmo de representación global que usa el espacio de color YPQ, similar al YIQ. Para realzar el contraste, así como convertir de color a gris realiza reducción de dimensionalidad usa una técnica que ellos llaman "análisis de componentes predominantes", similar al análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en

inglés). La transformación de RGB a YPQ es de forma lineal como se muestra en la ecuación (2).

$$\begin{bmatrix} Y \\ P \\ Q \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.298936 & 0.587043 & 0.114021 \\ 0.500000 & 0.500000 & -1.000000 \\ 1.000000 & -1.000000 & 0.000000 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (2)$$

Cadik [25] perceptualmente evaluando en 2008 varios métodos de conversión de RGB a escala de grises muestra que el resultado de la conversión *Decolorize* fue el mejor de todos. El código de *Matlab* del algoritmo *Decolorize* puede ser accedido en el sitio <http://www.eyemaginary.com/Rendering/decolorize.m>

## 1.4 PROCESAMIENTO INICIAL DE LA IMAGEN

En aras de mejorar los resultados finales se han aplicado diferentes técnicas de preprocesamiento, buscando mantener bajo el costo computacional así como una fácil implementación. Las técnicas que se aplicaron fueron: suavizado, corrección de iluminación y realce, las cuales están basadas en procesamiento morfológico.

### 1.4.1 Suavizado

Una técnica que se utiliza durante el preprocesamiento es el suavizado de la imagen. Se le denomina "suavizado", a la operación de filtrado que se usa principalmente para eliminar detalles y ruido de una imagen. Las técnicas de suavizado englobadas dentro del preprocesamiento de imágenes tienen como objetivo obtener, a partir de una imagen origen, otra final cuyo resultado sea más adecuado para una aplicación específica. Las mismas mejoran ciertas características de la imagen que posibilitan efectuar operaciones del procesado sobre ella.

Con ello se persigue reducir la cantidad de variaciones de intensidad entre píxeles vecinos, eliminar aquellos píxeles cuyo nivel de intensidad es muy diferente al de sus vecinos y cuyo origen puede estar tanto en el proceso de adquisición de la imagen como en el de transmisión, y todo ello sin que se afecten los bordes de las estructuras de interés, en este caso, los glóbulos rojos. Este suavizado no persigue una mejora visual de la imagen, sino que la misma pueda ser segmentada y no se pierdan células ni partes de ellas en la imagen máscara resultante. Las técnicas de suavizado que se aplican están basadas en morfología

matemática, debido a las características brindadas por las mismas, para el suavizado con preservación de bordes.

La apertura sobre imágenes en escala de grises es una forma de filtrado para suavizar una imagen y suprimir el ruido. Es la combinación de erosión (supresión de detalles brillantes), seguida de dilatación (supresión de detalles oscuros) [26] y se define en la ecuación (3):

$$A \circ B = \bigcup \{(B)_z | (B)_z \subseteq A\} \quad (3)$$

Por su interpretación geométrica, la apertura se define como la unión de todas las traslaciones de  $B$  que están comprendidas en  $A$ . En imágenes en niveles de grises, la apertura además de eliminar el ruido de la imagen tiene el inconveniente de suavizar los bordes de los objetos brillantes en la imagen. El filtrado llamado erosión-reconstrucción-dilatación-reconstrucción (ERDR) es una forma muy parecida de filtrado, pero como se aplica la reconstrucción la diferencia es que este último filtra pero no suaviza bordes. Para observar lo planteado en la Fig. 1.3 a) muestra una imagen de las que serán utilizadas y en Fig. 1.3 b) un suavizado de la misma mediante ERDR. Mientras mayor sea el elemento estructurante (EE) más suavizado se logra en la imagen.

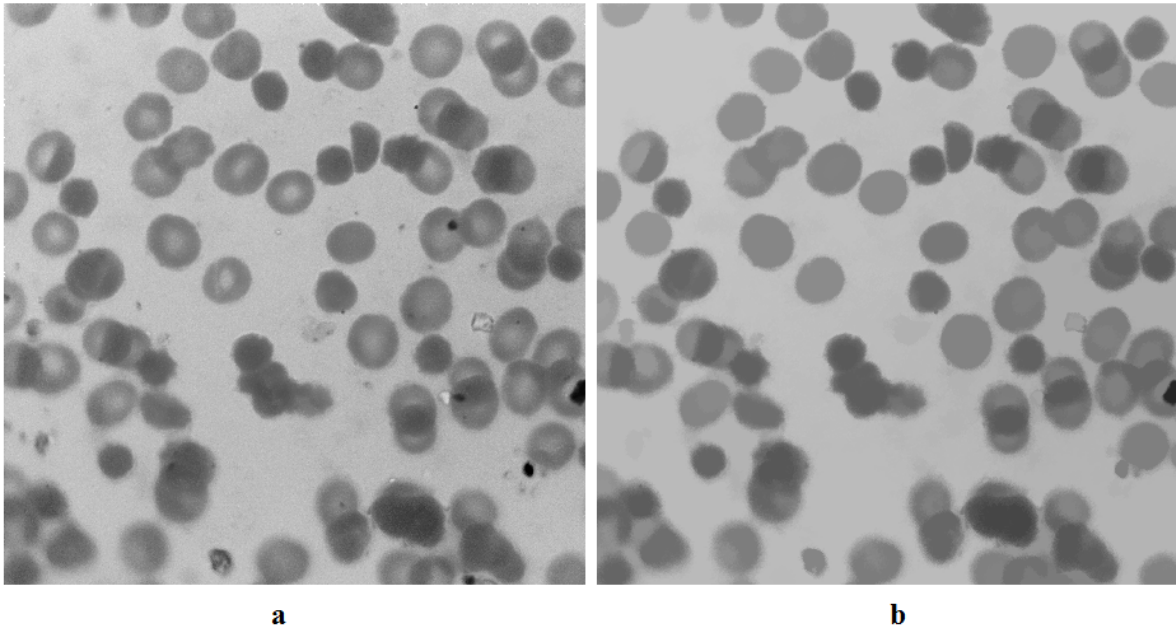


Fig. 1.3: a) Imagen original, b) Imagen suavizada mediante ERDR con un EE circular de radio 20.

### 1.4.2 Corrección de iluminación

La corrección de iluminación es uno de los aspectos esenciales para realizar una buena segmentación, sobre todo cuando se aplica la segmentación a partir de umbral. Al calcular el umbral global, en las zonas donde la imagen sea más brillante las células pueden tener el mismo color que el fondo donde la imagen sea más oscura, por lo que al segmentar la imagen podrían perderse células o parte de ellas. Esto puede suceder cuando las imágenes no son tomadas con una buena iluminación.

Una solución rápida y eficiente sería una corrección de iluminación aplicando el filtrado morfológico denominado "sombrero de copa" (*top-hat*). Las transformaciones *top-hat* consisten en descubrir aquellas estructuras de la imagen que han sido eliminadas en el filtrado de apertura o cierre. Una operación entre la imagen original y el filtrado aumenta considerablemente el contraste de las zonas eliminadas. Esta operación se define, cuando el fondo es oscuro y las estructuras de interés son más claras que el fondo, como una resta entre la imagen original y la apertura de la misma con un elemento estructurante [26], [27], como se muestra en la ecuación (4).

$$h = f - (f \circ b) \quad (4)$$

En la Fig. 1.4 a y b se puede observar una imagen original y con iluminación corregida respectivamente. La imagen se representa con el fondo más claro que las estructuras de interés pero para aplicar *top-hat* se realiza con la imagen complementada.

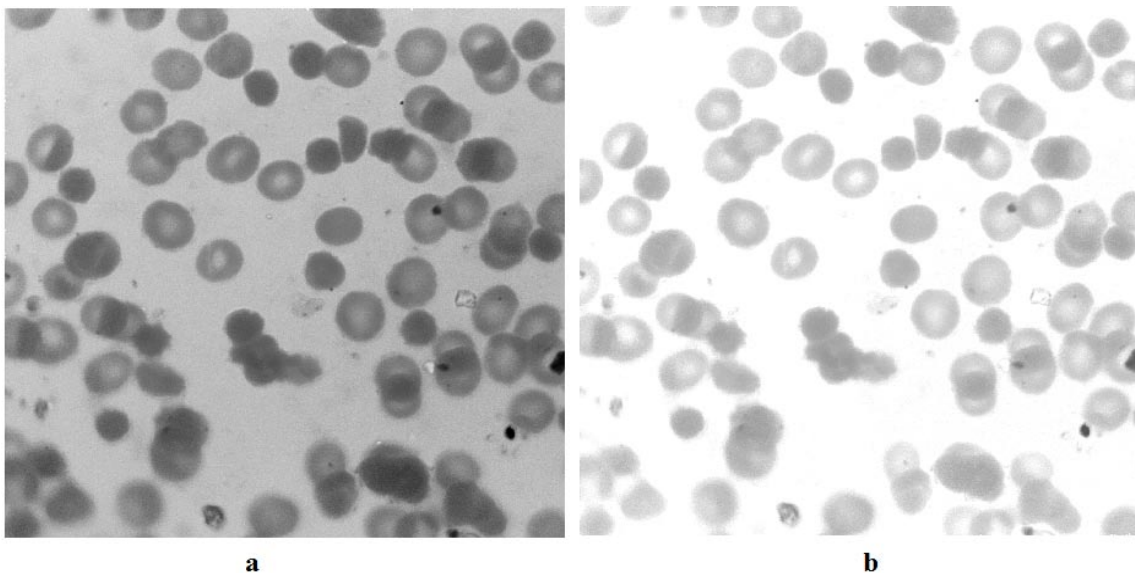


Fig. 1.4: a) Imagen original, b) Imagen con iluminación corregida por la "transformación *top-hat*".

### 1.4.3 Realce

El realce del contraste ha sido uno de los primeros problemas atacado por los especialistas en procesamiento digital de imágenes. Existen muchas aplicaciones en las que se pudiera pensar en estas técnicas para mejorar la visión de una imagen, siendo un clásico la aplicación orientada hacia imágenes médicas donde muchas veces las diferencias de contraste entre dos tejidos diferentes, es muy pequeña.

En muchas imágenes en escala de grises la diferencia entre el primer plano, en el que están presentes las estructuras de interés, y el fondo es un pequeño cambio de intensidad, por lo que nos encontramos ante un bajo contraste entre estos. Principalmente puede conseguirse una mejora en la definición de los bordes, un realce de las zonas intermedias de detalle, un enfoque relativo o un aumento del contraste general de la imagen. Luego todas aquellas aplicaciones en la que se desee distinguir más detalles de los que la propia imagen permite percibir son candidatos para este tipo de técnicas.

El objetivo del realce sobre las imágenes de extendido de sangre es lograr que las células de estas queden resaltadas con respecto al fondo de la imagen, para cuando se aplique la segmentación de la imagen la misma logre una máscara binaria que no pierda ninguna célula. Para el realce se aplicaron técnicas de morfología matemática por su bajo costo computacional y los resultados que brinda la misma. El método utilizado en este trabajo se basa en morfología geodésica, usando dilatación, máximos regionales, erosión y reconstrucción [28], [29]. En la Fig. 1.5 a y b se muestra la imagen original y un realce morfológico respectivamente.



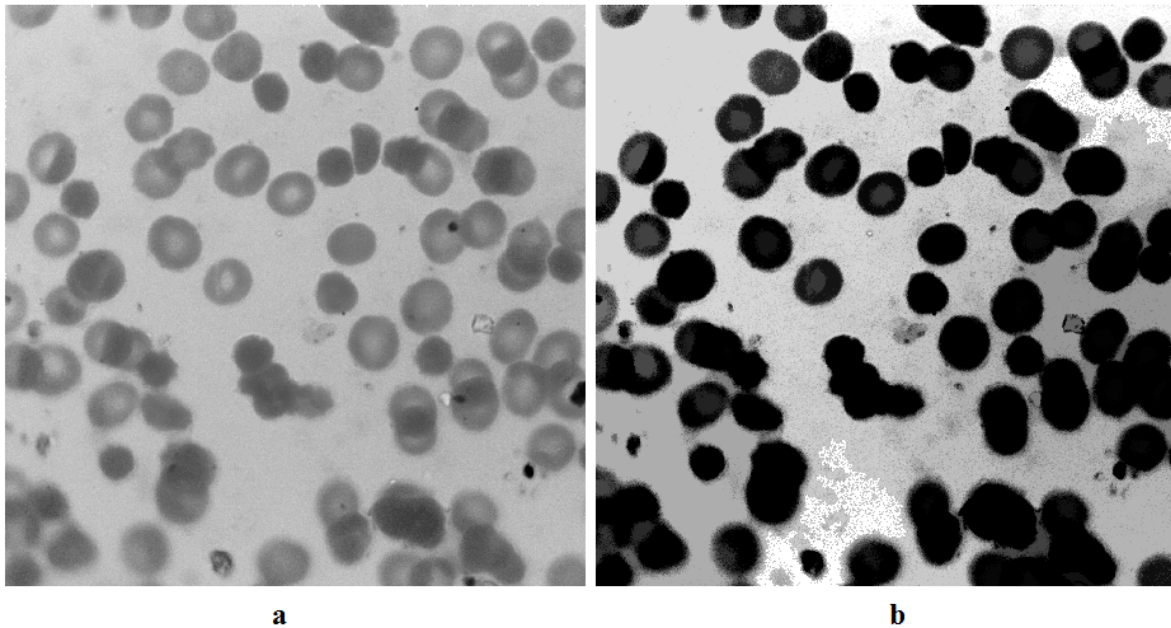


Fig. 1.5: a) Imagen original, b) Imagen con realce morfológico aplicado.

## 1.5 SEGMENTACIÓN

Uno de los pasos para analizar una imagen consiste en separar los distintos objetos, que aparecen en la misma, del fondo de la imagen. La segmentación subdivide una imagen en las regiones u objetos que la contienen. Para la implementación del método que se desarrolla en esta tesis es necesaria una segmentación gruesa. Con el objetivo de lograr una máscara que defina las células como primer plano, sin separar los aglomerados, ni definir con gran exactitud los contornos, solo detectar todas las células presentes en la imagen.

Existe una gran variedad de técnicas de segmentación, que se adaptan al tipo de imágenes y al objetivo que se persigue. La segmentación por umbralado clasifica los píxeles atendiendo únicamente a su nivel de gris. El cálculo de este umbral puede ser de forma global, para segmentar las imágenes sobre la base de la información global obtenida empleando el histograma.

La obtención de este umbral puede ser calculado de forma iterativa por el método de *Otsu* [26], [30], [31], el cual se calcula de forma estadística, basado en el uso de los parámetros función de densidad probabilística de los niveles de intensidad de cada clase y la probabilidad de ocurrencia de cada clase en una aplicación dada. Otras variantes de segmentación se realizan calculando un umbral adaptativo basado en las características



locales de la imagen, el cual se va adaptando a las diferentes regiones de la misma, funcionando muy bien en imágenes con iluminación no uniforme, la cuales son planteadas por Wellner [32], Niblack [33], y White [34], [35].

El método de Wellner calcula un umbral que varía en dependencia de la posición en la imagen, relativo a la media o a la mediana local a un punto de la misma. La implementación en este trabajo difiere del planteado por Wellner, en el cual se calcula una media ponderada justo a lo largo de una fila, o pares de filas en la imagen usando filtros recursivos. Para la implementación de este método en *Matlab* se usa un suavizado simétrico 2D Gaussiano para calcular la media local, siendo lento computacionalmente, pero más general. Este código además ofrece la opción de usar filtrado de mediana como una alternativa robusta a la media (los valores atípicos no influirán en el resultado) y ofrece la opción de usar un umbral fijo relativo a la media/mediana.

El método de Niblack calcula un umbral adaptativo acorde con la media local  $m(i, j)$  y una desviación estándar  $s(i, j)$  y calcula una ventana de dimensiones  $N \times N$ .

El método de White calcula el umbral adaptativo filtrando la imagen original con un filtro de promedio y después restando la imagen original de la filtrada sumándole un desplazamiento y la imagen binaria se obtiene comparando con cero.

Las variantes mencionadas anteriormente basadas en umbralado son de muy poco costo computacional y brindan una imagen máscara que no pierde eritrocitos, ni partes de ellos. En el Anexo 3 se presentan los códigos en *Matlab* y la explicación detallada en los artículos referenciados anteriormente.

### 1.5.1 Detección de bordes

En imágenes médicas una de las características que se pueden obtener fácilmente y cuya detección resulta útil en varias aplicaciones son los contornos y bordes. En la detección de bordes, la imagen inicial se reduce al contorno o borde de los objetos que ella contiene. El borde es un concepto local basado en la medición de la discontinuidad en el nivel de gris en un punto.

La detección de bordes puede ser aplicada de diferentes formas, en dependencia de las características de las imágenes. Las técnicas más comúnmente utilizadas son: derivación, convolución o filtrado, transformada *wavelet*, transformada *Hough*, métodos de *Canny*,

métodos de *Harris*, morfología matemática, etc [26], [30]. Algunas de estas técnicas utilizan detección de puntos y líneas para conformar los bordes. Dentro de estas técnicas existen distintas formas, las cuales se aplican sobre imágenes en niveles de gris, y pueden ser eficientes en dependencia de lo que se quiera como resultado.

En el desarrollo de este trabajo la transformada *Radon* se aplica sobre la imagen gradiente y es necesario que la misma esté limpia de ruido, sin bordes más allá de los que delimitan las células como fronteras. En las imágenes con las cuales se trabaja, la detección de bordes utilizando las técnicas mencionadas anteriormente sobre imágenes en niveles de grises son insuficiente en algunos casos, y en otros se realiza una sobre-detección innecesaria.

De igual forma la detección de bordes también puede ser aplicada sobre imágenes binarias, lo cual sería muy sencillo por cualquiera de las variantes y permite obtener mejores resultados al aplicar la transformada *Radon*. En esta tesis se utilizan los métodos basados en la primera derivada, mediante la variante *Sobel* [26], los cuales dependen de la pendiente de transición. La pendiente en imágenes binarias es muy abrupta y se encuentra solamente en las fronteras que definen las células del fondo.

## 1.6 TRANSFORMADA RADON

La transformada *Radon* continua fue formulada durante el año 1917 por el matemático austríaco *Johann Karl August Radon* (1887-1956), quien demostró que la reconstrucción de una señal 2D a partir de proyecciones 1D es posible.

### 1.6.1 Transformada *Radon* directa

La transformada *Radon* bidimensional (RT-2D) continua es la integral de una función sobre un conjunto de rectas. Una recta  $p = x\cos(\theta) + y\sin(\theta)$  donde  $p$  es la mínima distancia desde la recta al origen y  $\theta$  es el ángulo que forma el eje  $x$  con el vector posición del punto de la recta más cercano al origen. Las coordenadas de una imagen son usualmente positivas con el origen en su esquina superior izquierda; no obstante, para el cálculo de la RT-2D el origen debe desplazarse al centro de la imagen, lo que involucra un desplazamiento espacial. La transformada se presenta en la ecuación (5)

$$R_f(\theta, p) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x\cos(\theta) + y\sin(\theta) - p) dx dy \quad (5)$$

La transformada *Radon*, [10] calcula las integrales de líneas de múltiples fuentes a lo largo de rayos paralelos que atraviesan el objeto, en este caso la imagen, en una cierta dirección. Para representar una imagen, toma múltiples proyecciones de rayos paralelos, de diferentes ángulos, rotando la fuente alrededor del centro de la imagen.

Para ver cómo funciona esta transformada ante estructuras circulares se explicará su comportamiento ante un cilindro como estructura teórica semejante a un eritrocito. El cilindro expresado por la función  $f_{cyl}(x, y)$  centrada en el origen  $(x, y)$  con simetría circular y altura  $\rho$  se muestra en la Fig. 1.6; para el caso que tenga un soporte  $d$  positivo en el plano  $(x, y)$  puede representarse si su radio satisface  $|r| < d$  mediante

$$f_{cyl}(x, y) = f_{cyl}(r) = cyl\left(\frac{r}{d}\right) \begin{cases} \rho; & \text{para } |r| < d, d > 0 \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \quad (6)$$

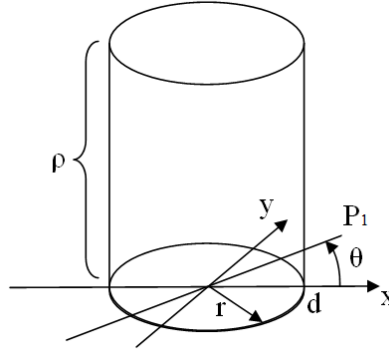


Fig. 1.6: Cilindro con centro en  $(x, y)$  y altura  $\rho$ .

Por tanto la transformada *Radon* en un ángulo dado para un cilindro se define a partir de (5) y (6) en la ecuación (7).

$$\begin{aligned} R^{cyl}_{\theta}(p_1) &= \iint f_{cyl}(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - p_1) dx dy \\ &= \begin{cases} 2\rho \sqrt{d^2 - p_1^2}; & \text{para } |p_1| < d, d > 0 \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \end{aligned} \quad (7)$$

La función de una circunferencia se representa mediante la siguiente ecuación:

$$f_{circ}(x, y) = f_{circ}(r) = circ\left(\frac{r}{d}\right) \begin{cases} \rho; & \text{para } |r| = d, d > 0 \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \quad (8)$$

Para cualquier ángulo la transformada *Radon* de una circunferencia se comporta como una "herradura de caballo". El conjunto de las proyecciones de la transformada *Radon* directa para múltiples direcciones,  $0 \leq \theta \leq 180$  grados, es el sinograma. En la Fig. 1.7 a) se muestra

una circunferencia en blanco con coordenadas  $[x, y]$ . La Fig. 1.7 b), c) y d) muestran las proyecciones en los ángulos 0, 45 y 90 respectivamente.

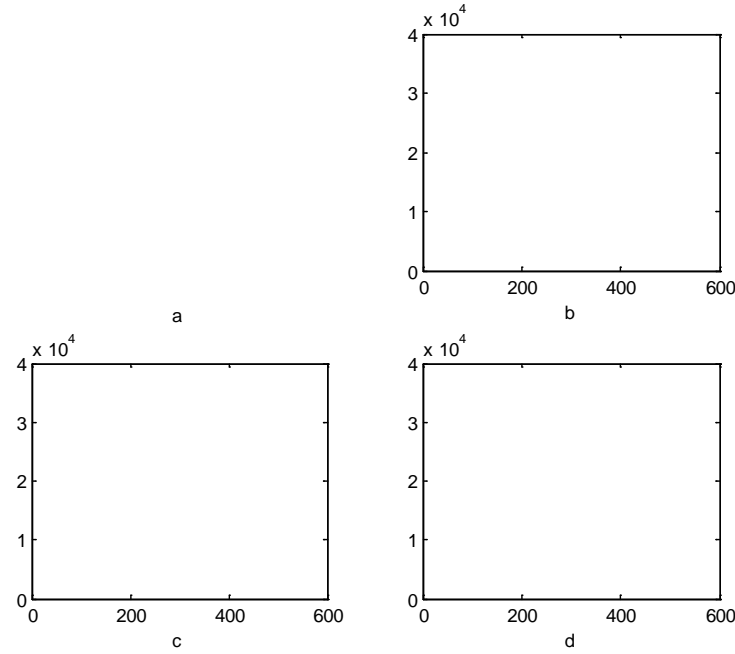


Fig. 1.7: a) Imagen de una circunferencia. b) Proyección de la transformada *Radon* en ángulo 0. c) Proyección de la transformada *Radon* en ángulo 45. d) Proyección de la transformada *Radon* en ángulo 90.

En la aplicación práctica para imágenes digitales la transformada *Radon* no se aplica en su forma continua. Los rayos paralelos que atraviesan la imagen a todo lo largo de cualquier proyección, son un número finito, ya que los sensores prácticos en las cámaras digitales son de espacio discreto. Además los incrementos de los ángulo de giro  $\theta$  también son discretos, como se puede observar en la Fig. 1.8. Por esta razón la transformada *Radon* se aplica en el espacio discreto. La cantidad de proyecciones y ángulos dependen de las características de la imagen u objeto a reconstruir y ningún autor define una cantidad fija.

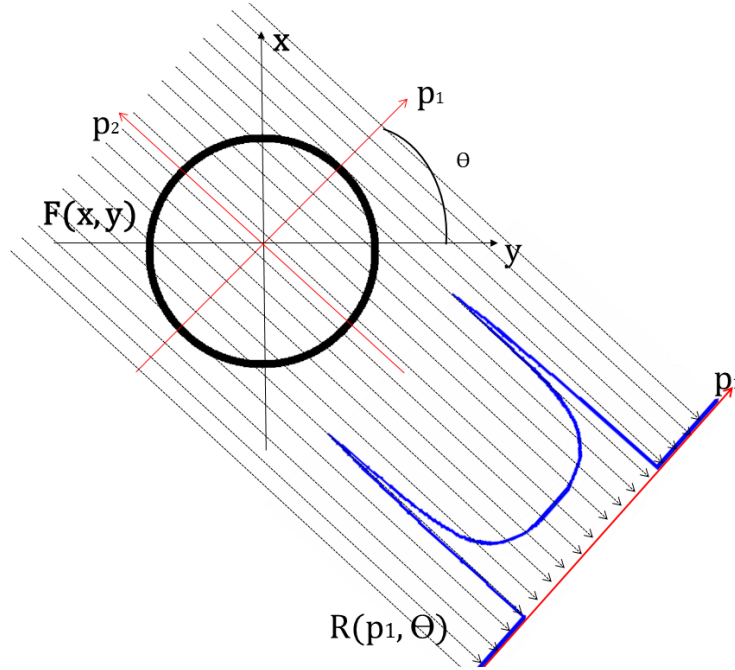


Fig. 1.8: Representación de la transformada *Radon* de una estructura circular para un ángulo  $\theta$  dado.

En el espacio discreto 2D la proyección de una imagen es la sumatoria de todos sus píxeles en un ángulo dado. Para un sistema de coordenadas  $[n_1, n_2]$ , definido por un ángulo  $\theta$ , la transformada *Radon* a lo largo del eje  $n_1$  es la sumatoria de todos sus píxeles, definido en la ecuación (9).

$$R_x(n_1', \theta) = \sum_{n_1 \rightarrow \infty}^{\infty} \sum_{n_2 \rightarrow \infty}^{\infty} f[n_1, n_2] \delta(n_1 \cos(\theta) + n_2 \sin(\theta) - n_1'),$$

$$-\infty < n_1' < \infty \quad (9)$$

### 1.6.2 Filtrado adaptado

Un filtro adaptado es un sistema lineal invariante cuya función principal es detectar la presencia de una señal conocida, o referencia, dentro de una señal recibida. La señal a la salida del filtro será la correlación de la señal referencia (función del filtro) con la señal desconocida.

Para cada ángulo de rotación  $\theta$  la proyección del cilindro sobre el eje  $p$  es la función "herradura de caballo", debido a la simetría del cilindro y a que este se encuentra centrado en el origen de  $(x, y)$ . Para la construcción del filtro se realizó primeramente el cálculo

matemático, el cual se explica a continuación. La implementación en *Matlab* se presenta en el Capítulo 2.

En el plano  $(x, y)$  un cilindro de soporte  $d$  centrado en el origen sería como se presenta en la Fig. 1.9 a), y su proyección para cada ángulo  $\theta_i$ ,  $R_{\theta_i}^{cyl}(p)$  en la Fig. 1.9 b).

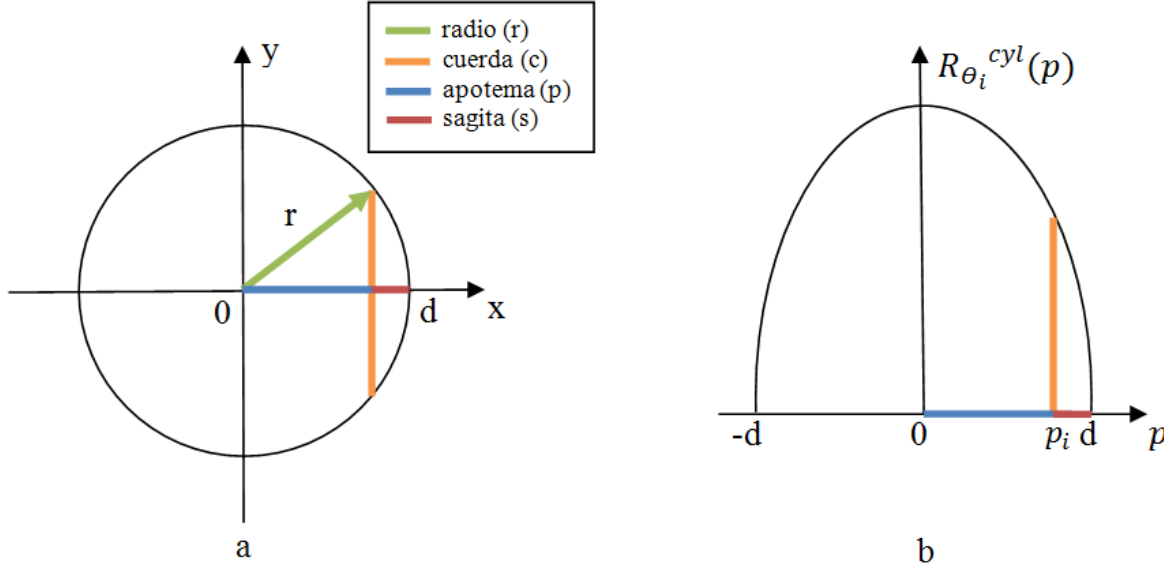


Fig. 1.9: a) Circunferencia que representa la base del cilindro, b) Proyección de la circunferencia en el ángulo  $\theta_i$ .

Por ejemplo, para  $\theta_i = 0$  en cada punto  $p_i$  la altura de  $R_{\theta_i}^{cyl}(p)$  es la cuerda de cada vertical con  $x$ , lo que coincide con el doble de la altura medida desde el eje  $x$

$$2d = 2r \quad (10)$$

El punto  $p_i$  constituye la apotema de la circunferencia. Basado en conocimientos de trigonometría elemental, la longitud de la cuerda que pasa por el punto  $p_i$ , en función del largo de la apotema, siendo el valor  $p_i$  el lado de la apotema, es

$$cuerda = 2\sqrt{d^2 - p_i^2} \quad (11)$$

Por tanto, conociendo la cuerda puede calcularse la apotema ( $p$ ).

Para una estructura circular con un radio conocido  $r_0$  la construcción del filtro se obtendría a partir de las proyecciones correspondientes a cada ángulo [10]. Como se mencionó en el subepígrafe 1.6.1 la transformada *Radon* de una circunferencia es similar a la función “herradura de caballo”. La solución de la transformada *Radon* de una función circular para cualquier ángulo dado, [10] es:

$$R^{circ}_{\theta}(p_1) = \begin{cases} \frac{\partial 2\sqrt{d^2 - p_1^2}}{\partial d}; & \text{para } |p_1| < d, d > 0 \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \quad (12)$$

Resolviendo la ecuación (12) se obtiene la función del filtro:

$$fil(p_1) = \begin{cases} \frac{4d}{\sqrt{d^2 - p_1^2}}; & \text{para } |p_1| < d, d > 0 \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \quad (13)$$

Sustituyendo (10) en (13):

$$fil(p_1) = \begin{cases} \frac{4r}{\sqrt{r^2 - p_1^2}}; & \text{para } |p_1| < r \\ 0; & \text{otro caso} \end{cases} \quad (14)$$

### 1.6.3 Transformada *Radon* reversa

*Johann Radon* demostró matemáticamente que es posible recuperar una función de dos variables si se conocen las integrales de la misma en todas las líneas del plano. Este resultado equivale a que se puede reconstruir la imagen de un objeto bidimensional si se tienen suficientes proyecciones del objeto en 180 grados. Smith, Solmon y Warner [36] definieron que un conjunto cerrado y compacto queda determinado de manera única por el conjunto infinito de sus proyecciones, pero por ningún conjunto finito de ellas. Luego, solo se obtiene una aproximación de la sección a reconstruir. Dado el carácter discreto del problema, lo que se reconstruye no es la imagen de partida sino una aproximación a la misma.

Los métodos para reconstruir una imagen a partir de su sinograma con la transformada *Radon* reversa haciendo que el resultado de la misma  $f'(x, y)$  tienda a  $f(x, y)$  con mayor exactitud se dividen en:

- Métodos algebraicos: Técnicas de Reconstrucción Algebraica (ART por sus siglas en inglés)
- Métodos analíticos: Retroproyección (BP) y Retroproyección Filtrada (FBP por sus siglas en inglés) [37]
- Métodos iterativos: Reconstrucción Iterativa (IR por sus siglas en inglés)

El Teorema de la Proyección [38] es un resultado fundamental, pues demuestra que a partir de suficientes proyecciones se puede conseguir una aproximación suficientemente buena de

$f'(x, y)$ , lo cual trae consigo poder reconstruir  $f(x, y)$ . Si tal reconstrucción es posible, debe existir una forma de expresar la transformada inversa de *Radon*, pues dicha operación consiste en recuperar la señal  $f(x, y)$  a partir de sus proyecciones.

La recuperación mediante retroproyección es el aporte de cada proyección sobre los píxeles de la imagen desde su ángulo de adquisición entre el número de proyecciones. Para la reconstrucción de la imagen  $x[n_1, n_2]$ , donde  $Rx(n_1', \theta)$  es su sinograma en las direcciones  $0 \leq \theta \leq 180$ , puede calcularse su retroproyección mediante la ecuación (15).

$$x'[n_1, n_2] = \sum_{n_1' \rightarrow \infty}^{\infty} \sum_{\theta \rightarrow 0}^{\pi} Rx(n_1', \theta)(n_1 \cos(\theta) + n_2 \sin(\theta) - n_1') \quad (15)$$

La principal dificultad de la retroproyección es que tras su única iteración no alcanza la solución esperada, por tanto es necesario mejorar el resultado. La retroproyección filtrada es la variante mejorada, la misma realza las altas frecuencias mediante un filtrado paso-alto de las proyecciones del sinograma previo a la reconstrucción. Para ello es necesario utilizar el teorema de línea central de Fourier de la transformada *Radon*. El problema de utilizar el teorema de la línea central de Fourier como método para recuperar la imagen a partir de sus proyecciones radica en el muestreo no uniforme. Una vez filtrado el sinograma en el dominio de la frecuencia se retorna al dominio del espacio mediante la transformada de Fourier inversa 1D de sus columnas.

El método de retroproyección filtrada es el más utilizado en tomografía para reconstrucción tanto en imágenes de transmisión (ej. CT) como de emisión (ej. PET) y es actualmente el algoritmo recomendado por la Asociación Nacional de la Industria Eléctrica (NEMA por sus siglas en inglés) debido a su bajo costo computacional, velocidad y sencillez.

Filtrado: Cada proyección puede ser filtrada en el dominio de la frecuencia antes de la reconstrucción multiplicando la transformada de Fourier de las columnas por la respuesta de frecuencia del filtro. En general, en tomografía el tipo de filtrado depende de factores muy diversos tales como la estadística del ruido, el tipo de método de producción de la imagen, el órgano a ser escaneado, el tipo de información que se espera observar en la imagen, etc. Los tipos de filtros son: *Ram-Lak* (filtrado de rampa), *Shepp-Logan* (multiplica el filtro *Ram-Lak* por una función *sinc*), *Cosine* (multiplica el filtro *Ram-Lak* por una función coseno), *Hamming* (multiplica el filtro *Ram-Lak* por una ventana *Hamming*), *Hann* (multiplica el filtro *Ram-Lak* por una ventana *Hann*) [38].



Interpolación: El aumento de la cantidad de proyecciones mejora la calidad de la reconstrucción, pero no siempre son suficientes para una buena recuperación de la imagen. Una alternativa de mejora es la interpolación la cual mejora sustancialmente los resultados, los métodos de interpolación son varios: *nearest*, *linear*, *spline*, *pchip*, *cubic* y *vicubica* [39].

#### 1.6.4 Aplicaciones de la transformada *Radon*

La transformada de *Radon* es una herramienta fundamental en muchas áreas, pues reconstruye una imagen a partir de una colección de sus proyecciones en varias direcciones, siendo el campo de aplicación original de esta técnica la radioastronomía. No obstante, la aplicación más importante y conocida de la transformada *Radon* se da en el campo de la imaginología médica proporcionando las bases teóricas para los dispositivos de tomografía computarizada (CT).

Como ejemplos de aplicaciones se encuentra la detección de barcos en imágenes de Radar de Apertura Sintética (SAR por sus siglas en inglés) [40], la detección de blancos pequeños en *clutter* de mar [41], así como una herramienta para la detección de curvas en imágenes digitales ruidosas [42].

También se usa para la segmentación de imágenes médicas, usando la combinación del histograma multinivel basado en técnicas de segmentación con la transformada *Radon* reversa para incrementar la eficiencia de la segmentación de imágenes [43]. Para la detección de vasos sanguíneos en la retina en imágenes a color basada en la transformada *Radon* y reconstrucción morfológica [44].

### 1.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Después que el algoritmo marque las células, el método propuesto debe ser evaluado estadísticamente. Un análisis estadístico comúnmente empleado para evaluar la calidad de métodos de procesamiento de imágenes es el cálculo de indicadores de desempeño. Ejemplo de los mismos son sensibilidad (Se), especificidad (Sp), predictividad positiva (PP o P+), predictividad negativa (PN o P-), etc. Nasir, Mashor y Mohamed [17], [45] emplean para evaluar métodos de segmentación los indicadores exactitud, sensibilidad, especificidad, predictividad positiva, exhaustividad y medida-F. Popovic [46], utiliza también

sensibilidad, especificidad, DSC o medida-F y otros como eficacia y nivel de prueba. En este trabajo se adaptan estas medidas con vistas a la evaluación de los algoritmos marcadores de eritrocitos.

## 1.8 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

1. En este capítulo se sentaron las bases teóricas para el desarrollo del método de detección de marcadores basado en la transformada *Radon* y sus propiedades de detección de parámetros de forma.
2. De todos los métodos de conversión de color a escala de grises el que mejor resultados ofrece en cuanto a contraste es el algoritmo decolorize, lo cual ha sido confirmado por otros autores como Cadik [27], escogiéndose para el desarrollo de este trabajo.
3. Los métodos de segmentación de Wellner, Niblack y White permiten la obtención de una imagen binaria con todos los eritrocitos representados, siendo elegidos para este trabajo.

## CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se abordan los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de este trabajo. En el epígrafe 2.2 se habla de las imágenes a utilizar y sus características y el epígrafe 2.3 se habla sobre el software y hardware utilizados. El siguiente epígrafe explica el diseño del experimento para la evaluación de los algoritmos de marcado y en el epígrafe 2.5 las variantes utilizadas.

### 2.2 IMÁGENES A UTILIZAR

La transformada *Radon* se aplica en su forma discreta (DRT por sus siglas en inglés), y para el trabajo con imágenes la misma es muy útil. Una imagen digital es un arreglo bidimensional (2D) de números reales o complejos, usualmente denotado por  $x[n1, n2]$  y representados por un número finito de bits, que se obtiene al muestrear una escena física.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizarán imágenes de microscopía celular tomadas en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio marca *Zuzi*, dotado de tres oculares, dos oculares de 10x/20mm, para visualizar las muestras a escala microscópica, y un tercer ocular, al que se conecta un equipo de fotomicrografía. La cámara de fotomicrografía es digital del modelo UCMOS031100KPA, de la misma marca que el microscopio, conectada a una PC por un puerto USB para adquirir las imágenes de forma digital.

Las imágenes están en el espacio de color RGB, en formato TIF, con dimensiones 1500x1500x3 píxeles. De un grupo de imágenes se seleccionaron 20 que en total contienen 1118 eritrocitos obtenidos a partir de extendidos delgados de sangre humana infectada con Malaria mediante cultivo *in vitro*, por lo que las mismas no contienen leucocitos ni plaquetas. Las imágenes tienen diferentes contrastes, no se les estandarizó el color, y cada una posee diferente cantidad de eritrocitos. Además, los aglomerados presentan disímiles formas y posiciones en la imagen para observar cómo se comporta el algoritmo desarrollado. Las 20 imágenes marcadas por los expertos y consideradas como *ground-true* se presentan en el Anexo 6.

### 2.3 SOFTWARE Y HARDWARE UTILIZADO

Para el desarrollo de este trabajo la herramienta fundamental a utilizar fue el *software Matlab* en su versión 7.10.0, por su facilidad de trabajar y reproducir vectores y matrices como gráficos, teniendo instalados las cajas de herramientas (*toolboxes*) de procesamiento digital de imágenes. Para correr los programas se utilizó una computadora con microprocesador Dual Core Intel Pentium E5300 2600MHz de velocidad de procesamiento, con 2 Mega Byte de Caché L2 y 2 Giga Byte de memoria RAM. El Sistema Operativo es Windows 7 Home Premium a 64 bits.

Algunas de las funciones de *Matlab* utilizadas fueron: *imread*, *im2double*, *mat2gray*, *imcomplement*, *strel*, *imerode*, *imdilate*, *imopen*, *imclose*, *graythresh*, *im2bw*, *imfill*, *edge*, *bwconncomp*, *regionprops*, *median*, *imfilter*, *radon*, *iradon*, *imhist*, *bwmorph*. Los resultados de las imágenes marcadas serán visualizados con la función *imshow* y para guardar las imágenes marcadas se superpone la imagen marcador sobre la original y se guarda en memoria con la función *imwrite* para después analizarla estadísticamente.

### 2.4 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En el procesamiento digital de imágenes se han implementado diferentes métodos para la detección de marcadores basados en morfología matemática, lógica difusa y aglomerados. Para la obtención de un método que detecte marcadores en imágenes de microscopía celular se ha trabajado basado en la propiedad de la transformada *Radon* y su comportamiento ante estructuras circulares. Al aplicarle un filtro adaptado, con la forma "herradura de caballo", como se explicó en el capítulo anterior, con un radio específico, a cada una de las proyecciones de la transformada *Radon*, y después reconstruir la imagen mediante la transformada reversa de *Radon*, la misma da como resultado elevaciones máximas en presencia de circunferencias [10].

Generalmente en la detección de parámetros de forma la transformada más utilizada es la de *Hough*, sin embargo, en otros estudios se demuestra que el método de la transformada *Radon* es equivalente, la diferencia reside simplemente en su interpretación computacional. La transformada de *Hough* es más costosa computacionalmente que la transformada *Radon* [7], [9]. En la Fig. 2.1 se muestra el diagrama de flujo de nuestro experimento.

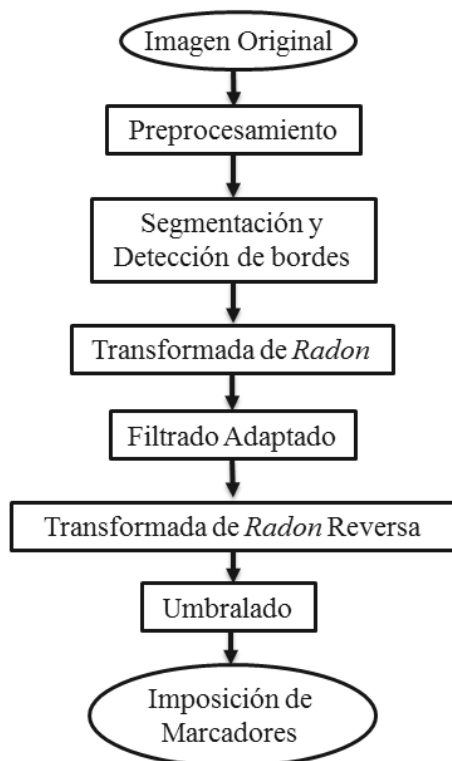


Fig. 2.1: Diagrama de flujo del método implementado.

Para el desarrollo de este trabajo se creó una función llamada *radonmarker* a la cual se le pasa de primer argumento una imagen con bordes detectados y como segundo una imagen binaria y a la salida se obtiene una imagen binaria con marcadores en la posición de cada célula.

A la imagen de bordes se le aplica la transformada *Radon* directa, después se filtran cada una de las proyecciones con un filtro adaptado de radio igual al tamaño de una célula para que al reconstruir la imagen con la transformada *Radon* reversa las estructuras circulares queden resaltadas con picos en sus centros. Después se le aplica un umbral para binarizar la imagen reconstruida y obtener los picos como marcadores. En este epígrafe se explica la función desarrollada y los códigos de la misma se encuentran en el Anexo 2.

#### 2.4.1 Transformada *Radon* directa en Matlab

Para la implementación de la transformada *Radon* se utilizó la función proveniente del *toolbox* de Procesamiento Digital de Imágenes, *radon*, la cual calcula las proyecciones de la imagen a lo largo de direcciones específicas. En este trabajo se utiliza la opción de la transformada *Radon* con haces paralelos y no divergentes (*fan*). Una proyección de una

función bidimensional  $f(x, y)$ , es un conjunto de integrales de líneas. La función *radon*, como está en el espacio discreto, calcula la sumatoria de los píxeles a lo largo de caminos paralelos, o rayos (*beams*), en determinada dirección. Para representar una imagen, toma múltiples proyecciones de la misma en forma de haz, rotando la fuente diferentes ángulos alrededor del centro de la imagen. [39]. La misma tiene la siguiente sintaxis:

$$[R, xp] = \text{radon}(I, \theta) \quad (16)$$

Donde en  $R$  se obtiene la transformada *Radon* de una imagen  $I$  en el ángulo  $\theta$ , en caso de que  $\theta$  sea un vector de ángulos,  $R$  será una matriz denominada sinograma donde cada una de sus columnas representa la transformada de cada ángulo, teniendo tantas columnas como ángulos se quiera. Por lo general, y en este trabajo se emplea así, se toman los ángulos de  $0^\circ$  a  $180^\circ$  con incrementos de  $1^\circ$ , ya que para los demás ángulos se comporta de forma simétrica respecto al eje de las abscisas. El ángulo  $180^\circ$  no se incluye porque es igual al ángulo  $0^\circ$ . Esta función se llama dentro de la implementada en este trabajo y se le aplica a la imagen con bordes detectados como se explicó en este epígrafe.

#### 2.4.2 Implementación del filtro adaptado

Un paso muy importante para que el algoritmo desarrollado de como resultado picos en el centro de cada objeto que detecte como circunferencia, es la etapa de filtrado del sinograma. Para obtener marcadores en la imagen final es necesario filtrar cada una de las proyecciones de la transformada *Radon* con un filtro adaptado, para después reconstruir la misma con la transformada *Radon* reversa. El filtro adaptado debe tener la forma de la transformada *Radon* de una circunferencia, la cual responde a la función "herradura de caballo" como fue demostrado en el subepígrafe 1.6.2.

Antes de la construcción del filtro adaptado es necesario conocer el diámetro de una de las células, y a partir del mismo determinar el del filtro. Este diámetro se calculó de forma automática. Para ello se toma la máscara binaria obtenida de la imagen original y se le pasa como argumento a la función construida. En esta imagen se encuentran elementos con aéreas más pequeñas que la de las células, comportándose como ruido y otros más grandes que son las células aglomeradas. Es necesario eliminar la mayor parte del ruido, para ello se realiza una apertura morfológica con un disco de radio 20. A partir de la máscara limpia de ruido se calcula el área de cada componente con la función *regionprops* y se obtiene un

vector de áreas. Seguido se calcula la mediana de este vector para garantizar que el área que se escoja pertenezca a una célula y no a un objeto ruidoso o a un aglomerado. Suponiendo las células como un círculo y conociendo su área se calcula el diámetro a partir de la ecuación (17). Una vez calculado el diámetro aproximado de una célula se diseña el filtro obtenido en el epígrafe 1.6.2, en *Matlab*. Los códigos del cálculo del diámetro y la obtención del filtro adaptado se encuentran dentro de la función *radonmarker*, (Anexo 2). La representación del filtro se observa en la Fig. 2.2 b.

$$diámetro = 2 * \sqrt{\frac{Area}{\pi}} \quad (17)$$

Para detectar las circunferencias es necesario aplicar un filtrado a cada una de las proyecciones de la transformada *Radon*, como ya se había mencionado. Para el filtrado se utilizó la función *imfilter*, con la siguiente sintaxis:

$$Rf = imfilter(R, filt) \quad (18)$$

Donde *R* es la transformada *Radon*, como se menciona en el epígrafe anterior, *filt* es el filtro calculado y *Rf* es una matriz donde cada columna representan las proyecciones de *Radon* en cada ángulo, pero filtradas.

Para ver la función del filtro en la Fig. 2.3 a) se observa la proyección de 45 grados de la transformada *Radon* sobre una imagen con cinco circunferencias, una en el centro y las otras cuatro en cada una las esquinas, Fig. 2.2. Al filtrar esta proyección con un filtro adaptado, Fig. 2.3 b, se puede observar como el mismo realza las estructuras que tengan su forma en la Fig. 2.3 c.

Fig. 2.2 Imagen de cinco circunferencias.

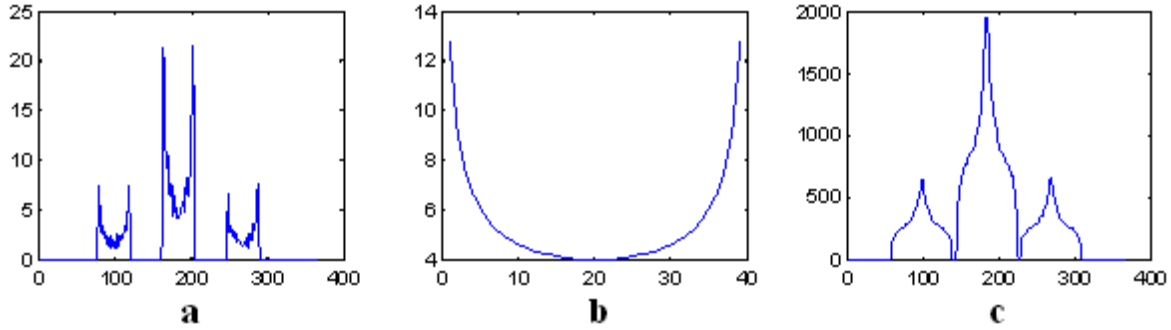


Fig. 2.3: a) Proyección de la transformada *Radon* a 45 grados de una imagen con cinco circunferencias, b) filtro adaptado y d) proyección de 45 grados filtrada con filtro adaptado.

### 2.4.3 Transformada *Radon* reversa en *Matlab*

Para la recuperación de la imagen se aplica la transformada *Radon* reversa al sinograma filtrado obtenido anteriormente. El objetivo no es recuperar la imagen exactamente como estaba al principio, sino que la misma tenga las células resaltadas con picos en el centro.

La reconstrucción de la imagen por este método está implementada en *Matlab* con la función *iradon*. La sintaxis de la misma es:

$$IR = iradon(R, theta, interp, filter, tamaño) \quad (19)$$

Donde *IR* es la imagen reconstruida, *R* será las proyecciones de la transformada *Radon*, en nuestro caso serán las proyecciones después de filtradas con el filtro adaptado, y *theta* es el mismo vector de ángulos que tiene como argumento la función *radon*.

También se le pasa como argumento otros tres parámetros adicionales. Primero el tipo de interpolación, utilizado en el algoritmo de retroproyección (*back projection*) para convertir de coordenadas radiales a coordenadas rectangulares. Segundo un filtro paso-alto tipo rampa en frecuencias que se aplica en este algoritmo para realzar los detalles a ser reconstruidos.

La función *iradon* usa el algoritmo de reconstrucción retroproyección filtrada (*filter back projection*). El filtro que aplica el algoritmo es diseñado directamente en el dominio de la frecuencia y multiplicado por la transformada rápida de Fourier (FFT por sus siglas en inglés) de las proyecciones. Las proyecciones son rellenadas con ceros para evitar el *aliasing* en el dominio espacial y acelerar la FFT. Como último argumento se le debe pasar el tamaño de la imagen a reconstruir.



Si el sinograma de la imagen fue obtenido con la función *radon*, la imagen reconstruida puede no ser del mismo tamaño de la imagen inicial, pero no cambia la escala. En el caso de que se le pase una imagen cuadrada de dimensiones  $N \times N$  la imagen reconstruida es de  $N \times N$ , pero en caso de que la imagen fuese de  $M \times N$ , la imagen reconstruida será de dimensiones igual a  $2 * \text{floor}(\text{size}(R, 1) / (2 * \text{sqrt}(2)))$ , lo cual no coincide con las dimensiones de la imagen a reconstruir.

Para solucionar este problema y que a la función creada se le pueda pasar imágenes con diferentes dimensiones se aplican condiciones. Se calculan las dimensiones de la imagen la cual se quiere reconstruir, si la imagen es de dimensiones  $M \times N$ , siendo  $M = N$ , se le pasa como argumento la dimensión  $N$  y la imagen final sería  $IR(1:N, 1:N)$ . Si la imagen es de dimensiones  $M \times N$ , donde  $N > M$  se le pasa como argumento  $N$ , para que la imagen reconstruida sea de dimensiones  $N \times N$  y la imagen final sería  $IR(1+(N-M)/2:\text{end}-(N-M)/2,:)$ . El tipo de interpolación se escogió realizando pruebas sobre la imagen y observando los resultados, atendiendo a las diferencias que tenían para marcar las células y al costo computacional.

El que mejor resultados ofreció fue interpolación *nearest* (vecinos más cercanos) ya que tiene menor costo computacional que todas los demás. El tipo de filtro escogido es el *Ram-Lak* (filtro rampa) que al compararlo con los demás computacionalmente las diferencias no son significativas, pero los marcadores obtenidos son mejores en cuanto a posición y cantidad, por sus características de resaltar las altas frecuencias.

Al aplicarle esta función al sinograma filtrado con el filtro adaptado el cual realza las formas donde hay una estructura similar a la "herradura de caballo", y reconstruir la imagen con la transformada *Radon* reversa obtendremos a la salida una imagen con elevaciones en la posición central de todos los elementos de la imagen que se hayan detectados como círculos. En la Fig. 2.4 se muestra un ejemplo de cómo al aplicar este método las células son resaltadas en el centro. En Fig. 2.4 a) se muestra la imagen de glóbulos rojos, en b) se muestra la imagen después de aplicarle la transformada *Radon* directa, filtrar cada una de las proyecciones de la misma y recuperarla con la transformada *Radon* reversa y en c) se muestra tipo malla para visualizar mejor los picos.

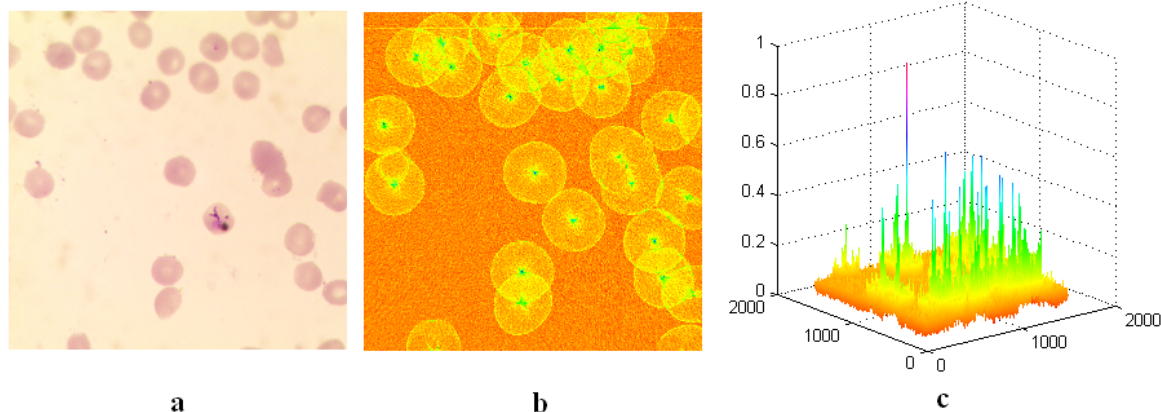


Fig. 2.4: a) Imagen de microscopía celular de glóbulos rojos, b) Imagen reconstruida con la transformada *Radon* reversa después aplicarle la transformada directa y filtrarla, c) Representación de la imagen b tipo malla.

#### 2.4.4 Umbralado y detección de marcadores

Después de obtener la imagen reconstruida mediante la transformada *Radon* reversa es necesaria la búsqueda de un umbral, como se muestra en la Fig. 2.5 a), para binarizar la misma y obtener la imagen marcador. Los picos por encima de un nivel de umbral serían los marcadores y todo lo demás el fondo en negro, Fig. 2.5 b).

La obtención de este umbral de forma automática que funcione para todas las imágenes y obtenga solo los picos que representan centros de células no es simple. Como se puede observar en la Fig. 2.4 c) y 2.5 a), los picos que representan centros de células no tienen la misma altura, dependen del tamaño de la célula y la posición que ocupe la misma en la imagen.

La detección de un umbral adaptativo podría ser la solución pero no solamente binariza los picos que marcan la posición central de las células, también lo hace con los bordes de las células que están levemente resaltados. El histograma de la imagen recuperada no es bimodal, tiene un solo lóbulo, y el cálculo del umbral por el método de Otsu no ofrece una solución para el problema. Para calcular el umbral de forma automática y que el mismo se comporte diferente según la imagen a tratar se tuvo en cuenta la forma de las mismas y cómo se comporta su histograma.

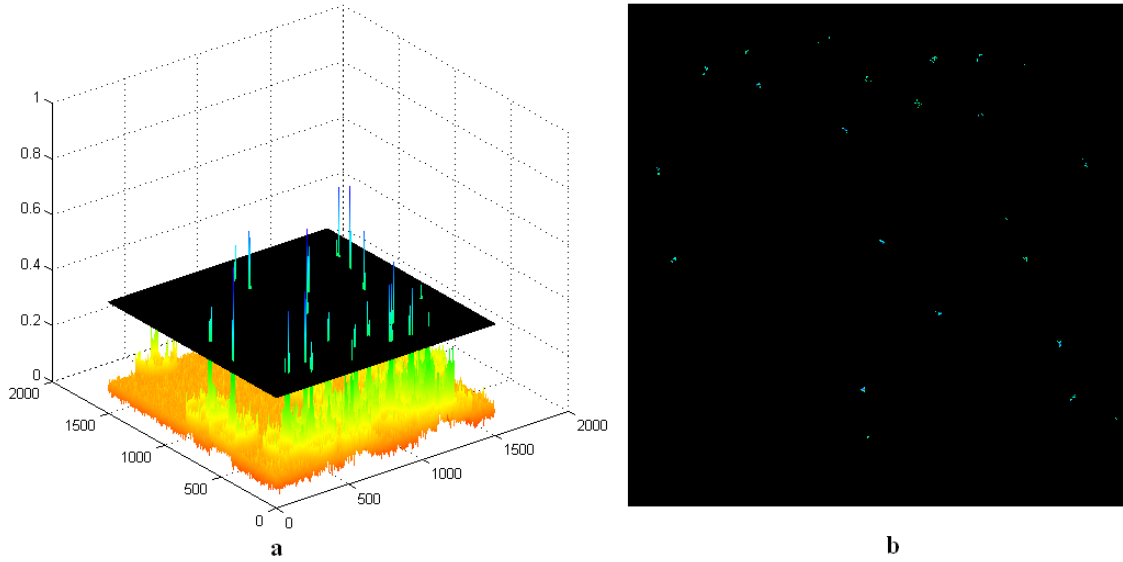


Fig. 2.5: a) Malla de la imagen reconstruida con un nivel de umbral en negro, b) Binarización de la misma a partir del umbral.

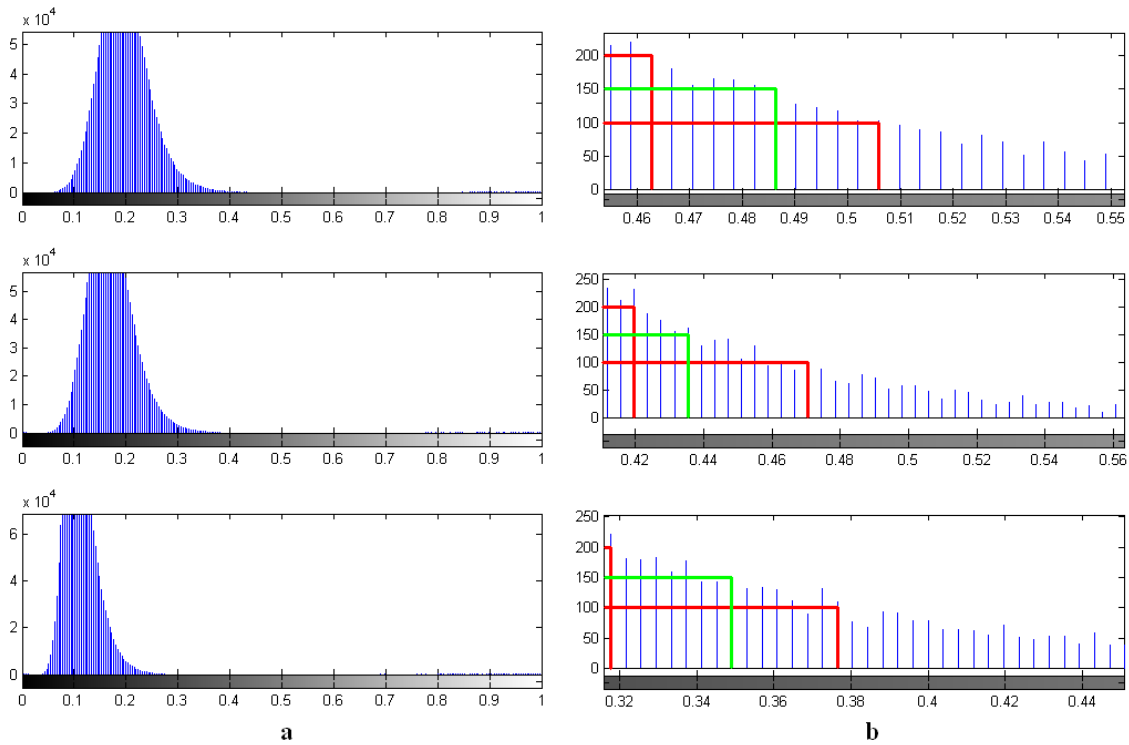


Fig. 2.6: a) Histogramas de tres imágenes obtenidas de la transformada *Radon* reversa, b) Histogramas ampliados en el rango donde se umbraliza.

El histograma de una imagen por el eje de las abscisas representa la distribución de grises y por el eje de las ordenadas la cantidad de píxeles presentes en la imagen de un nivel de intensidad determinado. En la imagen obtenida a la salida de la transformada *Radon* reversa

los picos que representan los centros de los eritrocitos, son los que tiene niveles de intensidades más cercanos a uno. La probabilidad de ocurrencia de los niveles de intensidad que representan los picos es muy baja.

Analizando las imágenes recuperadas y sus histogramas, Fig. 2.6 a) y b) se pudo observar que la distribución de píxeles representadas en el lóbulo del mismo representa completamente el fondo de la imagen, y no los picos que sobresalen en el centro de las células. La representación de los picos en el histograma son los píxeles que se encuentran desde el final del lóbulo visible hasta el final de histograma.

En la imagen recuperada, erróneamente se producen picos que no representan el centro de ninguna célula. Para determinar un umbral que fuese automático y en la medida de lo posible se adaptara a cada una de las imágenes, determinando todos los centros de células y discriminando aquellas elevaciones que no son de interés se tomó como criterio adoptar un valor fijo para el eje de las ordenadas, y que en dependencia del mismo se calculará el umbral en las abscisas.

Para ello se hizo un ciclo *while* que recorriera el histograma de mayor a menor intensidad, y cuando llegara a una cantidad de píxeles dada se detuviera y estableciera el umbral. Probando para las 20 imágenes con que se va a trabajar se observó que fijando una cantidad cualquiera de probabilidad de ocurrencia de píxeles entre 100 y 200 el cálculo del umbral no varía significativamente para una misma imagen, y los resultados son los esperados. Además, el cálculo del umbral se adapta a las veinte imágenes. En la Fig. 2.6 b) se puede observar lo explicado anteriormente para los mismos tres histogramas. Se tomó 150 como la cantidad de píxeles fijas.

Como se puede observar en la Fig. 2.5 b) puede existir más de un marcador dentro de una célula. Para solucionar este problema se realizó una dilatación sobre la imagen binaria obtenida al aplicar el umbral mencionado en el párrafo anterior, con un disco de radio veinte, para unir todos los píxeles dentro de una misma célula y representarlo con un solo marcador. Con el objetivo de que los marcadores fuesen todos del mismo tamaño se aplicó la función *bwmorph* con la sintaxis que muestra la ecuación

$$BW1 = bwmorph(BW', shrink', inf) \quad (20)$$

Otro problema que puede presentarse es que existan marcadores en el fondo de la imagen donde no existen células. Para eliminar este problema se realizó un *and* entre la imagen

obtenida y la binaria limpia de ruido que se le pasa como segundo parámetro a la función implementada. Para obtener la salida de la función *radonmarker* lo último que se realiza es otra dilatación para agrandar los marcadores que habían sido llevados a un solo píxel, esto solo con el objetivo de hacerlos más visibles por un observador humano, lo cual no es necesario para un algoritmo computacional.

## 2.5 VARIANTES DESARROLLADAS

Para el desarrollo de esta tesis se creó la función *radonmarker*, la cual necesita como argumentos una imagen con bordes detectados sobre la que se aplicara la transformada *Radon* y otra imagen en blanco y negro (binaria) sin ruido en el fondo para calcular el diámetro que se utiliza en la construcción del filtro adaptado, como se explicó en el epígrafe anterior. La detección de bordes es un paso fundamental, y de ella dependen en gran medida los resultados finales. Para llegar a la imagen con bordes detectados se aplican cuatro pasos.

1. Primeramente se convierte la imagen de color a escala de grises, y se utilizaron dos variantes, escoger el plano de intensidad del espacio de color CIEL\*a\*b\* y conversión a gris mediante el algoritmo *decolorize*.
2. Seguidamente, como un paso opcional, se realiza un preprocesamiento sobre la imagen, que puede ser suavizado, realce o corrección de iluminación. Existen muchas formas de mejorar una imagen, pero en este trabajo se escogieron basadas en morfología matemática las cuales se explicaron en el epígrafe 1.4.
3. El siguiente paso es la conversión de la imagen a binaria, para sobre esta detectar los bordes. Las variantes de conversión de escala de grises a binaria fueron las tratadas en el epígrafe 1.5.
4. Se detectan los bordes sobre la imagen binaria con la función de *Matlab edge*.

La combinación de estos cuatro pasos en las diferentes formas de aplicarlos ofrece disímiles variantes. Además existen en la literatura otras formas de conversión de color a escala de grises, de preprocesamiento y de conversión de la imagen de escala de grises a binaria. De todas las variantes probadas se escogieron las que mejores resultados ofrecieron en cuanto a las variables estadísticas medidas y al costo computacional.

Las tres variantes escogidas se presentan en el siguiente esquema gráfico:

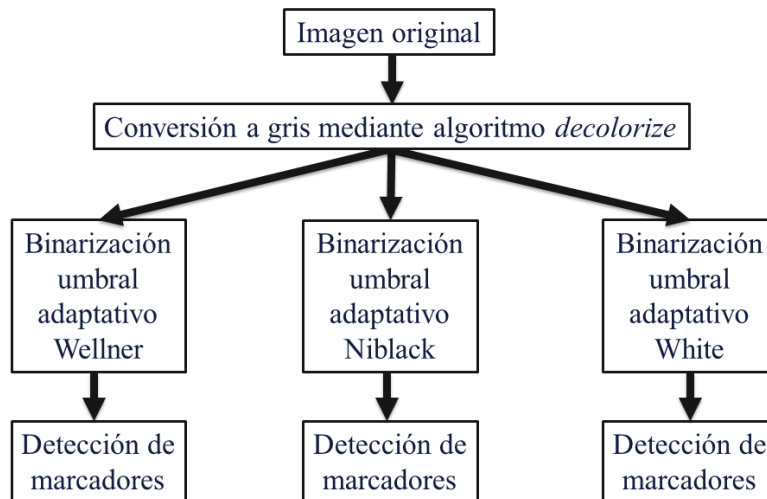


Fig. 2.7: Variantes escogidas finalmente.

Para identificar cada una de ellas a la hora de mencionarlas se adoptan los siguientes nombres:

1. Variante de obtención de marcadores segmentando con el método de Wellner.
2. Variante de obtención de marcadores segmentando con el método de Niblack.
3. Variante de obtención de marcadores segmentando con el método de White.

Para explicar cómo están implementadas en *Matlab* las variantes finalmente desarrolladas primeramente se carga la imagen con la función *imread* pasándole como argumento el camino y el nombre de la imagen a analizar. Luego de cargar la imagen en RGB se convierte a escala de grises con el algoritmo *decolorize*, al cual se le pasa como argumento la imagen y un segundo parámetro llamado "efecto" que especifica cuanto del contenido acromático de la imagen debería ser alterado para adaptar el contraste cromático. El mejor resultado se obtuvo en 0.3.

Luego se aplica un método de segmentación gruesa, que puede ser el planteado por Wellner, por Niblack o por White. Este paso de segmentación es muy importante, ya que sobre la imagen binaria se van a detectar los bordes, y mientras más se asemejen los eritrocitos con los bordes detectados a circunferencia de radios semejantes mejor será el filtrado adaptado, que es el encargado de resaltar picos en la imagen reconstruida por la transformada *Radon* reversa.

La imagen binaria obtenida por los métodos de segmentación planteados ofrece muy buenos resultados, ya que segmenta la gran mayoría de los eritrocitos y elimina fragmentos

de ellos en muy pocos casos. Un inconveniente que tienen estos métodos de segmentación es que dejan mucho ruido en el fondo.

Para eliminar artefactos en la imagen binaria se realiza una apertura con un disco de radio 20, suavizando mucho los bordes. Sobre el resultado de esta apertura se calculan las áreas de todos los objetos con la función *regionprops*, y se escogerá la mínima. Con la función *bwareaopen* se eliminan, en la imagen binaria obtenida por los métodos de segmentación de Wellner, Niblack y White, aquellos objetos que sean menor que el área mínima calculada anteriormente.

Teniendo la imagen binaria se pueden detectar los bordes pero para ello primero se le hace otra apertura con un disco de radio 3 para suavizar los contornos de los eritrocitos levemente. Esta imagen con bordes detectados o gradiente es la que se utiliza para pasarle como primer argumento a la función creada.

Como segundo argumento es necesario pasarle además la imagen binaria, porque sobre esta se calcula el diámetro promedio de los eritrocitos para construir el filtro adaptado. Esta imagen debe estar limpia de ruido y solo tener representada como primer plano los eritrocitos.

Para el segundo parámetro que se le pasa a la función creada no se utiliza la imagen binaria sobre la cual se detectaron los bordes. Se calcula otra imagen binaria a partir de un umbral obtenido por el método de *Otsu*. Después, la imagen binaria con los eritrocitos en el primer plano se le rellena con *imfill* los huecos dentro de los mismos para finalmente aplicarle una apertura con un disco de radio 10 y eliminar el ruido.

Para este segundo parámetro se usa el método de *Otsu* Debido a que el mismo ofrece una imagen binaria la cual con una simple apertura se eliminan aquellos objetos que no son eritrocitos, para sobre esta imagen calcular el diámetro del filtro adaptado, el cual se explicó en el subepígrafe 2.4.2. Las variantes seleccionadas solo dependen del tipo de segmentación aplicada. En el Anexo 1 se pueden encontrar los códigos de *Matlab* implementados en cada una de las tres variantes.

En la búsqueda de variantes se probaron muchas alternativas aplicando los métodos de pre-procesamientos expuestos en el epígrafe 1.4, o detectando bordes sobre las imágenes en escala de grises. Comparando las tres escogidas con otras implementadas los resultados

estadísticos de las tres variantes escogidas son superiores, de bajo costo computacional y de fácil implementación y programación.

## 2.6 MEDIDAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACIÓN

Para el cálculo de los índices de desempeño es necesaria la construcción de una Matriz de Confusión o Tabla de Contingencia, de la cual se muestra su estructura en la Fig. 2.8. Las células marcadas por el algoritmo realizado serán comparadas con un estándar dorado. Para la construcción del mismo fueron marcadas 20 imágenes de glóbulos rojos por 5 especialistas, dos de ellos del Centro de Estudios de Electrónica y Tecnología de la Información (CEETI) y los otros tres del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ). Estos dos centros de investigación se encuentran en la Universidad Central de las Villas (UCLV).

			Imagen	
			Especialista	
			célula	no célula
Variante	Software	célula	VP	FP
		no célula	FN	VN

Fig. 2.8: Matriz de Confusión o Tabla de Contingencia.

En la construcción de la Tabla de Contingencia se realiza a partir de la siguiente terminología. Los verdaderos positivos (VP) corresponden a células marcadas por el experto que el software marcó como célula. Los falsos positivos (FP) son los marcadores que marcó el software donde no marcó el experto. Los falsos negativos (FN) son las células que fueron marcadas por el experto y no por el software. Los verdaderos negativos (VN) son objetos o células en la imagen que no fueron marcadas por el experto y tampoco por el software. En el capítulo 3 se verán ejemplos en imágenes de lo anteriormente explicado.

Para determinar si una célula es contable o no y determinar las imágenes marcadas que se consideraran estándar dorado se tuvo en cuenta los siguientes criterios:



1. Que fuera marcada por al menos 3 de los 5 especialistas.
2. Si la célula toca los bordes de la imagen, sea visible más de la mitad.
3. En caso de que una célula se encuentre superpuesta completamente sobre otra se toma como una sola.
4. Las células que están en los bordes y no fueron marcadas por el experto no se consideran como válidas, por tanto si el especialista no la marca y el software tampoco no se considera como VN y si el especialista no la marca y el software sí, no se considera FP.
5. Como VN se toman aquellos objetos que formen parte del fondo y el especialista no considero como célula.
6. Los FP son las marcas que puso el software en donde no había células. Cuando en una célula existen dos o más marcas se considera una como VP y las demás como FP.
7. Cuando hay dos células solapadas marcadas por el experto como independientes y un solo marcador impuesto por el software se considera como un VP y un FN.

Para el desarrollo de este trabajo serán calculados los indicadores de desempeño exactitud (Ex), sensibilidad (Se), especificidad (Sp), predictividad positiva (Pp), y medida-F (m-F).

La exactitud es la probabilidad de que los resultados del software sean completamente verdaderos, e indica su consistencia, expresada en este trabajo en por ciento. Se calcula como la cantidad de aciertos que tiene el software dividido entre la suma de aciertos con los no aciertos, ecuación (21).

$$Exactitud = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} * 100 \quad (21)$$

La sensibilidad se expresa como la probabilidad de que lo marcado por el experto como eritrocitos sean marcados por el software, expresada en por ciento, ecuación (22).

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} * 100 \quad (22)$$

La especificidad es la probabilidad de que los no eritrocitos sean detectados correctamente, también expresada en este trabajo en por ciento, ecuación (23).

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} * 100 \quad (23)$$

La predictividad positiva se expresa como la probabilidad de que los eritrocitos detectados realmente lo sean, ecuación (24).

$$\text{Predictividad positiva} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (24)$$

La medida-F es la probabilidad de que el software marque los eritrocitos señalados por el experto sin cometer errores, ecuación (25).

$$\text{Medida} - F = \frac{2 * VP}{2 * VP + FN + FP} \quad (25)$$

No obstante, dado que algunas referencias utilizan el cálculo del porcentaje total de eritrocitos marcados como criterio de evaluación; esto es la relación del total marcado entre el total a marcar ( $\times 100$ ) este trabajo también determina este índice.

## 2.7 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

1. Para la detección de bordes los métodos que mejores resultados ofrecieron en pruebas preliminares fueron los calculados sobre la imagen binaria, por lo que para la búsqueda de una máscara binaria que detectara todos los eritrocitos, y fuese de fácil implementación y bajo costo computacional se implementaron los métodos de umbralado adaptativo de Wellner, Niblack y White.
2. La detección de marcadores utilizando la transformada *Radon* a una imagen gradiente, aplicando después un filtro adaptado a cada una de las proyecciones, reconstruyendo la imagen con la transformada *Radon* reversa y finalmente umbralando los picos realzados es muy factible.
3. Una buena medida de comparar los resultados entre las variantes desarrolladas y el método de morfología matemática es calculando índices de desempeños.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos por cada una de las variantes escogidas del método de detección de marcadores aplicando la transformada *Radon*. Las tres variantes escogidas fueron las que mejores resultados ofrecieron de forma global. Las mejoras que se obtienen al aplicar un método de preprocesamiento, al escoger otro método de segmentación o de detección de bordes, al variar el segundo parámetro de la función *decolorize* o utilizar el espacio de color CIEL\*a\*b\* puede resultar mejor a la hora de imponer los marcadores para determinadas imágenes. Pero de forma global las variantes planteadas son las mejores. Para observar cómo se comportan las variantes se realiza una comparación estadística entre las mismas y además con otro método de detección de marcadores mediante morfología matemática. Para la evaluación de las variantes escogidas se tienen en cuenta los resultados estadísticos y el costo computacional de la misma.

### 3.2 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE WELLNER (VARIANTE 1).

En la Fig. 3.1 a) se observa el *ground-truth* (imagen de referencia) de la imagen en cuestión, marcada manualmente, tomando la media del criterio de todos los especialistas mientras que en la Fig. 3.1 b) se encuentra la misma imagen con la detección de marcadores realizando la segmentación a través del método de Wellner. Las marcas verdes que fueron impuestas por el software automáticamente y coinciden con las de la imagen de referencia se corresponden con los VP.

Señalado con flechas rojas están algunos eritrocitos que no fueron marcados por el software y si por los expertos, los cuales se consideran como FN. En la parte inferior izquierda se señalan dos aglomerados los cuales el software no marca los eritrocitos que los componen como independientes y los expertos sí. Estos eritrocitos están solapados unos con otros en la mayor parte de su área, por lo que es muy difícil que con este algoritmo sean marcados como independientes.

Con una flecha azul se encuentra señalado aquellas marcas que fueron consideradas como FP. La gran mayoría de los FP detectados en el conteo de las imágenes viene dado como marcas dobles sobre un eritrocito. Esta variante, para la imagen escogida tiene solamente un FP, pero en el Anexo 4 se puede observar que la cantidad de FP por imágenes es baja, de seis en el mayor de los casos.

La flecha amarilla es un ejemplo de lo que se toma como VN, es decir, aquellos artefactos que existen en la imagen de referencia no siendo marcados por los expertos y sobre los que el software no impone marcas. Los glóbulos rojos que se encuentran en los bordes de la imagen y no son considerados como contables en la imagen *ground-truth* y el software no los marca, no son considerados FN, pero en caso de que fuesen marcados no se consideran FP, porque realmente existe su presencia en la imagen.

Las 20 imágenes acumulan en esta variante un total de 963 VP, 155 FN, 31 FP y 36 VN. Las imágenes 9, 17 y 19 son en las que mayor cantidad de eritrocitos deja de marcar. Esta variante marca un 86 % del total de los eritrocitos. La imagen más costosa computacionalmente para esta variante fue la número 15, con 31.3 segundos y la menos costosa es la número 12 con 19.2 segundos.

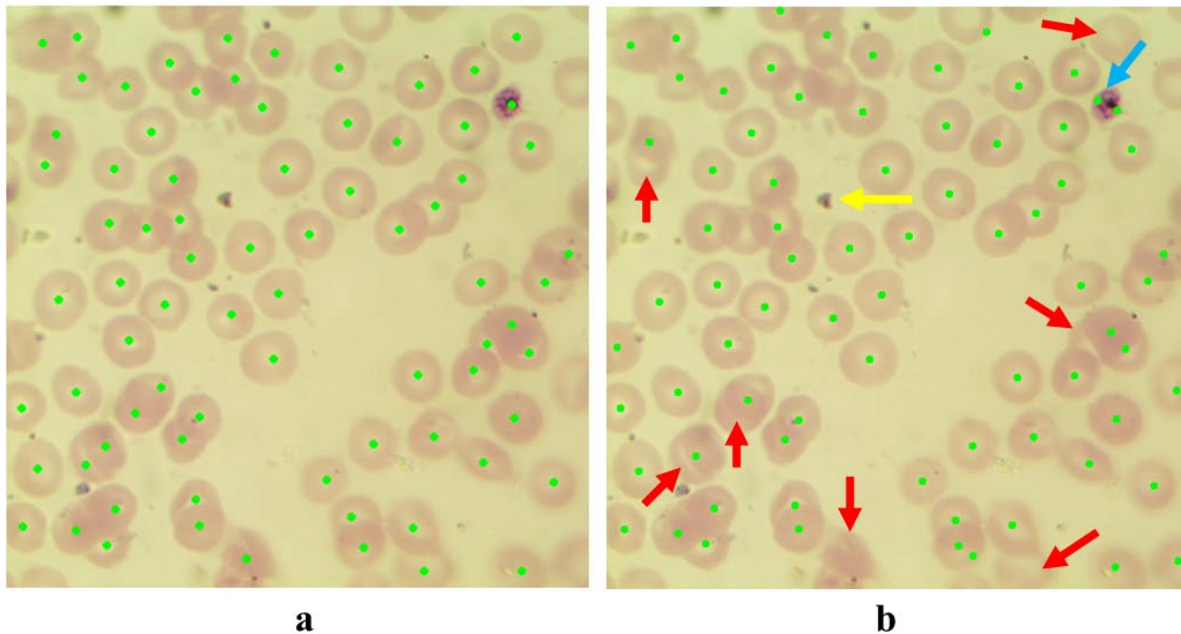


Fig. 3.1: a) Imagen *ground-truth*, b) Imagen marcada por la Variante 1.

### 3.3 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE NIBLACK (VARIANTE 2).

Para comentar los resultados de esta variante se escogió la misma imagen que en la variante 1. En la Fig. 3.2 a) se muestra nuevamente el *ground-truth* y a su derecha la imagen marcada por el software (Fig. 3.2 b). La determinación de VP, FN, FP y VN se hace análogamente como se realizó en la variante 1.

Esta variante dio como resultado un total de 985 VP, 133 FN, 38 FP y 36 VN, marcando un 88 % de los 1118 eritrocitos contables definidos por los expertos. La cantidad de VP en esta variante fue superior que en la variante 1 (umbralado mediante Wellner), siendo significativas las imágenes 1 y la 18, aunque en la mayoría de las imágenes marca mayor o la misma cantidad de VP, excepto en las imágenes 4, 5, 11 y 20.

El total de verdaderos negativos disminuyen en 1 con respecto a la variante anterior dado que en la imagen 17 se encuentra en el fondo un objeto el cual no es definido por los especialistas como un eritrocito y no es marcado en la variante 1, no siendo así en la variante 2, por lo que en esta última lo considera un FP. La imagen más costosa fue la número 11 con 21.3 segundos y la menos costosa fue la 16 con 15.1 segundos.

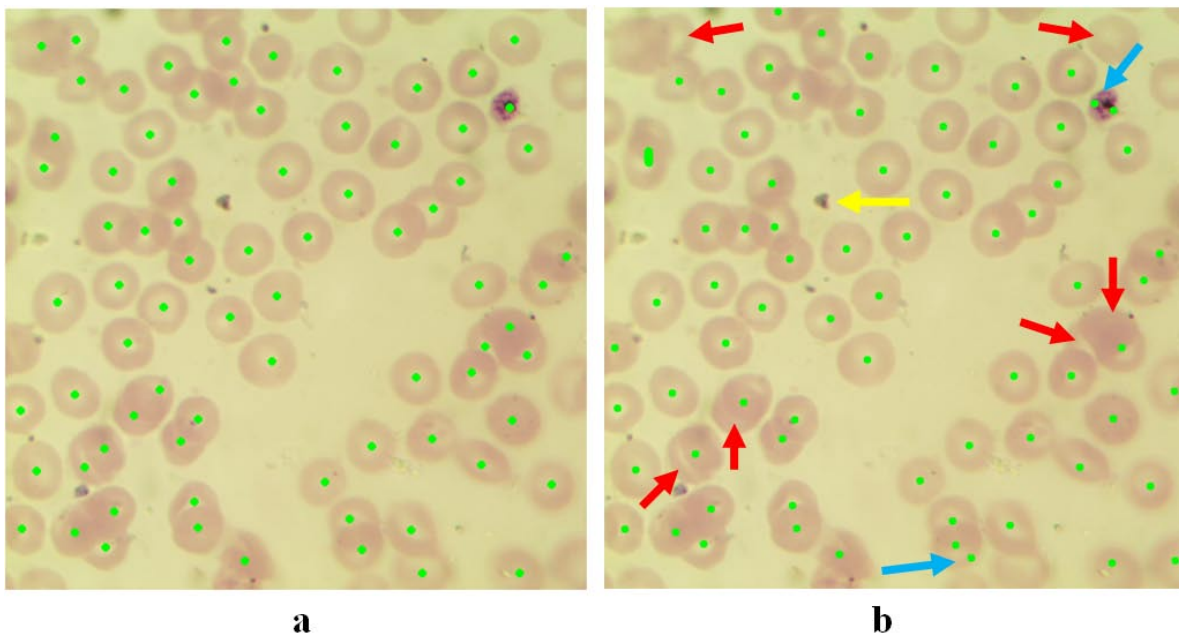


Fig. 3.2: a) Imagen *ground-truth*, b) Imagen marcada por la Variante 2.

### 3.4 VARIANTE DE OBTENCIÓN DE MARCADORES SEGMENTANDO CON EL MÉTODO DE WHITE (VARIANTE 3).

En esta variante, al igual que para las dos anteriores se selecciona la misma imagen para ser analizada en la forma en que el software realiza las marcas. En la Fig. 3.3 a) se muestra nuevamente la imagen *ground-truth* y en b) la imagen marcada por el algoritmo. La determinación de VP, FN, FP y VN se hace análogamente como se realizó en la variante 1 (umbralado mediante Wellner) y 2 (umbralado mediante Niblack).

Esta variante, a pesar de no ser la de mejores resultados globalmente sí lo fue para la imagen que se analiza. En esta variante se corrobora como los eritrocitos aglomerados, que se encuentran en la esquina inferior izquierda tampoco son marcados como independientes. Mediante esta variante se obtuvieron un total de 973 VP, 145 FN, 30 FP y 35 VN marcando el 87 % del total de eritrocitos.

La cantidad de VP y FN para esta variante fue igual que para la primera, sin embargo, se comporta de forma diferente a la hora de marcar cada imagen por separado. Esta variante es la que menor cantidad de FP da como resultado y en cuanto a FN presenta el mismo comportamiento que la variante 2. Para la variante 3 la imagen de más costo computacional fue la número 15 con 34.8 segundos y la de menor costo fue la imagen 13 con 15.9 segundos.

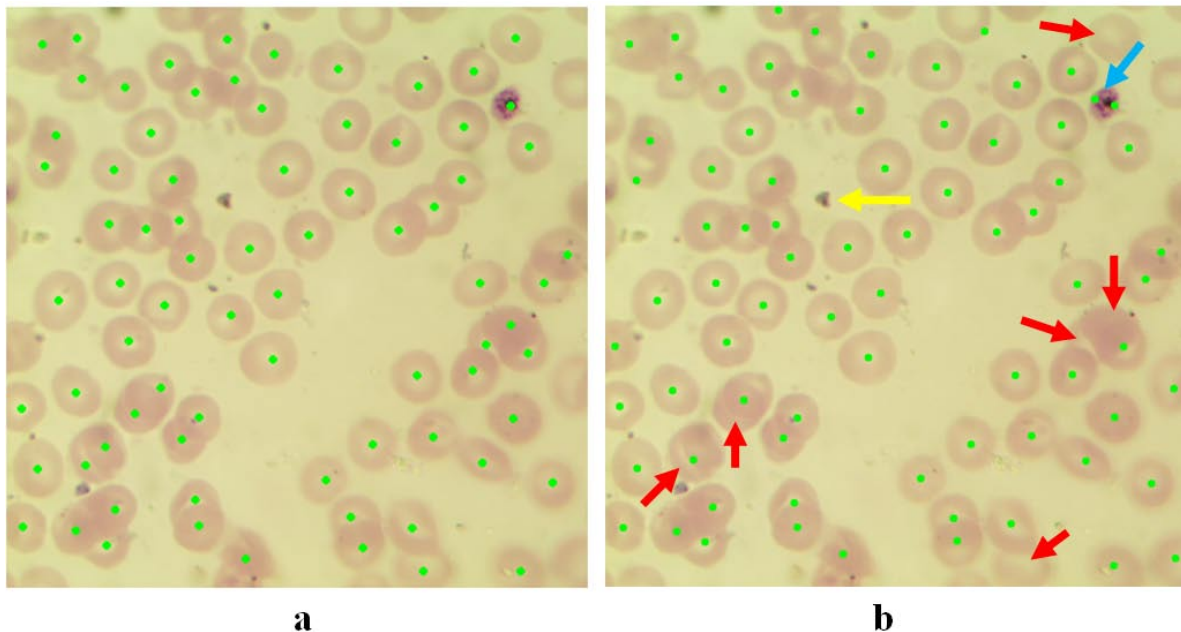


Fig. 3.3 a) Imagen *ground-true*, b) Imagen marcada por la Variante 3.

Para las tres variantes desarrolladas en esta tesis, se puede afirmar que cuando los aglomerados están compuestos de eritrocitos solapados en la mayor parte de su área el software falla a la hora de marcarlos como independientes. Sin embargo, para el eritrocito marcado en la parte superior derecha los tres métodos fallan a la hora de marcarlo, y el mismo, no se encuentra formando un aglomerado.

La causa de que no sean marcados los eritrocitos como este es la selección del umbral que se aplica después de la transformada *Radon* reversa para binarizar la imagen con picos que resulta de la misma. Por la gran variedad de tamaños de los eritrocitos y por la posición que los mismos ocupan en la imagen el filtrado adaptado que se le aplica a las proyecciones de la transformada *Radon* no resalta todos los picos de igual forma, por lo que se pueden perder algunas marcas a la hora de aplicar el umbral.

### 3.5 COMPARACIÓN ENTRE LAS VARIANTES DESARROLLADAS Y EL MÉTODO DE MM.

En este epígrafe se realiza una comparación estadística entre las tres variantes planteadas en este trabajo basadas en la transformada *Radon* y además con una de las variantes basadas en morfología matemática que se mencionó en el epígrafe 1.2. A partir de este momento cada vez que se hable del método de MM se hará mención a la "extracción de marcadores utilizando la transformada de distancia", mediante morfología matemática.

Esta última se escogió debido a que la otra basada en esta misma técnica ofrece resultados muy inferiores para estas imágenes. Se mostrarán gráficas de barras con los índices estadísticos exactitud, sensibilidad, especificidad, predictividad positiva y medida-F de forma comparativa entre las tres variantes y el método de MM para cada una de las veinte imágenes. Por el eje de las abscisas se representan las imágenes y por el de las ordenadas el valor del índice a representar. Además se mostrará una tabla con cada uno de estos índices calculados de forma global para cada variante.

#### 3.5.1 Índices estadísticos para cada imagen.

La Fig. 3.4 muestra la gráfica de la exactitud, que es la probabilidad de que los resultados del software sean completamente verdaderos, definida en la ecuación (21), e indica que tan fiel es el algoritmo a la hora de marcar sin cometer errores.

Comparando los resultados para cada imagen se puede observar como las variantes basadas en la transformada *Radon* son superiores al método MM en todas las imágenes, exceptuando en la imagen 11 que da mejores resultados el método MM que la variante 1 (umbralado mediante Wellner) y en la imagen 15 también ofrece mejores resultados que la variante 3 (umbralado mediante White).

En la imagen 9 y 19 es donde peores resultados ofrece este índice para todas las variantes, debido a que son en las que más células se dejan de marcar con respecto al total. En la imagen 10, la variante 2 (umbralado mediante Niblack) y la 3 (umbralado mediante White) dan como resultado un 100%, como para la imagen 13 la variante 2, debido a que todos los eritrocitos señalados por los expertos como contables son marcados por el software como independientes y lo que no fue marcado como eritrocito el software lo detectó como no eritrocito.

En estas dos imágenes los eritrocitos marcados están bien definidos, y ninguno se encuentra en la mayor parte de su área solapado con otro. Al observar la gráfica mostrada en la Fig. 3.4 para las imágenes 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 la exactitud ofrece los mejores resultados. Estas son las imágenes que menor cantidad de eritrocitos tienen y los aglomerados presentes tienen los eritrocitos bien definidos. Sin embargo, la imagen 1 es una de la que más eritrocitos presentan, y los mismos se encuentran aglomerados igual que en las demás imágenes, pero en esta están bien definidos, y no hay ninguno completamente solapado con otro.

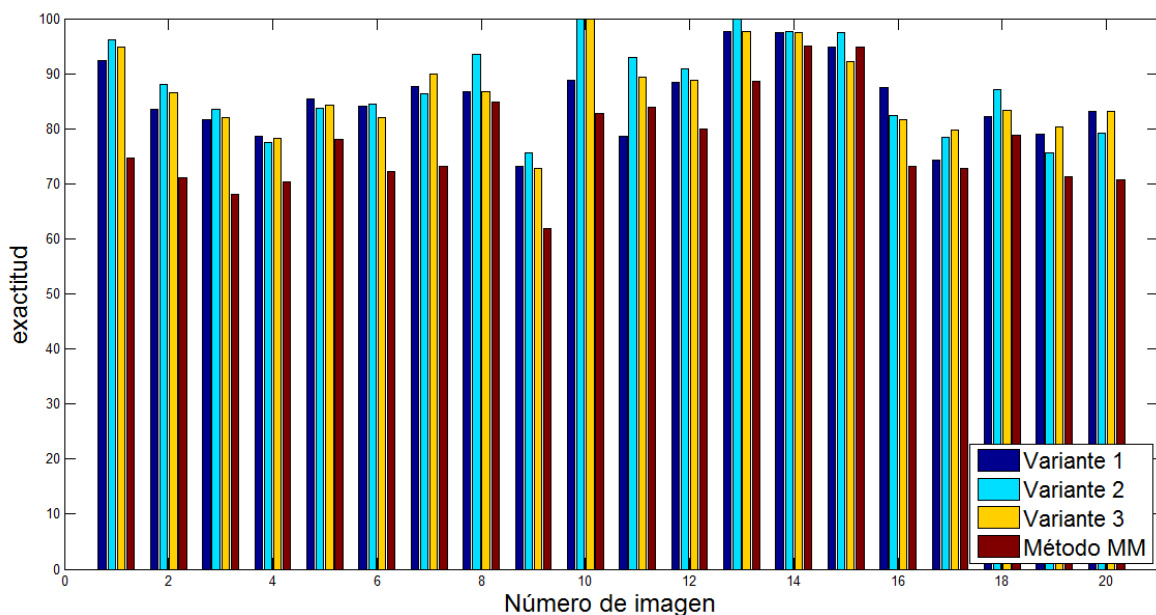




Fig. 3.4: Exactitud calculada para cada una de las tres variantes propuestas y para el método de MM.

La gráfica mostrada en la Fig. 3.5 es la sensibilidad, definida como la probabilidad del software marcar todo lo que definieron los expertos como eritrocitos. En este índice el método de morfología matemática funciona mejor o igual que todas las variantes planteadas en este tesis en las imágenes 6, 11, 15 y 16. En la imagen 6 y la 16 los VP marcados por el método MM son superiores a las tres variantes basadas en la transformada *Radon*, sin embargo la cantidad de FP aumenta considerablemente, ver Anexo 4. Para este índice las imágenes que peor resultados dan son la 9 y la 19 al igual que en la exactitud y las mejor marcadas también son las mismas que en el índice anterior.

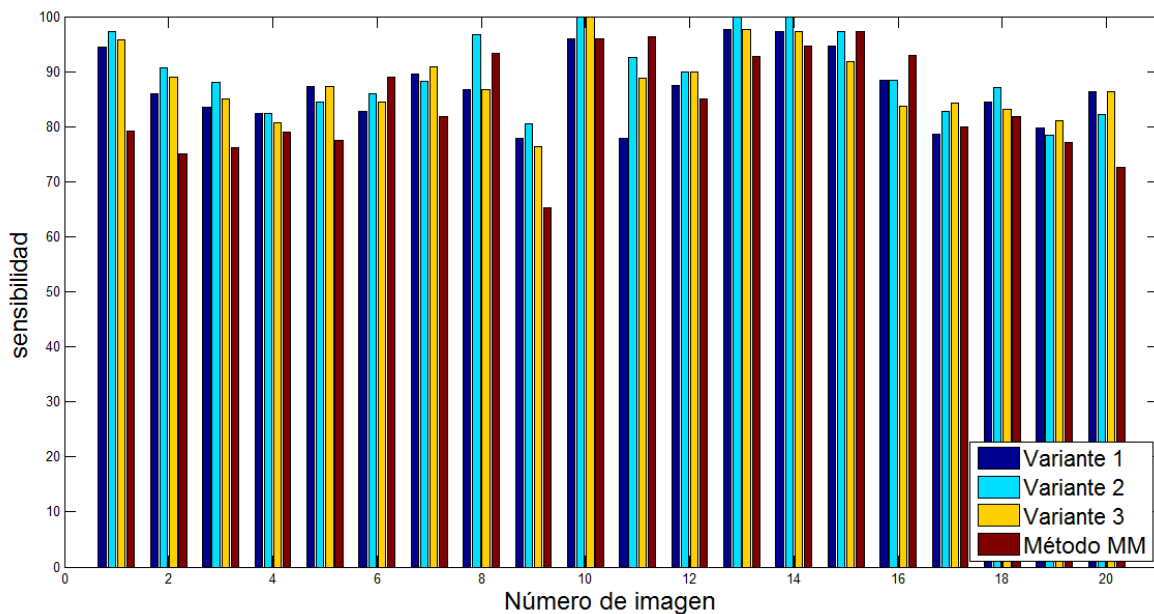


Fig. 3.5: Sensibilidad calculada para cada una de las tres variantes propuestas y para el método de MM.

La especificidad calculada para cada imagen se muestra en la gráfica de la Fig. 3.6, y se define como la probabilidad de que los no eritrocitos sean detectados correctamente. Por la experiencia adquirida en el desarrollo de este trabajo se puede afirmar que con estas imágenes no se puede determinar bien este parámetro, lo cual se corrobora en la Fig. 3.6.

Los objetos que fueron definidos por los especialistas como no eritrocito el algoritmo no los marca, sin embargo impone más de una marca por eritrocito en algunos casos, los cuales fueron considerados como FP. Los FP no representan un gran número en las imágenes pero son muy significativos con respecto a la cantidad de VN. Por ejemplo, las tres variantes en la imagen 2 tienen 2 FP y un solo VN, lo que da como resultado un 33%

de especificidad y para la variante 1 (umbralado mediante Wellner) en la imagen 9 que tiene 4 FP la especificidad es de un 20 %.

En algunas imágenes como en la 8 y en la 10 los VN son ceros, la imagen no tiene artefactos, por lo que la especificidad es 0 en esos casos para todas las variantes. En la imagen 11 las tres variantes desarrolladas en este trabajo tienen una especificidad de 100 %, debido a que la imagen tiene un VN y no tiene FP. Como ya se mencionó, este parámetro para estas imágenes tiende a acercarse a cero porque la cantidad de VN en estas imágenes es muy bajo. Para corroborar lo anteriormente planteado se puede ver el Anexo 4.

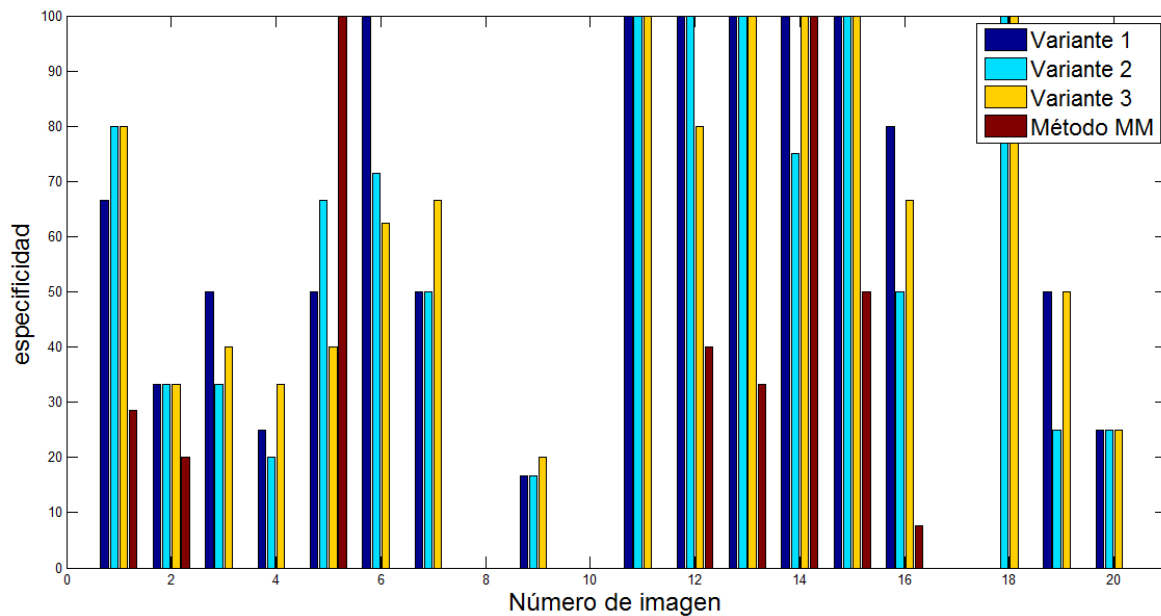


Fig. 3.6: Especificidad calculada para cada una de las tres variantes propuestas y para el método de MM.

La predictividad positiva se define como la probabilidad de que los eritrocitos marcados realmente lo sean. Es un índice estadístico muy importante ya que nos da una idea de qué tan bueno es el software para marcar todos los eritrocitos sin sobre-marcar la imagen.

Este índice corrobora lo anteriormente planteado; las variantes desarrolladas basadas en la transformada *Radon* son buenas a la hora de marcar las células y la mayoría de los FP son eritrocitos marcados con dos puntos, como se observó en las imágenes de las Fig. 3.1, 3.2 y 3.3. El método de MM tiene una predictividad positiva de 1 para la imagen 5 ya que el mismo no impone FP, al igual que las variantes planteadas lo hacen en las imágenes 11, 13 y 15. Donde peor se comporta este índice es en las imágenes 9 y 16 pero siempre

comportándose en alguna de las tres variante por encima de 0.9. Para ver gráficamente la predictividad positiva de las veinte imágenes observar el gráfico de la Fig. 3.7.

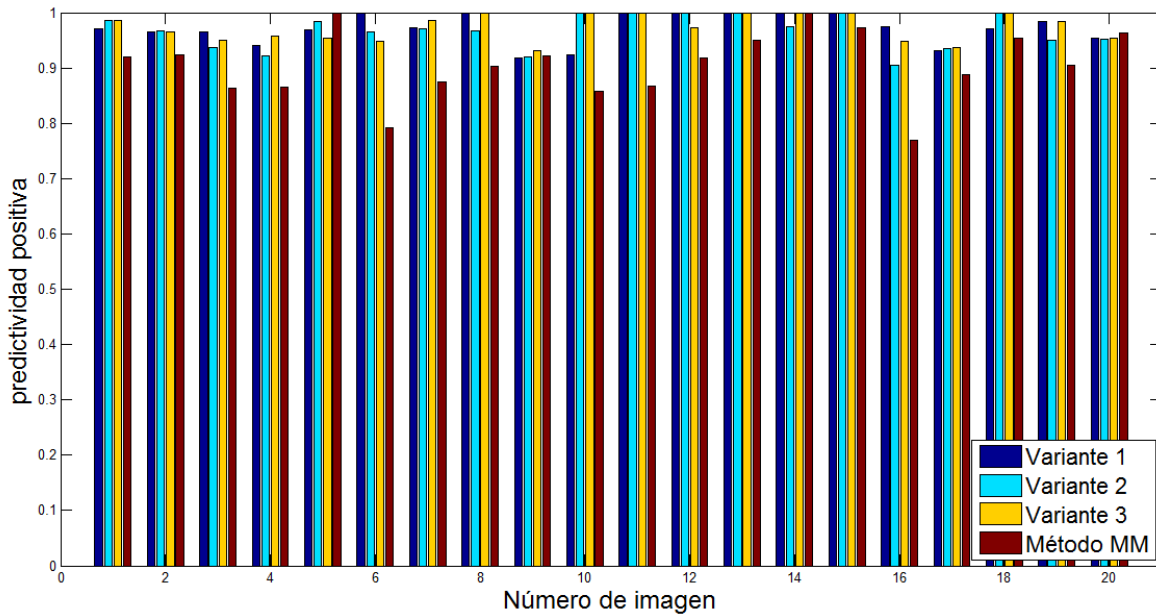


Fig. 3.7: Predictividad positiva calculada para cada una de las tres variantes propuestas y para el método de MM.

La medida-F se define como la probabilidad de que el software marque los eritrocitos señalados por los expertos como contables, sin cometer errores. En la Fig. 3.8 se muestra este índice calculado para las 20 imágenes. En la gráfica se puede observar como en la mayoría de las imágenes las tres variantes desarrolladas son superiores al método de morfología matemática, y en todas las imágenes al menos dos variantes son superiores. También, como en los otros índices, las tres variantes se comportan de forma diferente en cada imagen, siendo una mejor o peor en dependencia de la imagen que se esté analizando. En el caso de que este parámetro sea 1 es porque la variante para esa imagen no dio FN ni FP, es decir, marcó todo lo que el especialista definió como eritrocito. Si se compara la gráfica de la medida-F con la gráfica de la exactitud se puede apreciar que son muy similares. Las variantes planteadas, así como el método de MM se comportan de la misma manera ante todas las imágenes, la diferencia es solo numérica, debido a que la medida-F le da mayor peso a los VP y no toma en cuenta los VN.

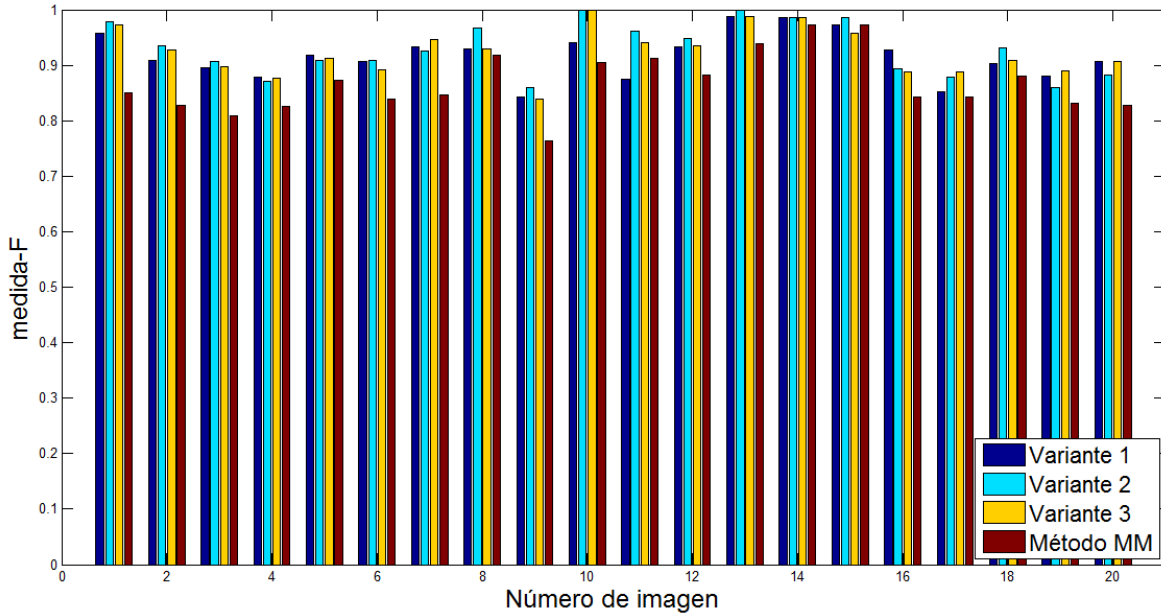


Fig. 3.8: Medida-F calculada para cada una de las tres variantes propuestas y para el método de MM.

### 3.5.2 Valor medio y desviación estándar de los índices.

Para analizar el comportamiento de las tres variantes planteadas y del método de MM se presentan cuatro gráficas, Fig. 3.9, las cuales muestran la media y la desviación estándar de los índices estadísticos exactitud, sensibilidad, predictividad positiva y medida-F para las veinte imágenes.

Para la especificidad no será representada, debido a que la misma puede variar desde cero hasta cien por ciento. La predictividad positiva y la medida-F se representan en por ciento para poderlas visualizar junto a las otras dos. Por el eje de las ordenadas se representan los cuatro índices, y por el de las abscisas el valor correspondiente a la media del índice en las 20 imágenes, la cual es simbolizada por la barra azul. La desviación estándar del índice alrededor de la media se representa por la línea roja, por lo que mientras más grande sea la desviación estándar mayor será la longitud de la misma.

De los cuatro índices la media más alta la presenta la variante 2 (umbralado mediante Niblack) excepto en la predictividad positiva, que la variante tres y dos tiene una media superior, debido a que las mismas son las que menos FP dan como resultado de forma global. La media de la exactitud para la variante 2 tiene un valor de 87.47%, pero para la variante 1, que es donde más bajos resultados ofrece, es de 85.25%, comportándose esta

diferencia como la mayor entre las tres variantes para la media de todos los índices estadísticos.

En la predictividad positiva, donde mayor media se obtiene es en la variante 3 (umbralado mediante White) con un valor de 97.37%, y menor en la variante 2 con un resultado de 96.68%. Las medias calculadas para las tres variantes resultantes de esta tesis no varían significativamente unas de otras. Comparando con los resultados obtenidos para el método de MM la media para la exactitud es de 77.29%, lo cual es una diferenciación significativa con respecto a las tres variantes. Este índice es el que más varía con respecto a los demás, pero la Se, Pp y medida-F también lo hacen en gran medida. Lo anteriormente planteado se puede observar en la Fig. 3.9 y los datos numéricos en la tabla presentada en el Anexo 5.

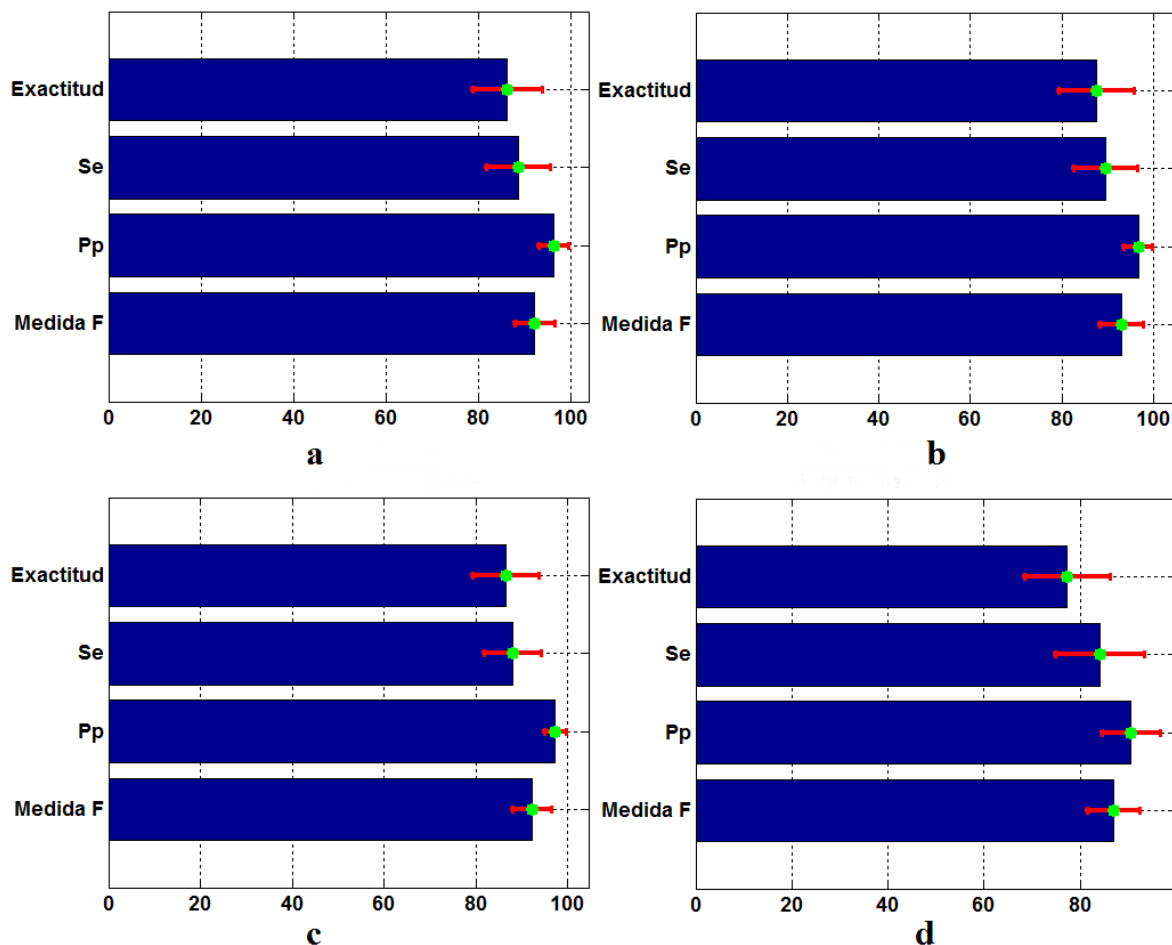


Fig. 3.9: Media y Std para las veinte imágenes, a) Variante 1 (umbralado mediante Wellner), b) Variante 2 (umbralado mediante Niblack), c) Variante 3 (umbralado mediante White), d) Método de MM.

La desviación estándar (Std), es una medida del grado de dispersión de los resultados del índice con respecto a su media. Cuanto mayor sea este valor mayor será la variabilidad de

este índice ante cada una de las muestras, en este caso las imágenes. Para la exactitud se había planteado que la variante 2 (umbralado mediante Niblack) era la de mayor media, pero también lo es la Std, siendo para este índice la variante 2 la que más varía con respecto a la media, con un valor de 8.16. Para la sensibilidad y la medida-F también es la que mayor Std presenta.

De las variantes, la número 3 (umbralado mediante White) es la de menor da la desviación estándar para los índices exactitud y medida-F y la variante 1 para los índices sensibilidad y predictividad positiva. En el método de MM, la exactitud y la medida-F no cambia tanto la Std con respecto a las variantes 1, 2 y 3, pero de todas maneras su valor es mayor que las tres.

La desviación estándar para la sensibilidad y la predictividad positiva es un poco más significativa, lo que confirma que el método de MM falla más que las variantes basadas en la transformada *Radon* a la hora de imponer las marcas que se consideran VP. Visualmente se pueden comparar la media y la desviación estándar de los cuatro índices mencionados al inicio de este epígrafe para cada una de las variantes. Para observar los resultados numéricos se presenta una tabla en el Anexo 5.

### 3.5.3 Comparación de los índices de forma global.

Para comparar las tres variantes entre cada una de ellas y además con el método de MM se presenta la Tabla 3.1, la cual muestra de forma numérica los índices estadísticos analizados para cada una de las 20 imágenes calculados de forma global.

Excepto en la especificidad y en la predictividad positiva la variante 2 es la que mejor se comporta en todos los demás índices calculados. La especificidad y la predictividad positiva son mejores en la variante 2 y 3 debido a que las mismas tienen menos FP. Para analizar la Tabla 3.1 en forma de gráfica en la Fig. 3.9 se representa por el eje de las abscisas los cinco índices estadísticos calculados y por el eje de las ordenadas el valor global que alcanzó cada variante en el índice correspondiente. Para la representación gráfica los índices predictividad positiva y medida-F se también se expresan en % para que se puedan visualizar.

Tabla 3.1: Índices estadísticos calculado de forma global para cada variante y para el método de MM

	Ex %	Se %	Sp %	Pp	m-F
Variante 1	84.2773	86.1360	52.3077	0.9688	0.9119
Variante 2	85.6544	88.0250	49.3151	0.9638	0.9201
Variante 3	85.2196	87.0304	54.5455	0.9701	0.9175
Método MM	75.2846	81.6637	11.6071	0.9022	0.8573

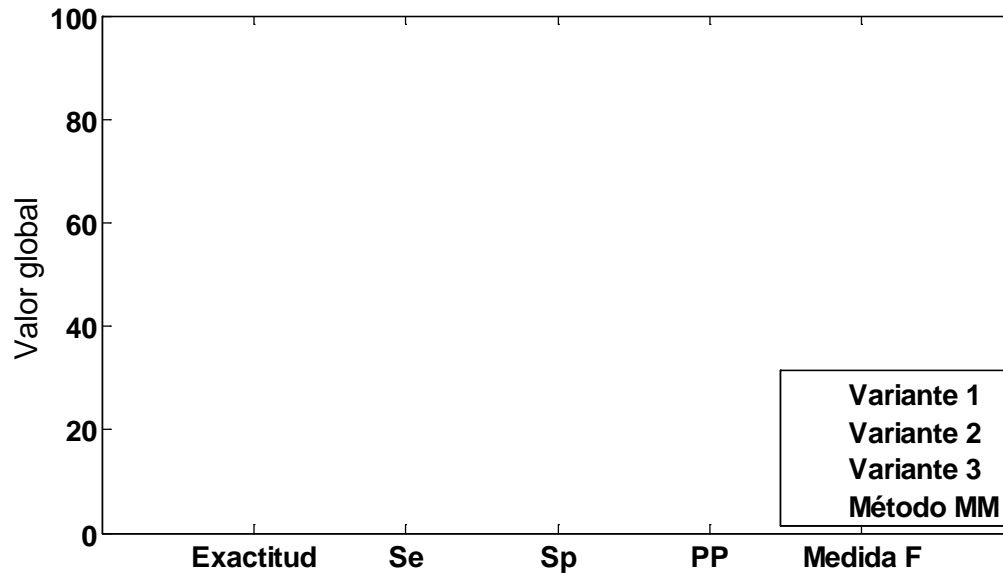


Fig. 3.9: Gráfica que representa el valor global de cada índice para cada variante y para el método de MM

### 3.5.4 Costo computacional

Para determinar el costo computacional de todos los algoritmos corridos se utilizó la función de *Matlab tic- toc*. Para cada una de las tres variantes planteadas y para el método de morfología matemática se le calculó el tiempo de cómputo a cada imagen y luego se calcula la media para cada variante, la cual se presenta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Tiempo medio en segundos para cada Variante y el método de MM

	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Método MM
Tiempo medio (s)	22.6934	17.6389	20.2903	26.6228

La segunda variante es la que tiene un mejor desempeño computacional, lo cual es muy importante cuando se va a analizar grandes cantidades de imágenes. Además, ofrece los mejores resultados a la hora de determinar la mayor cantidad de VP y por tanto la que mejor exactitud, sensibilidad y medida-F. El que mayor costo computacional presentó fue

el método de MM. Para las variantes planteadas en esta tesis, y para el método de MM, el costo computacional de una imagen depende de las dimensiones de la misma. Sin embargo el método de MM es más costoso cuando tiene que imponer más marcas, es decir, cuando la imagen tiene mayor cantidad de glóbulos rojos.

### 3.6 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

1. Los resultados globales de las tres variantes desarrolladas son similares, sin embargo pueden resultar diferentes analizando imagen por imagen, siendo mejor una u otra en determinados casos.
2. Los resultados de las variantes basadas en la transformada *Radon* son superiores al método basado en morfología matemática en cuanto a resultados estadísticos y a costo computacional.
3. La variante 2, que utiliza umbralado mediante el método de Niblack, es superior a las demás al marcar los eritrocitos seleccionados por el experto como contables y en cuanto a costo computacional. Sin embargo, la variante 3, que utiliza el umbralado mediante el método de White, fue la que menos marcadores equívocos impuso y la que menor desviación estándar muestra en los índices calculados.
4. En las imágenes donde los eritrocitos aglomerados no estén solapados en la mayor parte de su área las variantes basadas en la transformada *Radon* pueden ofrecer resultados superiores a los obtenidos en esta tesis.



## CONCLUSIONES GENERALES

1. La detección de bordes que mejores resultados brinda fue la aplicada sobre la imagen máscara después de realizar el umbralado.
2. El método de detección de marcadores basado en la transformada *Radon* marca los eritrocitos como independientes cuando los que están aglomerados no se encuentran completamente solapados uno con otro.
3. En las imágenes se puede observar cómo los algoritmos dejan de marcar en ocasiones eritrocitos que visualmente no se consideran que tengan dificultad para detectar marcadores sobre los mismos, lo cual puede ser debido a que en la segmentación los mismos no son tomados de forma circular y a la hora de aplicar el filtrado adaptado al sinograma de la transformada *Radon* el mismo no logra realzar aquellos eritrocitos que no quedaron segmentados idealmente.
4. Otra causa de porque los algoritmos dejan de marcar eritrocitos es el umbralado de la imagen resultante de la transformada *Radon* reversa. Los picos que resaltan en esta imagen idealmente deberían ser del mismo tamaño, pero no es así, por lo que a la hora de determinar un umbral los mismos pueden quedarse por debajo y ser eliminados en la imagen marcador.
5. El uso de la transformada *Radon* para determinar marcadores en imágenes de extendidos de sangre periférica ayuda a mejorar el conteo automático de eritrocitos por medio de una computadora y permite el marcado de los mismos para una posterior segmentación mediante la transformada *de watershed*.
6. El cálculo de los índices de desempeño obtenidos ofrece buenos resultados en comparación con el método de morfología matemática.

## RECOMENDACIONES

1. Buscar otros métodos que realicen una buena detección de bordes y obtengan una imagen gradiente limpia de píxeles que no representen bordes, solo los eritrocitos.
2. Mejorar el paso de búsqueda del umbral que se aplica a la imagen resultante de la transformada *Radon* reversa.
3. Implementar una interfaz gráfica que permita seleccionar diferentes formas de conversión de color a escala de grises, algún preprocesamiento incluido, formas de segmentación y otros parámetros que puedan ser variables.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] World Malaria Day - Emerging Infectious Disease journal. 2013 April 24, 2014.
- [2] WHO, *Basic malaria microscopy Part I. Learner's Guide*. World Health Organization, 1991.
- [3] Maragos, P., R. W. Schafer, and M. A. Butt, Editors, *Mathematical Morphology and its Application to Image and Signal Processing*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1996.
- [4] Soille, P., Texture analysis, En: *Morphological Image Analysis: principles and applications*: Ch. 11, Second ed., P. Soille (ed.), Springer. 2004: Italy. 399.
- [5] González, M., *Segmentación morfológica watershed en imágenes médicas: métodos de selección de marcadores.*, in *Facultad de Ingeniería*. 2007, Universidad de Mar del Plata: Mar del Plata.
- [6] Chinea-Valdés, L., *Segmentación de imágenes para el análisis de eritrocitos en microscopía celular*, in *Centro de Estudios de Electrónica y Tecnologías de la Información*. 2010, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara. p. 89.
- [7] Ginkel, M.v., C.L.L. Hendriks, and L.J.v. Vliet, *A short introduction to the Radon and Hough transforms and how they relate to each other*. Quantitative Imaging Group Technical Report Series, 2004.
- [8] Tek, F.B., *Computerised diagnosis of malaria.*, in *School of Life Sciences*. 2007, University of Westminster: Westminster. p. 280.
- [9] Tek, F.B., Andrew G. Dempster, Izzet Kale *Blood Cell Segmentation Using Minimum Area Watershed and Circle Radon Transformations* in *Mathematical Morphology: 40 Years On*, S. Netherlands, Editor. 2005. p. 441-454.
- [10] Peng, H. and R. Rao, *A novel circle detection method using Radon Transform*. 2008. Vol. 6813.
- [11] Haritha, H. and R.S. Reddy, *Color Conversion and Watershed Segmentation for RGB Images*, International Conference on Electrical and Electronics Engineering, pp. 82-87, 27th Jan 2013.

- [12] Kim, Y., Ch. Jang, J. Demouth, and S. Lee, *Robust Color-to-gray via Nonlinear Global Mapping*, ACM Trans. Graph, SIGGRAPH Asia, 2009.
- [13] Nikolaev, D. and S. Karpenko, *Color-to-Grayscale Image Transformation Preserving the Gradient Structure*, Proceedings 20th European Conference on Modelling and Simulation (ECMS), W. Borutzky, A. Orsoni, R. Zobel (Edts.), 2006.
- [14] Panchbhavi, V.V. and L.B. Damahe, *RBCs and Parasites Segmentation from Thin Smear Blood Cell Images*. Press, 2012: p. 54-60.
- [15] Walliander, M., R. Turkki, and N. Linder, *Automated segmentation of blood cells in Giemsa stained digitized thin blood films*. Diagnostic Pathology, 2013. Vol. 8(1).
- [16] Mandal, S. and A. Kumar, *Segmentation of Blood Smear Images using Normalized Cuts for Detection of Malarial Parasites*, in *Annual IEEE India Conference (INDICON)*. 2010.
- [17] Nasir, A.S.A., M.Y.Mashor, and Z.Mohamed, *Segmentation Based Approach for Detection of Malaria Parasites Using Moving K-Means Clustering*. 2012.
- [18] Makkapati, V.V. and R.M. Rao, *Segmentation of Malaria Parasites in Peripheral Blood Smear Images*. 2009.
- [19] Grundland, M. and N.A. Dodgson, *Decolorize: fast, contrast enhancing, color to gray scale conversion*, Computer Laboratory, University of Cambridge, Pattern Recognition, vol. 40, pp. 2891 – 2896, 2007.
- [20] Wu, J., X. Shen, and L. Liu, *Interactive two-scale color-to-gray*, Vis. Comput. (doi:10.1007/s00371-012-0683-2), 2012.
- [21] Hill, B., Th. Roger, and F.W. Vorhagen, *Comparative Analysis of the Quantization of Color Spaces on the Basis of the CIELAB Color-Difference Formula*, ACM Transactions on Graphics, Vol. 16, No. 2, pp. 109–154, April 1997.
- [22] Kaarna, A., *Modifying the Lab Color Space in Search for Uniformity*, Distributed Intelligent Systems and Technologies (DIST-2012), St. Petersburg, Russia, 2-4 July 2012.

- [23] Bianco, S., F. Gasparini, A. Russo, and R. Schettini, *A New Method for RGB to XYZ Transformation Based on Pattern Search Optimization*, IEEE Transactions on Consumer Electronics, Vol. 53, No. 3, pp. 1020-1028, AUGUST 2007.
- [24] Poynton, C., *A Guided Tour of Color Space*, Proceedings of the SMPTE Advanced Television and Electronic Imaging Conference, San Francisco, pp. 167-180, Feb. 1997.
- [25] Cadik, M., *Perceptual Evaluation of Color-to-Grayscale Image Conversions*, Computer Graphics Forum (CGF-Pacific Graphics 2008), Vol. 27, No. 7, pp. 1745-1754, 2008.
- [26] Gonzalez, R.C. and R.E. Woods, *Digital Image Processing*. Second ed. 2002, Prentice Hall, Cap 3, 6, 9, 10, New Jersey.
- [27] Dueñas, C.P., *Apuntes de Visión Artificial*. 2007.
- [28] Jiménez-Sánchez, A.R., J.D. Mendiola-Santibañez, and I.R. Terol-Villalobos, *Morphological Background Detection and Enhancement of Images With Poor Lighting*. Image Processing, IEEE Transactions on, 2009. Vol 18.
- [29] Maragos, P., Morphological Filtering for Image Enhancement and Feature Detection, En: *The Image and Video Processing Handbook*, E.A. A. C. Bovik, Editor. 2004: Athens. p. 135-156.
- [30] Gonzalez, R.C., R.E. Woods, and S.L. Eddins, *Digital Image Processing Using MATLAB*, 2004. Pearson Prentice Hall, Cap 3, 6, 9, 10, New Jersey.
- [31] Otsu, N., *A threshold selection method from gray-level histograms*, IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, 1979. Vol. 19: 62-66.
- [32] Wellner, P.D., *Adaptive Thresholding for the DigitalDesk*. EuroPARC Technical Report, 1993.
- [33] Sezgin, M. and B.I. Sankur, *Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation*. Electronic Imaging, 2004. Vol. 13(1): p. 146-165.
- [34] White, J.M. and G.D. Rohrer, *Image Thresholding for Optical Character Recognition and Other Applications Requiring Character Image Extraction*. IBM J. Res. Develop, 1983. 27(4): p. 400-411.

- [35] Mandal, S. and A. Kumar, *Segmentation of Blood Smear Images using Normalized Cuts for Detection of Malarial Parasites*, in Annual IEEE India Conference (INDICON). 2010.
- [36] Smith, K.T, Solmon, C and Wagner, L. *Practical and mathematical aspects of the problem of reconstructing objects from radiographs*. Bull. Am. Math. Soc, 1977. p. 1229.
- [37] Zakavi, S.R. et al. *Image reconstruction using filtered back projection and iterative methods: Effect on motion artifacts in myocardial perfusion SPECT*, Journal of Nuclear Medicine Technology, vol. 34, No. 4, pp.: 220-223, Dec. 2006.
- [38] Jain, A.K, *Fundamentals of Digital Image Processing*, Prentice Hall, NJ, ISBN: 0-13-336165-9, 1989.
- [39] MathWorks, *Image Processing Toolbox™ 7*, User's Guide, 2010.
- [40] Rey, M.T., Tunaley, J.K., Folinsbee, J.T., Jahans, P.A. Dixon, J.A., Vant, M.R., *Application Of Radon Transform Techniques To Wake Detection In Seasat-A SAR Images*, Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactionson , vol.28, no.4, pp. 553-560, Jul 1990.
- [41] Carretero-Moya, J., J. Gismero-Menoyo, and A. Asensio-López, *Aplicación de la transformada de Radon a la detección de blancos en clutter de mar*. 2008.
- [42] Toft, P.A., *Using the generalized Radon transform for detection of curves in noisy images*.
- [43] Ganga, T.K., *Medical image segmentation using histogram equalization technique with inverse Radon transform*. International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST), 2011. Vol. 3(No. 5): p. 3923-3926.
- [44] Pourreza, R., H. Pourreza, and T. Banaee, *Segmentation of Blood Vessels in Fundus Color Images by Radon Transform and Morphological Reconstruction*. Third International Workshop on Advanced Computational Intelligence, 2010. Vol. 10(4): p. 512-526.
- [45] Abdul-Nasir., A.S., M.Y. Mashor., and Z. Mohamed., *Colour Image Segmentation Approach for Detection of Malaria Parasites Using Various Colour Models and k-Means Clustering*. Biology and Biomedicine, WSEAS Transactions on, 2013. 10(2): p. 41-56.

- [46] Popovic, A., et al., *Statistical validation metric for accuracy assessment in medical image segmentation*. Int J CARS, 2007. Vol. 2: p. 169–181.

## ANEXOS

### Anexo 1: Algoritmos desarrollados

% Cargar imagen RGB y la guarda en la variable I

I = imread('D:\Tesis\Todo sobre tesis\Imágenes Para Trabajar\01.tif');

% \_\_\_\_\_

% Se convierte de RGB a gris mediante el método decolorize. Luego se complementa para obtener las células en el primer plano.

Idec = decolorize(im2double(I), 0.3);

Icomp = imcomplement(im2uint8(Idec));

% \_\_\_\_\_

% Tres variantes de segmentación propuestos

% \_\_\_\_\_

% Conversión a BW algoritmo propuesto por Wellner

Imagepad = padarray(Icomp, [150 150], 'replicate'); % para que a la hora de binarizar se eliminen los bordes blancos se rellena en este paso y después se eliminan

% Algoritmo del umbral adaptativo de Wellner

fsize = 60;

t = 0;

filType = 'gaussian';

thrMode = 'relative';

bwW = AdaptThresh\_Wellner93(Imagepad, fsize, t, filType, thrMode);

BW = bwW(151:end-150, 151:end-150); % Se elimina los bordes que fueron rellenos

BWfill = imfill(BW, 'holes'); % rellena los huecos dentro de los eritrocitos en la máscara binaria

% \_\_\_\_\_

% Niblack (1986) Algoritmo de umbral adaptativo.

Icomp = im2double(Icomp);

wsiz = 100;

Offset = 0.01;

pixNum = 5;



```
bwN = AdaptThresh_Niblack86(Icomp, wsiz, Offset, pixNum);
BWfill = imfill(bwN, 'holes'); % rellena los huecos dentro de los eritrocitos en la máscara
binaria
% _____
% White (1983) Algoritmo de umbral adaptativo.
N = 121;
Offset = 0.01;
bwA = AdaptThresh_White83(Icomp, N, Offset);
BWfill = imfill(bwA, 'holes'); % rellena los huecos dentro de los eritrocitos en
% la máscara binaria
% _____
% Eliminar artefactos. Para eliminar artefactos en la imagen se realiza una apertura con un
disco de radio 20 para que el ruido desaparezca, degradando en gran medida los eritrocitos.
Sobre el resultado de esta apertura se calculan las áreas de todos los objetos, y se escogerá
la mínima área. Con la función bwareaopen se eliminan los objetos en la imagen antes de
hacer la apertura que sean menor que el área del menor objeto que hay en la imagen que se
realiza la apertura
% Se etiqueta la imagen binaria.
Iopen = imopen(BWfill, strel('disk', 20, 0));
[L cantidad] = bwlabel(Iopen);
% Con la función regionprops se calculan todas las áreas de las regiones etiquetadas.
stats = regionprops(L, 'Area');
allArea = [stats.Area];
minimaarea=min(allArea);
%Se realiza una apertura para eliminar los elementos pequeños que tengan menor área que
la calculada sobre la imagen sin erosionar.
Mascaracell= bwareaopen(BWfill,round( minimaarea));
BWend = imopen(Mascaracell, strel('disk', 3, 0)); % esta apertura se realiza para suavizar
los bordes en la imagen máscara
% Detección de bordes sobre imagen binaria
edges = edge(BWend, 'sobel');
```

---

```
%
% Con esta función se determinan los marcadores, hay que pasarle como argumento la
imagen con bordes detectados, y la imagen BW; La imagen BW que se le pasa no es la
misma de la cual se calcularon los bordes, el método de segmentación adaptado segmenta
mejor los eritrocitos pero también mucho ruido. Como el segundo parámetro que se le pasa
a la función radonmarker es la imagen binaria que va a ser usada para calcular el diámetro
del filtro adaptado, y hace falta que la misma no tenga ruido en el fondo, se binariza con el
umbral de Otsu, y después se rellenan los huecos y se limpia de ruido con una apertura
level1 = graythresh(Idec);
BWprueba = imcomplement(im2bw(Idec,level1));
BWprueba = imfill(BWprueba, 'holes');
BWprueba = imopen(BWprueba, strel('disk', 10, 0));
% Se aplica la función creada la cual da como salida la imagen con marcadores
Detdil = radonmarker(edges, BWprueba);
```

## **Anexo 2: Función creada *radonmearker***

```
function Detfin = radonmarker(BWedge, BW)
% Esta función busca los marcadores. Como primer parámetro se le pasa la imagen con
bordes detectados, como segundo parámetro se le pasa la imagen binaria
[M N]=size(BW); % calcula el tamaño de la imagen
%
% Cálculo del diámetro
cc=bwconncomp(BW,4);
numob = cc.NumObjects; % número de objetos que tiene la imagen binaria
Mat = zeros(1,numob);
for i=1:numob
    graindata = regionprops(cc,'basic');
    Mat(1,i) = graindata(i).Area; % El vector Mat contiene todas las áreas de cada objeto que
    tiene la imagen binaria que se le pasa a la función radonmarker como segundo parámetro
end
```

med = median(Mat); % En med se guarda la mediana de las áreas guardas en Mat, lo cual garantiza que se escoja un área que pertenece a un eritrocito y no a ruido del fondo ni a aglomerados

DiskDiam = ceil(2\*sqrt(med/pi)); % Cálculo de diámetro suponiendo que los eritrocitos son circunferencias.

% \_\_\_\_\_

% Diseño del filtro herradura de caballo

d = round(DiskDiam/2);

p = -d+1:d-1;

MatchFilt = 4\*d./sqrt(d^2 - p.^2);

% \_\_\_\_\_

% Transformada *Radon* de la imagen con bordes detectados

theta = 0:179;

IEdgRT = radon(BWedge, theta);

% \_\_\_\_\_

% Filtrado de cada una de las proyecciones de la transformada *Radon* con filtro adaptado.

IEdgRTFilt = imfilter(IEdgRT, MatchFilt);

% \_\_\_\_\_

% Transformada *Radon* reversa y detección de picos

if M == N

    IEdgDet = mat2gray(iradon(IEdgRTFilt, theta, 'nearest', 'Ram-Lak', N));

elseif M > N

    IEdgDet = mat2gray(iradon(IEdgRTFilt, theta, 'nearest', 'Ram-Lak', M));

    IEdgDet = IEdgDet(1+(M-N)/2:end-(M-N)/2, :);

elseif

    IEdgDet = mat2gray(iradon(IEdgRTFilt, theta, 'nearest', 'Ram-Lak', N));

    IEdgDet = IEdgDet(1+(N-M)/2:end-(N-M)/2, :);

end

% \_\_\_\_\_

% Cálculo de un umbral para la imagen marcador

[counts,x] = imhist(IEdgDet);

```

i = 256;
while counts(i) < 150
    i = i - 1;
end
umbral = x(i);
% _____
% Obtención final de la imagen marcador
Det = im2bw(IEdgDet, umbral);
set = strel('disk',20,0);
Detdil = imdilate(Det, set); % para unir los marcadores finales se realiza una dilatación con
un disco de radio 20.
Detpoint = bwmorph(Detdil,'shrink',inf); % se llevan los marcadores a un solo píxel
Detfin = and(Detpoint, BW); % Este and se realiza entre la imagen que se convirtió a BW y
la imagen marcador para eliminar todos aquellos que estén fuera de los eritrocitos.

```

### **Anexo 3: Funciones usadas para la búsqueda de la imagen máscara.**

```

% Método de Wellner
function bwW = AdaptThresh_Wellner93(Image, fsize, t, filType, thrMode)
    % Set up default parameter values as needed
    if ~exist('fsize')
        fsize = fix(length(Image)/20);
    end
    if ~exist('t')
        t = 15;
    end
    if ~exist('filType')
        filType = 'gaussian';
    end
    if ~exist('thrMode')
        thrMode = 'relative';
    end
end

```

---

```

    % Apply Gaussian or median smoothing
    if strncmpi(filType, 'gaussian', 3)
        g = fspecial('gaussian', 6*fsize, fsize);
        fim = filter2(g, Image);
    elseif strncmpi(filType, 'median', 3)
        fim = medfilt2(Image, [fsize fsize], 'symmetric');
    else
        error('Filtertype must be "gaussian" or "median" ');
    end

    % Finally apply the threshold
    if strncmpi(thrMode, 'relative', 3)
        bwW = Image > fim*(1-t/100);
    elseif strncmpi(thrMode, 'fixed', 3)
        bwW = Image > fim-t;
    else
        error('mode must be "relative" or "fixed" ');
    end

    %
    _____
    % Método de Niblack
    function bwN = AdaptThresh_Niblack86(Image, wsiz, Offset, pixNum)
    if ~exist('wsiz')
        wsiz = fix(length(Image)/20);
    end
    if ~exist('Offset')
        Offset = 0;
    end
    if ~exist('pixNum')
        pixNum = 10;
    end
    [xs, ys] = size(Image);

```

---

```

avr = mat2avr(Image, wsiz);
STD = sqrt(mat2avr(Image.^2, wsiz) - avr.^2);
Image = (Image - avr)./STD;
Image = Image > Offset;
bwN = bwareaopen(Image, pixNum, 4);
%%%%%%
function Image = mat2avr(Image, num)
% finds the 2*num+1 pixel square window average for each scalar in the matrix
[xs,ys] = size(Image);
Image = [Image(:, num+1:-1:2, :, :) Image Image(:, ys-1:-1:ys-num, :, :)];
Image = [Image(num+1:-1:2, :, :, :) Image; Image(xs-1:-1:xs-num, :, :)];
mask = zeros(size(Image));
mask(1:2*num+1, 1:2*num+1, :, :) = 1;
Image = real(ifft2(fft2(Image).*fft2(mask)))./((2*num+1).^2);
Image = Image(2*num+1:end, 2*num+1:end, :, :);
return
%

```

---

```

% Método de White
function bwA = AdaptThresh_White83(Image, N, Offset)
if ~exist('N')
    N = fix(length(Image)/40)*2 + 1;
end
if ~exist('Offset')
    Offset = 0;
end
AverMask= ones(N, N)/(N^2);
AverImage= imfilter(Image, AverMask, 'replicate');
ThreshMask= (Image - AverImage + Offset);
bwA= (ThreshMask > 0);

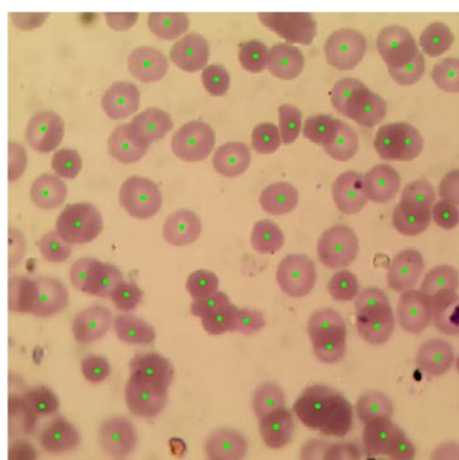
```

**Anexo 4: Matriz de confusión de las variantes propuestas para cada imagen.**

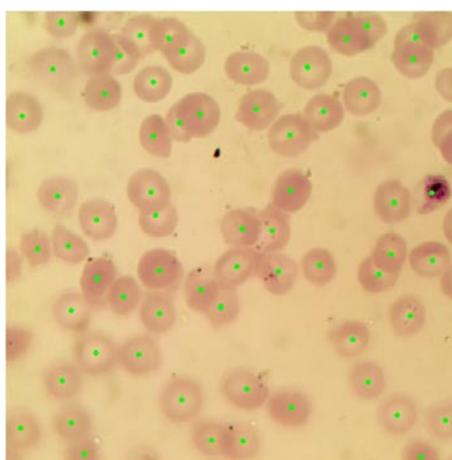
			I1		I2		I3		I4		I5		I6		I7		I8		I9		I10	
			Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp	
			c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n
Var 1	Soft	c	68	2	55	2	56	2	47	3	62	2	53	0	69	2	26	0	56	5	24	2
		n	4	4	9	1	11	2	10	1	9	2	11	5	8	2	4	0	16	1	1	0
Var 2	Soft	c	70	1	58	2	59	4	47	4	60	1	55	2	68	2	29	1	58	5	25	0
		n	2	4	6	1	8	2	10	1	11	2	9	5	9	2	1	0	14	1	0	0
Var 3	Soft	c	69	1	57	2	57	3	46	2	62	3	54	3	70	1	26	0	55	4	25	0
		n	3	4	7	1	10	2	11	1	9	2	10	5	7	2	4	0	17	1	0	0
MM	Soft	c	57	5	48	4	51	8	45	7	55	0	57	15	63	9	28	3	47	4	24	4
		n	15	2	16	1	16	0	12	0	16	2	7	0	14	0	2	0	25	0	1	0
			I11		I12		I13		I14		I15		I16		I17		I18		I19		I20	
			Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp		Exp	
			c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n
Var 1	Soft	c	21	0	35	0	40	0	36	0	35	0	38	1	55	4	65	2	59	1	63	3
		n	6	1	5	3	1	2	1	3	2	1	5	4	15	0	12	0	15	1	10	1
Var 2	Soft	c	25	0	36	0	41	0	37	1	36	0	38	4	58	4	67	0	58	3	60	3
		n	2	1	4	4	0	2	0	3	1	1	5	4	12	0	10	1	16	1	13	1
Var 3	Soft	c	24	0	36	1	40	0	36	0	34	0	36	2	59	4	64	0	60	1	63	3
		n	3	1	4	4	1	2	1	3	3	1	7	4	11	0	13	1	14	1	10	1
MM	Soft	c	26	4	34	3	38	2	35	0	36	1	40	12	56	7	63	3	57	6	53	2
		n	1	0	6	2	3	1	2	3	1	1	3	1	14	0	14	0	17	0	20	0

**Anexo 5: Tabla de media y desviación estándar.**

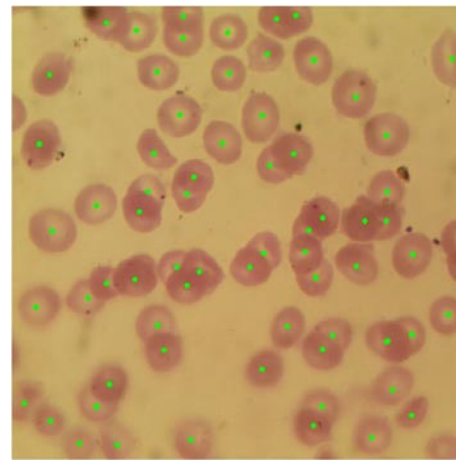
		Exactitud	Se	Pp	Medida-F
<b>Variante 1</b>	Media	85.2484	86.9366	97.1907	91.6702
	Std	6.9026	6.378	2.7093	4.0442
<b>Variante 2</b>	Media	87.4705	89.5964	96.6752	92.9119
	Std	8.1594	6.9572	3.054	4.7247
<b>Variante 3</b>	Media	86.5365	88.024	97.3724	92.3912
	Std	7.2084	6.2046	2.4433	4.2101
<b>Método de MM</b>	Media	77.2969	841266	90.5522	86.8139
	Std	8.8025	9.3013	6.113	5.46

**Anexo 6: Imágenes de referencia**

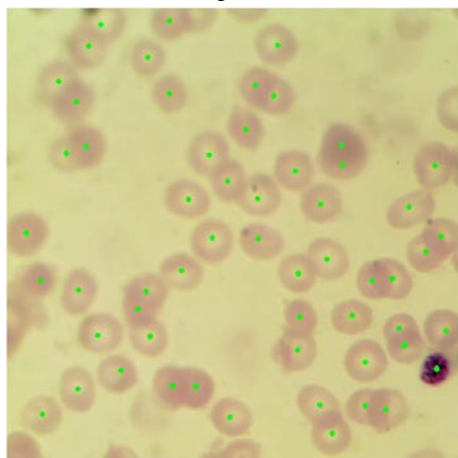
1



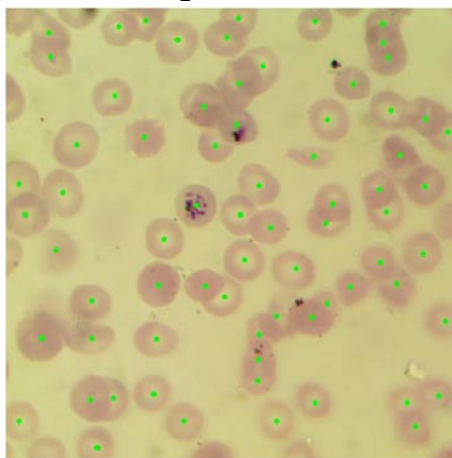
2



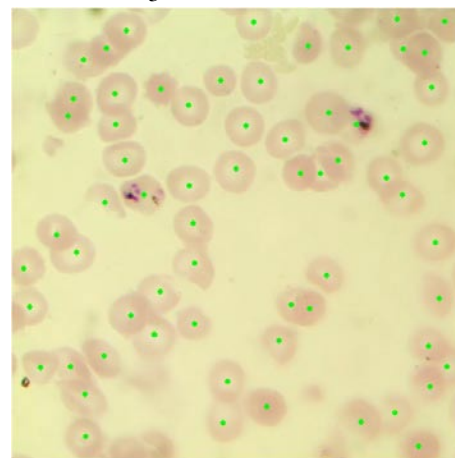
3



4

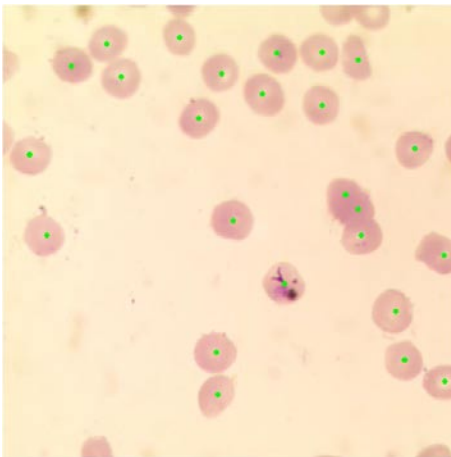
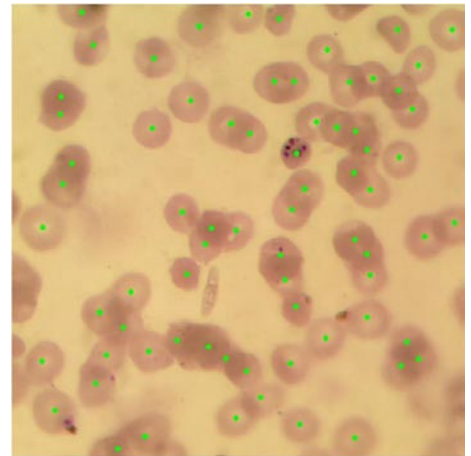
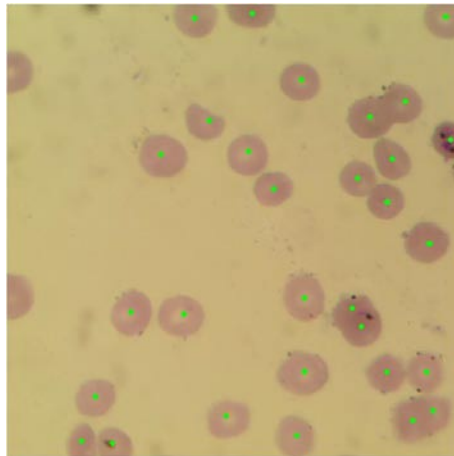
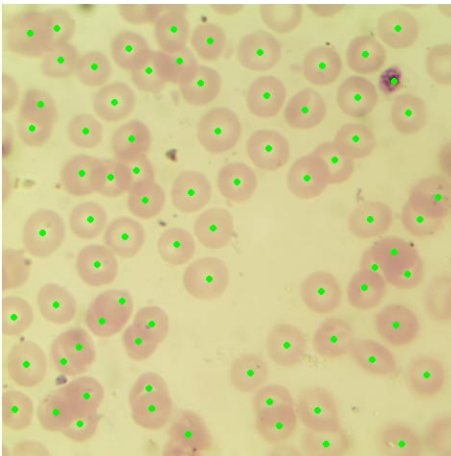


5

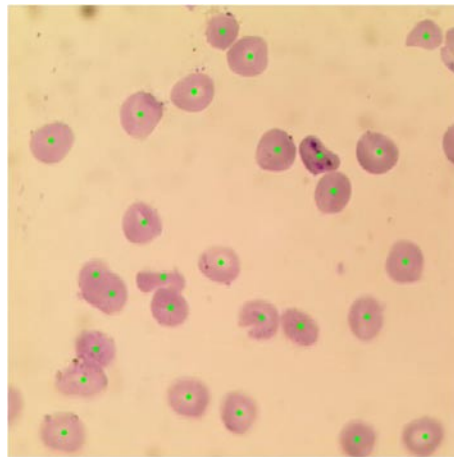


6

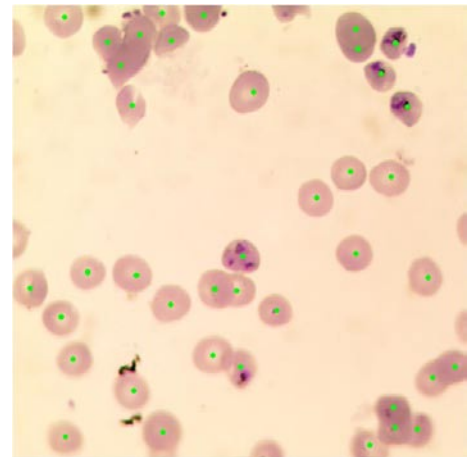




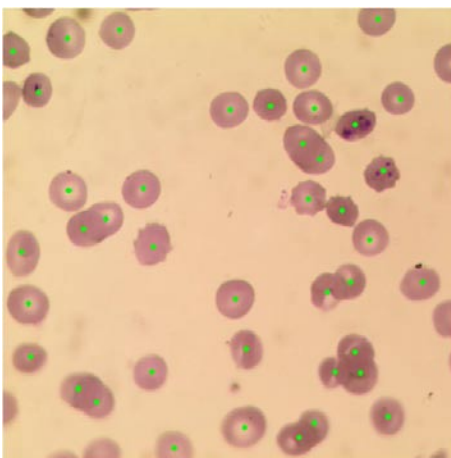
10



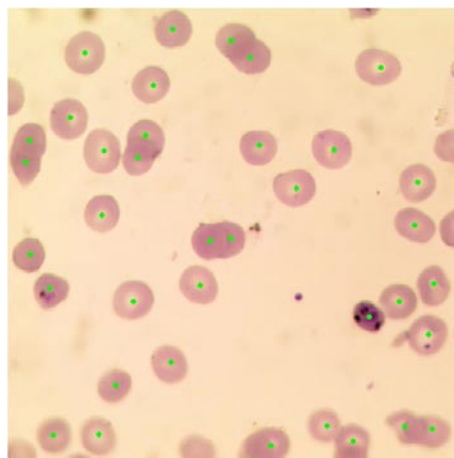
11



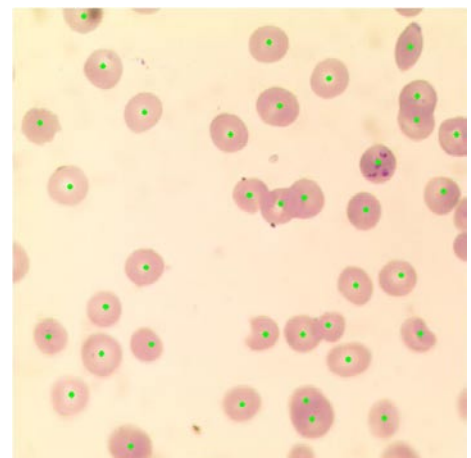
12



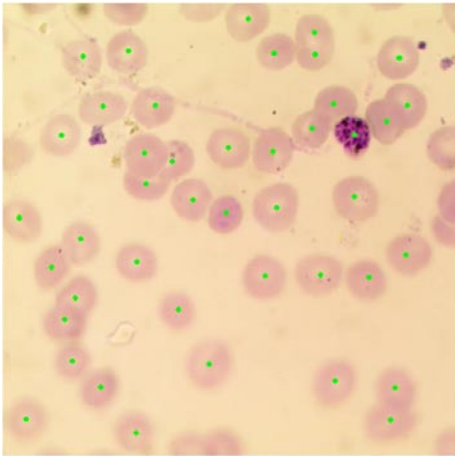
13



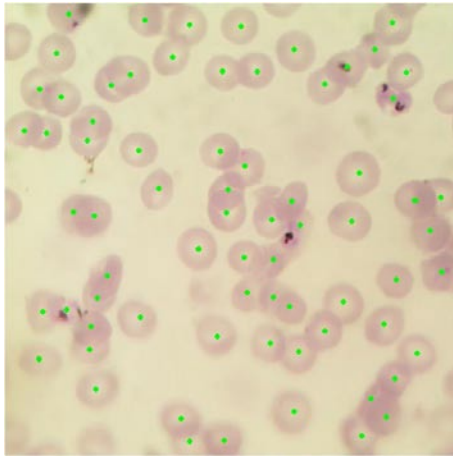
14



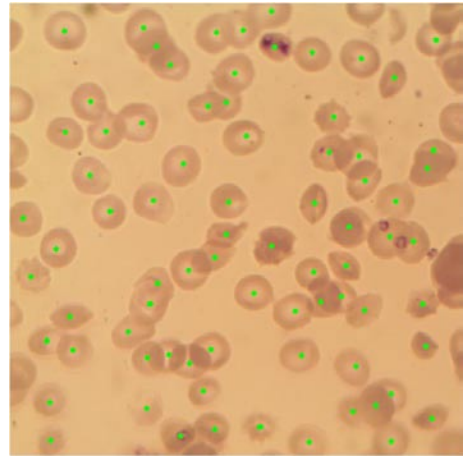
15



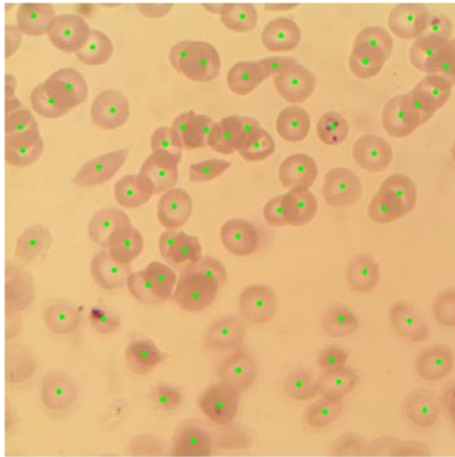
16



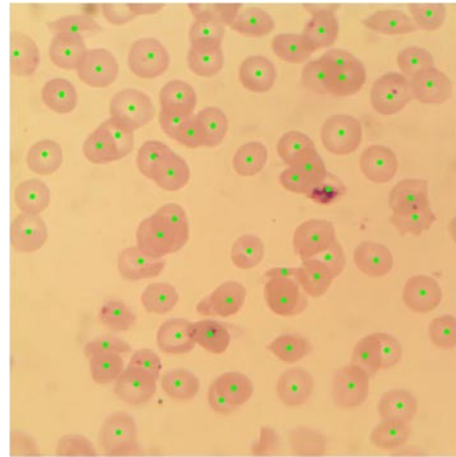
17



18



19



20