

03099  
7



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA DE LA COMPUTACION**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo de tesis.  
NOMBRE: LETICIA VEGA ALVARADO

FECHA: 26 JUN 2003

FIRMA: [Signature]

**BUSQUEDA AUTOMATIZADA DE CELULAS EN DIVISION (METAFASES)  
POR MEDIO DE LA CARACTERIZACION DE SU TEXTURA**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**DOCTORA EN INGENIERIA (COMPUTACION)**  
**P R E S E N T A :**  
**LETICIA VEGA ALVARADO**

**DIRECTOR DE LA TESIS: DR. GABRIEL CORKIDI BLANCO**

MEXICO, D. F.

2003.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACION  
DISCONTINUA**

## AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi madre Celia Alvarado Elizalde, quien no sólo me dio el ser sino también el poder ser. Le agradezco haberme enseñado el sentido de las palabras confianza, responsabilidad y fe, así como a no claudicar ni en tiempos de adversidad. Pero sobre todo le agradezco el amor y apoyo que siempre me ha dado. Gracias por ser y estar...

A mi padre Medardo Vega León le agradezco el apoyo y cariño que siempre me ha brindado y el haberme enseñado el sentido de la libertad, la responsabilidad y la autodeterminación.

Agradezco a mis hermanos Eduardo y Alfredo por ser mis compañeros y amigos.

Agradezco al Dr. Gabriel Corkidi Blanco, director de la presente tesis, por la asesoría, el apoyo y confianza brindada para la realización de la misma.

Agradezco a los sinodales: Dr. Fernando Arámbula Cosío, Dr. Joaquín Azpiroz Lechan, Dr. Ernesto Bribiesca Correa, Dra. María Garza de Jinich, Dra. Verónica Medina Bañuelos y Dr. Humberto Sossa Azuela, por sus valiosos comentarios y críticas al trabajo de investigación presentado en esta tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Dirección General de Posgrado-UNAM, al Instituto de Matemáticas Aplicadas y Sistemas-UNAM, al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico-UNAM, al Laboratorio de Imágenes del

---

---

CCADET-UNAM, a la Dra. Patricia Ostrosky del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM y al proyecto PAEP-UNAM 104301. el apoyo y facilidades brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a todas aquellas personas e Instituciones que han sido parte importante de mi formación o deformación profesional y personal. En específico agradezco a: Verónica Jiménez Jacinto, Martha Ortiz Posadas, Esther Guevara Hernández, Job Morales Escobar, José Ruiz Shulcloper, Manuel Lazo Cortes, Laura Mejía Calvo, Patricia Larralde Corona, Blanca Taboada Ramírez, Katy Juárez y Daniel Segura el apoyo, cariño y confianza que siempre me han demostrado. Mil gracias a todos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

---

---



---

# ÍNDICE

<i>Índice defiguras y tablas</i>	<i>i</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Introducción</i>	<i>2</i>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<i>Búsqueda de metafases para el cálculo del índice mitótico</i>	<i>7</i>
1.1 Ciclo de reproducción celular	7
1.2 Estudios de proliferación celular y sus aplicaciones	8
1.3 Cálculo del índice mitótico para la evaluación de la citotoxicidad	9
1.3.1 Método de conteo manual	10
1.4 Estado del arte en la búsqueda automatizada de metafases (“metaphase finders”)	13
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<i>Adquisición y segmentación</i>	<i>22</i>
2.1 Control automático de los movimientos de las platinas en los tres ejes (x, y, z) y adquisición de la imagen para el cálculo del IM	22
2.1.1 Recorrido y enfoque de las laminillas para la adquisición de las imágenes	23
2.2 Segmentación	28
2.2.1 Segmentación de las imágenes de los cultivos celulares	29
2.3 Selección de características	33
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<i>Análisis de textura</i>	<i>37</i>
3.1 Introducción	37
3.1.1 El concepto de textura	37
3.2 Enfoque estadístico para el análisis de textura	41

---



---

	Índice
3.3 Enfoque estructural para el análisis de textura	43
3.3.1 Primitivas	44
3.3.2 Relaciones espaciales	44
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b><i>La textura como característica representativa de las metafases</i></b>	<b>51</b>
4.1 Introducción	51
4.2 Característica de textura basada en la relación altura y ancho de los puntos extremos de la imagen	55
4.3 Característica de textura basada en la información de intensidad y relación espacial entre puntos extremos de las metafases	58
4.4 Evaluación de las características propuestas y comparación con otras características de textura	61
4.5 Invariantes a rotación, traslación y escala de IEPR y MDWRE	66
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b><i>Clasificación de Interfases y Metafases para el cálculo del IM</i></b>	
5.1 Introducción	71
5.2 Clasificación de interfases y metafases	73
5.2.1 Análisis del rendimiento de las redes	73
5.3 Evaluación del impacto de los errores de clasificación en el cálculo del índice mitótico	76
5.4 Estudio comparativo con otros sistemas buscadores de metafases	77
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>88</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>100</b>
A.1 Especificaciones del equipo utilizado	100
A.2 Método "Between Class Variance", utilizado para la segmentación	101
A.3 Pseudocódigo para el cálculo de MDWRE e IEPR	103
A.4 Artículos internacionales derivados del trabajo de tesis	104

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Recorrido de la laminilla y campo de visualización	11
<b>Figura 1.2.</b> Ejemplo de un campo real del microscopio con: (1) interfases; (2) metafases; (3) interfases no estimuladas	12
<b>Figura 1.3</b> Muestra de diferentes tipos de metafases que va desde la muy conglomerada hasta la muy dispersa	13
<b>Figura 2.1</b> Esquema de conexión del microscopio, computadora, cámara y controlador	23
<b>Figura 2.2</b> Zona de interés para el barrido en la laminilla	25
<b>Figura 2.3</b> Enfoque de la laminilla por medio de la ecuación de un plano: (a) puntos de enfoque definidos por el usuario; (b) plano que se forma con los tres puntos no colineales definidos por el usuario	26
<b>Figura 2.4</b> Imagen de un campo de la laminilla	29
<b>Figura 2.5.</b> Muestra de diferentes metafases: (a) metafases dispersas; (b) metafases conglomeradas	29
<b>Figura 2.6</b> Aplicación de la función $f(x) = ax^2$ a la imagen de la Figura. 2.4	31
<b>Figura 2.7</b> Operaciones morfológicas aplicadas a la imagen para la segmentación de las metafases dispersas.: (a) primera dilatación; (b) segunda dilatación	31
<b>Fig. 2.8</b> Proceso de segmentación: (a) segmentación de interfases y metafases compactas; (b) segmentación de metafases dispersas; (c) segmentación final.	32
<b>Fig. 2.9</b> Muestra de interfases y metafases: (a) interfases cuya descripción se basa en la forma casi circular y color, gris oscuro; (b) metafases cuya caracterización se asocia a la textura conformada por la densidad de sus cromosomas.	34
<b>Figura 3.1</b> Localización de los puntos extremos (máximos y mínimos) de un perfil densitométrico, utilizando el algoritmo RED (ROSENFELD A. <i>et al.</i> , 1970). Los círculos muestran los puntos extremos y la tabla los niveles de grises de cada pixel del perfil	47

<b>Figura 3.2</b> Puntos extremos (máximos y mínimos) de un perfil densitométrico con planicies. Las elipses muestran las planicies y la tabla los niveles de gris de cada píxel del perfil.	47
<b>Figura 4.1</b> Representación de intensidades de gris a) Representación tridimensional de los niveles de gris de la metafase c), b) Representación tridimensional de los niveles de gris de la interfase d), c) Figura bidimensional de una metafase, d) Figura bidimensional de una interfase	52
<b>Figura 4.2</b> Perfiles densitométricos de las líneas punteadas de tres texturas diferentes: (a) planicies de pocos píxeles y mucho contraste; (b) planicie de muchos píxeles y poco contraste; (c) planicies de muchos píxeles	54
<b>Figura 4.3.</b> Descripción geométrica de la característica MDWRE	57
<b>Figura 4.4.</b> Poros detectados en una metafase (M), interfase (I) y en un artefacto (A)	57
<b>Figura 4.5.</b> Análisis de perfiles inter-cromosomas: (a) metafase; (b) puntos extremos detectados en un análisis vertical y horizontal de la imagen (a); (c) gráfica del perfil densitométrico entre los puntos $P_i$ y $P_j$	59
<b>Figura 4.6.</b> Conjuntos de prueba: (a) interfases; (b) metafases; (c) artefactos	63
<b>Figura 4.7.</b> Invarianza de la medida IEPR: (a) rotaciones; (b) escalamiento	66
<b>Figura 4.8.</b> Variabilidad de IEPR en % de VP de 14 rotaciones diferentes: (a) metafases y b) artefactos	68
<b>Figura 4.9.</b> Variabilidad del desempeño de IEPR para las 14 rotaciones	69
<b>Figura 5.1.</b> (a) Matriz de confusiones $C_{ij}$ ; (b) Vector NC de porcentajes de objetos no clasificados	74

### Tablas

<b>Tabla 4.1.</b> Comparación del porcentaje de desempeño de MDWRE e IERP, con relación a algunas medidas clásicas de textura.	64
<b>Tabla 4.2</b> Matriz de confusiones para los métodos Contraste, MDWRE e IEPR. Los valores resaltados indican el porcentaje de artefactos que se clasifican como metafases (Falsos Positivos).	65

---

<b>Tabla 4.3.</b> Desempeño de IEPR en 14 orientaciones, considerando el mejor desempeño como el 100%	70
<b>Tabla 5.1</b> Matriz de confusiones y vector de objetos no clasificados de las redes con mejor rendimiento	75
<b>Tabla 5.2.</b> Número de células y artefactos esperados para en la evaluación del IM (IM = 3.5%).	76
<b>Tabla 5.3.</b> Comparación del error en el cálculo del IM automatizado y semi-automatizado, utilizando las redes 10-9-3 y 10-15-3	77
<b>Tabla 5.4.</b> Comparación del rendimiento en la identificación automática de metafases. Uso de buscadores de metafases comerciales: (*) Magiscan 2, (§) Genetiscanner, (t) Metafer 2, (¢) Cytoscan 110 y (&) Cytogen	79

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

El presente trabajo muestra una metodología para la caracterización de textura que permite la identificación de metafases en presencia de núcleos interfásicos (células que solamente están estimuladas sin llegar a un proceso de división) y de una gran cantidad de artefactos. Pretende ser un paso más para la automatización de la búsqueda de metafases en el estudio de la proliferación celular. Dicha metodología se basa en características de magnitud e interrelación espacial que se pueden extraer de los *puntos extremos* (máximos y mínimos relativos que se encuentran en perfiles de niveles de gris) de las imágenes de los objetos a detectar y clasificar. La textura se describe cuantitativamente a través de 1) la porosidad o rugosidad de la superficie, considerada en función de los valles y crestas (del perfil de niveles de gris) que se forman entre *puntos extremos* 2) la evaluación de los perfiles de niveles de gris entre *puntos extremos*, que dan información de la textura característica *intercromosoma*. El desempeño de la metodología propuesta se evaluó para la identificación de metafases en un estudio de proliferación celular por medio de un conjunto prueba definido por el experto. Los resultados de la evaluación fueron comparados con los obtenidos en algunos trabajos, reportados en la literatura, relacionados con la búsqueda automatizada de metafases, así como con los resultados obtenidos de algunas medidas de textura clásicas, derivadas de las matrices de co-ocurrencia: contraste, energía, entropía y segundos momentos angulares y con la medida "Relative Extrema Density" (RED). La metodología propuesta tuvo un porcentaje de desempeño entre 14% y 133% mejor que los métodos con los que se comparó.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos en el campo del reconocimiento de patrones y análisis de imágenes digitales es la clasificación de objetos. El problema en el reconocimiento y clasificación de imágenes consiste en asignar una imagen dada o componentes de la misma, a una o varias clases, a través de su caracterización. En general, una imagen puede ser descrita por gran cantidad de características derivadas de la forma, el color o la distribución espacial de sus componentes, sin embargo, cuando las imágenes son complejas, estas características pueden no ser discriminantes. Por lo tanto, es necesario introducir características más elaboradas, que tomen en cuenta propiedades estadísticas y estructurales de la superficie de las mismas, como por ejemplo la *textura*, que es una característica importante para el análisis de muchos tipos de imágenes. La textura ha sido un tema de investigación desde hace muchos años y se han desarrollado muchas técnicas y algoritmos para el análisis de las mismas. En las últimas décadas se ha incrementado el estudio en este tema debido a que empezó a tener aplicación en problemas reales en diferentes áreas, como por ejemplo, la geociencia donde la textura se ha utilizado para el reconocimiento de fotografías aéreas e imágenes satelitales (DARLI E. *et al*, 1968; WESZKA J. *et al*, 1976; LUMIA R. *et al*, 1983; LEE H. *et al*, 1983) y el análisis de la estructura de las rocas (HARALICK R. *et al*, 1973), entre otros ejemplos. En el caso de la biomedicina, el análisis de texturas se ha aplicado en el reconocimiento de leucocitos (BACUS J. *et al*, 1972), en imágenes de ultrasonido, para la detección de hepatitis crónica y cirrosis (WU CH. *et al*, 1992; BLECK J. *et al*, 1996) y para diagnóstico en imágenes de ultrasonido de ovarios (MUZZOLINI R. *et al*, 1994), por mencionar algunos ejemplos.

La necesidad de resolver este tipo de problemas ha generado el desarrollo de diversas técnicas para la caracterización de texturas, donde, muchas de ellas se basan en lo que se

denomina análisis de textura de “imágenes modelos” o “imágenes sintéticas”, las cuales por lo general son imágenes con patrones bien definidos, ya sean diseñados u obtenidos de fotografías, tales como las que se presentan en el libro de Brodatz (BRODATZ P. *et al.*, 1966).

El análisis de texturas ha sido un tema de investigación desde hace mucho tiempo, y por lo tanto, se han desarrollado muchas técnicas y algoritmos para el análisis de las mismas, sin embargo, el problema es tan complejo que cuando se desarrollan algoritmos específicos a una aplicación concreta, difícilmente pueden generalizarse a otras aplicaciones. A su vez los algoritmos más generales pueden funcionar adecuadamente en patrones sintéticos, bien controlados, y tener una baja eficiencia al aplicarse en situaciones reales donde intervienen factores tales como el ruido o la distorsión. Por todo lo anterior, el desarrollo de nuevos algoritmos para el análisis de texturas sigue siendo un reto hasta nuestros días.

La presente tesis se enfoca al análisis de textura en una aplicación concreta en el área de la biomedicina, específicamente para la búsqueda de metafases (células en proceso de división) en linfocitos, para la evaluación de la proliferación celular en estudios de citotoxicidad (ROJAS *et al.*, 1992). Este trabajo pretende reducir tanto el tiempo que se invierte, así como los errores que se introducen en los métodos de conteo y clasificación manual. Para llevar a cabo el proceso de identificación de las metafases se consideran las características que el experto toma en cuenta en el conteo manual las cuales están principalmente relacionadas con los patrones que forman los cromosomas de la células en metafase y los cuales dan lugar a una textura característica.

### 1.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo es proponer una metodología para la caracterización de textura que permita la búsqueda de metafases y junto con otras características morfológicas y fotométricas, el análisis cuantitativo de la proliferación celular. Sobre la base de esta

metodología, se propone un sistema automatizado, basado en la adquisición, procesamiento y análisis de imágenes de cultivos celulares, para la detección de metafases y el cálculo del índice mitótico.

## 1.2 Aportaciones de la tesis

Las aportaciones principales de esta tesis son:

- Se propusieron dos medidas de textura: MDWRE e IEPR que en conjunto con otras características morfológicas y fotométricas permiten el conteo automático de metafases para el análisis cuantitativo de la proliferación celular y el cálculo del Índice Mitótico.
- Se demostró la invariabilidad a rotaciones, traslaciones y escalamiento de las características de textura propuesta.
- Se evaluaron y validaron las características de textura propuestas, MDWRE e IEPR en un conjunto de metafases, interfases y artefactos. Con los resultados obtenidos se hizo un estudio comparativo con algunas características de textura clásica reportadas en la literatura (medidas derivadas de las matrices de co-ocurrencias: contraste, energía, entropía y segundos momentos angulares, así como '*Relative Extrema Density*'), así como con algunos buscadores automáticos de metafases.
- Se realizó un estudio y análisis crítico de los resultados de clasificación de metafases, interfases y artefactos obtenidos por las redes neuronales propuestas en (ARAMBULA F., *et al.*, 2001a), las cuales consideraron en sus vectores de características a la medida de textura MDWRE y su desviación. Así mismo, se evaluó cómo afectan los errores de clasificación al cálculo del índice mitótico cuando se tiene una muestra con las proporciones reales de interfases y metafases.

Las aportaciones secundarias de la tesis son:

- Se propuso una medida de desempeño de la redes neuronales (ARAMBULA F., *et al.*, 2001a), basada en las matrices de confusiones (CASTLEMAN and WHITE,

1995), el vector de objetos no clasificados y la relevancia de las metafases e interfases para el índice mitótico.

- Se propuso el uso de otra metodología para el enfoque automático de las laminillas, de tal manera que éste se hiciera de una manera más rápida y precisa. La metodología propuesta se basó en la ecuación de un plano, para encontrar el enfoque en una posición específica  $(x,y)$ .

### 1.3 Organización de la tesis

La tesis está estructurada en 5 capítulos. El capítulo 1 contiene una descripción de la problemática en relación con la búsqueda de metafases y en específico a la evaluación de la proliferación celular en estudios de citotoxicidad. Asimismo contiene la revisión bibliográfica de los métodos que se han desarrollado hasta nuestros días para resolver dicha problemática, haciendo un análisis crítico de los mismos. El capítulo 2 trata de la interfaz del microscopio con la computadora para la adquisición de las imágenes que serán analizadas. En ese mismo capítulo se describe la manera en que se realizó la segmentación de la imagen para clasificar los objetos de interés, así como los problemas que se tuvieron y la solución que se les dio a los mismos. En el capítulo 3 se hace una revisión bibliográfica de los métodos para el análisis, segmentación y clasificación de texturas desarrollados en los últimos 10 años. En el capítulo 4 se describe la metodología propuesta para la caracterización de la textura aplicada al problema de la búsqueda de metafases y se hace un análisis de la metodología propuesta en términos de la invariabilidad a la rotación y traslación. En el capítulo 5 se hace un análisis crítico de los resultados de clasificación de metafases, interfases y artefactos obtenidos por las redes neuronales propuestas en (ARAMBULA F., *et al.*, 2001a). Así mismo, se evalúa cómo afectan los errores de clasificación al cálculo del índice mitótico cuando se tiene una muestra con las proporciones reales de interfases y metafases. Finalmente se presentan los resultados obtenidos en este trabajo, las conclusiones a las que se llegó y la proyección a futuro del mismo.

Los resultados generados durante los estudios de doctorado, dentro de la línea de investigación “*Búsqueda automatizada de metafases*”, incluyen tres artículos publicados en una revista internacional (CORKIDI G *et al.*, 1998; ARÁMBULA F *et al.*, 2001a; VEGA-ALVARADO L *et al.*, 2002), los cuales se anexan en el apéndice A.1 y tres artículos en memorias de congresos internacionales (VEGA-ALVARADO L *et al.*, 2001a; VEGA-ALVARADO L *et al.*, 2001b; ARÁMBULA F *et al.*, 2001b). Así mismo se presentó la ponencia (en inglés) “*Inter-Extrema Profile Analysis for a Texture Coarseness Estimate in Automatic Metaphase Finding*”, en el “*2nd International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis*”, realizado en Pula, Croacia, del 19 al 21 de Junio de 2001.

# CAPÍTULO 1 Búsqueda de metafases para el cálculo del índice mitótico

## 1.1 Ciclo de reproducción celular

El ciclo de división celular es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se mantienen en un status y se reproducen. En especies unicelulares como las bacterias y las levaduras, cada división de la célula produce un nuevo organismo. En especies pluricelulares se requieren muchas secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo. La división celular también es necesaria para el crecimiento de individuos en etapa de desarrollo y en el cuerpo adulto para regenerar las células perdidas, en tejidos y órganos, por desgaste, deterioro o por muerte celular programada. Así, un humano adulto, debe producir muchos millones de nuevas células cada segundo simplemente para mantener el estado de equilibrio y, si la división celular se detuviera, el individuo moriría en pocos días (VILLE C, 1984).

El *ciclo celular* eucariótico (células que contienen núcleo) implica tanto eventos nucleares como citoplasmáticos. Los citoplasmáticos se dividen en dos fases: la fase de división y la fase de crecimiento. Durante la fase de crecimiento la célula duplica su masa y todos sus componentes en preparación para el siguiente ciclo de división. La fase de división consiste de dos procesos en los cuales el núcleo se divide, seguido de la división de la célula. Al proceso de división nuclear se le llama *mitosis* y la subsecuente división del citoplasma en dos células hijas es llamada citocinesis (BERKALOFF A. *et al.*, 1984a).

La división celular ocupa sólo una pequeña porción del ciclo celular, ya que la célula pasa la mayor parte del tiempo en fase de crecimiento, donde el núcleo se encuentra en *interfase*, dirigiendo las actividades sintéticas de la célula y preparándose para la siguiente división mitótica. Es en la interfase donde se duplican todos los componentes celulares incluyendo al ADN, actuando como un mecanismo que asegura que cada célula hija reciba la misma información genética.

El ciclo celular completo está constituido por la interfase y la mitosis. Toda división mitótica es un proceso en el que cada fase va seguida imperceptiblemente de la siguiente. Sin embargo para fines descriptivos la mitosis se divide en cuatro fases: *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. Entre cada una de las divisiones mitóticas se considera que el núcleo está en reposo o *interfase*. Una de las fases importantes de la mitosis es la *metafase*, ya que es en esta fase donde los cromosomas se encuentran más condensados, lo cual facilita la observación de las células al microscopio y por otra parte el análisis y estudio de sus cromosomas para la búsqueda de anomalías en los mismos.

## 1.2 Estudios de proliferación celular y sus aplicaciones

Los estudios enfocados a la proliferación celular en animales y humanos han contribuido de manera importante al entendimiento y desarrollo de procedimientos utilizados en biología celular y molecular. Estos estudios se han incrementado en distintas áreas, como: farmacología, genética, química médica, biología reproductiva y oncología, entre otras.

En el área de la genética y la biología reproductiva, el estudio de la proliferación celular se ha enfocado hacia el análisis de células en metafase para la búsqueda de aberraciones cromosómicas. Una aberración cromosómica, ya sea en número o estructura, que lleve a pérdida o ganancia de cromosomas, producirá un desarrollo embrionario anormal. Esto conducirá a diferentes malformaciones que dependerán de los cromosomas implicados y de

---

la cantidad de material cromosómico ganado o perdido, siendo la pérdida mucho más severa (BENDER M. *et al.*, 1988; GALLOWAY S. 1994).

En el área de la farmacología, química médica y oncología, los estudios en la proliferación celular se han enfocado en su gran mayoría a la evaluación de la citotoxicidad (BARILE F. 1994; EISENBRAND G. 2002). Debido al gran aumento de productos químicos y biológicos utilizados en la industria farmacéutica, cosmetológica y hasta alimenticia, se ha creado la necesidad de métodos eficaces y rápidos para evaluar los efectos que éstos puedan tener en la proliferación celular, ya que pueden contener sustancias que a determinada dosis resulten carcinógenas o que disminuyan la proliferación celular, dando origen a la muerte de algún tejido u órgano. Por lo tanto, en todas las agencias ocupadas al desarrollo de productos para la salud del ser humano se exigen pruebas de citotoxicidad, que permitan definir si las sustancias utilizadas en cierto producto farmacéutico, alimenticio o cosmetológico, por mencionar algunos, son carcinógenas o si éstas pueden llegar a detener la reproducción celular. AUGUSTIN C *et al.*, 1995; MELONI M *et al.*, 1995; SUGIHARA N *et al.*, 1997; OSORIO RM *et al.*, 1998; JANTOVA S *et al.*, 2001; DOLFINI E *et al.*, 2002 son algunos ejemplos de investigaciones en citotoxicidad que se han realizado en las áreas farmacéutica, alimenticia y cosmetológica.

Un parámetro importante que se utiliza comúnmente para la evaluación de la citotoxicidad, es el denominado Índice Mitótico (IM) (ROJAS *et al.*, 1992; ROJAS *et al.*, 1993), el cual es un indicador que sirve para medir la proliferación celular; y que se definirá en la siguiente sección.

### **1.3 Cálculo del índice mitótico para la evaluación de la citotoxicidad**

El IM indica el porcentaje de células que está en metafase con relación a las que están en interfase. En términos generales, es un marcador ampliamente utilizado para evaluar y comparar la velocidad de proliferación de las células, resultando además un buen parámetro para la evaluación de la citotoxicidad. Dicho índice puede ser afectado por la exposición a

---

agentes físicos, químicos y biológicos que conlleven a citotoxicidad, lo cual resulta en una disminución en la proliferación y consecuentemente en una reducción del IM (GONSEBATT L. *et al.*, 1992; HERRERA L. *et al.*, 1992).

Típicamente el cálculo del IM de una población celular se realiza analizando las preparaciones en el microscopio óptico. Para tener un resultado estadísticamente significativo del índice mitótico en un experimento, comúnmente se hace un conteo de 2000 elementos que incluyen células en metafase y células interfase (ROJAS *et al.*, 1992). La evaluación de la citotoxicidad de una sustancia requiere un mínimo de 40 horas promedio de trabajo de observación al microscopio por personal especializado y es un proceso largo y tedioso.

### ***1.3.1 Método de conteo manual***

Una vez hecha la preparación de cultivo que se va a analizar, se prosigue a verterla a las laminillas (las laminillas son de tipo esmerilado). La vertición de la preparación en las laminillas se hace desde una distancia de 2 metros aproximadamente, para que se rompa la membrana celular y los cromosomas puedan ser visualizados.

Cada experimento puede componerse de más de una laminilla, sin embargo, antes de revisar todo el experimento se realiza un análisis de controles, es decir, una o dos laminillas que servirán como muestra de la preparación. Si las laminillas controles poseen un índice mitótico mayor a un cierto porcentaje (típicamente 5%) entonces se supone que la preparación es apta para revisarse y se prosigue a revisar todas las laminillas del experimento. Esto se debe a que este porcentaje es un indicador de que la preparación está bien hecha.

La revisión manual se lleva a cabo comenzando por el lado esmerilado de la laminilla y moviéndose en zig-zag, como se muestra en la Figura 1.1. Este movimiento de zig-zag se realiza hasta acabar con la laminilla o alcanzar el número de cuerpos que se desean contar. El analista identifica y cuenta 2000 células y reporta el porcentaje de las que están en metafase con relación a las que están en interfase. El reconocimiento de las células interfásicas se realiza de la manera siguiente: las células interfásicas tienen por lo general una tonalidad típica, entran dentro de un rango de tamaño y poseen una forma casi circular, como se puede observar en los objetos marcados con el número 1 de la Figura 1.2.

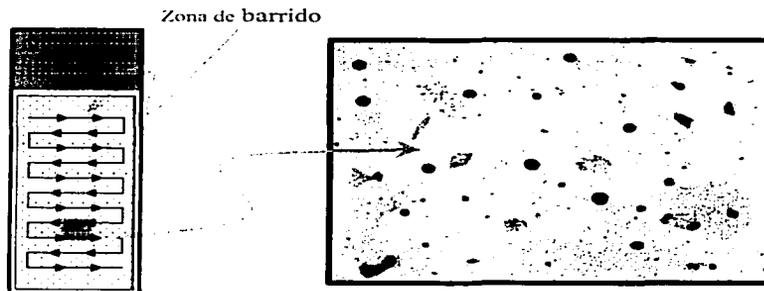


Figura 1.1. Recorrido de la laminilla y campo de visualización

En la muestra también se pueden hallar células más pequeñas y de tonalidad más oscura denominadas núcleos no estimulados, los cuales no entran en la cuenta debido a que no han llegado a su etapa máxima de crecimiento. La Figura 1.2 muestra estos objetos etiquetados con el número 3. Para la identificación de células en metafase, el reconocimiento se basa en la identificación de un conglomerado de cromosomas, como se muestra en la Figura 1.2 con los objetos marcados con el número 2.

Para el conteo, los analistas se basan en la experiencia adquirida después de observar y analizar varios portaobjetos para clasificar los diferentes cuerpos antes mencionados, y sobre todo poder discernir entre las células que están en el límite de dos diferentes categorías.

La automatización total del cálculo del IM podría traer muchos beneficios en el área de la citogenética, sin embargo, es un proyecto muy complejo debido a los siguientes puntos: a) Existen muy pocas células en metafase en un portaobjetos, donde hay cientos de células en interfase y miles de artefactos, lo que implica una alta probabilidad de error en el proceso de reconocimiento, b) Para reducir el número de

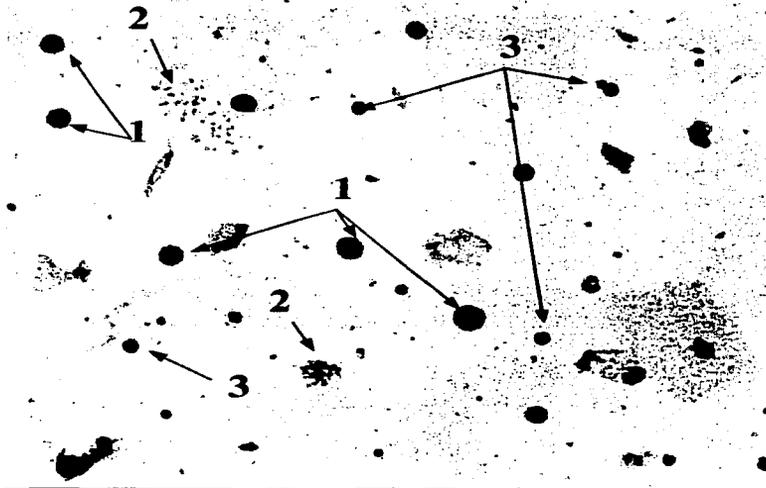


Figura 1.2. Ejemplo de un campo real del microscopio con: (1) interfases; (2) metafases; (3) interfases no estimuladas

campos a analizar, es conveniente usar la mínima magnificación del microscopio, teniendo como límite que la resolución de cada figura mantenga la mínima información de la distribución espacial de los cromosomas, c) Las metafases son variables en forma, dado que los cromosomas pueden estar muy dispersos o muy conglomerados e incluso traslapados (Figura 1.3).



Figura 1.3 Muestra de diferentes tipos de metafases que va desde la muy conglomerada hasta la muy dispersa

#### 1.4 Estado del arte en búsqueda automatizada de metafases (“metaphase finders”)

Muchos sistemas y algoritmos conocidos como buscadores de metafases han sido propuestos para solucionar el problema. Los primeros intentos para la búsqueda semi-automatizada de metafases se describieron en un trabajo publicado en 1963 (LEDLEY *et al.*, 1963). Este trabajo se enfocó básicamente a la digitalización de fotografías de metafases para el análisis de los cromosomas de las mismas. En particular el trabajo de LEDLEY *et al.*, 1963, fue el que impulsó el desarrollo de otros instrumentos similares para el análisis de metafases, tal es el caso de los sistemas: CELLSCAN (INGRAM M. *et al.*, 1968), TICAS (WIED G. *et al.*, 1968) y CYDAC (MAYALL B y MENDELSON M, 1970). Es importante mencionar que anteriormente al desarrollo de todos estos sistemas, el análisis de cariotipo de las metafases se realizaba sobre fotografías de las mismas, es decir, una vez localizada una metafase se le tomaba una fotografía, se revelaba la fotografía, se recortaban los cromosomas y se pegaban alineados en una hoja de papel para su posterior análisis (obtención de medidas cuantitativas). Es por eso que, aun cuando estos sistemas resultaron muy costosos y sofisticados, su relevancia se debe a que fueron los primeros que

---

permitieron no sólo adquirir imágenes sino también almacenar y tomar medidas cuantitativas de los cromosomas, así como obtener estadísticas de dichas medidas.

Posteriormente en el año de 1974 investigadores del Centro Médico de Nueva Inglaterra (GREEN *et al.*, 1974), desarrollaron un sistema no sólo para el análisis de metafases sino también para la búsqueda de las mismas. Este sistema estaba basado en un microscopio óptico y una cámara "plumbicon". La búsqueda de las metafases se realizaba por medio de un análisis de agrupamiento (cluster) de los cromosomas. En una primera etapa el sistema localizaba las metafases usando un objetivo de 22x de aumento y almacenaba las coordenadas centrales de la misma y al final del análisis se regresaba a cada una de las coordenadas centrales para que el usuario confirmara si el objeto encontrado era metafase. El porcentaje de reconocimiento de metafases reportado fue de un 80% de verdaderos positivos, sin embargo, el porcentaje de falsos positivos fue del 90%, así en términos generales se reportó un reconocimiento entre el 10 al 50% considerando la totalidad de objetos reconocidos. El bajo reconocimiento de objetos se debió a las características que se tomaron en cuenta para el agrupamiento de los cromosomas, las cuales fueron seleccionadas considerando que la muestra contaba sólo con metafases ideales, es decir, aquéllas que no fueran conglomeradas, que no tuvieran cromosomas traslapados y que no se traslaparan metafases entre sí. Aun cuando el porcentaje de reconocimiento no fue muy alto, el trabajo realizado por GREEN *et al.*, 1974, fue un paso importante debido a que fue de los primeros trabajos en donde se intentó la completa automatización para la búsqueda de las metafases. En paralelo, JOHNSON *et al.*, 1974 reportó otro sistema automatizado que funcionaba con un microscopio óptico con platinas motorizadas y un objetivo de 40x de aumento, así como una cámara de video de circuito cerrado (CCTV) para la adquisición de las imágenes. El hecho de que el microscopio contara con platinas motorizadas permitía que los movimientos para el análisis de cada campo de la laminilla se hiciera de manera automática y además que el enfoque fuera semiautomático, ya que requería de la interacción del usuario. La metodología que se desarrolló para el reconocimiento de las

metafases se basó en el análisis de las variaciones de niveles de gris (puntos mínimos) que se registraban en cada una de las líneas de la imagen, en aras de diferenciar el fondo de los objetos de interés y en específico los cromosomas de las metafases. En este trabajo se partió de la hipótesis que las variaciones de los niveles de gris de las metafases tienen una longitud en un rango característico. Así una vez analizadas todas las líneas de la imagen se hacían agrupamientos (con relación al vecino más cercano) de los puntos mínimos encontrados y si estos agrupamientos cubrían un cierto tamaño de área, se consideraba que existía una metafase. Esta metodología sólo sirvió en laminillas en las cuales no había artefactos ni interfases, ya que en aquéllas donde sí había, éstos se confundían con metafases. Esto se debía a que los agrupamientos tanto de los artefactos como de las interfases podían tener un área muy similar a los agrupamientos de las metafases, aun cuando la distribución de los puntos fuera diferente. El porcentaje de reconocimiento no fue reportado, sin embargo, se reportó un 5% de metafases no reconocidas y un 10% de falsos positivos, en laminillas completamente limpias. En el caso de laminillas con artefactos, el porcentaje de falsos positivos aumentó al 80% y el de metafases no reconocidas aumentó también, aunque no se reporta en cuánto. Finalmente JOHNSON *et al.*, 1974, concluyeron en su trabajo que era necesario mejorar la técnica de reconocimiento de tal manera que se tuviera la posibilidad de reconocer metafases en presencia de artefactos e interfases (condiciones reales de una preparación). Este sistema, al igual que el desarrollado por GREEN *et al.*, 1974, permitía la interacción con el usuario, mostrando todos los objetos encontrados de tal manera que el usuario pudo seleccionar de éstos sólo los que realmente eran metafases.

Con los rápidos avances en el campo de la citogenética, muchas compañías dedicadas al análisis de imágenes de video acoplaron sus sistemas de propósito general a través de un software especializado para su aplicación en la localización de metafases con diferentes grados de interacción del usuario. Tal es el caso de IBAS, sistema de análisis de imágenes de video desarrollado por Kontron GMBH en Alemania y Quantimet 720, desarrollado por Cambridge Instruments en Reino Unido para el análisis de texturas en mineralogía y

metalografía. El uso del sistema Quantimet 720 para la búsqueda de metafases fue reportado en un trabajo realizado en 1979 (VAN DEN BERG H. and DE FRANCE H., 1979), donde se describe el desarrollo de un sistema para la búsqueda automatizada de metafases. El sistema constaba de una cámara "plumbicon", un microscopio universal con un objetivo de 25x de aumento, el software Quantimet 720 para la adquisición de las imágenes del microscopio y los módulos programados de los algoritmos desarrollados por GREEN *et al.*, 1974, para la detección de los cromosomas con un módulo más que permitía realizar a la imagen algunos pre-procesos para su mejora. Es importante mencionar que este trabajo no reportó el porcentaje de reconocimiento de las metafases, sin embargo, debido a que utiliza el algoritmo de agrupamiento definido en GREEN *et al.*, 1974, se considera que tuvo los mismos problemas con relación al porcentaje de falsos positivos detectados.

Otro trabajo que reporta el uso de un sistema comercial de análisis de imágenes de propósito general (*Magiscan*) para el desarrollo de un sistema de análisis de cromosomas, fue el creado por GRAHAM J. and TAYLOR C., 1980. Este sistema fue el primer buscador de metafases comercial y fue comercializado por Joyce-Loebl, Gateshead en Inglaterra. Debido a que es un software de tipo comercial, no se reportó de manera clara la metodología utilizada para el reconocimiento de las metafases, sólo se mencionó que se hacen agrupamientos de objetos pequeños que den indicios de la presencia de una metafase. Para la búsqueda se utiliza un microscopio con platinas motorizadas y un objetivo de 25x de aumento. El porcentaje de reconocimiento que tiene el sistema no es reportado debido a que hasta ese momento no se tenían todavía información cuantitativa de su rendimiento, sin embargo, el trabajo concluye que el buscador resultó aparentemente satisfactorio para algunas muestras, pero que faltaba mostrar su aplicabilidad de manera general, es decir, con diferentes tipos de muestras. El uso del sistema *Magiscan* como buscador y analizador de metafases se reportó en LUNDSTEEN C. *et al.*, 1987, en GRAHAM J. and PYCOCK D., 1987 y en ODAWARA K. *et al.*, 1997. En el primer trabajo sólo se presentan resultados en términos del análisis de cromosomas y no en relación con la búsqueda de metafases. En el

segundo trabajo se reportan los resultados en el reconocimiento de metafases en dos tipos de experimentos, uno con células de la sangre (linfocitos) y otro con células de líquido amniótico. En el caso de los linfocitos, el porcentaje de falsos positivos fue de 3% y de falsos negativos de 40%, mientras que en el líquido amniótico el porcentaje de falsos positivos fue de 30% y 29% de falsos negativos. En ninguno de los dos casos se reportó el porcentaje de verdaderos positivos. El trabajo concluye con una discusión en términos de los parámetros que se deben de tomar en cuenta para evaluar el rendimiento de un sistema buscador de metafases, considerando que las muestras de células pueden tener características muy variadas en dependencia del tipo de las mismas. Finalmente en el trabajo realizado por ODAWARA K. *et al.*, 1997, se presentó un estudio comparativo en relación con el reconocimiento de las metafases bajo diferentes condiciones de una muestra (densidad de células y tiempo de tinción). Los porcentajes de reconocimiento se determinaron por medio de dos medidas denominadas sensibilidad y predictibilidad, ambas relacionadas con el porcentaje de verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN).

$$\text{sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (1.1)$$

$$\text{predictibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (1.2)$$

En un primer experimento se evaluó la importancia del tiempo de tinción en la búsqueda de las metafases. Para ello se consideraron 5 muestras con diferentes períodos de tiempo de tinción (5, 10, 20, 40 y 60 minutos). Para cada muestra se realizó el conteo automatizado de la metafase y se calcularon las medidas definidas por la ec. (1.1) y (1.2). En el mejor caso los porcentajes alcanzados de sensibilidad y predictibilidad fueron del 85% y del 92% respectivamente, con un período de fijación de 20 minutos. En el peor caso los porcentajes

---

obtenidos de sensibilidad y predictibilidad fueron de 35.4% y 85% respectivamente, con un periodo de fijación de 5 minutos.

En un segundo experimento se evaluó la importancia de la densidad de células en la búsqueda de metafases. Para ello se consideraron 5 muestras con diferentes diluciones. Las muestras fueron analizadas de manera automatizada utilizando un objetivo de 400x de aumento. Para cada muestra se evaluaron las medidas definidas en las ec. (1.1) y (1.2). En el mejor de los casos se obtuvieron porcentajes de sensibilidad y predictibilidad de 92% y 98% respectivamente y en el peor caso los porcentajes de sensibilidad y predictibilidad fueron de 92.3% y 84% respectivamente. Tanto los experimentos de tinción como de densidad de células del trabajo de ODAWARA K. *et al.*, 1997, fueron realizados para encontrar los tiempos óptimos de tinción y la dilución adecuada que den el máximo porcentaje de reconocimiento de metafases. Sin embargo, es evidente que no en todos los problemas de búsqueda de metafases se pueden modificar estos parámetros, debido a que las muestras sólo pueden estar a una dilución determinada o el tiempo de tinción no siempre puede variar.

En paralelo con el desarrollo de Magiscan, un grupo de investigadores en Edimburgo desarrolló varios sistemas prototipos para la búsqueda de metafases. Los más importantes fueron el denominado FIP (Fast Interval Processor) y METAFIP. En 1984 la compañía Shandon Southern Products Ltd, comercializó el sistema FIP renombrándolo como *Cytoscan 110*, para la búsqueda y análisis de metafases. El sistema estaba equipado con un microscopio con platinas motorizadas y un objetivo de 20x de aumento. El reconocimiento de las metafases se llevó a cabo por medio de agrupamientos y las características de los mismos, como son: el número de objetos (cromosomas) dentro de un agrupamiento, el área, la forma, la densidad óptica y las variaciones de densidades en el agrupamiento. El uso de este sistema se reportó en FINNON P. *et al.*, 1986 y en SHIPPEY G. *et al.*, 1986. En ningún caso se indicó el porcentaje de reconocimiento, sin embargo, en FINNON P. *et al.*,

---

1986, se mencionó que Cytoscan encontró más metafases que el experto y se hizo un análisis para la justificación de dichos resultados, considerando que los errores de conteo los cometía el experto y no el sistema, teniendo por lo tanto un extra-reconocimiento de aquellas metafases que el experto no lograba visualizar.

Posteriormente entre 1985 y 1990 se desarrollaron otros sistemas comerciales para la búsqueda de metafases y cariotipo, éstos fueron: *Genetiscan* de Perspective System Inc., E.U.; *Chromobas* de Kontron/Zeiss, Alemania; *Metachrome* de An-Con Genetics, E.U.; *Miamed* de Leitz, Alemania; *Metafer 2* de Metasystems Sandhausen, Alemania y *LAI Metafind* de Loast Associates Inc., E.U. La evaluación y características de algunos de estos sistemas se describen en los trabajos que se comentan en los siguientes párrafos.

CASTLEMAN K, 1992, reportó las características, uso y rendimiento del sistema Genetiscan para el reconocimiento de células en linfocitos. Para el reconocimiento de las metafases se utilizó un objetivo de 16x de aumento y las imágenes se adquirieron con una cámara CCD. El porcentaje de reconocimiento alcanzado por el sistema, en ese trabajo, fue del 80% en verdaderos positivos y 20% en falsos positivos.

En WEBER J. *et al.*, 1992 y HUBER R. *et al.*, 1995, 1998, 2001, se reportó el uso del sistema METAFER 2. En el primer trabajo el sistema fue utilizado para el reconocimiento de linfocitos. El análisis se realizó con un objetivo de 25x de aumento y el rendimiento del sistema no se reportó de manera cuantitativa. En el caso de los trabajos realizados por HUBER R. *et al.*, ninguno de los tres reportó el porcentaje de reconocimiento de metafases, únicamente se obtuvieron estadísticas en relación con el cariotipo. En estos trabajos el sistema se utilizó para el reconocimiento de linfocitos en investigaciones sobre cáncer y el análisis se llevó a cabo usando un objetivo de 16x de aumento en los tres casos.

El uso del sistema Metafin se reportó en BLAKELY *et al.*, 1995. Este trabajo sólo mencionó las características del sistema (uso de objetivo de 10x de aumento, microscopio

---

con platinas motorizadas con capacidad para 15 laminillas, cámara de color) y de la muestra (linfocitos de ser humano, para el estudio de radiaciones), pero no reportó el porcentaje de reconocimiento de metafases.

A partir de la aparición de los sistemas comerciales para la búsqueda de metafases y cariotipo, la mayoría de los trabajos reportados se enfocaron a la utilización y evaluación de estos sistemas en la aplicación a problemas específicos, sin embargo, algunas otras investigaciones continuaron en el desarrollo de algoritmos para el análisis de metafases (GARZA-JINICH *et al.*, 1992; VROLIJK *et al.*, 1994; PIPER J. *et al.*, 1994; MCLEAN J. *et al.*, 1995; MASCIO L. *et al.*, 1998). En términos generales estos trabajos centraron sus esfuerzos en el diseño de metodologías con el uso de imágenes de microscopía de fluorescencia, debido a que ésta resalta ciertas características de los cromosomas que permite detectar de una manera más simple algunas aberraciones de los mismos. Uno de los primeros trabajos en esta dirección fue el desarrollado por VROLIJK J *et al.*, 1994. El objetivo principal de éste fue mostrar las ventajas de la fluorescencia en el análisis de translocaciones de cromosomas. Con relación a la búsqueda de metafase el porcentaje de reconocimiento reportado fue de 12.7% en falsos negativos y de 7.4% en falsos positivos.

Los trabajos más recientes reportan el uso de sistemas comerciales en conjunción con microscopía de fluorescencia para la detección de traslocaciones en cromosomas. Tal es el caso del trabajo presentado por HUBER R. *et al.*, 2001 que utiliza el sistema METAFER2 y el de ROY L. *et al.*, 2001, que usa el sistema CYTOGEN.

Aun cuando se han tenido avances significativos en la búsqueda automatizada de metafases, no todos los problemas pueden ser resueltos con las herramientas ya desarrolladas, sean comerciales o no (VAN DEN BERG H. *et al.*, 1981). Esto se debe a que las características de la muestra a analizar se vuelven diferentes en términos de: la densidad, cantidad y calidad de células a cuantificar en dependencia del tipo de

experimento que se realice. Por otra parte, la mayoría de las herramientas desarrolladas utilizan la búsqueda de metafases como un paso intermedio para el cariotipo, por lo tanto el tipo de células que se buscan son aquellas que cumplen con características muy específicas, es decir, 1) que no tengan cromosomas traslapados, ya que al momento de hacer el cariotipo los cromosomas que estén traslapados no pueden ser analizados, 2) que tenga un número mínimo de cromosomas y 3) que no tengan traslape con artefactos o con otras metafases. Por lo tanto cuando se habla de problemas en donde lo que interesa es cuantificar todas las células que se encuentren en metafase, este tipo de herramientas no pueden ser utilizadas, debido a que sólo localizan aquellas metafases que cumplen con las características antes enumeradas. Tal es el caso de la problemática del cálculo del índice mitótico, donde la cantidad de células en metafase que se encuentran en una laminilla es considerablemente menor que las células en interfase y sobre todo que la cantidad de artefactos que se presentan es muy importante, lo que incrementa la probabilidad de errores en el proceso de reconocimiento y clasificación de las metafases e interfases.

El presente trabajo se enfocó al desarrollo de características que permitan el reconocimiento de metafases e interfases de linfocitos, que junto con otras características morfológicas y fotométricas, permitan el análisis cuantitativo de la proliferación celular y la evaluación del índice mitótico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

---

## CAPÍTULO 2 Adquisición y segmentación

El problema de la automatización de la búsqueda de metafases se puede dividir en varios subproblemas: 1) La automatización del control de los movimientos de las platinas del microscopio, 2) El enfoque automático durante el análisis de las laminillas, 3) La adquisición de las imágenes y 4) El reconocimiento de las metafases. Así, la calidad en términos de reconocimiento y tiempo de un sistema para la búsqueda de metafases, dependerá de la buena solución que se le dé a los cuatro problemas mencionados (LUNDSTEEN and MARTÍN O, 1989 y ROY L. *et al.*, 2001).

### **2.1 Control automático de los movimientos de las platinas en los tres ejes (x, y, z) y adquisición de la imagen, para el cálculo del IM.**

Como un primer paso en el reconocimiento semiautomatizado de metafases e interfases para el cálculo del IM, se requiere que la computadora obtenga la información de los cultivos celulares de las laminillas, es decir, la adquisición de las imágenes de cada uno de los campos que el experto visualiza en el microscopio cuando lo hace manualmente, para después hacer el análisis de las mismas y así contabilizar los objetos de interés. Por lo tanto para realizar este proceso, es necesario que la computadora tenga control sobre el microscopio óptico, tanto para la adquisición de las imágenes, como para el control automático del movimiento de las platinas en los tres ejes (x,y,z).

La adquisición de las imágenes de los cultivos celulares se realiza mediante una cámara de video CCD blanco y negro que está conectada al microscopio y a su vez a una tarjeta de adquisición (Flashpoint, Integral Technologies, Inc., USA) con entradas para video, la cual

permite digitalizar las imágenes en la computadora mediante el uso de un software comercial (Image Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, L.P., USA).

Para el manejo de las platinas y las perillas de enfoque se cuenta con un controlador, Multicontrol 2000, de motores a pasos ("stepper motor"), que consta de un intérprete que soporta los comandos de un lenguaje interfaz denominado Venus-1, el cual permite manejar las funciones de los motores a pasos. Así mismo, el controlador cuenta con un CPU RISC de 32 bits, que le otorga la habilidad de hacer tareas en tiempo real. La Figura 2.1 muestra la conexión de la computadora y sus periféricos. Las especificaciones a detalle del equipo utilizado se muestran en el Apéndice 2.

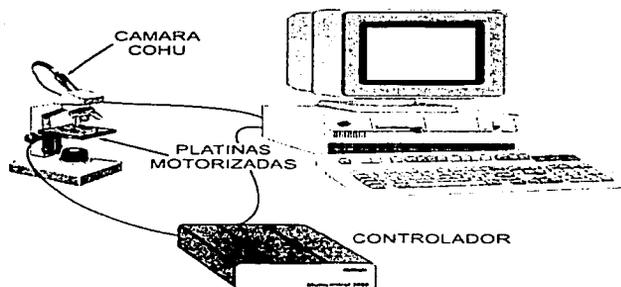


Figura 2.1 Esquema de conexión del microscopio, computadora, cámara y controlador

### *2.1.1 Recorrido y enfoque de las laminillas para la adquisición de las imágenes*

El control del movimiento de las platinas en los tres ejes ( $x, y, z$ ) se implementó por medio de un conjunto de rutinas escritas en lenguaje C y FORTRAN que permitieran enviar al controlador los comandos para ejecutar algunas tareas como la calibración de las platinas y los movimientos tanto absolutos como relativos, para el posicionamiento en un campo

deseado o para el barrido completo de una laminilla, así como para el enfoque de los campos. Todas estas rutinas fueron desarrolladas en un trabajo previo (GARDUÑO E, 1995).

Para implantar el recorrido que se debe realizar sobre las laminillas siguiendo las especificaciones proporcionadas por los expertos, es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones. Si el cultivo es muy grande, se puede tener un número alto de laminillas que constituyen el experimento, por lo tanto se toma una muestra de laminillas que serán revisadas previamente (llamadas controles). Si estas laminillas cumplen con un índice mitótico mínimo, entonces se revisa el resto de las laminillas que conforma el experimento. En caso en de que el cultivo no sea tan grande, se revisan todas las laminillas del experimento.

Para realizar el barrido de una laminilla se requirió considerar los siguientes puntos:

- 1) Realizar una calibración de las platinas, es decir, detectar los límites físicos de las mismas y así poder llevar a cabo los movimientos tanto absolutos como relativos a una determinada posición de la laminilla.
- 2) Calibrar el área del campo microscópico visible en la pantalla usando un objetivo determinado, es decir, con un objetivo de  $n_x$  aumentos se observa un plano  $(x,y)$  que difiere del observado bajo un objetivo con otro aumento. La información sobre el área que abarca cada objetivo es guardada en un archivo de definiciones, el cual puede ser modificado por el usuario, para redefinir una nueva área. En el caso del problema del IM, la búsqueda se realiza con un objetivo de 10x de aumento, sin embargo, el programa permite utilizar objetivos de otras magnificaciones.
- 3) Permitir un cierto traslape entre cada campo, para que posibles objetos que hubiesen quedado entre dos campos puedan ser revisados. El área de traslape puede ser modificada por medio del programa.
- 4) Definir la sección a analizar en cada una de las laminillas. Como las muestras de cultivo normalmente ocupan una sección de la laminilla, es inútil barrer toda el área

de la laminilla; por lo tanto se define un área específica de las laminillas a analizar, desechando el resto, como puede verse en la Figura 2.2.

- 5) Emular el barrido en zig-zag, tal y como lo realiza el experto en el conteo manual, comenzando cerca de la parte esmerilada de la laminilla.



Figura 2.2 Zona de interés para el barrido en la laminilla

En relación con el enfoque de los campos de la laminilla, una opción consiste en ir aplicando un filtro pasa-altas a la imagen digital y encontrando iterativamente el punto de mayor afinamiento (máximo contraste) y por lo tanto el punto de mejor foco (RUSS J, 1990). Para realizar el enfoque en una posición  $(x,y)$  específica de la muestra se puede utilizar un algoritmo que calcula el contraste en una serie de tomas de un barrido en el eje  $z$ , considerando el enfoque óptimo en la toma que posea el mayor contraste. Una desventaja de este método es que el barrido en el eje  $z$  debe abarcar una distancia lo suficientemente grande para que el proceso siempre encuentre el enfoque del campo que se va a analizar y por otra parte, los incrementos en el barrido deben ser pequeños con el propósito de que el enfoque sea más fino.

La metodología para el enfoque descrita anteriormente y utilizada por GARDUÑO E. 1995, resultó ser lenta, debido a que para obtener un buen enfoque en cada campo se requería barrer por lo menos  $\pm 6$  puntos en el eje  $z$  haciendo lo más pequeño posible los incrementos en el barrido. Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó otra metodología de enfoque automático que permitiera que éste se hiciera de una manera más rápida y precisa. Dicha metodología se basó en algunas ideas descritas en trabajos previos relacionados tanto con el autoenfoque para microscopía automatizada como con los sistemas buscadores de

metafases (GROEN F. *et al.*, 1985; GRAHAM J and PYCOCK D., 1987; FIRESTONE I. *et al.*, 1991).

El algoritmo propuesto considera la ecuación de un plano  $\pi$  para encontrar el enfoque de una posición específica  $(x, y)$ . Si se conoce la ecuación del plano enfocado, entonces se puede conocer el enfoque de cualquier punto que pertenezca a dicho plano. Así, para obtener la ecuación del plano enfocado (la laminilla), se le pide al usuario que enfoque, por cada laminilla a analizar, tres puntos específicos de la misma, como se muestra en la Figura 2.3a. Se asume que la laminilla forma un plano ideal.

Las coordenadas de los tres puntos no colineales  $P(x_0, y_0, z_0)$ ,  $Q(x_1, y_1, z_1)$ ,  $R(x_2, y_2, z_2)$ , dados por el usuario definen un plano  $\pi$ , pues ellos determinan dos vectores no paralelos que se intersectan en un punto como se muestra en la Figura 2.3b.

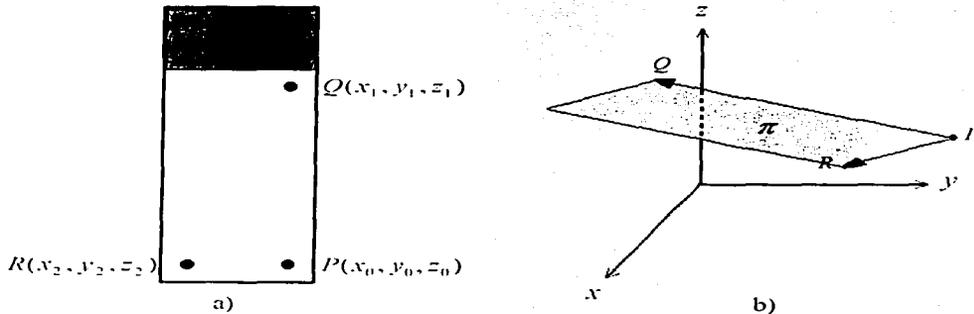


Figura 2.3 Enfoque de la laminilla por medio de la ecuación de un plano: (a) puntos de enfoque definidos por el usuario; (b) plano que se forma con los tres puntos no colineales definidos por el usuario

Los vectores  $\overline{PQ} = (x_1 - x_0)\mathbf{i} + (y_1 - y_0)\mathbf{j} + (z_1 - z_0)\mathbf{k}$  y  $\overline{PR} = (x_2 - x_0)\mathbf{i} + (y_2 - y_0)\mathbf{j} + (z_2 - z_0)\mathbf{k}$  están en el plano y por tanto son ortogonales al vector normal, tal que

$$\overline{PQ} \times \overline{PR} = \begin{vmatrix} \mathbf{i} & \mathbf{j} & \mathbf{k} \\ (x_1 - x_0) & (y_1 - y_0) & (z_1 - z_0) \\ (x_2 - x_0) & (y_2 - y_0) & (z_2 - z_0) \end{vmatrix} = \mathbf{i}A - \mathbf{j}B + \mathbf{k}C, \quad (2.1)$$

donde:

$$\begin{aligned} A &= [((y_1 - y_0) \times (z_2 - z_0)) - ((z_1 - z_0) \times (y_2 - y_0))] \\ B &= [((x_1 - x_0) \times (z_2 - z_0)) - ((z_1 - z_0) \times (x_2 - x_0))] \\ C &= [((x_1 - x_0) \times (y_2 - y_0)) - ((y_1 - y_0) \times (x_2 - x_0))] \end{aligned}$$

Se obtiene la ecuación del plano:

$$\pi : A(x - x_0) - B(y - y_0) + C(z - z_0) = 0. \quad (2.2)$$

Despejando el valor de  $z$  en la ecuación (2.2) se obtiene la ecuación correspondiente al enfoque del plano en el punto  $(x, y)$ .

$$z = \frac{B(y - y_0) - A(x - x_0)}{C} + z_0. \quad (2.3)$$

Por lo tanto, para cada campo que se analiza durante el barrido de la laminilla, se calcula el valor de  $z$  definido por la ec. (2.3), para enfocar dicho campo. Para cada una de las laminillas se obtiene la ecuación del plano que permita realizar el enfoque.

Una vez que se tiene tanto el control sobre los movimientos de las platinas del microscopio como las rutinas para emular el barrido de las laminillas tal y como lo realiza el experto, se puede proceder a obtener la información de los cultivos celulares, a través de la adquisición

---

---

de las imágenes de cada campo recorrido, de tal manera que dichas imágenes puedan ser analizadas para la obtención de *objetos de interés*. Esto implica el discriminar la información del fondo y los objetos de interés, lo cual se realiza a través de un proceso de segmentación que se describe a continuación.

## 2.2 Segmentación

La segmentación es el proceso que subdivide a una imagen en sus partes constituyentes u objetos y es uno de los elementos más importantes en el análisis automatizado de imágenes, debido a que al realizar este paso se tienen objetos o entidades de interés que pueden ser descritos o reconocidos posteriormente. Es pertinente decir que muchos errores de análisis de los objetos parten de una mala segmentación de la imagen.

Los algoritmos de segmentación de imágenes generalmente se basan en una de dos propiedades de los valores de gris de las mismas: discontinuidad y similitud. Para la primera categoría la imagen se subdivide basándose en cambios abruptos en los niveles de gris, así la tarea principal en este tipo de segmentación es la detección de puntos aislados, líneas y bordes en la imagen. La segunda categoría subdivide la imagen en regiones que son similares de acuerdo a un conjunto de criterios predefinidos. Algunos métodos de segmentación por similitud son los de umbral y crecimiento de regiones (GONZALEZ R. *et al.*, 2002).

Antes de especificar cómo se llevó a cabo el proceso de segmentación, es importante mencionar que tanto la metodología de segmentación como la implantación de la misma se describe en un trabajo previo (CORKIDI G. *et al.* 1998). Después de un análisis de las características de las imágenes se decidió segmentar por medio de umbral, debido a que los objetos de interés se encuentran sobre un fondo contrastado como se muestra en la Figura 2.4. Para calcular el umbral de segmentación se utilizó el algoritmo Between Class Variance (BCV) desarrollado por Otsu (OTSU N. 1979), descrito en el Apéndice 3.

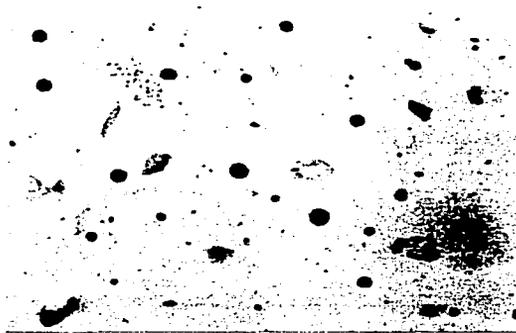


Figura 2.4 Imagen de un campo de la laminilla

### *2.2.1 Segmentación de las imágenes de los cultivos celulares*

En el caso del estudio de la proliferación celular para el cálculo del índice mitótico, es necesario identificar dos tipos de objetos en las laminillas, interfases y metafases. Las metafases se pueden subdividir en dos tipos: las conglomeradas y las dispersas (Figura 2.5).

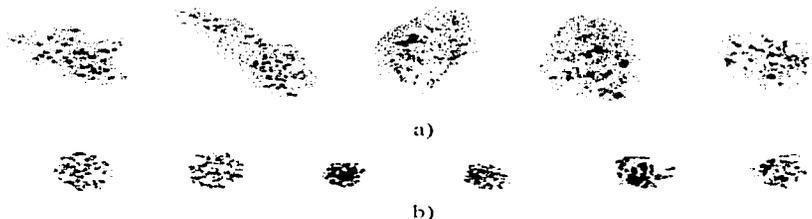


Figura 2.5. Muestra de diferentes metafases: (a) metafases dispersas; (b) metafases conglomeradas

Al segmentar directamente la imagen por el método BCV, se encontraron dos problemas importantes:

- (i) Algunas interfases no eran segmentadas en ciertas imágenes, debido a que éstas eran más brillantes que el umbral de segmentación obtenido.
- (ii) Los cromosomas de las metafases dispersas se segmentaban como objetos independientes, en lugar de segmentarse como un sólo objeto.

El problema (i) se relaciona con diferentes aspectos tales como la adquisición, el decoloramiento de la preparación en la laminilla y la iluminación, los cuales contribuyen a tener una imagen poco contrastada. Para resolver este problema se aplicó a la imagen una función polinomial de cuarto orden, lo que permitió oscurecer las interfases sin alterar el fondo de la imagen, evitando en gran medida la segmentación de artefactos que corresponden al fondo (Figura 2.6). Para ello se definió la función de transferencia  $f(x) = ax^4$ , aplicándola a la imagen a través de la modificación de las tablas "look-up" (LUT), donde  $x$  representa el nivel de gris de entrada,  $f(x)$  el valor de salida que se obtiene después de aplicarse la transformación y  $a$  es una constante, que se calcula de la siguiente manera:

Sea  $Max_{NG}$  el máximo valor de gris de la imagen, y  $x_M$  la moda del histograma de niveles de gris de la imagen. Si normalizamos con respecto a  $Max_{NG}$ , entonces  $f(x_M) = 1$  y  $a = 1/(x_M / Max_{NG})^4 = (Max_{NG} / x_M)^4$ .

Para resolver el problema (ii) referente a la segmentación de los cromosomas dispersos, se aplicó de manera iterativa la operación morfológica de dilatación, de tal manera que permitiera que los cromosomas se unieran para formar un solo objeto que pudiera ser segmentado. El número de iteraciones depende del grado de dispersión de los cromosomas y del objetivo con el que se vean al microscopio. En nuestro caso se utilizó un objetivo de

10x de aumento y el número adecuado de iteraciones se determinó en 2 (Figura 2.7). Debido a que las dilataciones sólo sirven para la segmentación de las metafases dispersas y no para las interfases y metafases conglomeradas, se decidió realizar una doble segmentación a cada una de las imágenes digitalizadas del microscopio, en aras de segmentar todos los objetos de interés.

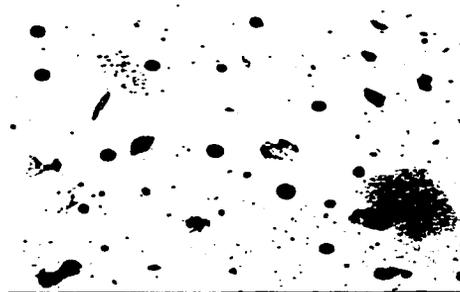


Figura 2.6 Aplicación de la función  $f(x) = ax^2$ , a la imagen de la Figura. 2.4

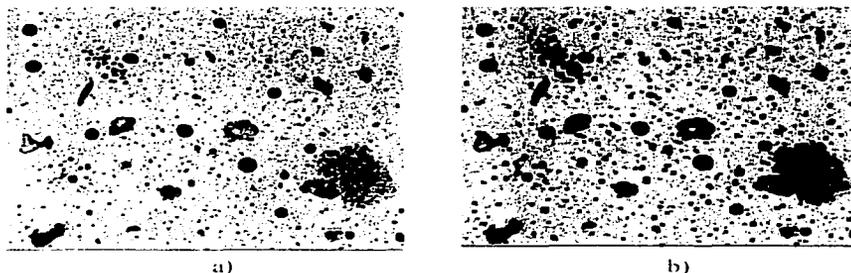


Figura 2.7 Operaciones morfológicas aplicadas a la imagen para la segmentación de las metafases dispersas.: (a) primera dilatación; (b) segunda dilatación

Para la primera segmentación (Figura 2.8a) se aplicó a la imagen la función de transferencia  $f(x)$  (definida anteriormente), se calculó el umbral de segmentación por medio del método BCV y se segmentó. En esta segmentación se obtuvieron las interfases y las

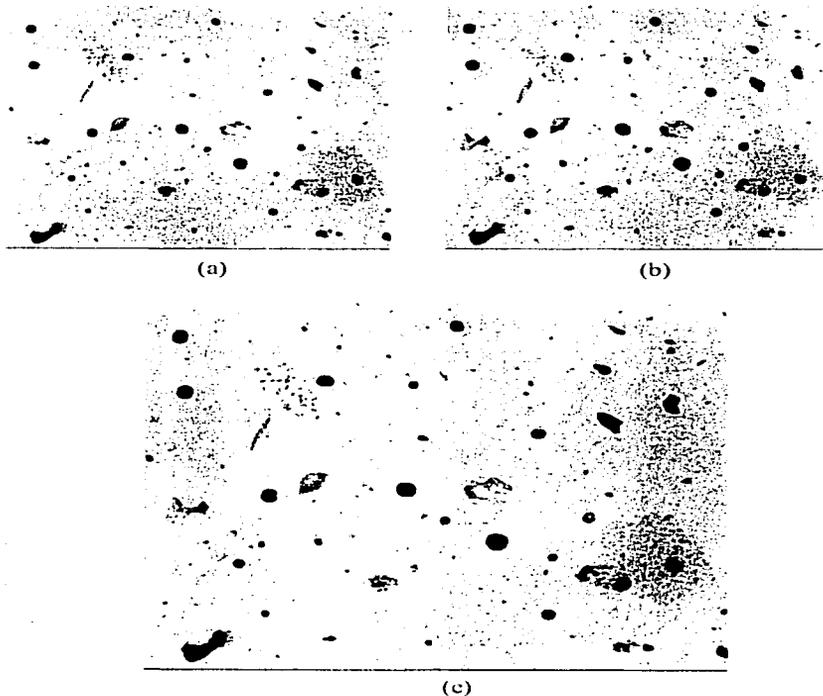


Fig. 2.8 Proceso de segmentación: (a) segmentación de interfases y metafases compactas; (b) segmentación de metafases dispersas; (c) segmentación final.

---

metafases conglomeradas, junto con un conjunto de objetos que no pertenecían a ninguna de las dos categorías mencionadas, a los cuales denominaremos artefactos. En la segunda segmentación (Figura 2.8b) se aplicaron dos dilataciones a la imagen original, se calculó el umbral de segmentación con el método BCV y se segmentó. En esta segmentación se obtuvieron las metafases dispersas y otro conjunto de artefactos. Finalmente se hizo la unión de los contornos de la primera y segunda segmentación, excluyendo los contornos repetidos, y sobreponiéndolos posteriormente a la imagen original. La Figura 2.8c muestra el conjunto final de objetos a analizar y clasificar.

### 2.3 Selección de características

Partiendo del hecho que las imágenes del microscopio ya han sido segmentadas, el problema del reconocimiento de los objetos segmentados se puede desglosar en dos subproblemas importantes:

- 1) La selección de características representativas que describan a las metafases e interfases y que permitan su discriminación.
- 2) La clasificación como tal de las metafases e interfases, por medio de un algoritmo de clasificación determinado.

En todo problema de clasificación una de las cuestiones primarias es la selección de variables que mejor caractericen las clases y de hecho, las diferencien de otras. En la medida en que las características que se escojan sean más representativas de los objetos, y en que se seleccione un buen método de clasificación que se acople a las propiedades del problema a resolver, se tendrá una mejor clasificación.

Con respecto al problema del cálculo del IM, se requiere reconocer dos tipos de objetos: las interfases y las metafases, sin embargo, existe un tercer grupo de objetos denominado artefactos que se agregan en el proceso de segmentación. Este grupo conforma más del

90% de la totalidad de los objetos. Los artefactos son de diferentes formas y tamaños y hacen que el problema de clasificación se torne más complejo, que si sólo se tuviera que discriminar entre metafases e interfases.

Cuando el conteo se realiza de manera manual, las características que el experto toma en cuenta para la clasificación de las interfases son: el tamaño, la forma (que es casi circular) y el color (gris oscuro) (Figura 2.9a). En el caso de las metafases, las características que se consideran de manera visual son más complejas, ya que los cromosomas que están en proceso de separación pueden encontrarse en diversas etapas, que van desde los que están muy aglomerados, hasta los que se encuentran completamente esparcidos en el campo de observación (Figura 2.9b), por lo que no tienen una forma característica ni un tamaño homogéneo. Las metafases dispersas tienen una densidad de cromosomas menor que las metafases compactas; por otra parte, en las metafases compactas no se puedan identificar cromosomas individuales sino una aglomeración de objetos. En consecuencia creemos que

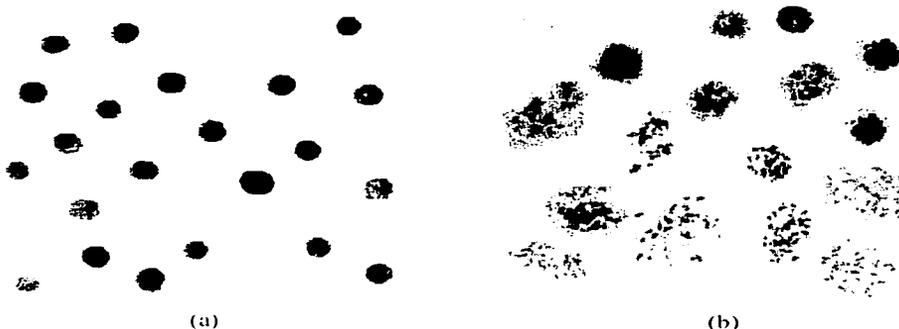


Fig. 2.9 Muestra de interfases y metafases: (a) interfases cuya descripción se basa en la forma casi circular y color, gris oscuro; (b) metafases cuya caracterización se asocia a la textura conformada por la densidad de sus cromosomas.

---

las características que el experto considera en el conteo manual de las metafases parecen estar asociadas a la *textura* que conforman los cromosomas de las mismas.

En términos de la automatización del cálculo del IM, las variables a considerar para la identificación de las interfases y metafases deben estar basadas en las características que el experto visualiza en los objetos. En este sentido, un trabajo previo reportó una propuesta de un conjunto de variables que permitieran clasificar dichos objetos (GARDUÑO E, 1995). Las variables definidas fueron: la forma (en relación con la circularidad), el área, el nivel de gris promedio, la desviación estándar del nivel de gris y dos variables asociadas al análisis unidimensional de las variaciones de los niveles de gris. Las primeras cuatro variables están relacionados con la descripción de las interfases y las dos últimas con la descripción de las metafases. El índice de reconocimiento con estas variables y un clasificador de mínimas distancias (con distancia Euclideana) fue del 75% en metafases y del 91% en interfases, en una muestra donde fueron excluidos todos los artefactos generados en el proceso de la segmentación, los cuales como ya se mencionó, representan el 90% de la muestra real de objetos. En cuanto se incorporaron los artefactos a la muestra, los índices de reconocimiento disminuyeron sustancialmente ya que éstos provocaron un alto índice de falsos positivos, principalmente en metafases (más de un 20% de los artefactos). Del análisis de estos resultados se dedujo que las variables relacionadas con las características de las interfases eran representativas mientras que las relacionadas con las metafases no. Esto se concluye del hecho que la mayor parte de los falsos positivos se presentó en las metafases. Así, resulta necesaria una mejor caracterización de las metafases que permita discriminarlas no sólo de las interfases sino también de los artefactos.

Algunos trabajos relacionados con la búsqueda de metafases reportan el uso de variables como el área, forma, nivel de gris promedio, variaciones de densidad óptica y el número de sub-objetos o cromosomas (FINNON P. *et al.* 1986; SHIPPEY G. *et al.* 1986; MASCIO L. *et al.* 1998); otros hacen un análisis de las variaciones de intensidad de gris, denominándola en algunos casos *textura* (GRAHAM J. and PYCOCK D. 1987; VROLIJK J. *et al.* 1994;

BLAKELY W. *et al*, 1995; MCLEAN J. and JONSON F, 1995). El uso de estas variables como tal en el problema del IM no resultaría apropiado debido a que en todos los trabajos antes mencionados, el tipo de metafases que se buscan son aquéllas en las que los cromosomas están bien dispersos y sin traslape (para análisis de cariotipo) teniendo éstas un área, una forma característica y una variación en intensidades que hace que su reconocimiento sea menos complejo.

Aun cuando los trabajos previos no nos permiten tener una solución satisfactoria para el reconocimiento de metafases e interfases para el cálculo del IM, podemos notar que en el caso de las metafases, la textura parece ser una característica importante para su descripción.

La presente tesis se enfocó principalmente al análisis y desarrollo de algunas variables que caracterizan la textura de las metafases, de tal forma que éstas permitan, junto con las variables de forma, área y nivel de gris, obtener una buena clasificación de las metafases e interfases en presencia de artefactos.

## CAPÍTULO 3 Análisis de textura

### 3.1 Introducción

Debido a la importancia que tiene la textura en el reconocimiento de las metafases, en este Capítulo se hizo una revisión de los trabajos de investigación relacionados con el análisis de textura publicados durante los últimos años, con el fin de definir una metodología para la caracterización de la textura de las metafases.

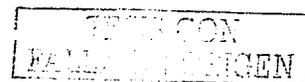
#### 3.1.1 El concepto de textura

Uno de los puntos importantes que dificultan el análisis de texturas es la falta de una definición clara y precisa de lo que es una textura. En HARALICK *et al.* 1973, se reporta el estado del arte de la teoría del análisis de texturas; y se menciona que hasta ese momento no había una definición precisa de lo que era una textura y que la mayoría de las técnicas habían sido desarrolladas para problemas específicos. Diecisiete años después BOVIK, A. *et al.* 1990, vuelve a mencionar que no ha sido formulada de manera adecuada una definición exacta de lo que es textura. En 1996 se publica un artículo (KARU K. *et al.* 1996) en el cual no sólo se cuestiona la no-existencia de una definición de textura, sino también se cuestiona que siempre que los métodos para el análisis de texturas son aplicados, se asume que la imagen tiene ciertas características de textura, sin embargo, una pregunta importante que debe de hacerse antes de aplicar algún tipo de algoritmo de análisis de textura, es *¿existe alguna textura en la imagen?* La respuesta a esta pregunta

depende no solamente de la imagen, sino de la aplicación que se le dará y de las características de textura que se extraerán de la misma. Este es un problema que está altamente relacionado con la conceptualización de textura, es decir, ¿cómo saber si en una imagen existe una textura, si *a priori* no tenemos claro como definir el concepto de textura o cuáles son los elementos que deben considerarse para poder caracterizar a las texturas?. Es importante mencionar que a la fecha no existe una definición precisa de lo que es textura.

Algunos psicólogos especialistas en percepción (GAGALOWICZ A, *et al.* 1981; JULESZ B., *et al.* 1983 y JULESZ B. 1984) opinan que las texturas no son entidades matemáticas que puedan ser definidas de manera formal, sino que éstas son hechos de la percepción humana y para poder entender el concepto de textura es necesario hacer más experimentos psico-fisiológicos que permitan entender un poco más la percepción visual del humano. Sin embargo, los logros obtenidos en el entendimiento de la percepción han resultado limitados y hasta el momento las variables que se encuentran involucradas en la percepción son todavía algo que se desconoce.

En NADLER M, 1992 se menciona que la problemática de definición de textura se debe a la gran variedad de texturas que pueden existir; de manera general se puede clasificar a las texturas como una gama que va desde las que están compuestas por elementos similares y que además se encuentran distribuidos de manera homogénea, denominadas regulares, hasta aquéllas que están compuestas por elementos que varían de manera aleatoria y que están distribuidos de manera aleatoria. Dichos elementos están relacionados solamente por alguna propiedad estadística como por ejemplo la autocorrelación; a este tipo de texturas se le denomina irregulares. Ejemplos de texturas regulares son las fotografías aéreas de zonas urbanas, o de cultivos agrícolas. De texturas irregulares son: vistas aéreas de bosques o montañas vía satélite, etc.



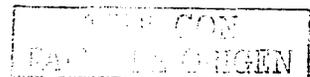
Si consideramos los casos extremos de los tipos de texturas mencionados, se puede hacer la formulación de dos tipos de enfoques diferentes que permitan el análisis de texturas. El estudio de texturas regulares, es decir, aquéllas que están constituidas por componentes similares, que se puede llevar a cabo por técnicas que determinen la estructura o componentes básicas y el patrón para generarla. Estos métodos ejemplifican el enfoque estructural de análisis de imágenes.

El análisis de texturas irregulares, es decir, patrones donde existe una variación aleatoria tanto en los elementos que componen al patrón como en su distribución, demanda la utilización de un enfoque diferente, ya que para este tipo de texturas resulta muy difícil tratar de encontrar los componentes básicos de la textura y tratar de caracterizar su distribución. Es por eso que para este tipo de problemas, lo que se trata de hacer es extraer algunas medidas que representen las propiedades que una textura tiene en una determinada región. Estos métodos ejemplifican el enfoque estadístico para el análisis de texturas.

Antes de hablar de los enfoques y métodos que existen para el análisis de textura, vamos a definir los tipos de problemas relacionados con el análisis de texturas (ERICH R. W *et al*, 1978).

De manera general, existen 3 tipos de problemas inmersos en el análisis de texturas: (1) Dada una textura cualquiera, definir a qué clase de un número finito de clases pertenece; (2) Dada una textura, cómo puede ser descrita ésta; (3) Dada una escena, cómo determinar las diferentes texturas que en ella aparecen, así como sus límites.

Los tres problemas antes mencionados están listados en orden de dificultad. El problema 1 es probablemente el menos difícil, ya que dado un número finito de clases de texturas se



---

puede probablemente encontrar un conjunto de reglas que permitan discriminar de manera efectiva cada una de las clases.

El problema 2 es más difícil ya que está en dependencia de la complejidad de la estructura de la textura. La descripción de una textura requiere del entendimiento de la dependencia que hay entre los componentes básicos de la textura y su composición o distribución, y relacionar estas dos no resulta sencillo. Es necesario describir a cada una de las texturas de manera única.

El problema 3 es probablemente el más difícil de resolver. En primer lugar resulta difícil especificar cuándo termina una textura y empieza otra, es decir, cómo se determinan los límites entre las texturas de una escena, eso cuando no se considera que una textura pueda estar dentro de otra. En este caso tendríamos que contemplar el problema de la segmentación de una textura inmersa en otra.

Hasta el momento no se ha encontrado una solución general a este problema. Se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar medidas verdaderamente robustas enfocadas a la percepción humana (GAGALOWICZ A., *et al.*, 1981; JULESZ B., *et al.*, 1983; JULESZ B., 1984).

En la literatura (HARALICK, R. M., 1979; REED T. *et al.*, 1993) se reporta que los problemas de texturas mencionados en los párrafos anteriores, podían ser estudiados al menos por dos enfoques: estructural y estadístico. Esto no significa que no existen algunos métodos que no estén considerados dentro de estos enfoques, sin embargo, éstos son los más conocidos. Dentro de cada uno de los enfoques existen una serie de técnicas que permiten la caracterización de algunas texturas. En el enfoque estadístico se analiza a las texturas como un patrón complejo definido por un conjunto de estadísticas extraídas de

algunas medidas locales tomadas del patrón. En este enfoque no se quiere dividir la textura en regiones homogéneas (primitivas o texeles). Lo que se hace es asignar ciertas medidas estadísticas a todas las regiones de la textura. Por otra parte, en el enfoque estructural se considera a la textura como un conjunto de primitivas organizadas espacialmente de manera regular y repetitiva. Por lo tanto, para describir una textura es necesario definir las primitivas que la conforman y sus reglas de organización espacial.

A continuación se presenta un análisis muy general de algunos algoritmos y metodologías desarrolladas con los enfoques estadístico y estructural.

### **3.2 Enfoque estadístico para el análisis de texturas**

Los métodos estadísticos definen a la textura en términos de estadísticas aplicadas de manera local a los niveles de gris, los cuales son constantes o varían lentamente a través de las regiones texturizadas. Diferentes texturas pueden ser discriminadas comparando los resultados de las estadísticas obtenidas sobre diferentes subregiones.

Los métodos estadísticos utilizados para la clasificación de texturas pueden ser divididos en varias categorías de acuerdo a cómo se calculan las medidas que determinarán el tipo de textura que se está analizando. Algunos algoritmos calculan dichas medidas directamente de la imagen. A este tipo de algoritmos se les denomina "métodos estadísticos basados en la imagen". En otros algoritmos se asume un modelo para la textura y los datos de la imagen se utilizan para determinar los parámetros del modelo. A estos algoritmos se les denomina "métodos estadísticos basados en modelos" (SCHACHTER B, 1980). Existen algoritmos donde las medidas se obtienen a través de una transformación que se le aplica a la imagen. A estos algoritmos se les denomina "métodos estadísticos basados en transformaciones"

---

(HARALICK R, 1979). Finalmente existen métodos basados en la distribución y dependencia espacial de los niveles de gris, denominada co-ocurrencia de niveles de gris.

En los métodos basados en la imagen se divide la imagen en regiones, se calcula la medida de textura en cada región y se agrupan en un vector, extrayendo la información más importante de la imagen. Dentro de estos métodos tenemos el denominado "Edginess" (SUTTON R. *et al.*, 1972) y los que aplican morfología matemática (MATHERON, 1975; SERRA *et al.*, 1973; DOUGHERTY E. *et al.*, 1992; WANG D *et al.*, 1993; KWON J. *et al.*, 1996). La problemática de los métodos basados en la imagen es la definición del tamaño de las regiones en que se dividirá la imagen y por otra parte como en la mayoría de los métodos estadísticos, la sensibilidad a las variaciones del contraste de la imagen.

Los métodos basados en modelos funcionan de la siguiente manera: se propone un "modelo", el cual es un arreglo abstracto de primitivas que tiene ciertos parámetros; si el modelo se ajusta a la textura de la imagen o mejor dicho si la imagen se ajusta al modelo, sólo se tienen que encontrar los parámetros del modelo. Algunos ejemplos de estos modelos son: los de autoregresión (McCORMICK B., *et al.*, 1974; DEGUCHI K, *et al.*, 1976; TOU J, 1980), los campos aleatorios de Markov (CHOW C, 1962; HASSNER M. *et al.*, 1980; CROSS G. *et al.*, 1983), series de tiempo (DELP E., *et al.*, 1979; JAU Y. *et al.*, 1984) y modelos de mosaico (SCHACHTER B. *et al.*, 1978; AHUJA N. *et al.*, 1980; AHUJA N. *et al.*, 1981).

En el caso de los métodos basados en transformadas, se aplica algún tipo de transformación para obtener la medida de textura de una imagen. En este tipo de métodos, la imagen se divide en subimágenes. Supongamos que el tamaño de cada imagen es de  $n \times n$  celdas de resolución, entonces los  $n^2$  pixeles de la subimagen pueden ser vistos como  $n^2$  componentes de un vector  $n^2$ -dimensional. El conjunto de subimágenes constituye entonces un conjunto

---

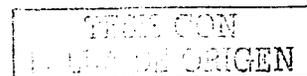
de vectores  $n^2$ -dimensional. Básicamente en la metodología de transformadas, cada uno de estos vectores es re-expresado en un nuevo sistema de coordenadas. El sentido de la transformación es que los vectores básicos del nuevo sistema de coordenadas tengan una interpretación que exprese la frecuencia espacial, la cual está relacionada con la textura. Una de las transformaciones más utilizadas es la transformada de Fourier (PENTLAND A, 1984). Nuevamente es importante mencionar que estos métodos son computacionalmente complejos.

Por último, una de las metodologías básicas en el enfoque estadístico la constituyen los métodos definidos por la co-ocurrencia de los niveles de gris. Básicamente esta metodología toma en cuenta la variación en parámetros ópticos como una función de dirección y caracteriza la relación espacial de los niveles de gris de una textura. Se han definido una serie de medidas que describen a las texturas utilizando las matrices de co-ocurrencias (HARALICK R. *et al.*, 1973), sin embargo, para que esta metodología funcione adecuadamente es necesario considerar la relación de cada pixel en sus cuatro ángulos lo cual la vuelve computacionalmente compleja.

Podemos agregar que, la problemática que se presenta en los algoritmos del enfoque estadístico es la de proporcionar el tamaño óptimo de las subregiones a las cuales se les van a aplicar las estadísticas; estas metodologías son muy sensibles al contraste de las imágenes, es decir, las estadísticas obtenidas en cada región en que fue dividida la imagen dependen directamente del contraste de la región y por lo general son computacionalmente complejas.

### 3.3 Enfoque estructural para el análisis de imágenes

Los modelos estructurales se basan en la idea de que toda textura está constituida por primitivas organizadas espacialmente de manera regular y repetitiva. En este sentido, para



describir una textura es necesario definir las primitivas y las reglas de organización y localización espacial de las mismas (HARALICK R., 1979).

### *3.3.1 Primitivas*

Una primitiva es un conjunto conectado de píxeles caracterizados por una lista de atributos. La primitiva más simple es la conformada por un píxel cuyo atributo es su nivel de gris. Otras primitivas pueden ser aquellas constituidas por regiones cuyos atributos pueden estar relacionados con la forma, como por ejemplo, la elongación o la longitud de la misma o pueden relacionarse con la homogeneidad de algunas propiedades locales tales como la orientación y los niveles de gris.

Algunas primitivas pueden ser generadas o construidas a partir de los datos de la imagen a través de la aplicación de algún operador. Ejemplos de este tipo de primitivas son los máximos y mínimos locales y la  $n$ -conectividad.

### *3.3.2 Relaciones espaciales*

Una vez que las primitivas y sus atributos han sido determinados, se puede obtener información topológica de las primitivas que defina la relación espacial entre las mismas. Esta relación puede ser expresada en términos de adyacencia, distancias cercanas y periodicidad. Prácticamente cada una de estas reglas de relación espacial representan una metodología para determinar la textura de la imagen.

Los métodos más conocidos para el análisis de textura utilizando el enfoque estructural son: "Edge Density" (ROSENFELD A. and THURSTON M. 1971), "Run lengths"

(GALLOWAY M. 1975). "Relative Extrema Density" (ROSENFELD A. *et al*, 1970) y "Relational Trees" (ERICH R. W. and FOITH J, 1976).

En el caso del método "Edge Density", se propone una medida de textura basada en la cantidad de contornos por unidad de área. La primitiva es el pixel y su atributo o propiedad es la magnitud de su gradiente. El gradiente puede ser evaluado por cualquiera de los operadores de vecindad del gradiente. Para una ventana específica centrada en un pixel dado, la distribución de las magnitudes del gradiente pueden ser determinadas. La media de esta distribución es la cantidad de bordes por unidad de área asociada con el pixel dado. Ejemplos de la aplicación de esta medida de textura en problemas reales son (SUTTON R. and HALL E. 1972) la clasificación de enfermedades pulmonares en radiografías del pecho y (OHLANDER R, 1975) la segmentación de escenarios naturales texturizados.

En el método "Run Lengths", las primitivas están conformadas por conjuntos maximales de pixeles colineales con el mismo nivel de gris. Las propiedades de las primitivas pueden ser por ejemplo la longitud de los pixeles colineales, el nivel de gris y la orientación angular. Algunas estadísticas de estas propiedades fueron utilizadas por GALLOWAY M. 1975, como medidas de textura. Las medidas propuestas fueron: (1) "Short-Run Emphasis", (2) "Long Runs Emphasis", (3) "Gray Level Nonuniformity", (4) "Run Length Nonuniformity" y (5) "Run Percentage". Cada una de estas medidas fue evaluada para la clasificación de imágenes de diferentes terrenos. Los resultados de la clasificación fueron de 66% de reconocimiento.

En el caso del método "Relative Extrema Density" (RED), la medida de textura que se propone se basa en el número de máximos y mínimos locales por unidad de área, en una ventana definida, la cual puede corresponder a toda la imagen. Los máximos y mínimos se

calculan en un análisis unidimensional (horizontal) de la siguiente manera: en un perfil de niveles de gris, el pixel  $i$  es un mínimo relativo si su nivel de gris  $g(i)$  satisface:

$$g(i) \leq g(i+1) \quad y \quad g(i) \leq g(i-1) \quad (3.1)$$

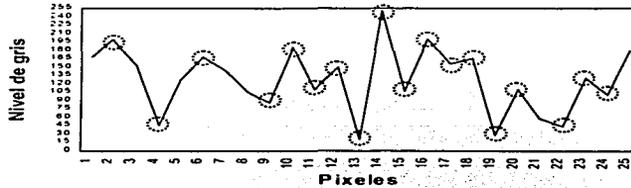
y un pixel  $i$  es un máximo relativo si:

$$g(i) \geq g(i+1) \quad y \quad g(i) \geq g(i-1) \quad (3.2)$$

En el algoritmo definido por ROSENFELD A. *et al.*, 1970, se marcan todos los máximos y mínimos de cada línea de la imagen como se muestra en la Figura 3.1. Se cuenta el número de píxeles marcados que se encuentren en área determinada y se calcula la proporción de extremos por unidad de área. En este caso las primitivas son los píxeles que corresponden a los valores máximos y mínimos.

Un problema importante en el método RED es que no es lo suficientemente sensible para diferenciar entre regiones que tienen algunas planicies largas con muchos extremos y regiones que tienen muchos extremos que no forman parte de una planicie. En la Figura 3.2 se muestra un perfil densitométrico con dos planicies (marcadas con las elipses punteadas). Como podemos observar el número de puntos extremos tanto de la Figura 3.1 como de la Figura 3.2 es igual, sin embargo, las variaciones de niveles de gris son diferentes en ambos perfiles y por tanto su textura debería ser también diferente. Esta diferencia no se refleja en la medida RED, ya que para ambos casos se obtiene el mismo valor de extremos por unidad de área.

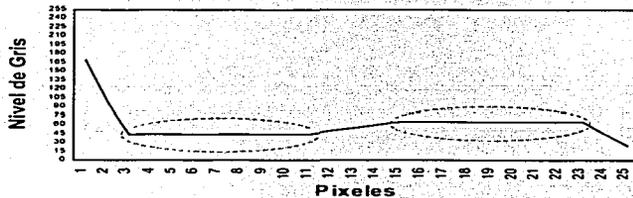
Perfil densitométrico de una línea



Pixel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Nivel de Gris	169	200	152	45	127	168	143	105	86	186	110	150	20	250	107	200	156	163	28	110	59	44	131	100	180

Figura 3.1 Localización de los puntos extremos (máximos y mínimos) de un perfil densitométrico, utilizando el algoritmo RED (ROSENFELD A. *et al*, 1970). Los círculos muestran los puntos extremos y la tabla los niveles de gris de cada pixel del perfil.

Perfil Densitométrico de una línea (planicies)



Pixel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Nivel de Gris	169	100	45	45	45	45	45	45	45	45	50	55	60	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	45	25

Figura 3.2 Puntos extremos (máximos y mínimos) de un perfil densitométrico con planicies. Las elipses muestran las planicies y la tabla los niveles de gris de cada pixel del perfil.

El método "Relational Trees" describe el uso de un árbol binario para la representación de los puntos máximos y mínimos, denominados extremos, de cada línea de la imagen. Para conformar el árbol se hacen particiones recursivas en función del mínimo de los mínimos. Todos los extremos que queden a la derecha de dicho mínimo formarán parte de la rama derecha del árbol y los que queden a la izquierda serán parte de la rama izquierda. De cada rama se vuelve a seleccionar el mínimo de los mínimos y se vuelve a particionar de manera recursiva hasta que ya no sea posible hacerlo. Una forma alternativa de construir el árbol es utilizando los máximos en lugar de los mínimos, para dividir. Las características de textura se pueden obtener en cualquier nivel del árbol. Una de esas características es la denominada contraste de la rama; esta medida es la diferencia entre el máximo de los máximos y el mínimo de los mínimos de una rama determinada. Otra característica puede ser la varianza de las longitudes de las ramas.

Es importante mencionar que aun cuando existe una división de los métodos para análisis de textura en dos enfoques, algunos autores consideran que la división no es muy clara, ya que de alguna manera todos los métodos pueden tener una parte estructural y otra estadística; por ejemplo un método propuesto por DAVIS L. *et al.*, 1978, sugiere utilizar las matrices de co-ocurrencia entre los puntos máximos y mínimos de la imagen. En este sentido el enfoque puede ser estructural en términos de que las primitivas son los puntos extremos y por otra parte es estadístico debido a que la interacción espacial entre las primitivas se mide por probabilidades establecidas a través de la matriz de co-ocurrencia. Siguiendo con este mismo ejemplo, si se considera que las primitivas son los pixeles, entonces podemos concluir que el método de matrices de co-ocurrencia puede ser un método estadístico-estructural (HARALICK R, 1979). HAN-BIN K. y RAE-HONG P., 1992, utilizan una combinación estadístico-estructural para extraer la información de la textura. Los elementos estructurales o primitivas de la imagen se localizan por medio de un análisis de periodicidad en las matrices de co-ocurrencias. Los resultados obtenidos con el

---

método propuestos son del 85.4%, en el reconocimiento de 6 imágenes sintéticas del libro BRODATZ P., 1966.

En los últimos años algunos trabajos para el análisis de textura se han enfocado a estudios comparativos de las medidas de textura clásicas ya existentes en la literatura. Tal es el caso de los trabajos propuestos por REED T. y HANS DU BUF J., 1993 y SMITH G. y BURNS I., 1997. En este último trabajo se propone un '*framework*' para evaluar los algoritmos de clasificación de textura. Otros trabajos se han enfocado a la aplicación de los métodos existentes en problemas específicos. CORNELOUP G. *et al.*, 1996, proponen el uso de las matrices de co-ocurrencias para el análisis de imágenes de ultrasonido. VENKAT K. y RAMAMOORTHY B., 1996 hacen un estudio comparativo de las matrices de co-ocurrencias y el método '*Run length*', para la clasificación de imágenes de superficies. Finalmente otros trabajos se han enfocado al desarrollo de nuevos métodos para el análisis de textura, algunos de ellos basados en metodologías ya definidas. WANG D. *et al.*, 1993, desarrollaron un algoritmo para la segmentación, basado en la aplicación iterativa de operadores morfológicos para la búsqueda de las primitivas de la imagen. La metodología propuesta es evaluada en la segmentación de patrones sintéticos del libro BRODATZ, 1966. STRAND J. y TAXT T., 1994, desarrollaron un método que utiliza los puntos extremos (ROSENFELD A. *et al.*, 1970) de la imagen y la amplitud de las curvas que forman los puntos extremos. GARCIA *et al.*, 1999 hacen la generalización de un modelo 1D booleano para el análisis de texturas en niveles de gris. El algoritmo se basa en el modelo propuesto por SERRA J., 1980. y se aplica para la clasificación de 30 imágenes sintéticas del libro BRODATZ, 1966. Recientemente se han desarrollado trabajos de análisis de textura relacionados con la orientación de los patrones que se encuentran en la textura [KINGDOM F. y KEEBLE D., 2000; PIETIKAINEN M. *et al.*, 2000].

En conclusión, aun cuando en los últimos años se han desarrollado muchos trabajos para el análisis de texturas, el problema es tan complejo que cuando se desarrollan algoritmos específicos a una aplicación concreta, difícilmente pueden generalizarse a otras aplicaciones. A su vez, los algoritmos más generales pueden funcionar adecuadamente en patrones sintéticos, bien controlados, y tener una baja eficiencia al aplicarse en situaciones reales donde intervienen factores tales como el ruido o la distorsión. Por lo anterior, el análisis de texturas sigue siendo un área de investigación abierta.

En el presente trabajo se tomaron en consideración tanto las características de las metafases como los trabajos previos, para definir la metodología a utilizar en la descripción de la textura de las mismas. Es importante resaltar que el enfoque que más se acopla a las características de las metafases es el estructural debido a que sus cromosomas pueden considerarse como las primitivas y la regla de distribución espacial podría ser entre otras la media de las distancias entre los cromosomas.

## **CAPÍTULO 4 La textura como característica representativa de las metafases**

### **4.1 Introducción**

Durante el conteo manual, el experto identifica las metafases principalmente por la textura interna producida por los cromosomas y su distribución. Esta composición nos lleva a pensar en la utilización del enfoque estructural para la identificación de las metafases, ya que la textura podría caracterizarse por primitivas específicas: los cromosomas y su distribución espacial, definida en términos de algunas medidas, como la distancia entre los cromosomas, por mencionar alguna. No obstante, en las imágenes digitales del microscopio óptico, los cromosomas no se encuentran bien definidos, debido a que: 1) la resolución de las imágenes reduce la forma de los cromosomas a puntos borrosos de pocos píxeles, 2) los cromosomas pueden encontrarse traslapados y 3) el ruido que se genera en la adquisición de la imagen. Por lo anterior, el carácter estructural de la textura observada se torna en un problema de indefinición en la medida en que la resolución decrece, ya que la información (forma) de los patrones de los cromosomas como primitivas se vuelve imperceptible.

Sin embargo, si en lugar de considerar a los cromosomas como primitivas, los visualizamos en términos de su intensidad luminosa y de su distribución espacial, podemos observar que las variaciones de niveles de gris entre éstos y el fondo forman huecos que dan la apariencia de una textura rugosa, con crestas y valles (máximos y mínimos) como la que se muestra en

la Figura 4.1a. Esta figura corresponde a la metafase de la Figura 4.1c, donde en el eje  $z$  están representadas las intensidades de gris de cada uno de los píxeles con coordenadas  $(x,y)$  de dicha metafase. Así mismo podemos observar en la Figura 4.1b, la representación tridimensional de la célula en interfase de la Figura 4.1d, en donde debido a la homogeneidad de la textura no se presentan variaciones muy marcadas en los niveles de gris.

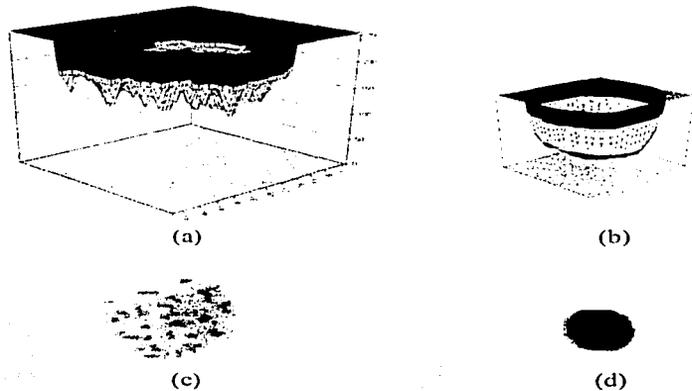


Figura 4.1 Representación de intensidades de gris a) Representación tridimensional de los niveles de gris de la metafase c), b) Representación tridimensional de los niveles de gris de la interfase d), c) Figura bidimensional de una metafase, d) Figura bidimensional de una interfase

De lo anterior podemos decir que en una imagen en niveles de gris de una metafase representada como una superficie, donde la intensidad es vista como la altura, la textura aparece en relieve y los puntos extremos (máximos y mínimos) combinan información

---

tanto de la forma como de la intensidad. Esta interpretación nos lleva a pensar que se pueden obtener medidas de textura como la propuesta por ROSENFELD A. *et al.*, 1970, a través del estudio de las propiedades de los puntos extremos, de tal manera que con dichas propiedades se puedan caracterizar a las metafases e interfases.

En el Capítulo 3 se describe un método simple para la caracterización de textura, propuesto por ROSENFELD A. *et al.*, 1970, que es el número de puntos extremos por unidad de área en un análisis horizontal 1D, denominado "Relative Extrema Density" (RED). Sin embargo, como ya se mencionó, este método tiene un problema importante debido a que no puede diferenciar entre imágenes que tienen algunas planicies largas (nivel de gris constante) con muchos extremos e imágenes con muchos extremos que no forman parte de una planicie. La Figura 4.2 muestra tres imágenes para las cuales el valor de RED es el mismo aun cuando éstas son diferentes. Esto se debe a que en dos de las imágenes existen planicies de muchos píxeles y todos son considerados como puntos extremos.

Para el reconocimiento de las interfases y metafases, se requiere una medida que sea sensible no solamente a la cantidad de puntos extremos, sino a las diferencias tanto de la distribución espacial de los puntos extremos, como de la intensidad de niveles de gris de los mismos. Por lo tanto, en este trabajo se proponen dos medidas de textura basadas en algunas características de los puntos extremos. En los párrafos siguientes se hará la descripción de las medidas propuestas. En primer lugar hablaremos de una medida de textura (rugosidad) que se obtuvo a través del estudio de la relación que existe entre el ancho y alto de las crestas y valles que se forman entre los puntos extremos. En segundo lugar describiremos una medida de textura basada en la relación espacial y de niveles de gris entre los puntos extremos que representan a los cromosomas, y a la textura que se genera entre ellos.

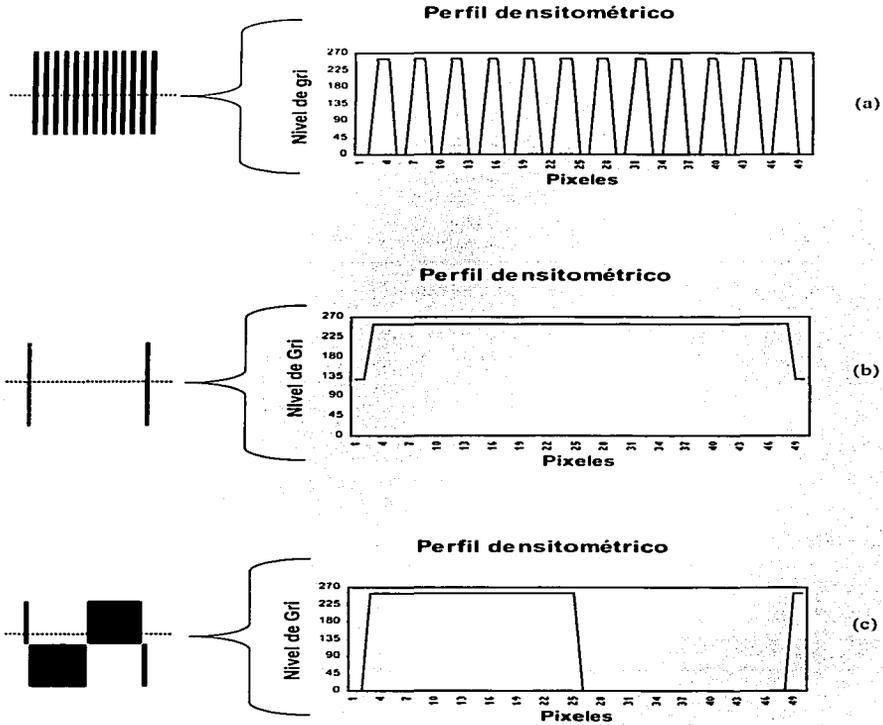


Figura 4.2 Perfiles densitométricos de las líneas punteadas de tres texturas diferentes: (a) planicies de pocos píxeles y mucho contraste; (b) planicie de muchos píxeles y poco contraste; (c) planicies de muchos píxeles

---

#### 4.2 Característica de textura basada en la relación altura y ancho de los puntos extremos de la imagen.

Los cromosomas en las metafases pueden verse en baja resolución como puntos extremos en perfiles densitométricos. A dichos extremos se les pueden asociar varias propiedades, dentro de las cuales podemos considerar: 1) la altura y 2) el ancho. La altura de un máximo puede verse como el promedio de las diferencias entre el valor de nivel de gris del máximo y el valor de nivel de gris de los mínimos adyacentes (a la izquierda y derecha del punto máximo en cuestión). Asimismo, la altura de un mínimo puede considerarse como el promedio de las diferencias entre el nivel de gris del mínimo y los niveles de gris de los máximos adyacentes. Por otra parte el ancho de un máximo puede considerarse como la distancia, en pixeles, entre sus dos mínimos adyacentes y de la misma manera, el ancho de un mínimo es la distancia entre sus dos máximos adyacentes. Haciendo el análisis de un perfil densitométrico en cualquier dirección en relación con los extremos en una metafase, se observó que el ancho de los mínimos representa la separación entre los cromosomas y la altura de los mínimos representa la diferencia de niveles de gris entre los cromosomas y el fondo de la imagen. En este sentido, es importante resaltar que en términos generales la separación entre cromosomas en las metafases sigue un cierto patrón de distancia y distribución, y tienen un contraste característico con relación al fondo. Por lo tanto es posible diseñar una medida de rugosidad a través del valor promedio de la relación que existe entre el ancho y alto de los mínimos (poros). A continuación se hace la formalización de la medida propuesta para caracterizar la textura a través de la rugosidad.

La medida de rugosidad de una imagen se calcula a través del análisis unidimensional de los perfiles densitométricos contenidos en un contorno cerrado de un objeto biológico segmentado (ver Figura 4.3). El proceso se hace en cualquier sentido, en este caso horizontal, por simplicidad en los cálculos. El algoritmo detecta primero los puntos

extremos en el perfil densitométrico (puntos  $m$  y  $n$ ); es importante mencionar que en el caso de las planicies sólo se considera un extremo, correspondiente al punto medio de la misma. Definiremos el tamaño de un poro como la suma de las proyecciones horizontales de los vectores  $A$  y  $B$  (Figura 4.3). Así, un poro será considerado como tal si y sólo si satisface las siguientes condiciones: a) el cociente de las proyecciones verticales de  $A$  y  $B$  es mayor o igual a 60%, valor aproximado donde el ojo humano distingue un poro, y b) la profundidad del poro, definida como el promedio de las proyecciones verticales de  $A$  y  $B$ , es mayor que un umbral  $\eta$  predeterminado. La medida de rugosidad de una figura biológica es definida como la suma de los cocientes de la distancia entre la profundidad de cada uno de los poros contenidos en todo el contorno de la figura biológica normalizada con relación al número de poros detectados.

Definamos la medida "Mean Depth-Width Ratio of Extrema" (MDWRE) [CORKIDI G. *et al.*, 1998] como:

$$MDWRE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f_i pdw_i \quad (4.1)$$

donde:

$$f_i = \begin{cases} 1 & \text{si } \frac{\min\{V_{provA}, V_{provB}\}}{\max\{V_{provA}, V_{provB}\}} > 0.6 \quad \text{y} \quad \frac{V_{provA} + V_{provB}}{2} > \eta \\ 0 & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (4.2)$$

$$pdw_i = \frac{V_{provA} + V_{provB}}{2(l_{provA} + l_{provB})} \quad (4.3)$$

$N$  es el número total de poros del objeto,  $H_{proy}$  y  $V_{proy}$  son las proyecciones horizontales y verticales de  $A$  y  $B$ , respectivamente y  $\eta$  es un umbral predeterminado.

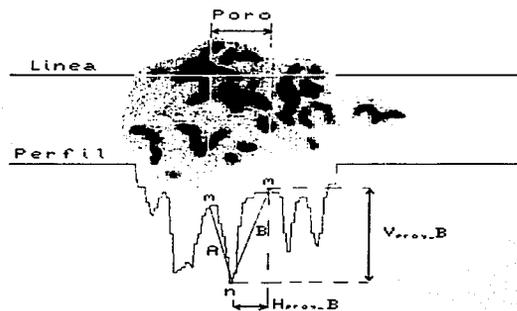


Figura 4.3. Descripción geométrica de la característica MDWRE

La Figura 4.4 muestra los poros (puntos blancos en caso del objeto etiquetado con  $N$  y puntos negros en los otros objetos) detectados, en un análisis horizontal, en una metafase, una interfase y un artefacto. (En el Apéndice A.3 se encuentra el pseudocódigo para el cálculo de la medida MDWRE).



Figura 4.4. Poros detectados en una metafase (M), interfase (I) y en un artefacto (A).

---

### 4.3 Característica de textura basada en la información de intensidad y relación espacial entre puntos extremos de las metafases.

Así como en MDWRE se utilizaron las propiedades de altura y ancho de los extremos, se pueden utilizar diferentes propiedades de los mismos para generar otras medidas de textura que tomen en cuenta información importante del patrón de comportamiento de las metafases que no haya sido considerada, de tal forma que todas las medidas sean complementarias permitiendo un mejor reconocimiento de las metafases. En este sentido se desarrolló una medida de textura que se caracteriza tanto por la distribución espacial de los extremos como por los perfiles de intensidad que hay entre ellos en una determinada vecindad. Como los extremos simbolizan a los cromosomas, en términos generales lo que se busca es una medida de textura representada por la rugosidad local, a través del análisis de la distribución de las variaciones de intensidad entre los cromosomas.

Para el análisis de la distribución de las variaciones de intensidad entre los cromosomas se puede utilizar algún filtro estadístico de rango. En términos generales, en un perfil o una región de una imagen que contiene una muestra de  $N$  valores de niveles de gris, éstos pueden ser clasificados para obtener una estadística de orden  $n$ , con  $n=1, \dots, N$ , que permita tener una caracterización de textura. Además de la medida tradicional de "RMS-roughness", otros filtros estadísticos de rango como la mediana o la media ordenada pueden ser utilizados como descriptores de textura (HARALICK *et al.*, 1992). De manera particular, el *filtro de mediana* es la estadística de orden  $N/2$ , si  $N$  es par y el promedio de los valores de  $(N-1)/2$  y  $(N+1)/2$  si  $N$  es impar, y constituye un estimador robusto ya que a diferencia de la media, en éste se eliminan los picos que puedan presentarse en la distribución. Tomando en consideración los conceptos anteriores se decidió utilizar un filtro de mediana para evaluar la distribución de las variaciones de intensidad entre los cromosomas. En este sentido la distribución de los rangos (histograma) se definió en

términos de las diferencias más grandes de los niveles de gris de cada perfil de una vecindad determinada, donde dicha diferencia se obtiene por medio de la sustracción del valor máximo menos el mínimo del perfil (Figura 4.5), y la vecindad es de un tamaño representativo en relación con la separación promedio entre cromosomas. Finalmente, la mediana puede ser evaluada una vez que todas las diferencias de los perfiles han sido clasificadas en el histograma (estadística de orden  $N$ ), siendo ésta ya como tal la medida de textura. Formalizaremos en términos matemáticos la descripción anterior en los siguientes párrafos.

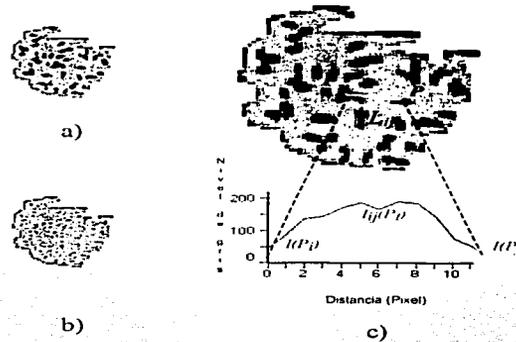


Figura 4.5. Análisis de perfiles inter-cromosomas: (a) metafase; (b) puntos extremos detectados en un análisis vertical y horizontal de la imagen (a); (c) gráfica del perfil densitométrico entre los puntos  $P_i$  y  $P_j$ .

Sea  $\rho$  el conjunto de  $N$  puntos  $P_i(x_i, y_i)$ , con  $i=1, \dots, N$ , cuyas coordenadas enteras,  $x_i, y_i$ , se encuentran dentro de un contorno cerrado. Dichos puntos  $P_i$  corresponden a las coordenadas de los extremos, obtenidos en dirección horizontal y vertical, de una imagen de intensidades  $I(x, y)$ , como se muestra en la Figura 4.5b.

Sea  $L_{ij} = \{P_t | P_t = (1-t)P_i + tP_j, t \in [0,1]\}$  el perfil densitométrico entre dos puntos extremos  $P_i$  y  $P_j$ . Y sea  $I_{ij}(P_t)$  el nivel de gris para cada  $P_t \in L_{ij}$ . Entonces

$$I_{ij}(P_t) = \begin{cases} I(P_i) & \text{si } t = 0 \\ I(P_j) & \text{si } t = 1 \end{cases} \quad (4.4)$$

son las intensidades en los puntos extremos de  $L_{ij}$ . Nótese que en un espacio discreto,  $I(x_n, y_n)$  puede no estar definido para cualquier  $t$ . En este caso, el valor es estimado a través de una interpolación bilineal, utilizando el vecino más cercano, esto es:  $t_u < t < t_{u+1}$ .

Sea

$$dif_{ij} = \max_{P_t \in L_{ij}} I_{ij}(P_t) - \min_{P_t \in L_{ij}} I_{ij}(P_t) \quad (4.5)$$

el rango del perfil de intensidades definido por la recta  $L_{ij}(t)$ , donde  $t \in [0,1]$ . Las coordenadas del punto inicial  $P_i$  y del punto final  $P_j$  del perfil se encuentran dentro de una vecindad, donde:  $|x_i - x_j| \leq \eta$  y  $|y_i - y_j| \leq \eta$ . En nuestro caso se determinó que  $\eta = 5$ . Dado que las intensidades de los cromosomas varían de manera aleatoria, sus puntos extremos e intensidades son variables aleatorias, al igual que sus diferencias.

Sea  $H(dif_{ij})$  el histograma de todos los rangos definidos por la ecuación (4.5) sobre el conjunto  $\varphi$ , con rangos de niveles de gris en el intervalo  $[0,255]$ . Sea  $\bar{H}$  la mediana del histograma  $H$ , entonces se define a la medida Inter Extrema Profile Range (IEPR) [VEGA-ALVARADO L. *et al.*, 2002] como:

$$IEPR = \frac{\bar{H}}{(I_{\max} - \min_{t,j} \{\min_{P_t \in L_{ij}} I_{ij}(P_t)\})}, \quad (4.6)$$

donde  $I_{max}$  es el máximo nivel de gris de saturación de la imagen y  $t \in [0,1]$ . Así,  $IEPR$  es una característica de textura que representa la rugosidad local, a través de los perfiles de intensidad entre extremos. La normalización nos permite hacer, de manera apropiada, comparaciones bajo diferentes condiciones de contraste. Es importante mencionar que el denominador  $I_{max} - \min\{\min_{i,j} I_{ij}(P_t)\}$  nunca es cero, dado que el perfil incluye siempre un extremo (En el Apéndice A.3 se encuentra el pseudocódigo para el cálculo de la medida  $IEPR$ ).

#### 4.4 Evaluación de las características propuestas y comparación con otras características de textura

En esta sección se presentan los resultados de la clasificación de metafases, interfases y artefactos utilizando MDWRE e  $IEPR$  como característica única en comparación con algunas características de textura clásicas reportadas en la literatura (medidas derivadas de las matrices de co-ocurrencia: contraste, energía, entropía y segundos momentos angulares, así como '*Relative Extrema Density*' ( $RED$ )). Con dichos resultados se realizó un estudio comparativo, en términos del porcentaje de metafases, interfases y artefactos bien clasificados por cada una de las medidas de textura evaluadas.

Para realizar el estudio comparativo se generaron tres conjuntos de objetos (metafases, interfases y artefactos) los cuales se obtuvieron por medio del análisis de 30 laminillas correspondientes a varios experimentos realizados por el experto. El proceso de toma de la muestra y fijación de la misma en la laminilla se llevó a cabo con la metodología definida en el Capítulo 1.

El análisis de cada laminilla se llevó a cabo de manera interactiva entre el usuario y el sistema, lo cual permitió que tanto el recorrido de las laminillas, como la adquisición y segmentación de las imágenes se hicieran automáticamente, dejando únicamente al usuario la tarea de seleccionar y clasificar las metafases e interfases de cada una de las imágenes adquiridas, para conformar los conjuntos de prueba de las mismas.

El proceso de adquisición y segmentación de las imágenes se llevó a cabo como se describe en el Capítulo 2. Una vez segmentada la imagen se aplicó, en una primera etapa, un filtro basado en el área de los objetos para eliminar un promedio de 58% de artefactos de cada imagen. Todos los objetos con un área fuera del rango  $[\hat{\mu}_{AI} - 3\hat{\sigma}_{AI}, \hat{\mu}_{AM} + 3\hat{\sigma}_{AM}]$  fueron eliminados.  $AI$  y  $AM$  representan el área de las interfases y las metafases respectivamente. De los objetos restantes el experto clasificó, en un proceso interactivo con la computadora, aquellos objetos que eran metafases, etiquetándolos con una marca específica y de la misma manera clasificó a aquellos objetos que fueran interfases. Todos los objetos segmentados que no fueron clasificados por el experto en metafases o interfases, automáticamente fueron considerados como artefactos. Así, al final del análisis de todas las laminillas se obtuvo un conjunto muestra de interfases (Figura 4.6a), un conjunto muestra de metafases (Figura 4.6b) y un conjunto muestra de artefactos (Figura 4.6c.). En total se obtuvieron 909 patrones repartidos en tres conjuntos de prueba (331 interfases, 191 metafases y 387 artefactos).

La evaluación de la caracterización de textura de cada una de las medidas comparadas (MDWRE, IEPR, contraste, energía, entropía, segundos momentos angulares y  $RED$ ), se realizó por medio de la siguiente fórmula:

$$desempe\tilde{n}o = \frac{VP_{tot} - FP}{Tot\_Objetos} \quad (4.7)$$

donde  $VP_{tm}$  representa el número de objetos caracterizados correctamente en cada tipo de textura (interfases + metafases + artefactos), denominados verdaderos positivos ( $VP$ ).  $FP$  representa el número de objetos mal caracterizados en relación con todas las clases, denominados falsos positivos. El valor del *desempeño* está definido en el intervalo  $[-1,1]$  y representa la relación de los objetos bien reconocidos con respecto a los mal reconocidos.

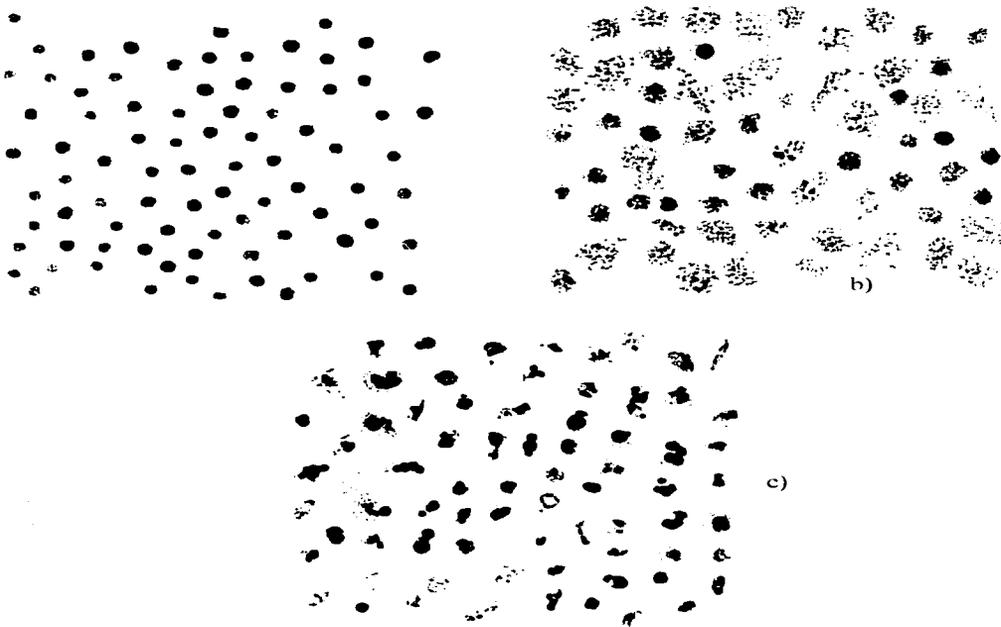


Figura 4.6. Conjuntos de prueba: (a) interfases; (b) metafases; (c) artefactos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Si todos los objetos son reconocidos correctamente, es decir, en la clase que les corresponde entonces, los falsos positivos serán cero, el número de verdaderos positivos será el total de objetos y por lo tanto el *desempeño* será 1. Por otra parte, si ninguno de los objetos es reconocido correctamente entonces, el número de falsos positivos será el total de objetos, el valor de los verdaderos positivos totales será cero y por tanto el *desempeño* será -1. El *desempeño* normalizado a un intervalo [0,1] se define como:

$$DN = \frac{1 + \text{desempeño}}{2} \quad (4.8)$$

La Tabla 4.1 muestra el porcentaje de *VP* y *FP* por clase, el *desempeño* y el *DN*, para cada uno de los métodos evaluados.

Tabla 4.1. Comparación del porcentaje de desempeño de MDWRE e IERP, con relación a algunas medidas clásicas de textura. *VP* son los Verdaderos Positivos, *FP* los Falsos Negativos totales y *DN* el desempeño normalizado

	% VP Interfases	% VP Metafases	% VP Artefactos	% FP	<i>Desempeño</i>	<i>DN</i>
MDWRE	87%	84%	77%	17%	0.65	0.83
IEPR	62%	96%	89%	19%	0.62	0.81
Contraste	92%	96%	49%	22%	0.56	0.78
RED	73%	74%	52%	34%	0.32	0.66
Energía	93%	32%	53%	39%	0.23	0.62
Momentos	82%	33%	0%	61%	-0.21	0.40
Entropía	86%	18%	6%	61%	-0.23	0.39

El criterio para establecer si un objeto fue correctamente clasificado o no por una determinada característica, se definió de la siguiente manera: (1) se obtuvieron las

distribuciones de probabilidades de los valores (MDWRE, IEPR y las otras medidas de textura) obtenidos para los objetos cada una de las clases (metafases, interfases y artefactos) y (2) se calculó la media y la desviación estándar de las distribuciones; si el objeto a caracterizar se encontraba dentro del intervalo de confianza de la distribución de una clase determinada [ $\mu \pm 2\sigma$ ], entonces significaba que ese objeto era clasificado por la textura correspondiente a dicha clase.

Como se puede observar en la Tabla 4.1, tanto MDWRE como IEPR tuvieron un mejor desempeño en comparación con las medidas de contraste, RED, energía, entropía y momentos angulares. Es importante mencionar que aun cuando la medida de Contraste reconoció mejor a las metafases en comparación con MDWRE, el porcentaje de verdaderos positivos en artefactos fue muy bajo provocando que la mayoría de los artefactos no reconocidos como tal se clasificaran como metafases (41%), como se muestra en la Tabla 4.2. Por otra parte, si bien el reconocimiento de las interfases por IEPR fue bajo (62%), el de las metafases fue muy alto y todas las interfases que no fueron reconocidas como tal se clasificaron como artefactos y no como metafases. Este problema no es tan relevante debido a que las interfases mal clasificadas se pueden recuperar aplicando un filtro de forma a los artefactos, para extraer los objetos de forma circular.

Tabla 4.2 Matriz de confusiones para los métodos Contraste, MDWRE e IEPR. Los valores resaltados indican el porcentaje de artefactos que se clasifican como metafases (Falsos Positivos).

	Contraste			MDWRE			IEPR		
	Metafas	Interfas	Artefact	Metafas	Interfas	Artefact	Metafas	Interfas	Artefact
Metafas	96%	0%	4%	84%	0%	16%	96%	0%	4%
Interfas	0%	92%	8%	7%	87%	6%	0%	62%	38%
Artefact	41%	10%	49%	23%	1%	77%	6%	5%	89%

#### 4.6 Invariantes a rotación, traslación y escala para IEPR y MDWRE

Un punto importante dentro del proceso de clasificación de objetos en imágenes, es el poder reconocerlos independientemente de su posición, orientación y tamaño. Así, un objeto descrito en términos de  $n$  características debe de ser reconocido siempre en la misma categoría sin considerar cómo aparece (Figura 4.7).



Figura 4.7. Invarianza de la medida IEPR: (a) rotaciones; (b) escalamiento

El hecho de que un objeto sea clasificado de manera adecuada, independientemente de su rotación, traslación o escalamiento, está altamente relacionado con la invarianza de las características que lo describen y con las cuales se lleva a cabo el proceso de clasificación. Si las características que describen a los objetos son invariantes a rotaciones, traslaciones y escalamiento, la clasificación también lo será. Existen varias técnicas que se pueden utilizar para hacer que una clasificación se vuelva invariante a traslaciones, rotaciones y escalamiento aun cuando las características que describen a los objetos no lo sean. Dentro de las técnicas más importantes que se manejan en el estudio de invariantes están las basadas en momentos centrales y las basadas en las transformadas integrales (WOOD, 1996; KHOTANZAND *et al.*, 1990). En el caso de la invarianza a rotaciones, algunas técnicas colocan de manera inicial a los objetos en una posición referencial (por ejemplo buscando los ejes principales) y partiendo de esa orientación se obtienen los valores de las

---

características que describen a los mismos, asegurando con esto que las características siempre serán evaluadas en la misma posición del objeto.

En el caso de IEPR y MDWRE es importante mencionar que en términos generales no son invariantes a rotaciones, pero sí a traslaciones y a escalamiento, sin embargo, para las metafases, la naturaleza de las mismas (texturas isotrópicas, donde los cromosomas siguen un cierto patrón de distribución) hace que estas características en promedio, puedan tener una variación a las rotaciones poco significativa.

Para evaluar el grado de invarianza a rotaciones de MDWRE y de IEPR como características de textura para la clasificación de metafases, se llevaron a cabo diferentes experimentos haciendo rotaciones en imágenes de metafases y artefactos y evaluando en cada rotación el valor de IEPR, para demostrar que su variabilidad no era significativa. Las pruebas realizadas se aplicaron sobre IEPR, ya que los puntos extremos de MDWRE se evalúan de manera similar a los de IEPR, por lo tanto si demostramos que la variabilidad a rotaciones de IEPR es no significativa, entonces tampoco lo será para MDWRE.

Para realizar las pruebas se utilizó un conjunto muestra de 64 metafases y 73 artefactos. Para cada uno de los objetos, tanto del conjunto de metafases como del conjunto de artefactos, se calculó el valor de IEPR en 14 orientaciones diferentes ( $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $135^\circ$ ,  $150^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $210^\circ$ ,  $225^\circ$ ,  $240^\circ$ ,  $270^\circ$ ,  $300^\circ$ ). En la Figura 4.8 se muestra la variabilidad IEPR con relación a los objetos clasificados correctamente (verdaderos positivos) en (a) metafases y (b) artefactos, para cada una de las rotaciones propuestas.

En el mejor de los casos se tendrá 96% y 89% de verdaderos positivos en metafases y artefactos respectivamente. En el peor de los casos se tendrá un 87% y 78% de verdaderos positivos en metafases y artefactos respectivamente. Haciendo un análisis de los resultados

podemos observar que en promedio se tendrá un 92.5% y 82.5% de verdaderos positivos, considerando que es equiprobable que una metafase o un artefacto caiga en cualquiera de las rotaciones.

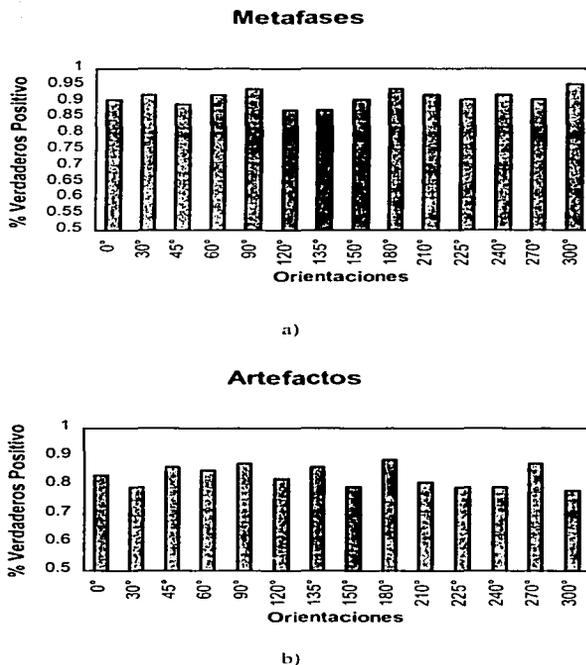


Figura 4.8. Variabilidad de IEPR con relación al porcentaje de Verdaderos Positivos en: (a) metafases y b) artefactos, en las 14 rotaciones propuestas.

Como una evaluación de la variación en el desempeño de IEPR en las 14 rotaciones, se realizó también un análisis en términos de los verdaderos positivos y los falsos positivos tanto de metafases como de artefactos en cada una de las rotaciones. La evaluación del desempeño de IEPR se realizó como en VEGA-ALVARADO *et al.* (2002) y los resultados se muestran en la Figura 4.9.

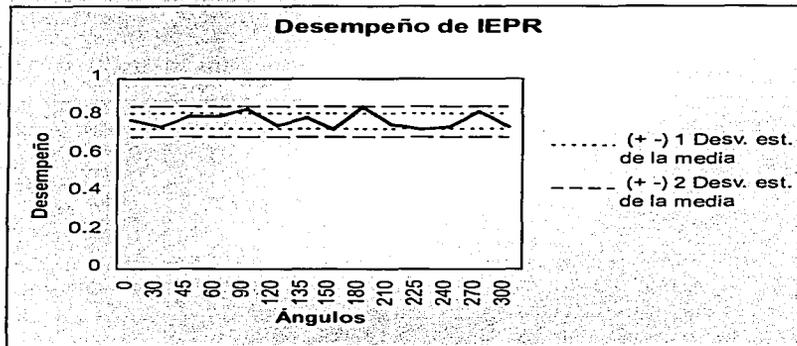


Figura 4.9. Variabilidad del desempeño de IEPR para las 14 rotaciones

Como podemos observar en la gráfica, la variación con relación al desempeño promedio es poca, ya que en la mayoría de las rotaciones (75% de ellas) el desempeño de IEPR se mantiene en  $[\bar{\mu}_{DIEPR} - \sigma_{DIEPR}, \bar{\mu}_{DIEPR} + \sigma_{DIEPR}]$ , donde  $DIEPR$  es el desempeño de IEPR. En las rotaciones que exceden una desviación estándar el desempeño es mejor que el caso promedio.

En términos de porcentaje, si consideramos a la rotación con el mejor desempeño (180°) como el 100% de reconocimiento, podemos decir que en el peor de los casos el desempeño

de IEPR se verá alterado en un 14%, como se muestra en la Tabla 4.3. Por lo tanto, considerando que es equiprobable que una metafase caiga en cualquiera de las rotaciones podemos decir que en promedio el desempeño de las medidas será de un 93%.

Tabla 4.3. Desempeño de IEPR en 14 orientaciones, considerando el mejor desempeño como el 100%

Rotación	180	90	270	45	60	135	0	210	120	30	240	300	150	225
% desempeño	1	0.98	0.96	0.94	0.94	0.93	0.92	0.89	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86

Con relación al escalamiento, IEPR es invariante a cambios de escala, debido a que no importando qué tamaño tengan los objetos, en ellos se mide la mediana de las diferencias entre el máximo y mínimo de los niveles de gris entre los puntos extremos en una vecindad definida. El tamaño de la vecindad se asigna con relación al objetivo con el que se observan la laminilla, de tal forma que no exista variación entre un objeto visto con un objetivo 10x de aumento y el mismo objeto visto con un objetivo de 40x de aumento.

En el caso de MDWRE, aun cuando esta característica representa el promedio de la relación de ancho y profundidad de cada poro contenido en el objeto, también es invariante a escalamiento ya que está normalizada con respecto al área de los objetos.

Con relación a la invarianza a traslaciones, tanto IEPR como MDWRE son invariantes a traslaciones debido a que no se toma en consideración el lugar donde se encuentre el objeto, sino la relación que tienen sus componentes. Si un mismo objeto es trasladado a otra posición, mientras no cambie la relación espacial de sus componentes internos, no cambiará la evaluación de las características.

## CAPÍTULO 5 Clasificación de interfases y metafases para el cálculo del IM

### 5.1 Introducción

Una etapa importante para la evaluación del cálculo de Índice Mitótico es el proceso de clasificación de las metafases e interfases y la discriminación de los artefactos. Una vez que se han seleccionado las características que describen a estos objetos, se debe buscar un método de clasificación que permita la discriminación entre las clases (metafases, interfases y artefactos). En la medida en que las características que se seleccionen sean más representativas de los objetos y en que se seleccione un buen método de clasificación que se acople a las propiedades del problema a resolver, se tendrá una mejor clasificación.

Algunos trabajos relacionados con la búsqueda de metafases han reportado el uso de clasificadores para el reconocimiento de las mismas. La mayoría de estos trabajos (GRAHAM J. y TAYLOR C., 1980; SHIPPEY G., *et al.*, 1986; HUBER R., *et al.*, 1995; ODAWARA K., *et al.*, 1997) utilizan un clasificador simple cuya regla de clasificación se describe a continuación:

Dado el objeto  $O = (x_1(O), \dots, x_n(O))$  descrito en términos de las  $n$  características, éste se clasificará como metafase si y sólo si :

$$\sum_{k=1}^n x_k(O) \geq \varepsilon \quad (5.1)$$

donde  $\varepsilon$  es un umbral definido por el experto.

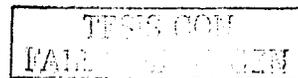
GRAHAM J. y PYCOCK D., 1987; VROLIJK J., *et al.*, 1994; MASCIOL. *et al.*, 1998, modifican la regla de clasificación definida en la ec. (5.1), haciendo una ponderación en las variables, como se muestra en la ecuación (5.2).

$$\sum_{k=1}^n x_k(O) \delta_k \geq \epsilon \quad (5.2)$$

donde  $\delta_k$ ,  $k = 1, \dots, n$  son las relevancias de las características que describen a los objetos y  $\epsilon$  es un umbral definido por el experto.

SCHOËVAËRT-BROSSAULT *et al.*, 1983; PIPER J. *et al.*, 1994; ROY L. *et al.* 2001, utilizan la igualdad estricta como regla de clasificación, es decir, un objeto  $O$  será clasificado como metafase si y sólo si todos los valores de sus variables están dentro de los rangos definidos por el experto para cada una de ellas. HUBER R. *et al.*, 1995, reporta el uso de un clasificador estadístico, pero no especifica cual.

En todos los trabajos antes mencionados existen dos puntos importantes a resaltar: (1) sólo se tienen que clasificar metafases y (2) las variables que se consideran para la clasificación de las metafases están altamente relacionadas con características que se extraen de los cromosomas, algunas de ellas son: area promedio, perímetro promedio, densidad de gris promedio, dispersión, forma y cantidad. Esto se debe a que la magnificación con la que se llevó a cabo el análisis en el microscopio fue utilizando al menos un objetivo de 25x de aumento, lo cual permite tener una mejor resolución en las imágenes. En consecuencia, estos métodos no pueden ser utilizados para el reconocimiento de metafases e interfases para la evaluación del cálculo del índice mitótico. Sin embargo, ARÁMBULA F. *et al.*, 2001, reportan el uso de redes neuronales para la clasificación de metafases e interfases utilizando en sus vectores de características a la medida de textura MDWRE y la desviación estándar de la misma. En este capítulo se hace un análisis de los resultados de clasificación obtenidos con dichas redes, se propone una medida de desempeño para la evaluación de



éstas, se evalúa cómo afectan los errores de clasificación al cálculo del índice mitótico cuando se tiene una muestra con las proporciones reales de interfases y metafases y se hace un estudio comparativo del desempeño de la mejor red con algunos buscadores automáticos de metafases reportados en la literatura.

## 5.2 Clasificación de interfases y metafases

En ARÁMBULA F. *et al.*, 2001, se proponen 17 redes con diferentes estructuras, para la clasificación de metafases e interfases. Tanto para el entrenamiento como para las pruebas de clasificación se empleó el conjunto muestra de 909 patrones (331 interfases, 191 metafases y 387 artefactos) definido en el Capítulo 4. El conjunto de datos de entrenamiento consistió de 135 interfases, 80 metafases y 150 artefactos, tomados de manera aleatoria del conjunto muestra. El conjunto de prueba para la clasificación se conformó con los patrones restantes en el conjunto muestra (196 interfases, 111 metafases y 237 artefactos). En todas las redes se utilizó en el vector de características la medidad de textura MDWRE, definida en el Capítulo 4.

### 5.2.1 Análisis del rendimiento de las redes

Para seleccionar la red con mejor rendimiento, se tomaron en cuenta los diferentes errores de clasificación, enfatizando aquéllos que resultaban más costosos. Todas las posibilidades de error se representaron en una matriz de confusiones (CASTLEMAN and WHITE, 1995). Dado que tenemos tres clases definidas, se tiene una matriz de confusión  $C$  de  $3 \times 3$  para cada red. En la matriz de confusiones la diagonal corresponde a los objetos bien clasificados, mientras que los elementos restantes de la matriz corresponden a los diferentes errores de clasificación (Figura 5.1a), así por ejemplo, en el primer renglón de la matriz tendremos el porcentaje de metafases clasificadas correctamente como metafase ( $M$  como



$M$ )%, el porcentaje de metafases clasificadas erróneamente como interfases ( $M$  como  $I$ )% y el porcentaje de metafases clasificadas erróneamente como artefactos ( $M$  como  $A$ )%. Por otra parte, se consideran también los porcentajes de objetos no clasificados por cada clase ( $NC$ ), es decir, aquellos objetos que la red no pudo clasificar en ninguna de las tres clases definidas (Figura 5.1b).

	$K_M$	$K_I$	$K_A$		$K_M$	$K_I$	$K_A$
				No clasificados			
$C =$	$K_M$	$(M \text{ como } M)\%$	$(M \text{ como } I)\%$	$(M \text{ como } A)\%$	$NC =$	$K_M$	$M\%$
	$K_I$	$(I \text{ como } M)\%$	$(I \text{ como } I)\%$	$(I \text{ como } A)\%$		$K_I$	$I\%$
	$K_A$	$(A \text{ como } M)\%$	$(A \text{ como } I)\%$	$(A \text{ como } A)\%$		$K_A$	$A\%$
		a)					b)

Figura 5.1. (a) Matriz de confusiones  $C_{ij}$ ; (b) Vector  $NC$  de porcentajes de objetos no clasificados

Se definió una medida objetiva  $RRN$  (*ad hoc*) del rendimiento de cada una de las redes que tomara en cuenta tanto la matriz de confusiones  $C$  como el vector de objetos no clasificados  $NC$  (ec. 5.3). Se consideró la diferencia de los objetos bien clasificados (verdaderos positivos) menos la suma de los objetos mal clasificados (falsos negativos) y los objetos no clasificados (falsos positivos), todo esto multiplicado por un peso (costo de error).

$$RRN = \sum_{\forall i \in \{M, I, A\}} \left[ \frac{\gamma_i}{|K_i|} \left( C_{ii} - \sum_{\substack{\forall j \neq i \\ j \in \{M, I, A\}}} [C_{ij} + C_{ji}] - NC_i \right) \right] \quad (5.3)$$

donde  $\gamma_i$  es el peso (costo de error) de la clase  $K_i$ ,  $|K_i|$  es el cardinal de la clase  $K_i$ , es decir, el número de objetos asignados a cada clase (interfases, metafases, artefactos),  $C_{ij}$  es la matriz de confusiones y  $NC_i$  es el porcentaje de objetos no clasificados en cada clase.



La mejor red será aquella que maximice el valor de *RRN*. Una red perfecta evaluada en términos de la ecuación 5.3 tendría un valor de 1 (100% de eficiencia), mientras que una red totalmente imperfecta tendría un rendimiento de -1 (0% de eficiencia).

Típicamente, el valor del IM está entre el 2% y 5% de los 2000 objetos contados (metafases + interfases), así los pesos  $\gamma_i$  se asignaron considerando un valor promedio de 3.5 para el IM. Los pesos asignados fueron los siguientes:  $\gamma_M=0.965$ ,  $\gamma_I=0.035$  y  $\gamma_A=0.0$ . Se asignó el valor de cero al peso de los artefactos (*A*) debido a que éstos no están involucrados en la evaluación de IM; esta clase fue creada únicamente para una mejor identificación de las dos clases relevantes: interfases (*I*) y metafases (*M*). En otras palabras, no es importante saber si los artefactos no fueron clasificados o fueron bien clasificados, sin embargo, sí es importante considerar si éstos son asignados a otra clase, en cuyo caso se toma en cuenta por medio de  $\gamma_M$  y  $\gamma_I$ .

Para las 17 redes se calculó el rendimiento *RRN* y se seleccionaron aquellas con los mejores rendimientos. Dichas redes se consideraron para el análisis del impacto de los errores de clasificación en el cálculo del IM. La tabla 5.1 muestra las matrices de confusiones para las dos mejores redes.

Tabla 5.1 Matriz de confusiones y vector de objetos no clasificados de las redes con mejor rendimiento

Entrada/ Salida	M		I		A		No clasificados	
	10-9-3	10-15-3	10-9-3	10-15-3	10-9-3	10-15-3	10-9-3	10-15-3
M	0.918	0.918	0	0	0.054	0.027	0.027	0.054
I	0	0	0.918	0.939	0.046	0.030	0.036	0.031
A	0.029	0.029	0.025	0.034	0.894	0.848	0.051	0.088



### 5.3 Evaluación del impacto de los errores de clasificación en el cálculo del índice mítótico

En esta sección se presenta el análisis de cómo pueden afectar los errores de clasificación al cálculo del IM cuando se tiene una muestra con las proporciones reales de interfases y metafases. Si se cuentan 2000 objetos (metafases + interfases) para cálculo del IM, se obtiene una proporción de 6 artefactos por interfase. Esto significa que para un valor típico del IM (por ejemplo  $IM=3.5\%$ ) se esperaría obtener alrededor de 11600 artefactos. Como se mencionó en la Sección 4.1, el 58% de los artefactos se eliminan por medio de un filtro de área, así el valor esperado de artefactos para un IM entre 2% y 5% es en promedio 4900 artefactos. La Tabla 5.2 muestra el número esperado de metafases, interfase y artefactos para un  $IM=3.5\%$ , considerando sólo las dos redes que tuvieron el mejor rendimiento.

La principal dificultad para la automatización del IM está relacionada con la baja probabilidad de encontrar metafases en relación con la alta probabilidad de encontrar artefactos (0.98% y 71%, respectivamente, para un  $IM=3.5\%$ ). Esta situación tiene un impacto determinante en los falsos positivos de las metafases y sobre todo en la precisión del cálculo del IM.

Tabla 5.2. Número de células y artefactos esperados para en la evaluación del IM ( $IM = 3.5\%$ ).

Entrada/ Salida	M		I		A		Tamaño muestra para $IM=3.5\%$	No clasificados	
	10-9-3	10-15-3	10-9-3	10-15-3	10-9-3	10-15-3		10-9-3	10-15-3
M	62	62	0	0	4	2	68	2	4
I	0	0	1774	1814	89	59	1932	69	59
A	145	145	124	165	4383	4156	4900	248	434
Total	207	207	1898	1979	4476	4217	6900	319	497



La Tabla 5.3 muestra la estimación de los errores del IM para las dos redes con mejor rendimiento. Dado el alto porcentaje de error en el cálculo automático del IM (Tabla 5.3), se propone que el experto realice una intervención con el sistema. Como se puede observar en la Tabla 5.2, el número de falsos positivos de metafases (145 en ambas redes) es suficientemente pequeño para una selección manual de las metafases verdaderas. En esta última etapa el sistema despliega al usuario una imagen que contiene todos los objetos clasificados como metafases y así el usuario selecciona las metafases verdaderas, requiriéndole alrededor de dos minutos, lo cual resulta una mínima cantidad de tiempo comparado con el tiempo que se invierte en el conteo manual (40 hrs.). Con esta simple intervención del usuario, el porcentaje de error en el IM se disminuyó a 6.47% para la red 10-9-3 debido a su alto índice de verdaderos positivos (92% para interfases y metafases). En la Tabla 5.2 podemos observar la ventaja de no forzar a la red neuronal a clasificar todos los patrones de entrada; 248 y 434 artefactos fueron excluidos por las redes (10-9-3, 10-15-3, respectivamente) del riesgo de ser mal clasificados.

Tabla 5.3. Comparación del error en el cálculo del IM automatizado y semi-automatizado, utilizando las redes 10-9-3 y 10-15-3

Red	% de error del cálculo del IM automático	% de error del cálculo de IM semi-automático
10-9-3	+210.12	-6.47
10-15-3	+197.46	-10.29

#### 5.4 Estudio comparativo con otros sistemas buscadores de metafases.

La Tabla 5.4 compara los resultados de la clasificación obtenidos por algunos buscadores de metafases reportados en la literatura, con los de la red neuronal propuesta, así como con

---

las medidas MDWRE e IEPR. La comparación se realizó en términos de los verdaderos positivos y falsos positivos encontrados. Los buscadores de metafases marcados con un símbolo, significa que se utilizó un sistema comercial: (\*) Magiscan 2, (\$) Genetiscanner, (t) Metafer 2, (¢) Cytoscan 110 y (&) Cytogen.

Aún cuando los sistemas propuestos por VROLIJK *et al.* 1994 y Mascio *et al.* 1998, tienen un índice de verdaderos positivos cercano al alcanzado con la red neuronal, dichos sistemas requieren una tinción con fluorescencia, lo cual representa una serie de desventajas: más tiempo en la preparación de las muestras, mayor costo y poca duración de vida de la muestra (36 hrs.). Además, estos sistemas al igual que los restantes en la Tabla 5.5, a excepción de MDWRE e IEPR, buscan metafases con características específicas que permitan el análisis posterior de sus cromosomas (análisis de cariotipo). Las metafases buscadas no deben tener cromosomas traslapados, deben estar lo más dispersas posibles y no deben estar traslapadas con otras metafases, ni con otro tipo de objetos. Si se cumplen las características antes mencionadas, la calidad de las metafases para el análisis de cariotipo será mayor, al igual que la factibilidad para ser reconocidas. Algunos trabajos (CASTLEMAN K y MELNYK J, 1976; OOSTERLINCK A. *et al.* 1977) mencionan la importancia de la calidad de las metafases en el cariotipo y por tanto la necesidad de determinar de manera automática la calidad de las mismas al momento de ser reconocidas. En (VAN DEN BERG H, 1981) se describe una metodología de selección automática de metafases por su calidad.

La comparación del rendimiento entre los sistemas buscadores de metafases resulta complicada (LUNDSTEEN C. y MARTÍN O, 1989; LUNDSTEEN C. y PHILIP J, 1989), ya que se requieren tomar en consideración diferentes aspectos relacionados con 1) el tipo de células que se analiza, 2) el experimento en específico que se quiera realizar y las condiciones en que fueron preparadas las muestras.

Tabla 5.4. Comparación del rendimiento en la identificación automática de metafases. Uso de buscadores de metafases comerciales: (\*) Magiscan 2, (§) Genetiscanner, (t) Metafer 2, (¢) Cytoscan 110 y (&) Cytogen.

Buscadores de metafases	% de verdaderos positivos reconocidos	% de falsos positivos
Jonson E. and Goforrh L. 1974	No reportado	15-20%
Graham J and Pycock D. 1987 *	60%	3%
Células de la sangre.		
Graham J and Pycock D. 1987 *	71%	30%
Células de líquido amniótico.		
Castleman, 1992 §	80%	20%
Weber <i>et al.</i> , 1992 †	No reportado	3%
Garza Jinich <i>et al.</i> 1992	78%	No reportado
Vrolijk <i>et al.</i> 1994 (Fluorescencia)	87.3%	7.4%
Piper <i>et al.</i> 1994 (Fluorescencia)	80%	9.3%
Mclean and Jonson, 1995	74%	6%
Mascio <i>et al.</i> 1998 (Fluorescencia) ¢	84%	10%
<b>MDWRE</b> (Corkidi <i>et al.</i> 1998)	84%	No reportado
Roy L. <i>et al.</i> 2001 (Fluorescencia) &	82%	14%
<b>Red Neuronal</b> (Arámbula <i>et al.</i> 2001)	91.8%	2.9%
<b>IEPR</b> (Vega-Alvarado <i>et al.</i> 2002)	96%	5%

Con relación al primer problema, SCHOËVAËRT-BROSSAULT D. *et al.*, 1983 y GRAHAM J y PYCOCK D, 1987, mencionan que tanto la calidad como la densidad de metafases en un experimento pueden variar en términos del tipo de células que se quiera analizar (sangre, médula ósea, líquido amniótico, cáncer de próstata, etc). En el caso de las células de médula ósea o de cáncer de próstata, éstas no son tan abundantes en comparación con las de la sangre y tampoco tienen la misma calidad ya que se encuentran más

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

---

compactas, lo que puede provocar que aun cuando se utilice un mismo sistema para su búsqueda, el rendimiento sea diferente. Tal es el caso del experimento reportado por GRAHAM J and PYCOCK D, 1987, en el cual se utilizó un sistema comercial tanto para la búsqueda de células del líquido amniótico como para células de la sangre. Como se puede observar en la Tabla 5.5, el porcentaje tanto de verdaderos positivo como de falsos positivos varía, sobre todo en el caso de los falsos positivos.

En el segundo problema se considera que, tanto la densidad de células como la calidad de las muestras puede variar no sólo por el tipo de célula que se analice, sino también por el tipo de experimento que se realice. En dos experimentos diferentes con el mismo tipo de células, se pueden obtener rendimientos muy variados utilizando un mismo sistema de reconocimiento. Esto puede deberse a la forma de preparación de las muestras (diferente tipo de tinción, incremento de artefactos contenidos en el mismo citoplasma de las células los cuales se expresan en ciertas condiciones).

Tomando en consideración todo lo anterior, diremos que el desempeño de la red neuronal propuesta es mejor en relación con los sistemas con los que se compararon, debido a 1) que sobrepasó el desempeño de todos los sistemas buscadores de metafases por al menos 7.8%, 2) a su alto índice de verdaderos positivos, 3) que obtuvo un índice muy bajo en falsos positivos: 2.9%, 4) la complejidad de las metafase analizadas, 5) la cantidad de artefactos que tenía que discriminar y 6) que no sólo debía discriminar a la metafases sino a las interfases también.

Con relación a IEPR, su desempeño fue mejor que el de la red neuronal en relación con los verdaderos positivos: el porcentaje de falsos positivos fue relativamente mayor. Por otra parte hay que recordar del Capítulo 4 que IEPR mostró un bajo desempeño en el reconocimiento de interfases, las cuales no fueron consideradas en ninguna de las

---

TRABAJADO CON  
FALLA DE ORIGEN

metodologías que se muestran en la Tabla 5.5, a excepción de la red neuronal. En este sentido podemos pensar que IEPR, en conjunto con una red neuronal, puede mejorar el porcentaje de reconocimiento metafases e interfases y por lo tanto la evaluación del IM, y que además resulta ser un muy buen parámetro para el reconocimiento de metafases en presencia de artefactos.

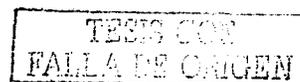
TESTEON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se propone, fundamenta y verifica experimentalmente una metodología para la caracterización de textura en metafases, que en conjunto con otras características morfológicas y fotométricas permita el conteo automático de metafases para el análisis cuantitativo de la proliferación celular y en específico para el cálculo del Índice Mitótico. Para el desarrollo de esta metodología se hizo un análisis crítico tanto de la complejidad de la problemática a resolver, como del estado del arte de los trabajos relacionados con la búsqueda automática de metafases y el análisis de textura.

Del análisis crítico de los trabajos desarrollados en relación con la búsqueda de metafases (incluyendo sistemas comerciales), se concluyó que éstos resultaban inutilizables en la solución del problema del cálculo del IM, debido a las características que éste presenta: a) Poca cantidad de células en metafase en un portaobjetos, donde hay cientos de células en interfase y miles de artefactos, b) Baja resolución de los objetos, debido a que el objetivo utilizado en el microscopio debe ser lo más bajo posible (para reducir el número de campos a analizar), manteniendo la mínima información de distribución espacial de los cromosomas, c) Diversidad en las metafases, donde los cromosomas pueden estar muy dispersos o muy conglomerados e incluso traslapados.

De la revisión de los trabajos referentes al análisis de textura, se llegó a las siguientes conclusiones en relación con su aplicación para la caracterización de las metafases. a) La baja resolución (50x50 pixeles, en promedio) y la forma variable de las metafases son

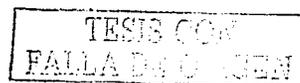


---

restricciones importantes que hacen que los métodos de multi-resolución (JEACOCKE *et al.*, 1994), no sean aplicables. b) Un problema similar ocurre con otras técnicas basadas en la distribución y dependencia espacial de los niveles de gris, para la discriminación de texturas, las cuales requieren ya sea una alta resolución o una buena definición.

La caracterización de las metafases por medio de su textura fue propuesta dado que en la práctica, las propiedades que el experto considera en el conteo manual de las mismas están altamente asociadas a la textura que conforman los cromosomas. En este sentido, el enfoque estructural resultó ser la opción más adecuada para la descripción de la textura de las metafases, dado que ésta se caracteriza por primitivas específicas y reglas de localización de las mismas: los cromosomas y su distribución espacial. Dentro de las diferentes formas de extraer la estructura subyacente (primitivas) de la textura, los puntos extremos resultaron ser una buena representación de los cromosomas. Se propusieron dos medidas de textura: MDWRE e IEPR cuya, principal ventaja sobre otras características de textura evaluadas en este trabajo, fue su especificidad, ya que fueron desarrolladas tomando en cuenta las características de los cromosomas de las metafases, en términos de su distribución espacial y variaciones de intensidad.

La medida MDWRE [CORKIDI G. *et al.*, 1998] se diseñó para ser sensible a las variaciones de las distancias entre los cromosomas y del contraste de éstos en relación con el fondo de la imagen, ya que es una función del promedio de la relación contraste luminoso/distancia de todos los cromosomas de la metafase. Las metafases con un alto contraste y una distribución espacial homogénea de los cromosomas producen un alto valor de MDWRE, en comparación con los artefactos, los cuales usualmente tienen un contraste bajo y una distribución heterogénea de sus picos (extremos). Como las interfases tienen una superficie lisa (dominantemente plana y oscura, lo que implica una mínima cantidad de poros (extremos)), su valor de MDWRE es el valor más pequeño comparado con las metafases y



---

los artefactos. El valor promedio de MDWRE tiene resultados diferentes para las metafases, las interfases y los artefactos.

En el caso de la medida IEPR (VEGA-ALVARADO L. *et al.*, 2002), ésta se definió sobre la base de la textura entre los cromosomas evaluando la distribución de las variaciones de intensidad entre los mismos. En términos generales, la distribución espacial, el tamaño y la tonalidad de los cromosomas de las metafases en un fondo claro, producen un contraste alto que se refleja en los perfiles de intensidades entre extremos. Esto da lugar a una distribución normal de rangos de niveles de gris, definida en términos de las diferencias más grandes entre los máximos y mínimos de los perfiles. Los artefactos no siguen el mismo patrón de variación de niveles de gris entre extremos, ya que el bajo contraste predomina en dichos artefactos, debido a que contienen grandes zonas heterogéneas oscuras. IEPR es una medida de textura que representa la rugosidad local sobre la distribución del histograma de diferencias del máximo y mínimo nivel de gris de los perfiles entre los extremos y es utilizada como una firma característica de las metafases. IEPR relaciona la clasificación de las distribuciones locales con la rugosidad local característicamente producida por los cromosomas.

El desempeño de MDWRE y de IEPR se comparó con el de otras características de textura clásicas reportadas en la literatura; medidas derivadas de las matrices de co-ocurrencia (Contraste, Energía, Segundo Momentos Angulares y entropía), así como, "Relative-Extrema-Density". MDWRE e IEPR obtuvieron el mejor desempeño, debido a su especificidad. Del estudio comparativo se concluye que aun cuando IEPR tuvo una mejor caracterización de la textura de las metafases en comparación con MDWRE, la caracterización de las interfases fue muy baja. MDWRE e IEPR resultaron ser medidas complementarias, ya que algunas metafases sólo fueron caracterizadas por una de las dos medidas. Este hecho resulta importante debido a que la cantidad de metafases que se

---

presentan en una muestra es muy pequeña en comparación de las interfases, por lo tanto, se requiere localizar el mayor número de metafases en aras de tener un IM confiable.

Dentro de las características que se consideran para definir si una medida determinada es robusta o no, se encuentran la invarianza a rotaciones, traslaciones y escalamiento. Tanto MDWRE como IEPR son invariantes a traslaciones y escalamiento y estrictamente hablando no lo son a rotaciones. En el Capítulo 4 se demostró de manera experimental, por medio de la evaluación de la medida de IEPR en diferentes orientaciones, que debido a la naturaleza de las metafases (texturas isotropicas), interfases y artefactos, el desempeño de esta medida puede variar hasta un 14%. Esto significa que en el peor de los casos el desempeño será de un 86% y en el mejor de un 100%. Por lo tanto, considerando que es equiprobable que una metafase caiga en cualquiera de las rotaciones podemos decir que, en promedio el desempeño de las medidas será de un 93%.

Con relación a la aplicación de redes neuronales [ARÁMBULA F. *et al.*, 2001] para la clasificación de las metafases e interfases y discriminación de artefactos, se demostró basándose en su desempeño, que son una herramienta apropiada en la práctica durante la identificación de metafases e interfases, superando los resultados obtenidos por otros buscadores automáticos de metafases reportados previamente.

Como se sabe, la principal dificultad para la completa automatización del IM, tiene que ver esencialmente con la baja probabilidad de encontrar metafases y la alta probabilidad de encontrar artefactos. En este sentido, se propone un sistema semiautomatizado para el cálculo del IM, en el cuál después del análisis automático de las muestras de las laminillas, se despliegue al usuario todos los objetos clasificados como metafases, de tal manera que él seleccione sólo las metafases verdaderas. Con estas metafases y las interfases reconocidas por el sistema se evaluaría el IM. Se considera que el proceso de selección de las metafases

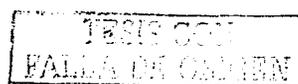
le tome al usuario sólo un par de minutos, que en comparación con las 40 hrs. que se invierten en el conteo manual, resulta mínimo.

Aun cuando es complicado hacer una comparación objetiva entre los desempeños de los buscadores de metafases reportados, vale la pena enfatizar que tanto las medidas de textura propuestas, como la red neuronal, obtuvieron excelentes desempeños en comparación con los buscadores de metafases reportados en la literatura, sobre todo considerando que las metafases para el IM son pocas y que las características que éstas presentan hacen que su reconocimiento sea más complejo que el de las metafases buscadas para estudios de aberraciones cromosómicas.

Podemos decir que la metodología propuesta en conjunción con el método de adquisición de imágenes y el sistema de procesamiento, tiene el potencial de ser un sistema susceptible a utilizarse como un identificador automático de metafases en un laboratorio regular y un sistema semiautomático para el cálculo del IM en imágenes a baja magnificación (10x).

#### PERSPECTIVAS A FUTURO

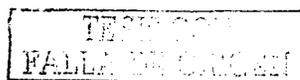
Una meta cercana es validar la metodología propuesta, en la medida de lo posible, con diferentes tipos de células y diferentes experimentos. En específico con muestras donde se busquen aberraciones cromosómicas, en aras de: 1) poder tener un comparativo menos subjetivo del desempeño de la metodología propuesta con relación a otras metodologías, 2) generalizar la metodología y 3) comprobar que existen otros problemas donde las condiciones de la muestra no son tan adversas en términos del número de artefactos y metafases.



Otra meta es la búsqueda de mecanismos que permitan eliminar la cantidad de artefactos que se presentan en la imágenes. Se sugiere que el experto utilice otras formas de preparación de la muestra, como cambio de tinción o uso de cubre objetos.

Se propone el desarrollo de un sistema completo para la búsqueda de metafases y el análisis de cariotipo. Una vez que se localizan las metafases, se debe hacer el análisis de los cromosomas de las mismas para detectar anomalías en términos de su estructura o número. Actualmente existen muchos trabajos relacionados con la temática, sin embargo, es un problema complejo que hasta nuestros días sigue siendo un reto.

Una última línea de trabajo a futuro es la generalización de las medidas de textura desarrolladas, probando en patrones sintéticos y en otros problemas de aplicación.



---

---

## REFERENCIAS

- AHUJA N., DUBITZKI T. and ROSENFELD A. (1980): 'Some experiments with mosaic models for images', *IEEE Trans. on Syst. Man and Cyber.* **SMC-10**: 744-749.
- AHUJA N. and ROSENFELD A. (1981): 'Mosaic models for textures', *IEEE Trans. on Patt. Analy. And Mach. Intell.*, **PAMI-3**: 1-11.
- ARÁMBULA COSÍO F., VEGA L., HERRERA BECERRA A., PRIETO MELÉNDEZ R. and CORKIDI G. (2001): 'A Neural Network Based Workstation for Automated Cell Proliferation Analysis. *Proc. of the 23rd Annl. Inter. Conf. of the IEEE Engin. in Med. and Biology Soc.* Estambul, Turquía. Octubre.
- ARÁMBULA, F., VEGA, L., HERRERA, A., PRIETO, R., CORKIDI, G. (2001): 'Automatic identification of metaphase spreads and nuclei using neural networks'. *Med. and Biol. Engin. and Comp.* **39(3)**: 391-396.
- AUGUSTIN C, DAMOUR O. (1995): 'Pharmacotoxicological applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity'. *Cell Biol Toxicol.* **11(3-4)**: 167-71.
- AVERS CH. (1983): *Biología Celular*. Grupo editorial Iberoamérica. México.
- BACUS J., GOSE E. (1972): 'Leukocyte pattern recognition', *IEEE Trans. Sys. Man. Cybernet.*, **SMC-2**: 513-526.
- BARILE F. (1994): *In vitro cytotoxicology. Mechanisms and methods*. Ed. CRC Press, USA: 1-222.
- BARNARD E. and CASASSENT D. (1989): 'Image processing for image understanding with neural nets', *Int. Joint Conf. NN.* **1**: 111-115.

- BENDER M., AWA A., BROOKS A., EVANS H., GROER P., LITTLEFIELD L., PEREIRA C., PRESTON R. AND WACHHOLZ B. (1988): 'Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation', *Mutat. Res.* **196**: 103-159.
- BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. and LACROIX J. (1984a): *Biología y fisiología celular III: cloroplastos, peroxisomas, división celular*. Ed.Omega, Barcelona, España.
- BLAKELY W., PRASANNA P., KOLNKO C., PYLE M., MOSBROOK D., LOATS A., RIPPEON T., LOATS H. (1995): 'Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder'. *Stem Cells*. **13**(suppl 1): 223-230.
- BLECK J., RANFT U. (1996): 'Random field models in the texture analysis of ultrasonic images of the liver', *IEEE Trans. on Medic. Imaging*, **15**(6): 796-801.
- BOVIK A., CLARK M., GEISLER G. (1990): 'Multichannel Texture Analysis Using Localized Spatial Filters', *IEEE Transactions Pattern Anal. and Mach. Intell.* **PAMI-12**(1): 55-73.
- BRODATZ P. (1966): 'A photographic album for artists and designers'. (Dover, New York).
- CASTLEMAN K and MELNYK J. (1976): 'An automated system for chromosome análisis. *Final report. JPL-doc. 5030-5040*.
- CASTLEMAN K.R.(1992): 'The PSI automatic metaphase finder'. *J. Radiat. Res.* **33**, (Sup 1.): 124-128.
- CASTLEMAN K. and WHITE B. (1995): 'Dot count proportion estimation in FISH specimens', *Bioimaging*. **3**: 88-93.
- CHOW C. (1962): 'A recognition method using neighbor dependence'. *IRE Trans. on Electron. Comput.* **11**: 683-690.
- CORKIDI G., VEGA L., MÁRQUEZ J. (1998): 'Roughness feature of metaphase chromosome spreads and nuclei for automated cell proliferation analysis'. *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**: 679-685.

- CROSS G. and Jain A. (1983): 'Markov random field texture models', *IEEE Trans. on Pattern Anal. and Mach. Intell.* **PAMI-5**: 25-39.
- CUMMINGS M. (1995): Herencia humana. Mc. Graw Hill, 3 ed: México.
- DARLI E., JOSEPH R. (1968): 'Pattern recognition from Satellite altitudes', *IEEE Trans. Sys. Science and Cybernet.*, **SSC-4**: 38-47.
- DAVIS L., JOHNS S. and AGGARWAL J. (1978): 'Texture analysis using generalized co-ocurrence matrices'. *Patte. Recog. and Image Proces. Conf.*
- DEGUCHI K. and MORISHITA I. (1976): 'Texture characterization and texture-based image partitioning using two-dimensional linear estimation techniques'. *IEEE Trans. on Comp. C-27*: 739-745.
- DEKLEIN A, VANKESSEL A, GROSVELD G, BARTRAM CR, HAGEMEIJER A. (1982): 'A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia'. *Nature*. **300**: 765.
- DELP E., KASHYAP L. and MITCHELL O. (1979): 'Image data compression using autoregressive times series models', *Pattern Recog.* **11**: 313-323.
- DOCHERTY JG, MCGREGOR JR, PURDIE CA, GALLOWAY DJ, O'DWYER PJ. (1995): 'Efficacy of tumoricidal agents in vitro and in vivo'. *Br J Surg.* **82**(8):1050-2.
- DOLFINI E, ELLI L, DASDIA T, BUFARDECI B, COLLEONI MP, COSTA B, FLORIANI I, FALINI ML, GUERRIERI N, FORLANI F AND BARDELLA MT. (2002): 'In vitro cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line'. *Toxicol In Vitro.* **16**(4): 331-7.
- DOUGHERTY E., NEWELL J., PELZ J. (1992): 'Morphological Texture-Based Maximum-Likelihood Pixel Classification Based on Local Granulometric Moments', *Pattern Recognition.* **25**(10): 1181-1198.
- EISENBRAND G, POOL-ZOBEL B, BAKER V, BALLS M, BLAAUBOER BJ, BOOBIS A, CARERE A, KEVEKORDES S, LHUGUENOT JC, PIETERS R, KLEINER J. (2002): 'Methods of in vitro toxicology', *Food Chem Toxicol.* **40**(2-3): 193-236. Review

- ERICH R. W.; FOITH J. (1976): 'Representation of random wave-forms by relational trees', *IEEE Trans. on Comp.* **C-25**: 725-736.
- ERICH R. W.; FOITH J. (1978): 'A View of Texture topology and Texture Description', *Computer Graphics and Image Processing*, **8(2)**: 155-173.
- FINNON P., LLOYD D. and EDWARDS A. (1986): 'An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110', *Mutat. Resar.* **164**:101-108.
- FIRESTONE L., COOK K., CULP K., TALSANIA N. And PRESTON K. (1991): 'Comparition of autofocus methods for automated microscopy', *Cytometry*, **12**: 195-206.
- GAGALOWICZ A.; DE MA S. (1981): 'A New Method for Texture Fields Synthesis: Some Applications to the Study of Human Vision', *IEEE Transaction on Pattern Anal. and Mach. Intell.* **PAMI-3(5)**: 520-532.
- GALLOWAY M. (1975): 'Texture analysis using gray level run lengths', *Comp. Graph. and Imag. Underst.* **4**: 172-179.
- GALLOWAY S. (1994): 'Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions', *Environ. Mol. Mutagen.* **23(Suppl. 24)**: 44-53.
- GARDUÑO E., (1995): 'Sistema automático para el cálculo del índice mitótico por el procesamiento digital de imágenes: MIT 2000', Tesis.
- GARZA-JINICH M., RODRIGUEZ C., CORKIDI G., MONTERO R., ROJAS E and OSTROSKY-WEGMAN P. (1992): 'A microcomputer-based supervised system for automatic scoring of mitotic index in citotoxicity studies', in ARCHIBALD C., and PETRIU E., (Eds.): *Advances in machine vision*, **32**, (World Scientific Press series on Computer Science): 301-313.
- GONSEBATT L., VEGA L., HERRERA L., MONTERO R., ROJAS E., CEBRIÁN M. and OSTROSKY-WEGMAN. (1992): 'Inorganic arsenic effects on human lymphocyte simulation and proliferation'. *Mut. Resea.* **283**: 91-95.
- GONZALEZ R., WOODS R. (2002): Digital image processing, Ed. Prentice Hall, 2<sup>nd</sup> Ed., Upper Saddle River, New Jersey

- GRAHAM J. and TAYLOR C. (1980): 'Automated chromosome analysis using the magiscan image analyser'. *Analyt. And Quant. Cytol.* **2(4)**: 237-242.
- GRAHAM J. and PYCOCK D. (1987): 'Automation of routine clinical chromosome analysis. II. Metaphase finding'. *Analyt. And Quant. Cytol.* **9(5)**: 391-397.
- GREEN D. and NEURATH P. (1974): 'The design, operation and evaluation of a high speed automatic metaphase finding'. *J. Histochem. Cytochem.* **22(7)**: 531-535.
- GROEN F., YOUNG I, LIGTHART G. (1985): 'Acomparision of different focus funtions for use in autofocus algorithms. *Citometry.* **6**:81-91.
- HARALICK, R. M. (1979): 'Statical and structural approaches to texture'. *Proc. IEEE.* **67**: 786-804.
- HARALICK R., SHANMUGAM K. AND DINSTEIN I. (1973): 'Texture features for images classification', *IEEE Trans. Systems Man Cybernet.* **SMC-3**: 610-621.
- HARALICK R and SHAPIRO L. (1992): 'Computer and Robot Vision'. Vol. I. Ed. Addison-Wesley Publishing Co.
- HASSNER M. and SKLANSKY J. (1980): 'The use of Markov random fields as models of texture', *Comput. Graph. and Imag. Process.* **12**: 357-370.
- HERRERA L., MONTERO R., LEÓN-CAZARES J., ROJAS E., GONSEBATT L and OSTROSKY-WEGMAN (1992): 'Effects of progesterone and estradiol on the proliferation of phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes'. *Mut. Resea.* **270**: 211-218.
- HERTZ J., KROG A. and PALMER R. (1991): 'Introduction to the theory of neural computation', Lecture Notes, Santa Fe Institute. Vol. 1 (Addison - Wesley).
- HU Y., ASHENAYI K., VELTRI R., O'DOWD G., MILLER G., HURST R. and BONNER R. (1994): 'A comparison of neural network and fuzzy c-means methods in bladder cancer cell classification', *IEEE Int. Conf. NN.* **6**: 3461-3466.
- HUBER R, KULKA U, LÖRCH TH, BRASELMANN H and BAUCHINGER M. (1995): 'Automated metaphase finding: an assessment of the efficiency of the METAFER2 system in a routine mutagenicity assay', *Mutation Research.* **334**: 97-102.

- HUBER R, LÖRCH TH, KULKA U, BRASELMANN H and BAUCHINGER M. (1998): 'Technical report: automated classification of first and second cycle metaphases', *Mutation Research*. **419**:27-32.
- HUBER R, KULKA U, LÖRCH TH, BRASELMANN H, ENGERT D, FIGEL M, and BAUCHINGER M. (2001): 'Technical report: application of the Metafer2 fluorescence scanning system for analysis of radiation-include chromosome aberration measured by FISH-chromosome painting', *Mutation Research*. **492**: 51-57.
- INGRAM M., NORGRÉN PE and PRESTON K. (1968): 'Image Processing in Biological Sciences'. Edited by DM Ramsey. University of California Press. 97-117.
- JACQUES P., CERVANTES A. (1982): 'Malformaciones congénitas secundarias anomalías cromosómicas'. *Rev Med Hosp Gen Mex XLV*: 340-349.
- JANTOVA S, HOJEROVA J, HANUSOVA B, MIKULASOVA M. (2001): 'Cytotoxic and genotoxic activity of certain preservative agents in cosmetics'. *Ceska Slov Farm.*, **50(5)**: 238-42.
- JAU Y., CHIN R. and WEINMAN J. (1984): 'Time series modeling for texture analysis and synthesis with applications to cloud field morphology study'. *Intern. Conf. On Patt. Recog.* Montreal: 1219-1221.
- JOHNSON E. and GOFORTH L. (1974): 'Metaphase spread detection and focus using closed circuit television', *J. Histochem. Cytochem.* **22(7)**: 536-545.
- JULESZ B.; BERGEN J. (1983): 'Textons, the Fundamental Elements in Preattentive Vision and Perception of Textures', *Bell System Technical Journal*. **62(6)**: 1619-1645.
- JULESZ, B. (1984): 'A Brief Outline of the Texton Theory of Human Perception', *Trends in Neurosciences*. **7**: 41-45.
- KARU K., JAIN A. AND BOLLE R. (1996): 'Is there any texture in the image?'. *Pattern Recognition*. **29**: 1437-1446.

- KHOTANZAD A. and HONG H. (1990): 'Invariant image recognition by Zernike moments'. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* **12**(5): 489-497.
- KOUFOS A, HANSEN MF, LAMPKIN BC, WORKMAN ML. (1984): 'Copeland NG, Jenkins NA et al. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms tumour'. *Nature.* **309**:170-174.
- KWON, J.; HONG, H.; CHOI, J. (1996): 'Obtaining a 3-D orientation of projective textures using a morphological method'. *Pattern Recognition.* **29**(5): 725-732.
- LEDLEY R., RUDDLE F., MIGEON B. (1963): 'Computer analysis of chromosomes'. *Proc. 16<sup>th</sup> Ann. Conf. Eng. Med. Biol.* **5**: 166-167.
- LEE H. (1983): 'Extraction of textured regions in aerial imagery'. *Image Underst. Proc.*:289-303.
- LUMIA R., HARALICK R., ZUNIGA O., SHAPIRO L. (1983): 'Texture analysis of aerial photographs', *Pattern Recognition*, **16**(1): 39-46.
- LUNDSTEEN C., GERDES T., MAAHR J. and PHILIP J. (1987): 'Clinical performance of a system for semiautomated chromosome analysis'. *Am. J. Hum. Genet.* **41**: 493-502.
- LUNDSTEEN and MARTÍN O. (1989): 'On the selection of systems for automated cytogenetic analysis'. *Am. J. of Med. Genet.* **32**: 72-80.
- LUNDSTEEN C. and PHILIP J. (1989): 'Automated cytogenetic analysis: accomplishments, present status and practical future possibilities'.
- MASCIO L., BRIAN K., PHILIP K., KEGELMEYER Jr., KYOMU M., BRINER J., ANDREW J. and WYROBEK J. (1998): 'Advances in the automated detection of metaphase chromosomes labeled with fluorescence dyes'. *Cytom.* **33**:10-18.
- MATHERON, G. (1975): 'Random sets and Integral Geometry', Wiley, New York.
- MAYALL B and MENDELSON M. (1970): 'Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leucocytes. II. The mechanical scanner of CYDAC, the theory of scanning photometry and magnitude of residual errors. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 383.

- McCORMICK B. and JAYARAMAMURTH Y. (1974): 'Time series model for texture synthesis', *International Journal of Computer and Information Sciences*, 3: 329-343.
- MCLEAN, J. R. and JOHNSON, F. (1995): 'Evaluation of a metaphase chromosome finder: potential application to chromosome-based radiation dosimetry', *Micron*, 26: 489-492.
- MELONI M., LAVAZZA M., FISCHI W., ZAVA S., DOLFINI E. (1995): 'In vitro efficacy evaluation of cosmetic products: a pool of tests on cultured cells'. *Boll Chim Farm.* 134(9): 509-17.
- MUSAVI M., BRYANT R., QIAO M., DAVISSON M., AKESON E. and FRENCH B. (1998): 'Mouse chromosome classification by radial basis function network with fast orthogonal search', *Neural Networks*, (II): 769-777.
- MUZZOLINI R., YANG Y., PIERSON R. (1994): 'Texture characterization using robust statics', *Pattern Recognition*, 27(1): 119-134.
- NADLER M., SMITH E. (1992): 'Pattern Recognition Engineering', Dc. John-Wiley & Sons Inc.: 225-280.
- NIEBUHR, E. (1978): 'The cri du chat syndrome: epidemiology, cytogenetics, and clinical features'. *Hum. Genet.* 44: 227-275.
- ODAWARA K., YAMAMOTO K., KATO H., HARA M., KOGISO S., KISHIDA F., YOSHITAKE A., NAKATSUKA I. (1997): 'A new semi-automated chromosome analysis system for in vitro chromosomal aberration tests'. *Mutat. Res.* 389:207-212.
- OHLANDER R. (1975): 'Analysis of natural scenes', Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, PA.
- OOSTERLINCK A., VAN DAELE J., DE BUYSSCHER L., DOM F., REYNAEERTS A., VAN DEN BERGHE H. (1977): 'A general picture processing system with application in the classification of human chromosomes. *Procee. Of seminar on Patt. Recogn.* SITEL: 6.2.1-6.2.10.

- OSORIO RM, HEFTI A, VERTUCCI FJ, SHAWLEY AL. (1998): 'Cytotoxicity of endodontic materials'. *J Endod.* **24**(2): 91-6.
- OTSU N. (1979): 'A threshold selection method from gray-level histograms'. *IEEE Trans. on Sys. Man. And Cyber.* **SMC-9**(1): 62-66.
- PENTLAND A. (1984): 'Fractal-based Description of Natural Scenes', *IEEE Transaction on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **PAMI-6**: 661-674
- PIPER J., POGGENSEE M., HILL W., JENSEN R., JI L., POOLE I., STARK M. and SUDAR D. (1994): 'Automatic fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes', *Cytometry*. **16**(1): 7-16.
- REED T, HANS J. (1993): 'A Review of recent texture segmentation and feature extration technique', *CVGIP: Image Understanding*, **57**(3): 359-372.
- ROJAS E., MONTERO R., HERRERA L., SORDO M., GONSEBATT M., RODRÍGUEZ R. and OSTROSKY -WEGMAN P. (1992): 'Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetic reproducible endpoints in genetic toxicology testing?', *Mutation Res.* **282**: 283-286.
- ROJAS E., HERRERA L., SORDO M., GONSEBATT M., MONTERO R., RODRÍGUEZ R. and OSTROSKY -WEGMAN P. (1993): 'Mitotic index lymphocyte proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity', *Anti-cancer Drugs*. **4**(6): 637-640.
- ROSENFELD A. and THURSTON M. (1971): 'Edge detection and curve detection for visual scene analysis', *IEEE Trans. on Comp.* **C-20**: 562-569.
- ROSENFELD A., TROY E. (1970): 'Visual Texture Analysis', Technical Report 70-116 University of Maryland, College Park.
- ROY L., DURAND V., DELBOS M., SOROKINE-DURM I., SOUSSALINE F. and VOISIN P. (2001): 'A new image analysis system for biological dosimetry by fluorescent *in situ* hybridization. Step 1: metaphase finder and automatic acquisition validation'. *J. Radiat. Res.* **42**: 165-177.

- ROWLEY JD. (1973): 'A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining'. *Nature*. **243**: 290-292.
- RUSS J. (1990): Computer-Assisted Microscopy: The measurement and analysis of images. Ed. Plenum Press, New York, Estados Unidos.
- SCHACHTER B. (1980): 'Model-based texture measures', *IEEE Trans. on Patt. Analy. And Mach. Intell.* **PAMI-2**: 169-171.
- SCHACHTER B., ROSENFELD A. and DAVIS L. (1978): 'Random mosaic models for texture', *IEEE Trans. on Syst. Man and Cyber.* **SMC-8**: 694-702.
- SCHOËVAËRT-BROSSAULT D., LÉONARD C. and SELVA J. (1983): 'A new method for automatic metaphase finding adaptable to different chromosome preparations'. *Comp. Progr. In Biomed.* **16**: 195-202.
- SERRA, J. and VERCHERY, G. (1973): 'Mathematical morphology applied to Fibre Composite Materials', *Film Science and Technology.* **6**: 141-158.
- SHIPPEY G., CAROTHERS A and GORDON J. (1986): 'Operation and performance of automatic metaphase finder based on MRC fast interval processor'. *J. of Histochem. and Cytochem.* **34**(10): 1245-1252.
- SUGIHARA N, SHIMOMICHI K AND FURUNO K. (1997): 'Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid'. *Toxicology.* **120**(1): 29-36.
- SUTTON R.; HALL E. (1972): 'Texture Measures for Automatic Classification of Pulmonary Disease'. *IEEE Transaction on Computers.* **C-21**(7): 667-676.
- TOU J. (1980): 'Pictorial feature extraction and recognition via image modeling'. *Comput. Graph. and Imag. Process.* **12**: 376-406.
- VAN DEN BERG H. and DE FRANCE H. (1979): 'A system for automatic metaphase finding and semi-automatic chromosome analysis'. *Microscópica Acta. Supplement 3*: 213-220.
- VAN DEN BERG H., DE FRANCE H., HABBEMA J. and RAATGEVER J. (1981): 'Automated selection of metaphase cells by quality'. *Citometry.* **1**(6): 363-368.

- VEGA-ALVARADO L, MÁRQUEZ J. and CORKIDI G.( 2001): 'Inter-Extrema Profile Analysis for a Texture Coarseness Estimate in Automatic Metaphase Finding'. *Proc. of the 2nd Inter. Sym. on Image and Signal Process. and Analysis*. Pula, Croacia. Junio. 159-162.
- VEGA-ALVARADO L., MÁRQUEZ J. and CORKIDI G. (2001): 'Automatic Metaphase Finding by Inter-Chromosome Extrema Profile Analysis'. *Proc. of the 23rd Annl. Inter. Conf. of the IEEE Engin. in Med. and Biology Soc.* Estambul, Turquía. Octubre.
- VEGA-ALVARADO L., MARQUEZ J., CORKIDI G. (2002): 'Inter-chromosome texture as a feature for automatic identification of metaphase spreads', *Med. and Biol. Enginee. Comput.* **40**(4): 479-484.
- VILLE C. (1984): *Biología*, Ed. Interamericana, México, séptima edición.
- VROLIJK J, SLOOS W. C, DARROUDI F., NATARAJAN A. T., and TANKE H. J. (1994): 'A system for fluorescence metaphase finding and scoring of chromosomal translocations visualized by *in situ* hybridisation', *Int. J. Radiat. Biol.* **66**(3): 287-295.
- WANG D., HAESE-COAT V., BRUNO A. and RONSIN J. (1993): 'Texture Classification and Segmentation based on Iterative Morphological Decomposition', *Journal of Visual Communication and Imag. Representation.* **4**(3): 197-214.
- WEBER J., SCHEID W. and TRAUT H. (1992): 'Time-saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder Metafer2', *Mutat. Res.* **272**(1): 31-34.
- WESZKA J., DYER C., ROSENFELD A. (1976): 'A Comparative study of texture measures for terrain classification', *IEEE Trans. Sys. Man. Cybernet.* SMC-6: 269-285.
- WIED G., BARTELS PH, BAHR GF and OLFIELD DG. (1968): 'Taxonomic intracellular analytic system(TICAS) for cell identification. *Acta Cytol.* **12**: 180.
- WOOD J. (1996): 'Invariant pattern recognition: a review', *Patt. Recog.* **29**(1): 1-17.

- WU CH., CHEN Y. (1992): 'Statical feature matrix for texture analysis', *Graph. Models and Image Processing*, **54(5)**: 407-419.
- ZACKNICH A. and ATTIKIOUZEL Y. (1995): 'Detection of sodium oxalate needles in optical images using neural network classifiers', *IEEE Int. Conf. NN.* **4**: 1699-1702.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICES

### A.1 Especificaciones del equipo utilizado

#### Hardware

Microscopio óptico Olympus BH2 con objetivo x10

Platinas Motorizadas para ocho laminillas

Controlador MultiControl 2000 manufacturado por MÄRZHÄUSER Gmb Wetzlar

Características:

- ⇒ Soporta el manejo de dos o tres ejes cartesianos
- ⇒ Posee una resolución de 40,000 pasos/revolución
- ⇒ Una velocidad máxima de 25 revoluciones/seg.
- ⇒ Velocidad máxima del joystick 25 revoluciones/seg.
- ⇒ Ajuste dinámico de corriente para los diferentes motores de pasos.
- ⇒ Interfaz física: RS232
  - Enlace de transputer.
  - SCSI-opcional
- ⇒ Sistema de coordenadas programable
- ⇒ Velocidad y aceleración programable
- ⇒ Memoria no volátil para los parámetros

Cámara de video CCD blanco y negro COHU 48000

Tarjeta de adquisición Flashpoint 128 manufacturada por Integral Technologies, Inc., USA

Computadora con:

- ⇒ Procesador Intel pentium III de 750 MHz
- ⇒ 128 Mb de memoria del sistema total

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Software**

Image-Pro 4.5, desarrollado por Media Cybernetics, USA.

Compilador de Borland C

Microsoft Excel para Windos 98

Visual Basic

Lenguaje interfaz VENUS-1 para la programación del controlador

**A.2 Método "Between Class Variance" utilizado para la segmentación**

El método de discriminación por umbral BCV se basa en el uso del histograma de niveles de grises de la región de interés, normalmente la imagen completa. En dicho método, la búsqueda del umbral en una imagen con  $L$  niveles de grises, está considerada como una partición de los píxeles en dos clases  $C_0$  y  $C_1$  a un nivel de gris  $k$ . Esto es  $C_0 = \{0, 1, \dots, k\}$  y  $C_1 = \{k+1, k+2, \dots, L\}$ . El número de píxeles en el nivel  $i$  se denota por  $n_i$  y el número total de píxeles está expresado por  $N = n_1 + n_2 + \dots + n_L$ . Se normaliza el histograma de niveles de gris y se considera como una distribución de probabilidad:

$$p_i = \frac{n_i}{N}, \quad p_i \geq 0, \quad \sum_{i=1}^L p_i = 1$$

Por lo tanto, las probabilidades de ocurrencia de clase y los niveles medios de clase respectivamente están dados por:

$$\omega_0 = P_r(C_0) = \sum_{i=1}^k p_i = \omega(k)$$

$$\omega_1 = P_r(C_1) = \sum_{i=k+1}^L p_i = 1 - \omega(k)$$

y

$$\mu_0 = \sum_{i=1}^k iP_r(i/C_0) = \sum_{i=1}^k \frac{ip_i}{\omega_0} = \frac{\mu(k)}{\omega(k)}$$

$$\mu_1 = \sum_{i=k+1}^L iP_r(i/C_1) = \sum_{i=k+1}^L \frac{ip_i}{\omega_1} = \frac{\mu_r - \mu(k)}{1 - \omega(k)}$$

donde:

$$\omega(k) = \sum_{i=1}^k p_i \mu(k) = \sum_{i=1}^k i p_i$$

son los momentos acumulativos de orden cero y primer orden del histograma hasta el nivel  $k$ .

$$\mu_T = \mu(L) = \sum_{i=1}^L i p_i$$

es la media total de la imagen original.

$$\omega_0 \mu_0 + \omega_1 \mu_1 = \mu_T, \quad \mu_0 + \mu_1 = 1$$

Las varianzas están dadas por:

$$\sigma_0^2 = \sum_{i=1}^k (i - \mu_0)^2 p_i / \omega_0 \quad \sigma_1^2 = \sum_{i=k+1}^L (i - \mu_1)^2 p_i / \omega_1$$

Para evaluar que tan bueno es el umbral (en el nivel  $k$ ) existen los criterios de medición discriminantes:

$$\lambda = \sigma_B^2 / \sigma_W^2, \quad k = \sigma_T^2 / \sigma_W^2, \quad \eta = \sigma_B^2 / \sigma_T^2$$

donde:

$$\sigma_W^2 = \omega_0 \sigma_0^2 + \omega_1 \sigma_1^2 \quad \text{varianza de la clase}$$

$$\sigma_B^2 = \omega_0 \omega_1 (\mu_1 - \mu_0)^2 \quad \text{varianza entre clase}$$

$$\sigma_T^2 = \sum_{i=1}^L (i - \mu_T)^2 p_i \quad \text{varianza total de niveles de grises}$$

tomando en cuenta las siguientes identidades:  $k = \lambda + 1$ ,  $\eta = \lambda(\lambda + 1)$  y  $\sigma_W^2 + \sigma_B^2 = \sigma_T^2$  se obtiene el umbral óptimo al hacer máximo  $\eta$ , o en equivalencia, hacer máximo  $\sigma_B^2$ . El máximo  $\sigma_B^2$  se selecciona en una búsqueda secuencial usando cantidades acumulativas  $\omega(k)$  y  $\mu(k)$ :

$$\eta(k) = \sigma_B^2(k) / \sigma_T^2, \quad \sigma_B^2(k) = \frac{[\mu_T \omega(k) - \mu(k)]^2}{\omega(k)[1 - \omega(k)]}$$

y el valor de umbral óptimo será:  $\sigma_B^2(k') = \max \sigma_B^2(k)$ .

### A.3 Pseudocódigo para el cálculo de MDWRE e IEPR

#### Evaluación de MDWRE

Dada una imagen de  $n \times m$  pixeles.

```

For  $i \leftarrow 1$  to  $i \leq m$ 
   $j \leftarrow 1$ 
  While  $j < n$ 
    While  $j < n$  and  $(arr[i][j] \geq \text{fondo or } arr[i][j] \leq arr[i][j+1])$ 
       $j \leftarrow j+1$ 
    if  $j < n$ 
       $s \leftarrow 1$ 
      While  $j < n$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
        if  $arr[i][j] > arr[i][j+1]$ 
          if  $(s < > 0)$ 
             $inibaja \leftarrow j$ 
            while  $j < n$  and  $arr[i][j] > arr[i][j+1]$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
               $j \leftarrow j+1$ 
            if  $j < n$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
              if  $arr[i][j] = arr[i][j+1]$ 
                 $cont \leftarrow 0$ 
                 $incipianicie \leftarrow j$ 
                while  $j < n$  and  $arr[i][j] = arr[i][j+1]$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
                   $j \leftarrow j+1$ 
                 $cont \leftarrow cont+1$ 
                if  $j < n$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
                  if  $arr[i][j] < arr[i][j+1]$ 
                     $hoyo \leftarrow incipianicie + cont/2$ 
                     $s \leftarrow -1$ 
                  else
                     $s \leftarrow 0$ 
              else
                 $hoyo \leftarrow j$ 
                 $s \leftarrow -1$ 
          Else
            While  $j < n$  and  $arr[i][j] < arr[i][j+1]$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
               $j \leftarrow j+1$ 
            if  $j < n$  and  $arr[i][j+1] < \text{fondo}$ 
               $distancia \leftarrow ((arr[i][inibaja] - arr[i][hoyo]) + (arr[i][j] - arr[i][hoyo]))/2$ 
              if  $distancia \geq \text{profundidad}$ 
                guardar coordenada ( $hoyo, i$ )
               $s \leftarrow 1$ 
        if  $s = -1$ 
           $distancia \leftarrow ((arr[i][inibaja] - arr[i][hoyo]) + (arr[i][j] - arr[i][hoyo]))/2$ 
          if  $distancia \geq \text{profundidad}$ 
            guardar coordenada ( $hoyo, i$ )
        if  $j < n$ 
           $j \leftarrow j+1$ 

```

**Evaluación de IEPR**

Dado un conjunto de  $s$  extremos

```

cont←0
Mmax←0
Mmin←255
For i←1 to i≤s-1
  Leer del archivo el registro i y asignarlo a x1, y1
  For j←i+1 to j≤s and
  Leer del archivo el registro j y asignarlo a x2, y2
  If |x1-x2|≤3 and |y1-y2|≤3
    Obtener max y min del perfil que se forma entre los puntos (x1,y1) y (x2,y2)
    If max > Mmax
      Mmax←max
    If min < Mmin
      Mmin←min
    w←(max-min) mod 256
    arr[w]←arr[w]+1
    cont←cont+1
  j←j+1
i←i+1
For med←1 to (arr[med-1]≤cont/2)
  arr[med]←arr[med]+arr[med-1]
  med←med+1
posc←med-2
aux←arr[med-1]-arr[posc]
mediana←posc+((cont/2)-arr[posc])/aux
IEPR←mediana/(MNS-Mmax-Mmin)

```

**A.3 Artículos internacionales derivados del trabajo de tesis**

- CORKIDI G., VEGA L., MÁRQUEZ J. (1998): 'Roughness feature of metaphase chromosome spreads and nuclei for automated cell proliferation analysis'. *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**: 679-685.
- ARAMBULA F., VEGA L., HERRERA BECERRA A., PRIETO MELÉNDEZ R., CORKIDI G. (2001): 'Automatic identification of metaphase spreads and nuclei using neural networks'. *Med. Biol. Eng. Comput.* **39**: 391-396.
- VEGA-ALVARADO L., MARQUEZ J., CORKIDI G. (2002): 'Inter-chromosome texture as a feature for automatic identification of metaphase spreads'. *Med. and Biol. Engin. Comput.* **40**(4): 479-484.