

00362



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

INSTITUTO DE FÍSICA

CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y
DESARROLLO TECNOLÓGICO

ANÁLISIS DE IMÁGENES DE
MICRONÚCLEOS CELULARES PARA
EVALUAR SU USO COMO
INDICADORES DE DAÑO CELULAR

T E S I S

*Que para obtener el grado académico de
Maestro en Ciencias (Física Médica)*

presenta:

ANTONIO LOZANO VINCENT

Director: Dr. Jorge Alberto Márquez Flores

Miembros de Comité Tutorial:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos

MÉXICO, D.F.

2005

m349118



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos.

A mi familia.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Jorge Alberto Márquez Flores

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

M. en C: Ana Elena Buenfil Burgos.

A mis sinodales:

Dr. Arnulfo Martínez Dávalos

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Dra. María Elena Martínez Pérez

Por su colaboración en la obtención de imágenes de micronúcleos celulares:

M. en C. Dora Patricia Guzmán Bazan

Por su apoyo:

Pablo Ruiz Abrin

Físico Max de Mendizábal

AUTORIZACIÓN: Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.
NOMBRE: Antonio Lozano Vincent
FECHA: 6 de Octubre 2005
FIRMA: [Firma]

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1. Antecedentes biológicos	5
1.1. El ADN y los cromosomas	5
1.2. El ADN y la radiación ionizante	8
1.3. El tejido epitelial	10
1.4. Biomarcadores	10
1.5. Micronúcleos celulares	11
1.6. Estudios y técnicas de diagnóstico con micronúcleos celulares	11
1.7. Otras anomalías	14
1.8. Confiabilidad del conteo manual	15
CAPÍTULO 2. Procesamiento de imágenes en Biomedicina	16
2.1. Técnicas de segmentación de imágenes digitales	16
2.2. Perfiles de una imagen	18
2.3. Remoción de fondo	19
2.4. Color	22
2.5. Herramientas de morfología matemática	26
2.6. Criterios de análisis de imágenes binarias	29
CAPÍTULO 3. Análisis de imágenes citológicas con micronúcleos	31
3.1. Adquisición	33
3.2. Digitalización	33
3.3. Realce	33
3.4. Remoción de fondo	37
3.5. Segmentación de núcleos y micronúcleos	39
3.6. Operaciones de restauración morfológica	40
3.7. Extracción de atributos	43
3.8. Análisis de atributos	43
3.9. Conteo	44
3.10. Separación de objetos en contacto	49
CAPÍTULO 4. Resultados y discusión	51
4.1. Detección y conteo	51
4.2. Discusión	54
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	57
ANEXO A. Programa de análisis de imágenes ImageJ	59
ANEXO B. Programas de análisis en Matlab vers. 6.0	61
REFERENCIAS	64

RESUMEN

Resulta de gran interés para la comunidad científica y la sociedad en general, encontrar métodos de diagnóstico para la detección oportuna de enfermedades graves como el cáncer. Para lograr lo anterior, tanto en los individuos como en grupos o poblaciones, es necesario encontrar biomarcadores adecuados así como técnicas para la evaluación de los mismos. Los micronúcleos celulares son configuraciones que aparecen en las células como un pequeño núcleo satélite alrededor del núcleo principal. Estos han sido reportados como indicadores de daño al ADN, ya que diversos estudios revelan que su incidencia es mayor en individuos expuestos a ciertos genotóxicos; es por ello que una presencia mayor de micronúcleos se considera como un indicador de riesgo de cáncer.

Este método tiene además potencialidad para ser automatizado, lo que aumentaría su eficiencia y rapidez. En el presente trabajo describimos el empleo de técnicas de procesamiento y análisis de imágenes para este fin, basados en programas para computadoras personales. El método consiste en que, a partir de imágenes digitales con micronúcleos celulares, separar nuestros objetos de interés, en este caso núcleos y micronúcleos; estos objetos serán analizados y filtrados con técnicas de morfología matemática, entre otras, para posteriormente ser contados y evaluar el número de micronúcleos presentes en la imagen.

Por la complejidad de las imágenes biológicas, se hizo un tratamiento inicial a éstas y se aplicaron técnicas de remoción de fondo antes de segmentar la imagen; posteriormente se aplicaron técnicas de restauración morfológicas para remover objetos ajenos a nuestro interés, que pudieron haber sido incluidos en la segmentación, así como para completar una parte de la información que no se pudo segmentar adecuadamente. Finalmente se realizó un análisis de atributos de los objetos segmentados mediante un filtrado morfométrico antes de realizar el conteo de los micronúcleos presentes en las imágenes. Para dicho análisis, se hizo un estudio inicial del problema con el programa de procesamiento de imágenes *ImageJ* para un conteo posterior en *Matlab*. Posteriormente se realizó todo el análisis en un programa de *Matlab*.

Los resultados obtenidos muestran que nuestro sistema no es aun confiable, sin embargo identificamos parte importante de los problemas, e indicamos de qué manera el sistema puede ser mejorado. Es importante señalar que la literatura reporta una baja confiabilidad del conteo manual como se realiza actualmente, por lo que inclusive un sistema automatizado de conteo de micronúcleos con una eficiencia de conteo relativamente baja (cociente de células detectadas/células existentes), pero de alta precisión (incertidumbre pequeña), puede ser de gran ayuda para una mejor caracterización y para el conteo de micronúcleos celulares.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones cromosómicas son eventos asociados no solo a una transformación maligna, sino también a esterilidad, pérdidas fetales y malformaciones congénitas. Hoy en día se acepta que enfermedades graves como el cáncer son producto de diversos agentes físicos o químicos como el arsénico, entre muchos otros. El detectar a tiempo los cambios biológicos iniciales producidos por dichos agentes, resulta importante para prevenir estos padecimientos. Así mismo, la presión actual de grupos ambientalistas, entre otros, han dado gran importancia a la búsqueda de formas de medir efectos y alteraciones biológicas debido a la presencia de agentes carcinogénicos como el arsénico o la radiación ionizante.

En principio cualquier tóxico capaz de alterar el código genético es potencialmente generador de enfermedades como el cáncer. La presencia de alteraciones cromosómicas es uno de los indicadores mas utilizados para el establecimiento de riesgo para cáncer. El ensayo de micronúcleos (MN) constituye una prueba relativamente sencilla que permite investigar la presencia de daño cromosómico tanto “in vitro” como “in vivo”. Los micronúcleos se producen por roturas de cromosomas o cromosomas enteros que no se incorporan en las células hijas luego de una división celular y se observa como un “núcleo pequeño”, satélite, junto al núcleo celular (ver figura 1.4).

Uno de los tejidos de interés para determinar la presencia de micronúcleos son los tejidos epiteliales, ya que el 90% de los cánceres se originan en ellos (Cairos, 1975). Existen numerosos reportes en los que se ha demostrado la inducción de micronúcleos en tejido epitelial por carcinógenos (Gonsebatt, 2000). Es por ello que su presencia se considera como un indicador de exposición a este tipo de agentes; sin embargo, debido a que tradicionalmente se requiere de una persona que cuente directamente los micronúcleos que pueda observar a través de la imagen de un microscopio, su aplicación como método masivo de diagnóstico presenta desventajas tales como el ser lento, tedioso y con cierto carácter subjetivo, por lo que la variabilidad entre el análisis realizado por dos o más personas puede ser elevada (Tolbert, 1992).

En este trabajo presentamos la opción de realizar el conteo de micronúcleos con técnicas de análisis de imágenes digitales, permitiendo que el análisis sea más rápido y sencillo, se guarde la información obtenida directamente en un archivo de computadora, y sea menos subjetivo con respecto al conteo manual de los micronúcleos celulares.

OBJETIVOS

1. Evaluar las técnicas de análisis de imágenes digitales para el conteo automático de micronúcleos celulares.
2. Caracterizar, en términos de parámetros visuales de forma y relaciones espaciales, las configuraciones de micronúcleos.
3. Desarrollar programas de análisis de imágenes digitales de micronúcleos celulares con el propósito de contar de los micronúcleos contenidos en dichas imágenes
4. Validar y obtener medidas de error para cuantificar la confiabilidad de los métodos.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

En el capítulo 1 se revisan los antecedentes de biología celular, biomarcadores en general y en particular sobre el uso de micronúcleos como indicadores de daño celular, así como algunos aspectos del análisis de imágenes de microscopía en general y su aplicación a la detección y conteo de micronúcleos.

En el capítulo 2 se explican la teoría y aplicaciones del análisis y procesamiento de imágenes digitales que fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo y que han demostrado su utilidad en problemas de biomedicina. Se explica lo que es la segmentación, se define lo que es el perfil de una imagen, además de técnicas de remoción de fondo, el análisis de las componentes de color y se describen algunas herramientas de morfología matemática. Finalmente se habla de algunos criterios morfométricos de análisis de imágenes binarias (circularidad, área y distancia).

En el capítulo 3 se describe paso a paso la aplicación de las técnicas descritas en el capítulo 2 para la detección y conteo de los micronúcleos, incluyendo, para el tipo de imágenes de este trabajo, las etapas de adquisición, digitalización, realce, remoción de fondo, segmentación, operaciones de restauración morfológica, extracción de atributos, análisis de atributos y conteo.

En el capítulo 4 se presentan los resultados del trabajo descrito en el capítulo 3, y una discusión y análisis de estos resultados.

CAPÍTULO 1.

Antecedentes biológicos

En el presente capítulo se describen las bases biológicas del trabajo. Se muestra como el ADN forma cromosomas dentro de las células eucariontes y cómo el ADN puede ser dañado por diversos factores físicos y químicos, y se menciona especialmente a la radiación ionizante. Finalmente se define lo que es un *micronúcleo celular* y los convencionalismos existentes para su identificación.

1.1. EL ADN y los cromosomas

El ADN tiene una estructura en forma de escalera torcida, donde cada “escalón” es una unión de bases unidas con un enlace débil conocido como puente de hidrógeno, mientras que cada lado de la escalera está compuesto de un azúcar conocida como desoxirribosa, y la unión de cada eslabón de desoxirribosa está unida por un tipo de enlace fuerte conocido como fosfodiéster.

El largo total del ADN celular dentro de las células es de cientos de miles de veces la longitud de la célula que lo contiene; por lo que el empaquetamiento del ADN celular en cromosomas es crucial en la arquitectura celular. Por ejemplo en el caso de las células de la bacteria *E. coli* se tiene que ADN de 1mm de largo está contenido en una célula de 2µm de largo y de 0.5 µm a 1.0 µm de ancho (Lodish, 1999 p. 320-329).

Diversos mecanismos deben de actuar para empaquetar la molécula de ADN dentro del volumen celular. Por ejemplo a lo largo de la molécula de ADN se ejerce una repulsión negativa debido a los grupos fosfato que se encuentran a lo largo de ésta.

Las proteínas más abundantes asociadas con el ADN en el caso de las células eucariontes son las *histonas*. Los cinco tipos mayores de histonas son ricos en aminoácidos positivamente cargados que interactúan con los fosfatos cargados negativamente en la molécula de ADN.

Cuando a la molécula de ADN se le aísla compactada con gran cantidad de proteínas, ésta forma un complejo llamado *cromatina*. Cuando se observa la cromatina en el microscopio electrónico a bajas concentraciones de sal, la estructura que se observa en la cromatina se asemeja a una cadena de “cuentas eslabonadas”. A cada una de estas “cuentas” se les llama *nucleosomas*. La figura 1.1 nos muestra una representación del ADN y los nucleosomas.

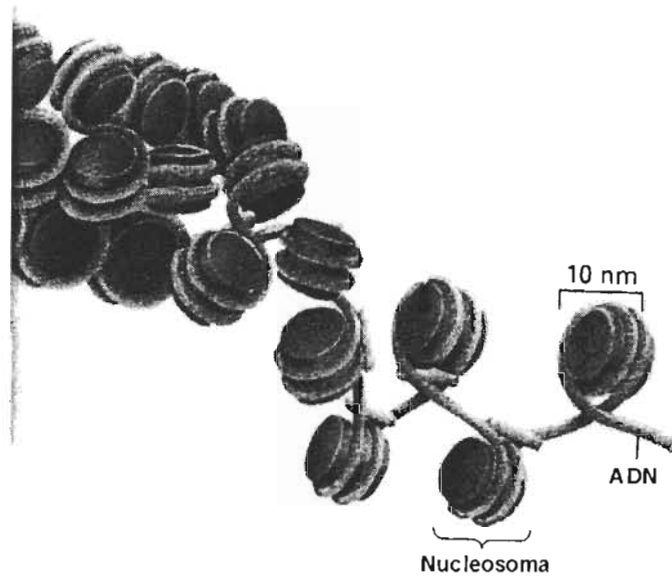


Figura 1.1. Molécula de ADN (fuente: Lewin, 1997).

La cromatina está organizada en largas unidades de cientos de miles de kilobases de ADN llamadas *cromosomas*. Durante la mitosis los cromosomas se condensan y son visibles bajo el microscopio. El número, tamaño y forma de los cromosomas en metafase, constituye el *cariotipo*, que es distintivo de cada especie. En la mayoría de los organismos, todas las células tienen el mismo cariotipo. Sin embargo, especies que parecen ser muy similares pueden tener cariotipos muy diferentes.

Aunque las histonas son las proteínas predominantes en los cromosomas, existen otras proteínas involucradas en su estructura. Largas vueltas de ADN se “anclan” a un *andamiaje cromosómico* compuesto por proteínas distintas a las histonas. La figura 1.2 nos muestra de manera esquemática la estructura del empaquetamiento de los cromosomas durante la metafase.

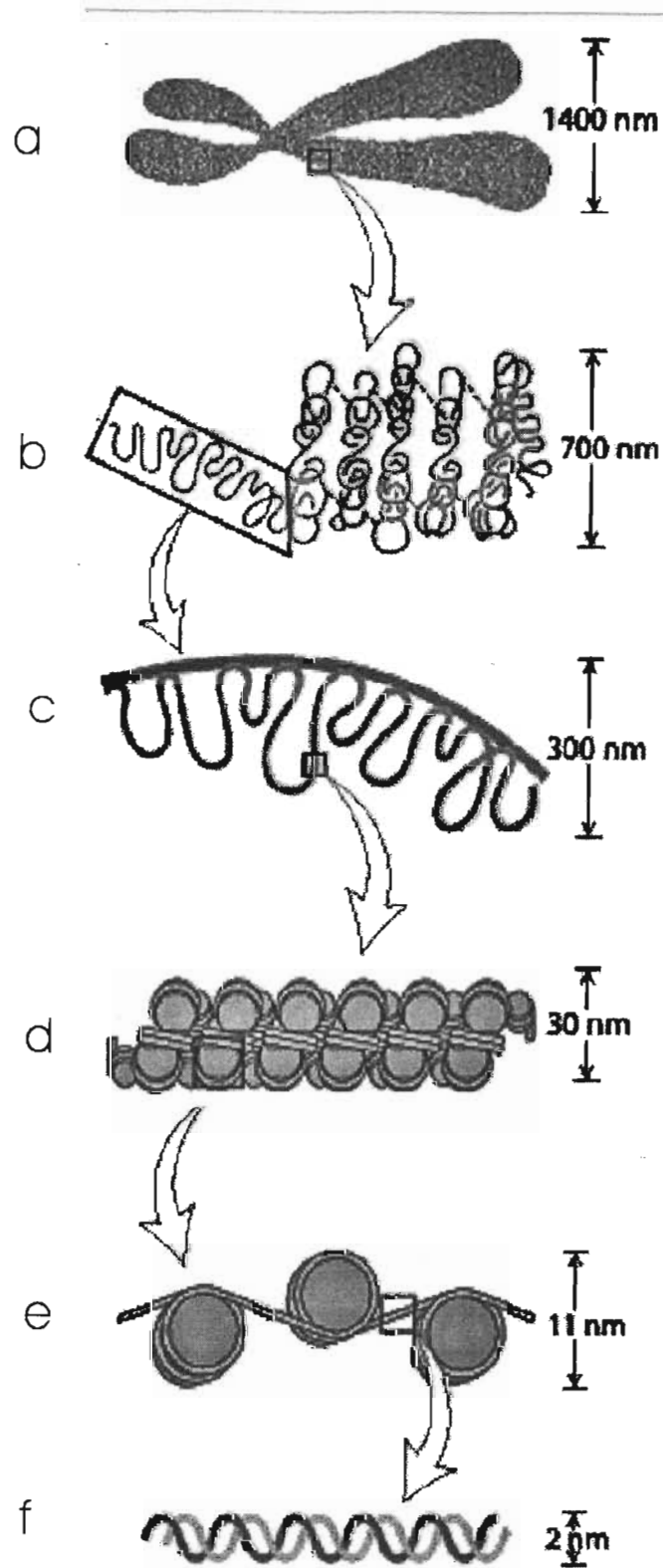


Figura 1.2 (a) Cromosoma (b) Andamiaje cromosómico condensado (c) ADN anclado al andamiaje cromosómico (d) Histonas condensadas (e) ADN enrollado en histonas (f) ADN (Lewin, 1997).

1.2. El ADN y la radiación ionizante

Un agente físico capaz de alterar la información genética es la radiación ionizante. Esta puede causar daño directo a la molécula de ADN, principalmente rompiendo los enlaces de fosfodiéster originando daños como rompimientos únicos o dobles de cadena, o también al interactuar la radiación con los compuestos del medio en que está inmerso el ADN. Estos compuestos al ser alterados pueden a su vez dañar a la información genética; un ejemplo de esto ocurre cuando al interactuar la radiación con proteínas, éstas, una vez alteradas (como radicales libres) pueden interactuar con el ADN, pegarse y formar lo que se conoce como complejos ADN proteína. La figura 1.3 muestra algunos de los daños posibles a la molécula del ADN. El rompimiento de cadena se puede observar en las células en mitosis como rompimientos a nivel de los cromosomas. Estos rompimientos pueden dar origen a micronúcleos celulares.

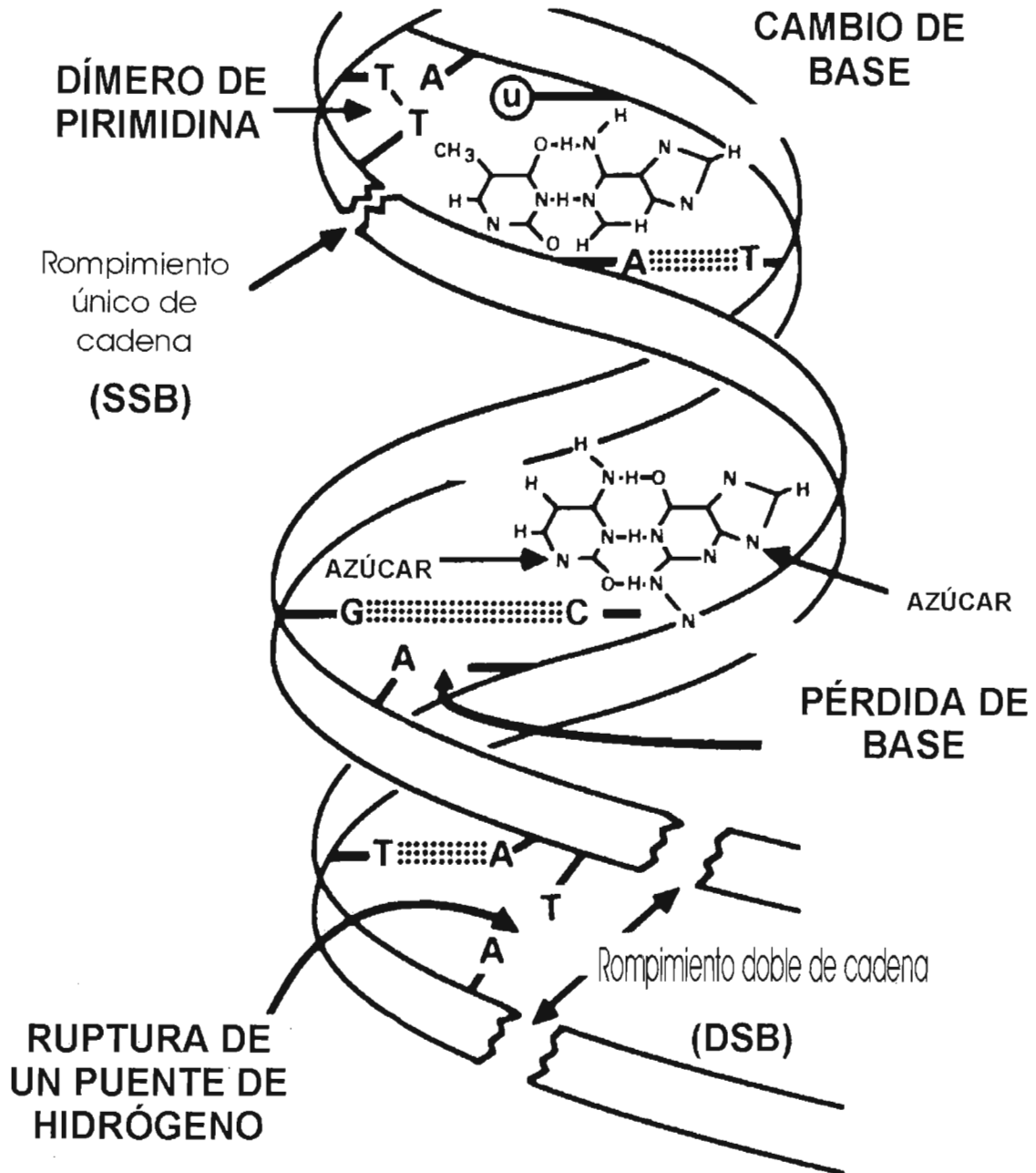


FIGURA 1.3. Algunos daños posibles a la molécula de ADN (Lewin, 1997).

1.3. El tejido epitelial

Los tejidos epiteliales cubren la superficie externa del cuerpo humano y la superficie interna de órganos cavitarios tales como nariz, boca, estómago, vejiga, túbulos renales, vagina, etcétera. Las células están directamente pegadas a la base de la membrana (gastrointestinal, tracto, nasofaríngeo, etcétera), en una sola capa epitelial, o puede estar estratificada y sólo las células basales están en contacto directo con la base de la membrana y las restantes se sobreponen unas a otras en un número variable de capas (cavidad oral, esófago, vagina, vejiga, etcétera). Las células se desprenden después de un periodo de tiempo que varía de un tejido a otro, por ejemplo, la vida promedio en la nasofaringe es de 15 días mientras que en la próstata es de 60 días (Gonsebatt, 2000). El reemplazo tiene lugar debido a las continuas divisiones mitóticas de las células basales indiferenciadas. Después de la división las células epiteliales maduran y se diferencian. Estos cambios normales así como alteraciones patológicas pueden ser observados en células desescamadas o exfoliadas. Es por eso que han sido ampliamente usadas en exámenes histopatológicos para detectar cambios anormales, pre-malignos o cáncer (Naib, 1996 p. 1-14). El epitelio en contacto constante con aire y agua contaminada, y con tóxicos ingeridos así como sus metabolitos en el cuerpo, en fluidos como la orina, sufren el encuentro más directo y dañino con el mundo exterior (Gonsebatt, 2000).

1.4. Biomarcadores

Para detectar el daño al ADN se pueden utilizar diferentes estrategias, una de ellas consiste en la observación de la integridad cromosómica o en la aparición de cuerpos extranucleares o micronúcleos. El daño cromosómico o la presencia de micronúcleos son considerados biomarcadores de daño al ADN. De manera más general un biomarcador se define como cualquier alteración biológica que puede ser medible en tejido, células o fluidos corporales (Hulka 1990).

En principio y de manera general podemos hacer la siguiente clasificación de biomarcadores (Guzmán, 1997 p. 3-5):

- a) **Indicador de exposición:** es el indicador que permite conocer las dosis de exposición de los organismos a contaminantes ambientales. Estos indicadores pueden ser *externos* cuando es la concentración o cantidad de material xenobiótico en el medio ambiente en el que vive un organismo, o *internos* cuando se trata de la cantidad de xenobiótico que es transferida o absorbida por el organismo y que al interactuar con un receptor celular o un blanco tisular crítico se inicia entonces un efecto biológico (dosis biológicamente efectiva).
- b) **Indicador de efecto:** son alteraciones que sufren los sistemas biológicos a nivel bioquímico, fisiológico y genético (estructural o numérico) y se utilizan para evaluar el riesgo potencial o efectivo por la exposición a un agente xenobiótico.
- c) **Indicador de susceptibilidad:** es un marcador biológico que permite conocer una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición de un agente xenobiótico específico.

1.5. Micronúcleos celulares

Como ya se mencionó anteriormente, las aberraciones cromosómicas son eventos importantes en los procesos de iniciación y promoción tumorales por lo que su presencia es indicativa de un riesgo mayor de tener cáncer (Guzmán, 1997).

Una aberración cromosómica que Guzmán (1997) reporta como un biomarcador de daño producido por exposición crónica a arsénico, son los micronúcleos celulares. Los micronúcleos celulares son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no son incorporados en el núcleo durante la división celular, apareciendo en la célula como pequeños núcleos secundarios, debido a rompimiento cromosómico y a la no disyunción de los cromosomas por interferencia o mal funcionamiento del huso mitótico (Evans y cols., 1959 p. 216-229; Matter y Schmid, 1971; Heddle, 1973; Yamamoto y Kikuchi, 1980) (ver figura 1.4), y que pueden resultar de la exposición a agentes ambientales (Vine, 1990).

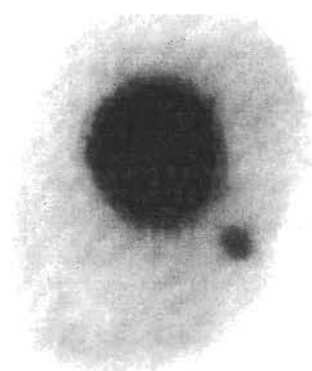


Figura 1.4 Célula con un micronúcleo celular

1.6. Estudios y técnicas de diagnóstico con micronúcleos celulares

La tabla 1 nos muestra una serie de estudios de campo realizados en individuos expuestos a agentes carcinogénicos o potencialmente carcinogénicos. Por ejemplo, notamos que en los estudios realizados por Sarto, (1990b), para óxido de etileno y ácido crómico en mucosa bucal y tejido nasal, no existe un incremento en la presencia de micronúcleos en los individuos expuestos con respecto a los controles, pero Tolbert, (1992), reporta una mayor presencia de micronúcleos en pacientes de radioterapia con respecto a sus controles.

Sin embargo el método de diagnóstico mediante presencia de micronúcleos tiene una desventaja que consiste en que una persona debe de identificar y contar los micronúcleos en muestras observadas a través de un microscopio, lo cual resulta un trabajo lento y tedioso sobre todo cuando se tienen muchas muestras que analizar. Con una identificación y conteo únicamente manual, el procedimiento resulta laborioso y desde el punto de vista biológico esto resulta desventajoso por su carácter subjetivo, por lo que, considerándolo un potencial sistema masivo de

diagnóstico de riesgo de cáncer, este método resulta poco eficaz debido al carácter subjetivo mencionado. En el caso de la cuantificación, para medir áreas y distancias pudiera ser más conveniente usar computadoras. Actualmente la tecnología y técnicas de procesamiento y análisis de imágenes digitales de microscopía óptica nos brindan la posibilidad de automatizar, parcial o totalmente el conteo de micronúcleos, mediante la digitalización de la imagen del microscopio, para ser enviada a una computadora, la cual, mediante operaciones de filtrado, segmentación, reconocimiento de patrones y morfometría, posibilita obtener automáticamente una estimación de los micronúcleos presentes en la imagen, sin embargo en el momento actual no existe un sistema de conteo automatizado de micronúcleos celulares.

Tabla 1.1. Media prevaleciente de células micronucleadas en tejidos epiteliales exfoliados de individuos en riesgo (controles reportados por el autor de referencia). (Gonsebatt, 2000).

Condición de riesgo o exposición a:	Media de Micronúcleos/1000 células			Referencia
	Tipo de célula	Controles	Expuestos	
Masticar nuez de bettel	Mucosa bucal	4.1	46.8	Stich 1985
Masticar nuez de squid			72.5	
Fumar y beber etanol			22.9	
Fumar y beber café	Vejiga urinaria	5.6	47	Sarto 1987
Fumar			0.66	
		0.5	2.9	
	Mucosa bucal	0.7	2.4	Fontham 1986
	bronquios	1.2	2.8-3.6	
Cerviz uterino	0.7	1.2-3.7		
Masticar tabaco	Mucosa bucal	2.7	22.2	Livingston 1990
Síndrome de Bloom heterocigótico		2.8	4.4	Rosin y German 1985
Síndrome de Bloom homocigótico	41.5			
Síndrome de Bloom heterocigótico	Vejiga urinaria	24.2	3.0	Rosin 1989
Síndrome de Bloom homocigótico			44.4	
Ataxia Telangiectaxia homocigótica	Mucosa bucal	2.9	10.2	Rosin 1989
Ataxia Telangiectaxia heterocigótica			15.1	
Ataxia Telangiectaxia homocigótica	Mucosa bucal	0.71	0.65	Tomanin 1990
Cánceres de la parte alta del tracto digestivo			1.3	2.6
Schistosoma haematobium	Vejiga urinaria	5.3	71.17	Rafaat 1984
		1.2	8.4	Anward y Rosin 1993
Fumadores	0.9	9.5		
No fumadores		1.3	7.9	
Pacientes de radioterapia	Mucosa bucal	0.3	5.2	Tolbert 1992
Aminas aromáticas fumadores	Vejiga urinaria	3.0	4.2	Ribeiro 1990
Aminas aromáticas no fumadores		2.6	3.2	
Curtidores de cuero (cromato) fumadores		9.7	10.5	González Cid 1991
Curtidores de cuero (cromato) no fumadores		4.0	9.6	
Formaldeido	Nasal	0.25	0.90	Ballarim 1992
Oxido de etileno			0.44	0.77
	Mucosa bucal	0.51	0.48	
Ácido crómico		Nasal	0.44	0.50

Una vez adquirida y digitalizada la imagen será necesario aplicar un método de segmentación, que consiste en aislar componentes de las configuraciones de núcleos y micronúcleos de la imagen. Estas configuraciones son identificadas mediante técnicas de reconocimiento de patrones y criterios de forma, distancia y relación espacial.

Estos son los criterios que debe de cumplir un objeto para ser considerado micronúcleo celular (Tolbert, 1992):

- Redondos con un perímetro suave, sugestivo de una membrana.
- Menos de un tercio del área respecto del núcleo asociado, pero suficientemente grande para discernir forma y color.
- Intensidad de color similar a la del núcleo.
- Textura similar a la del núcleo.
- Mismo plano focal que el núcleo.
- Ausencia de traslape o unión al núcleo.

1.7 Otras anomalías

Existen gran cantidad de anomalías que pueden confundirse con micronúcleos celulares (Tolbert, 1992); entre ellas podemos citar *células binucleadas* o la presencia de dos núcleos en una célula, *broken eggs* (“huevos rotos”), o células que parecen ser apretadas con una banda *feulgenética*; está además la *piconosis* o núcleos reducidos, la *cromatina condensada* en cuyo núcleo la cromatina parece agregada, la *karyorrhexis* o disgregación nuclear, que involucra pérdida de integridad del núcleo, y la *karyolysis* o disgregación nuclear, en cuya *feulgen-negativa* permanece una “imagen fantasma del núcleo”. La figura 1.5 nos muestra esquemáticamente cada una de estas anomalías. Arriba de la figura 1.5 aparece un micronúcleo “ideal”, como referencia.

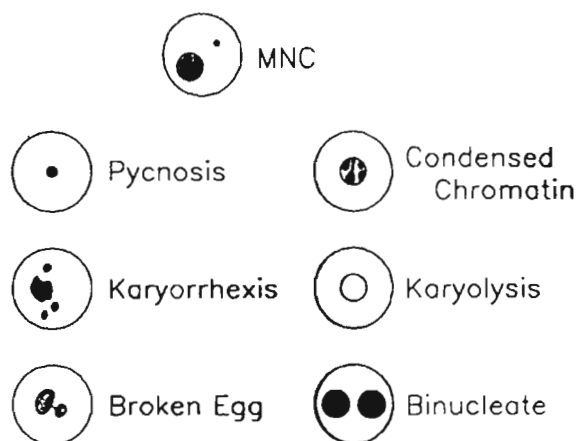


Figura 1.5. Algunas anomalías que pueden ser confundidas con micronúcleos celulares.

1.8 Confiabilidad del conteo manual

Tolbert, (1992) reporta que discusiones con otros investigadores indican diferencias significativas en el método, la interpretación en el enfoque de varios laboratorios, respecto de cuando se trata de las alteraciones de la figura 1.5 o micronúcleos. Parece haber una falta de consenso con respecto al criterio del conteo de micronúcleos, y los desacuerdos consisten en: las formas permitidas del objeto para ser considerado micronúcleo; si es requerida o no la suavidad del contorno del objeto sugiriendo una membrana; el grado de separación requerido entre el objeto y el núcleo; si el contraste de fase en la iluminación es necesario; el tamaño máximo y mínimo para que un objeto sea considerado micronúcleo, y lo mas importante: restricciones en cuanto al la integridad del núcleo asociado, en términos del grado de pycnosis, cromatina condensada y karyolisis.

La tabla 1.2 nos muestra la confiabilidad del conteo manual de cada una de las anomalías mostradas en la figura 1.5. La *confiabilidad intra-observador* se midió repitiendo los conteos de anomalías en una muestra de tejido con el mismo observador, mientras que la *confiabilidad general* se realizó repitiendo los conteos con distintos observadores.

Tabla 1.2. Confiabilidad del conteo manual de diversas anomalías (Tolbert, 1992)

Anomalía	Confiabilidad intra-observador (%)	Confiabilidad general(%)
Micronúcleos	76.6	47.2
Bincucleadas	80.6	80.6
Broken eggs	90.6	73.4
Pycnosis	92.6	78.2
Cromatina Condensada	99.3	98.8
Karyorrhexis	97.6	81.5
karyolysis	99.95	99.9

Como se nota en la tabla 1.2 la confiabilidad mas baja se presenta con micronúcleos celulares, tanto intra-observador como en la confiabilidad general.

Es muy importante hacer notar que Tolbert reporta en el mismo artículo (pp 74-75, Tolbert, 1992) que la confiabilidad neta del conteo de micronúcleos fue de sólo 47%. Tolbert señala que lo anterior implica que la mitad de la variabilidad en los micronúcleos contados en grupos expuestos, es debida más a la variabilidad intra e inter-observador, que a la variación intrínseca de los micronúcleos (Tolbert, 1992).

Para el conteo de imágenes digitales de micronúcleos, establecimos criterios de cocientes de áreas y distancias, entre los micronúcleos y su núcleo asociado. Esto se discute en detalle en el capítulo 3.

CAPÍTULO 2. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES EN BIOMEDICINA.

En este capítulo se da una introducción teórica a los aspectos de procesamiento y análisis de imágenes digitales que fueron empleados en este trabajo, con respecto a la detección y conteo de micronúcleos celulares.

2.1. Técnicas de segmentación de imágenes digitales.

La segmentación es el proceso que subdivide una imagen en regiones constituyentes u objetos. El nivel de subdivisión que se lleva a cabo depende del problema por resolver. Esto es, la segmentación debe detenerse cuando los objetos de interés en una aplicación han sido aislados (González 2004, p. 378). En nuestro caso los objetos de interés son los núcleos y micronúcleos.

Existe una gran cantidad de técnicas de segmentación de objetos en imágenes digitales. La técnica de segmentación utilizada para el presente trabajo, es la *segmentación basada en píxeles*. La segmentación basada en píxeles es puntual, o sea que no se considera siquiera alguna vecindad local (como podría ser una *segmentación por textura*); es conceptualmente la estrategia más simple que podemos adoptar para la segmentación (Jähne, 2002 p. 427). Una de las técnicas por considerar sería obtener el histograma de la imagen y a partir de las distintas modas que aparezcan en éste, identificar la moda que corresponda a la de los objetos de nuestro interés; después se selecciona un umbral para *binarizar* la imagen de tal modo que separemos a la moda de los objetos de interés de todo lo demás. Esto lo podemos expresar matemáticamente de la siguiente manera: consideremos una imagen digital $I(x,y)$, donde el atributo escalar de intensidad satisface $0 \leq I(x, y) \leq 255$, (donde x, y son coordenadas de los píxeles dentro de las dimensiones de la imagen $M \times N$) y definamos un valor de umbral que denotaremos como θ , donde $0 \leq \theta \leq 255$. De acuerdo con esta técnica podemos definir a nuestra imagen segmentada $B_\theta(x,y)$ como:

$$B_\theta(x,y) \triangleq \begin{cases} 255 & I(x,y) > \theta \\ 0 & I(x,y) \leq \theta \end{cases} \quad (2.1)$$

Nótese que ahora obtenemos una imagen con solo dos tonos de gris posibles, 0 y 255. Tal imagen se denomina *binaria* y su información es de tipo lógico o *booleano*, correspondiendo por ejemplo el “0” a “falso” (el píxel que pertenece al fondo donde no hay ningún objeto de interés) y el “255” a “verdadero” (el píxel que corresponde a un objeto de interés). El valor de θ debe ser tal que se “segmenten” o separen los objetos de interés del resto de la imagen lo mejor posible; una de las mejores maneras de lograrlo es valerse del *histograma* de la imagen como se describe a continuación.

En el caso particular del presente trabajo, en el que se analizarán imágenes de células con sus respectivos núcleos, es de esperarse que encontremos histogramas tri-modales: una moda correspondería al fondo de la imagen, otra moda correspondería al citoplasma celular y, finalmente, otra moda correspondería a los núcleos celulares en la imagen. Identificar esta última moda es de nuestro interés, así como determinar las mejores condiciones (iluminación, contraste, etcétera) como para realzar o definir lo mejor posible el pico correspondiente a esta moda. La

figura 2.1a es una imagen digital simplificada que sirve para ejemplificar la idea fundamental de la segmentación. En la figura 2.1b podemos observar el histograma de la figura 2.1a y, finalmente, estableciendo un umbral en el pico más oscuro del histograma (el de la izquierda), podemos segmentar el núcleo, el pico central correspondería al citoplasma y, el de la derecha corresponde al fondo blanco. Al inicio tenemos una imagen en escala de grises y el resultado final es una imagen binaria (solo dos colores, generalmente blanco y negro), mostrada en la figura 2.1c (ver también ecuación 2.1). Para lograr esto se escoge en la computadora un intervalo determinado, en la escala de grises (eje horizontal), de tal modo que éste intervalo sólo abarque al pico de nuestro interés (pico de la izquierda en nuestro ejemplo); a continuación la computadora mostrará en negro todo lo que esté dentro del intervalo o umbral seleccionado y, en blanco todo lo demás.

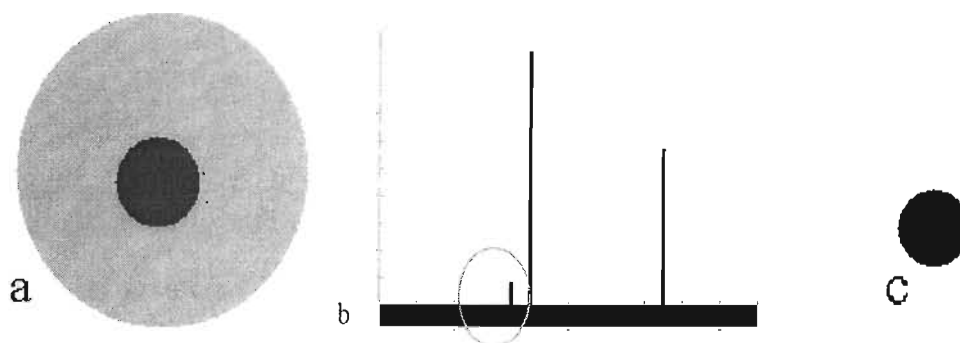


Figura 2.1. (a) se esquematiza una célula con su núcleo. En (b) encontramos el histograma de (a), el óvalo marca la parte correspondiente al núcleo (barra a la izquierda) la línea de en medio representa al citoplasma, y la última línea a la derecha el fondo blanco. (c) (por umbralaje) se obtiene al segmentar la barra o pico que se encuentra encerrado en un óvalo.

Es muy importante el tener en cuenta que la figura 2.1a fue diseñada especialmente para ejemplificar lo que aquí se ha mencionado y así entender mejor el concepto básico de la segmentación, pero esta imagen resulta sumamente burda comparada con las imágenes celulares. Por principio notemos que la figura 2.1a sólo tiene tres tonos de gris; es por ello que en su histograma (figura 2.1b) en lugar de picos con cierta dispersión solo aparecen tres barras, correspondientes a cada uno de los tres tonos de gris. En cambio las imágenes celulares generalmente tienen una gran variedad de tonos de gris (en el histograma la altura es el número de píxeles con dicho valor). En las imágenes celulares, basuras, gradientes de luz, artefactos en la adquisición, texturas variadas y complejas, son algunos de los factores que hacen que las imágenes celulares tengan histogramas muy complejos y por tanto difíciles para segmentar uno o varios objetos de interés en particular, por tanto es recomendable que estos factores sean controlados lo mejor posible para obtener los mejores resultados. La característica principal de tal complejidad es la superposición de las modas, y al clasificar un pixel como perteneciente a una u otra población se vuelve un problema que depende del contexto de dicho pixel y no sólo de su valor de gris. Por ejemplo, la figura 2.2 nos muestra una imagen de unas células y su respectivo histograma. Nótese que en el caso de la figura 2.2 de ninguna manera resulta fácil identificar, de manera exacta, qué parte del histograma corresponde a los núcleos celulares.

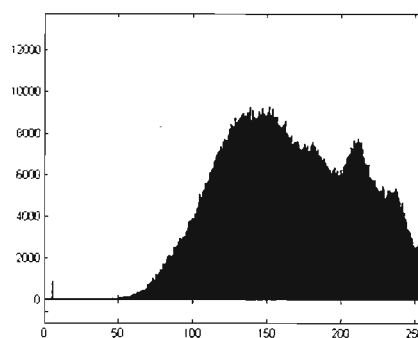
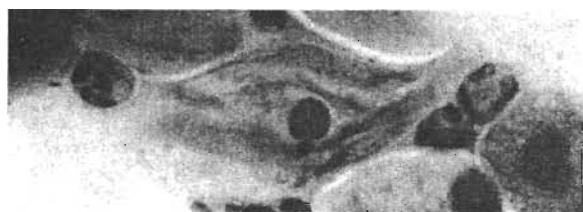


Figura 2.2. Imagen de varias células y su histograma.

Si, como en el caso de la figura 2.2, la parte del histograma que corresponde a los objetos de interés en la imagen, no es notoria o está muy traslapada con otro tipo de objetos en la imagen, puede tener como consecuencia que al tratar de segmentar los objetos de interés, con la técnica de *umbralaje* (algunos autores prefieren el término “umbralización”, otros “umbralizado”), ocurra cualquiera de estos problemas: se pierdan gran parte de los objetos de interés (que estos ya no aparezcan en la imagen final) o bien que aparezcan segmentados objetos de más, es decir que aparezcan basuras, objetos que no son de nuestro interés pero que complicarán cálculos futuros de la imagen segmentada. Si la imagen por segmentar es muy complicada y hay que optar por alguna de las dos opciones anteriores, el segmentar objetos de más, resulta mejor, ya que de este modo no perderemos información y generalmente existen otras maneras de tratar a los objetos segmentados que no son de interés, mediante técnicas de filtrado (eliminación selectiva), o diversos criterios que veremos más adelante.

Generalmente las imágenes celulares son tan complejas como la de la figura 2.2. El tratar previamente estas imágenes con técnicas de remoción de fondo ayuda hasta cierto punto en la segmentación. Una de estas técnicas, que se ha utilizado para este trabajo se describe más adelante (sección 2.3).

Finalmente, aún para una imagen ideal, los picos del histograma tendrán una dispersión o ancho efectivo debidos a la Función de Dispersión Puntual (PSF, del inglés *Point Spread Function*) del sistema de adquisición. Si esta PSF es grande, un “punto” puede producir, como respuesta del sistema de adquisición, una “mancha” (la respuesta a impulso). Otro efecto es el de *superficie parcial*, donde un objeto muy pequeño, o en las transiciones entre bordes (por ejemplo un objeto blanco sobre fondo negro), producirán una señal débil (sea el punto o el borde preciso), dando lugar a píxeles con un nivel de gris intermedio, al promediar valores de fondo y objeto.

2.2. Perfiles de una imagen

Un perfil se puede definir como un conjunto de valores de intensidad correspondientes a puntos específicos de una imagen a lo largo de una trayectoria o contorno; por ejemplo, la figura 2.3b nos muestra el perfil de la imagen 2.3a sobre la línea horizontal negra.

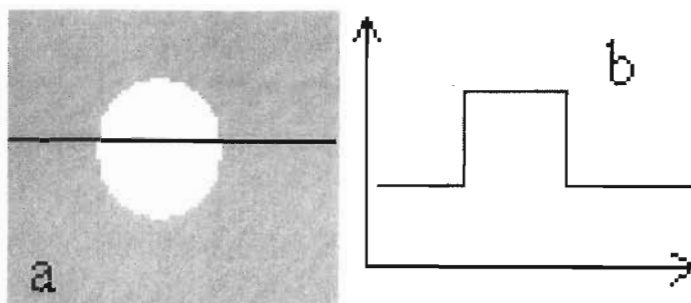


Figura 2.3. En la parte a, sobre la línea negra se crea un perfil en la parte (b), en el eje vertical se grafican las intensidades y el eje horizontal representa a los puntos a lo largo de la línea negra en la parte (a).

Los perfiles de imágenes biológicas suelen ser mucho más complejos que el de la figura 2.3. La figura 2.4 nos muestra un ejemplo de una imagen de células de cérvix.

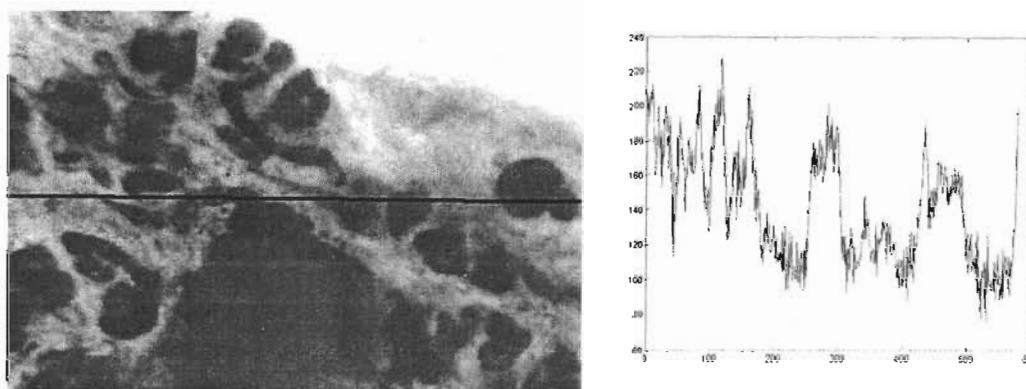


Figura 2.4 Figura de células de cerviz con un perfil sobre la línea negra

2.3. Remoción de fondo

Una técnica de remoción de fondo que ha sido de utilidad en este trabajo se describirá a continuación. Como ya se mencionó anteriormente, es necesario que los objetos de interés en la imagen estén bien contrastados y definidos. En caso contrario, una manera de mejorar la imagen hasta cierto punto, consiste en lo siguiente: primero se convoluciona la imagen con una función gaussiana bidimensional e isotrópica:

$$I_{BKG}(x, y) = I_A(x, y) * 2\pi R\sigma^2 e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (2.2)$$

Esta operación equivale, en dominio de frecuencia, a una *ventana o filtro pasa-bajas*, que caracteriza las variaciones “lentas” o gradientes suaves del fondo y excluye las variaciones “rápidas” o detalles pequeños de los objetos de interés. A continuación, se multiplica dicha imagen por un factor $\alpha < 1.0$; en nuestro caso $\alpha = 0.5$. Multiplicar la imagen por α significa que el nivel de intensidad de cada píxel es multiplicado por esta cantidad. Finalmente esta imagen obtenida es restada a la imagen original, pixel a pixel. Si llamamos I a la imagen original, y llamamos I_G a la imagen después de pasarle el filtro gaussiano, la imagen resultante de esta técnica I_R se puede expresar así:

$$I_R = I - (\alpha I_G) \quad (2.3)$$

De una manera esquemática, en la figura 2.5 se muestra lo que le sucedería al perfil de una imagen donde podríamos suponer que el pico central constituye información de interés. Notamos en la figura 2.5a un pico central que no sobresale demasiado de la imagen, mientras que después de la remoción de fondo en la figura 2.5c este pico es ahora bastante pronunciado.

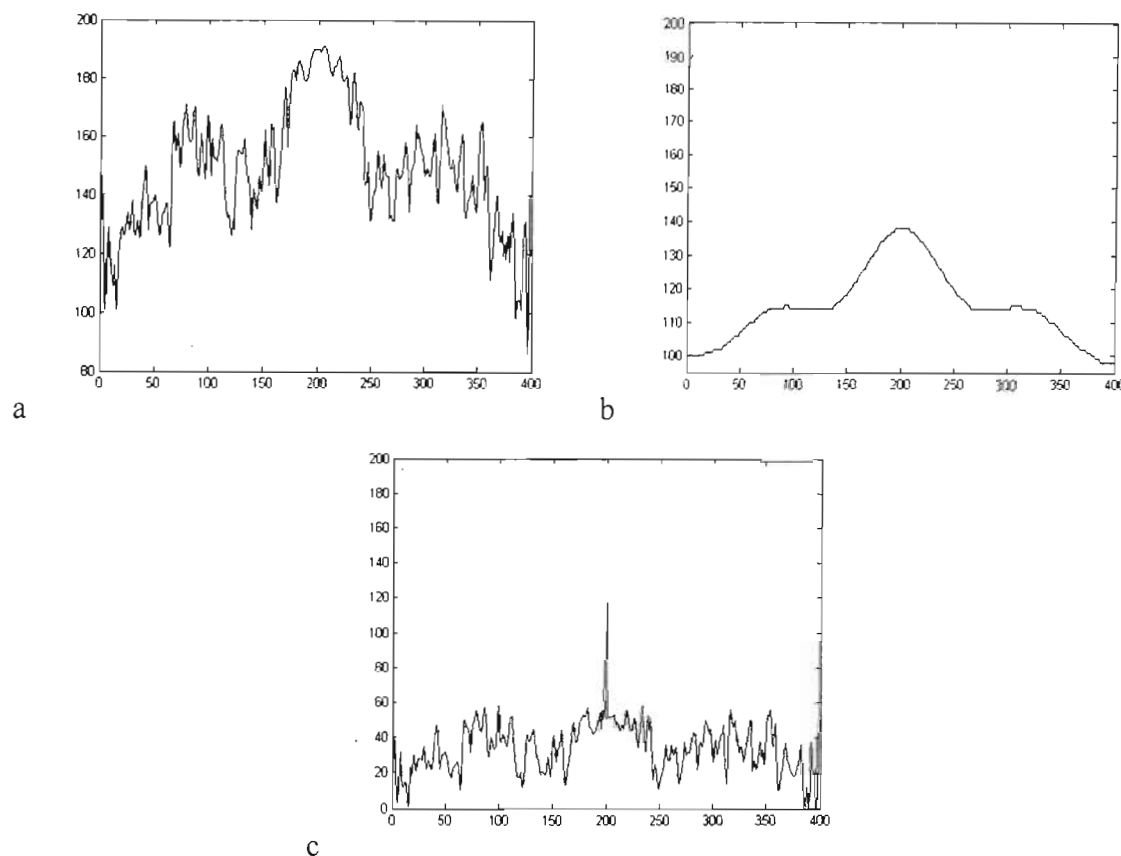
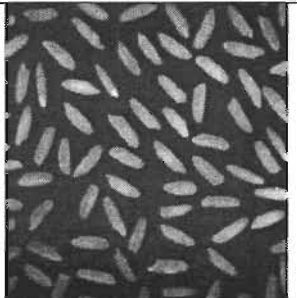
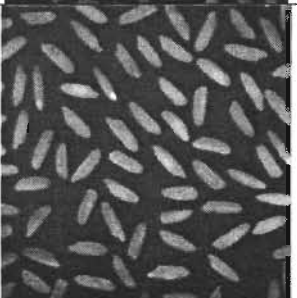
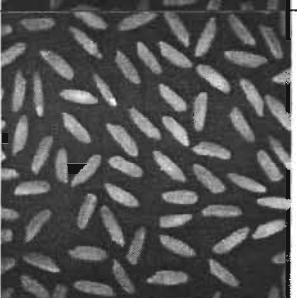
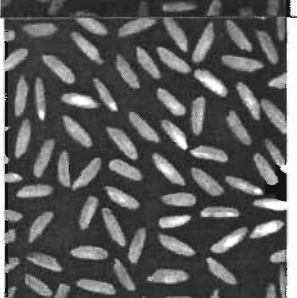
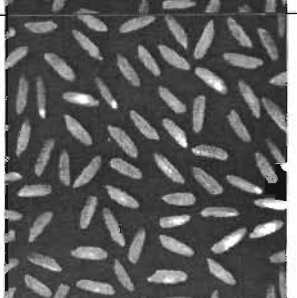


Figura 2.5. (a) El perfil de una imagen. (b) El perfil de la imagen después de pasarle un filtro gaussiano con un valor σ mayor que los detalles por examinar (ver ecuación 2) y ser multiplicada por 0.5. (Nótese que al ser multiplicada por 0.5 la curva en (b) está atenuada en esa magnitud con respecto a la figura (a). (c) A la imagen original en (a), se le resta la imagen obtenida en (b), y el resultado es este perfil (c).

En la tabla 2.1 observamos en la columna derecha una imagen a la cual se le aplicó esta técnica de filtrado, con distintos valores de α (columna central). Notamos que un valor mayor del alfa disminuye los gradientes de tonalidad en la imagen y hace más evidentes los detalles.

Tabla 2.1 Fórmula 2.3 aplicada a una imagen con distintos valores de α ; $\alpha=0$ corresponde a la imagen original

Valor de α	
0	
0.25	
0.50	
0.75	
1.00	

2.4. Color

Todo lo anterior involucra imágenes en escala de grises. Las imágenes fotografiadas en el microscopio son en color, imágenes de atributo vectorial de componentes (o canales) R,G,B, y que fueron convertidas a tres imágenes en escala de grises (imágenes escalares).

Una manera de convertir una imagen en color en una imagen en escala de gris, es separarla en sus componentes de color y seleccionar el canal donde la información de interés aparece más contrastada. Otra manera es utilizar la imagen monocromática equivalente, que por su simplicidad suele tomarse como $I_{\text{mono}}=(1/3)I_R+(1/3)I_G+(1/3)I_B$. La figura 2.6a muestra una imagen monocromática de la bandera italiana, con un cielo azul como fondo. En la figura 2.6b vemos a la misma imagen en su canal rojo; nótese cómo es más claro el lado derecho de la bandera que, como sabemos, es de color rojo. Lo mismo pasa con el lado izquierdo de la bandera en la figura 2.6c, que nos muestra el canal verde. Mientras que en el canal azul en la figura 2.6d el cielo se ve muy claro.

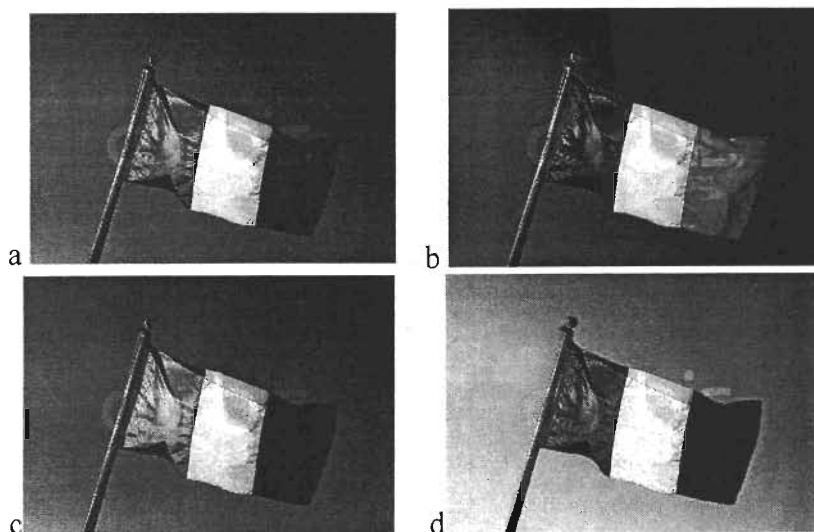


Figura 2.6. a) Imagen en escala de grises de la bandera de Italia. b) Canal rojo de la imagen en color de la cual fue sacada la imagen en la figura 14a, mientras que en la parte c) vemos el canal verde y en d) el canal azul. (Tomada de Corbis <http://pro.corbis.com/>)

En general, una imagen en escala de gris se puede formar con una combinación lineal de los tres canales:

$$\text{imagen} = \omega_r \text{rojo} + \omega_g \text{verde} + \omega_b \text{azul} \quad (2.4)$$

Donde ω_r , ω_g , ω_b son factores de peso a los canales rojo verde y azul respectivamente.

Por ejemplo, para formar una imagen en escala de gris convencional sería natural pensar en el promedio, es decir $\omega_r=\omega_g=\omega_b=1/3$, como ya se mencionó. Los pesos ω_r , ω_g y ω_b dependen del

modelo de percepción en color y además de cómo se reparte la información entre los canales rojo verde y azul; en nuestro caso es deseable obtener un máximo contraste de núcleos y micronúcleos respecto al resto de la imagen.

La figura 2.7a nos muestra una imagen epitelial de cérvix en escala de grises convencional, mientras que las imágenes 2.7b, 2.7c y 2.7d nos muestran la imagen en sus canales rojo verde y azul respectivamente.

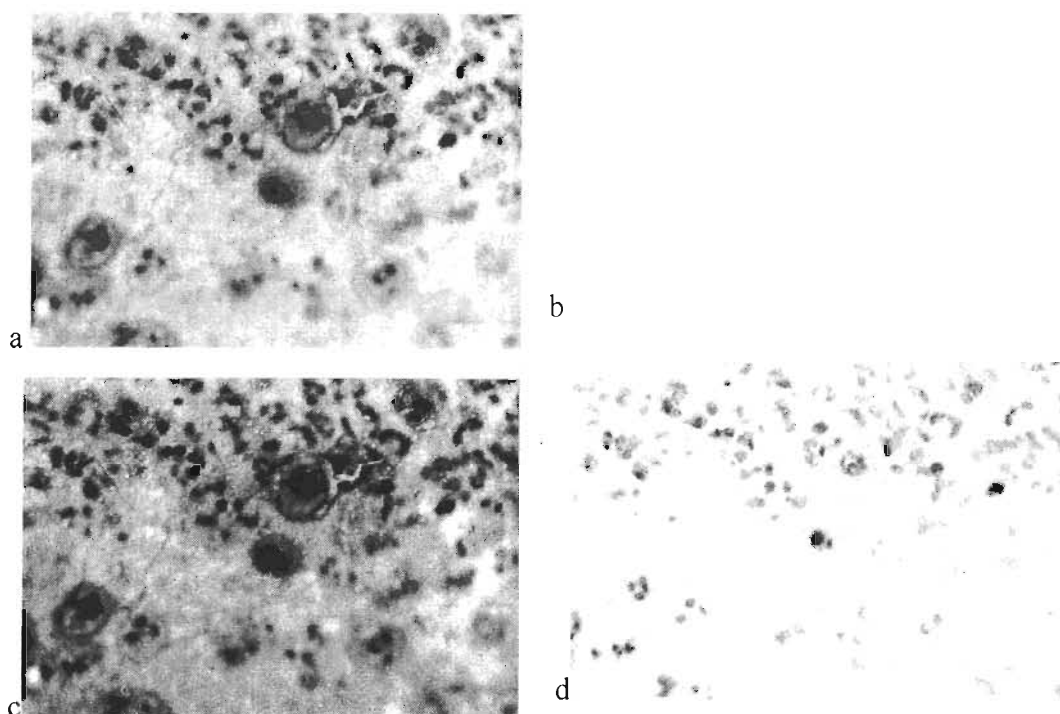


Figura 2.7. (a) Imagen en escala de grises de células epiteliales de cervix. (b) Canal rojo de la imagen. (c) Canal verde de la imagen. (d) Canal azul.

Si lo que nos interesa, de todas las estructuras de la imagen, son los núcleos y micronúcleos, notamos gran cantidad de rojo en toda la imagen, porque la imagen se ve demasiado clara en este canal y pocas estructuras se alcanzan a distinguir. Mientras que en el canal verde vemos muchas estructuras pero aunque en principio la imagen se ve muy contrastada, hay en realidad muy poco contraste en los objetos de interés, mientras que en el canal azul, aunque en apariencia es poco contrastado, podemos distinguir perfectamente al núcleo y micronúcleo. Por ello en este caso particular es conveniente tomar una imagen en escala de grises que sólo tome en cuenta ese canal, justo la imagen de la figura 2.7d ($\omega_b=1$, $\omega_r=\omega_g=0$). Nótese que, en términos generales, la imagen más contrastada es la imagen 2.7c, sin embargo, nuestro interés es el máximo contraste sólo de núcleos y micronúcleos respecto al resto de la imagen, por eso es más conveniente trabajar con la figura 2.7d que con la 2.7c.

Un ejemplo de lo conveniente que resulta utilizar los distintos canales de color se muestra en la figura 2.8. En la figura 2.8a vemos una imagen de una célula de cervix con un micronúcleo, combinando los tres canales de color como se hace de manera convencional. La figura 2.8b muestra la imagen 2.8a segmentada; en este caso el núcleo y el micronúcleo forman un solo objeto, en vez de dos objetos separados, de este modo resultará muy difícil detectar el micronúcleo en los pasos siguientes. En el capítulo 3 se describe un método para separar objetos en contacto. En la figura 2.8c tenemos una imagen en escala de grises formada por el promedio de los canales rojo y azul ($\omega_r=\omega_b=1/2$, $\omega_g=0$), y su imagen segmentada es la 2.8d; en este caso el núcleo y el micronúcleo fueron segmentados de manera adecuada, formando dos objetos distintos.

2.5. Herramientas de morfología matemática

Después de la segmentación obtenemos una imagen con píxeles blancos y negros. Grupos de píxeles contiguos forman objetos individuales llamados *componentes conexas*; existen principalmente dos convencionalismos para decir que un conjunto de píxeles forma un objeto (González, 2004 p. 359-362). Se dice que dos píxeles son *4-conexos* si son adyacentes por borde (vertical u horizontalmente). La figura 2.8 nos muestra una imagen binaria, el conjunto de píxeles negros nos muestra 3 rectángulos a b y c respectivamente. Todos son objetos separados con 4-conectividad y aunque los rectángulos b y c se “tocan” sus píxeles no son conexos, ya que los píxeles de las esquinas no lo hacen por borde sino por vértice, en diagonal, por lo que los rectángulos b y c forman objetos separados. Se dice que dos objetos son *8-conexos* si estos son adyacentes vertical, horizontalmente o también diagonalmente. De este modo, en la figura 2.9, el rectángulo (a) forma un objeto separado; sin embargo esta vez los rectángulos (b) y (c) forman un solo objeto ya que son conexos en una esquina.

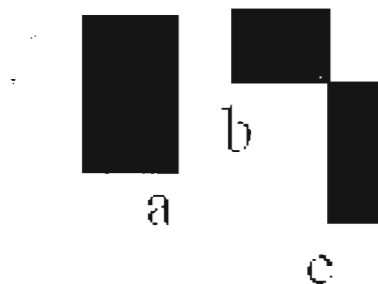


Figura 2.9 Figura binaria con tres rectángulos, el rectángulo a forma un objeto separado, sin embargo los rectángulos b y c son un par de objetos distintos con 4-conectividad pero forman un solo objeto con 8-conectividad, pues están conectados por vértice.

Existen numerosas herramientas de procesamiento y análisis de imágenes digitales dentro del marco de la *Morfología Matemática* (MM), que estudia relaciones espaciales y de formas mediante axiomas de la teoría de conjuntos. El principio es considerar los objetos como conjuntos de puntos (las coordenadas de los píxeles que forman parte de cada objeto) y las operaciones entre objetos son definidas a partir de operaciones entre conjuntos (unión, intersección, diferencia, complemento, etc.). En las imágenes binarias sólo hay dos intensidades y carece de sentido estudiar variaciones en la dimensión de intensidad; en cambio los contornos mismos de los objetos binarios y su interior son el objeto de procesamiento y análisis de la MM en imágenes binarias. En imágenes donde existan objetos superpuestos o unidos por defectos de la imagen original, es posible que algunas de las operaciones de MM permitan separar dichos objetos para su análisis. En general estas operaciones se van realizando en la vecindad de cada punto o píxel y su tamaño depende del orden del tamaño de los objetos, o segmentos de los objetos en que se desee aplicar la operación; por ejemplo, si existen en la imagen pequeños artefactos, ruido, etcétera, que se deseen remover, el elemento estructurante para una erosión morfológica debe de ser del orden del tamaño de los artefactos o ruido que deseamos remover. Esto es posible describirlo mediante el *criterio de muestreo de Nyquist* (muestrear al menos al doble de la frecuencia más alta en la señal; en dos dimensiones se trata de *frecuencias*

espaciales). Un elemento estructurante más pequeño no afectará mucho a estos artefactos que deseamos eliminar, mientras que un elemento estructurante demasiado grande puede afectar de manera indeseable a los objetos de la imagen que sí sean de interés y podría perderse su información correspondiente. También es importante la forma del elemento estructurante, ya que si no se escoge la forma adecuada se pueden tener problemas de anisotropía, entre otros, debido al carácter discreto de las imágenes digitales. Por ejemplo, si se está usando una operación que determine distancias y se usa un elemento estructurante de forma cuadrada, las distancias en orientaciones horizontales y verticales tendrán una métrica distinta a las distancias en orientaciones diagonales; en este caso, se recomienda verificar el uso alternado de elementos estructurantes que favorezcan las orientaciones diagonales (elementos rómbicos, e inclusive octagonales).

Un *punto o píxel frontera* se puede definir como aquel que incluso en su vecindad más pequeña, mayor que cero, tiene píxeles tanto del fondo como del objeto.

La *dilatación* consiste en que en el punto o píxel en donde se realice la operación, si éste pertenece a la frontera de un objeto, se le agregarán píxeles al objeto en donde se encuentre el elemento estructurante. Si llamamos “A” a nuestra imagen y “B” a nuestro elemento estructurante, la dilatación de A con un elemento estructurante B se suele denotar como:

$$A \oplus B \quad (2.5)$$

La *erosión* es una operación similar, sólo que a los objetos, en este caso en vez de agregarles píxeles, se removerán aquellos píxeles frontera en donde se encuentre el elemento estructurante. La erosión de A con un elemento estructurante B se suele denotar como:

$$A \ominus B \quad (2.6)$$

Estas dos operaciones son de gran utilidad para el análisis y manipulación de los objetos de la imagen. Por ejemplo, el contar cuántas veces se necesita erosionar un objeto hasta que desaparezca de la imagen, usando un elemento estructurante determinado, nos puede servir de criterio para determinar el área de los distintos objetos, o bien, en dos objetos separados podemos contar el número de dilataciones necesarias hasta unirlos en un solo objeto y usar esto como criterio de distancia.

Se pueden aplicar distintas combinaciones de estas dos operaciones básicas alternadamente sobre los objetos de nuestra imagen para definir nuevas operaciones compuestas por secuencias de las anteriores. Cabe aclarar que la dilatación y la erosión no son operaciones estrictamente inversas ni son operaciones que conmuten, es decir, si primero dilatamos y luego erosionamos una imagen, en general obtenemos una imagen distinta respecto de primero erosionar y luego dilatar la imagen. Entre las operaciones que son secuencias de las dos anteriores, podemos mencionar a la *apertura* que consiste en aplicar primero una erosión y luego una dilatación. Esta operación resulta de interés cuando se desea quitar pequeñas “basuras” de la imagen así como remover picos de pequeñas estructuras en los bordes de los objetos de interés, dándoles un aspecto más “redondeado”. La apertura de A por un elemento estructurante B se suele denotar como:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.7)$$

De manera análoga, podemos definir a la *cerradura* como una operación consistente en una dilatación y a continuación una erosión; con esta operación se pueden unir objetos muy cercanos, y rellenar los agujeros en los objetos. La cerradura de A con un elemento estructurante B se suele denotar como:

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.8)$$

Es claro que una vez segmentados los núcleos celulares de la imagen, contamos con herramientas para determinar su tamaño y distancia entre ellos y entonces, estableciendo criterios morfológicos, determinar la presencia de micronúcleos celulares para su posterior cuantificación.

Los procedimientos aquí explicados, hasta la segmentación, se pueden resumir en las figuras 2.10, 2.11 y 2.12.

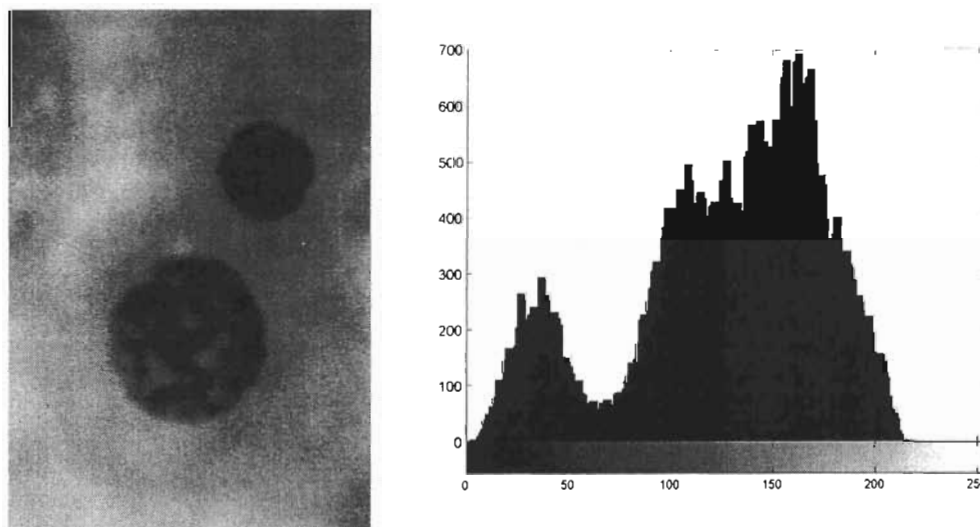


Figura 2.10. La imagen inicial por procesar y su histograma. Nótese la complejidad de este histograma.

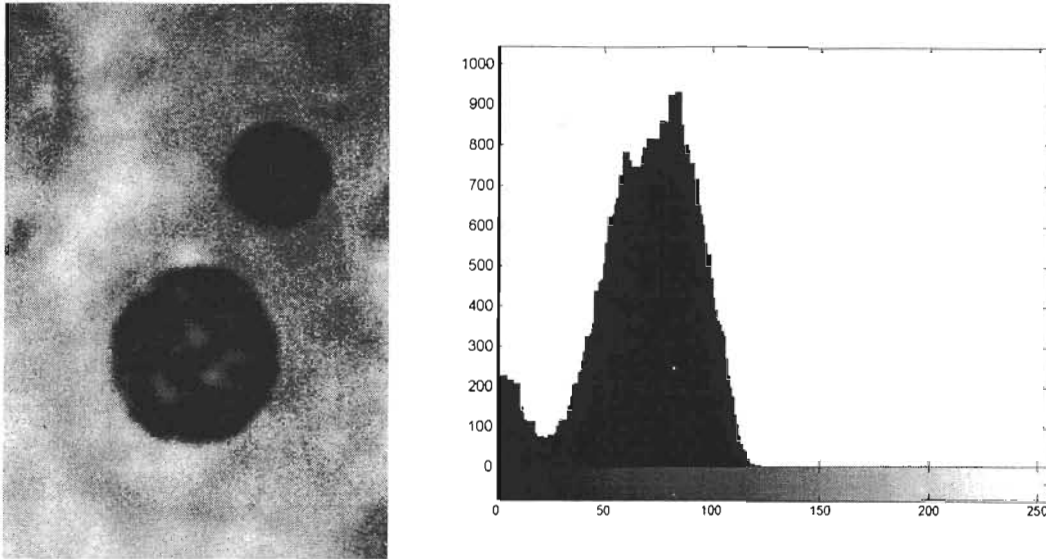


Figura 2.11. La imagen de la figura 2.10 después de aplicarle la técnica de remoción parcial de fondo descrita en el texto y su histograma. Nótese que ahora el histograma sólo está dividido a grosso modo en dos regiones.

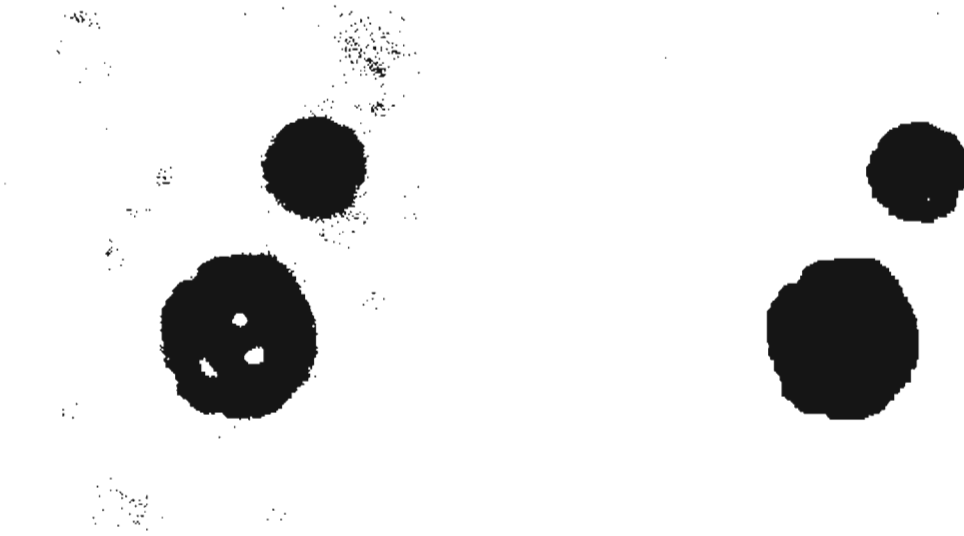


Figura 2.12. A la izquierda está la imagen de la figura 2.11 segmentada. Observamos gran cantidad de pequeños objetos que no son de nuestro interés. Con técnicas de morfología matemática, como la erosión y dilatación, podemos remover esos pequeños objetos además de rellenar los huecos en el núcleo de la célula. El resultado se aprecia en la imagen de la derecha.

2.6 Criterios de análisis de imágenes binarias.

Inicialmente contamos con una imagen en escala de grises, y una vez segmentados nuestros objetos de interés terminamos con una imagen binaria, es decir con objetos negros y un fondo blanco. Llegando a este punto, y considerando los criterios de Tolbert (1992) de la sección 1.6, contamos con diversos criterios de análisis para determinar características cuantitativas de los objetos en nuestra imagen. Los criterios utilizados en este trabajo, se basan en los siguientes parámetros:

- **Área (digital).** Es el número de píxeles que conforman al objeto. Dada una referencia de escala (v.g., micras cuadradas por píxel) puede asignarse unidades físicas al área digital de un objeto.
- **Centroide.** Es el promedio de las coordenadas X y Y de los píxeles que conforman el objeto, es decir la coordenada del centro geométrico del objeto.
- **Circularidad.** Es un criterio que nos indica que tanto “se parece” el objeto a un círculo. Una circularidad igual a 1.0 correspondería a un círculo perfecto, conforme tenemos objetos cada vez más alargados o irregulares, la circularidad se acerca más a cero. Como los objetos en las imágenes no están compuestos por puntos, sino por píxeles, este análisis no tiene sentido para objetos muy pequeños (menor a 5 píxeles). La circularidad está definida por la siguiente fórmula:

$$circularidad = 4\pi \left(\frac{\text{área}}{(\text{perímetro})^2} \right) \quad (2.5)$$

Estos parámetros nos permiten obtener datos cuantitativos de la imagen segmentada y sus objetos, los cuales se pueden analizar para obtener resultados posteriores.

En el caso de nuestro trabajo, estos datos se pueden analizar para determinar la presencia de micronúcleos, y determinar el número total de éstos en la imagen. Se han estudiado, con estas técnicas, para obtener resultados preliminares, imágenes de dos tipos de células, linfocitos y tejido epitelial de cérvix. En el siguiente capítulo aplicamos las herramientas que hemos descrito, al caso de imágenes de microscopía óptica que pueden contener micronúcleos.

CAPÍTULO 3.

ANÁLISIS DE IMÁGENES CITOLÓGICAS CON MICRONÚCLEOS

En el capítulo 2 se describieron técnicas elementales para procesar imágenes en general y en algunos casos particulares. Sin embargo, si se desea automatizar el procedimiento de conteo de micronúcleos, es necesario establecer un protocolo y analizar cuidadosamente los distintos problemas a resolver, además de identificar las características generales y todos los casos particulares de las imágenes en que trabajará el programa.

En este capítulo describimos cómo aplicar y adaptar las técnicas presentadas en el capítulo 2 para analizar imágenes de micronúcleos celulares con el fin de evaluar su potencial uso para un conteo automático de micronúcleos celulares. Se describen los problemas y limitaciones encontrados y propuestas para resolverlos o reducir su efecto en los errores en el conteo.

La figura 3.1 muestra un diagrama de flujo del procedimiento a seguir para el conteo automático de micronúcleos.

A continuación se analizan cada una de las etapas mostradas en la figura 3.1.

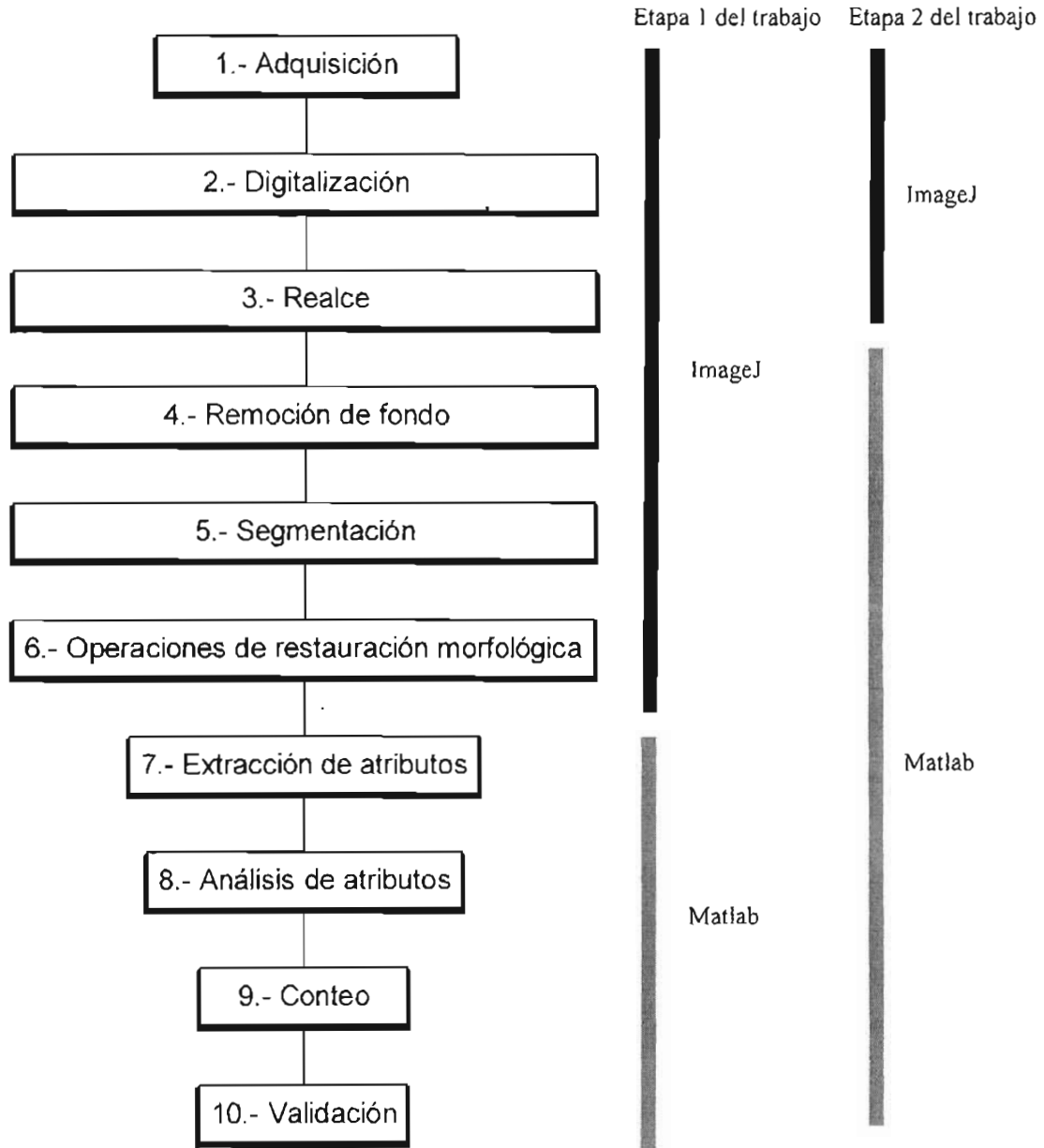


Figura 3.1. Diagrama de bloques que muestra el procedimiento para establecer el conteo de imágenes con micronúcleos. La línea negra nos muestra las etapas que fueron desarrolladas con el uso de Imagen y la línea gris las partes para las que se utilizó matlab, esto para la primera y segunda etapa del trabajo.

En una primera etapa del trabajo, parte del realce, la remoción de fondo, la segmentación, operaciones morfológicas y la extracción de atributos se realizaron con el programa *ImageJ* <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (versión 1.32); posteriormente solo parte de la restauración se realizó con ImageJ y todo lo restante se efectuó directamente con un “script” en el entorno de *Matlab* v. 6.5 <http://www.mathworks.com/>

3.1. Adquisición.

La adquisición fue hecha a partir de muestras celulares, principalmente de cérvix, preparadas con tinción de Papanicolaou y capturadas con una cámara adosada a un microscopio Nikon, con oculares 10x y objetivo de 100x, para un aumento total de 1000x. Se tomaron en película de negativos en color Fujifilm Superia 100. No fue posible uniformizar el proceso de revelado, que dependía de un laboratorio comercial, y hubo variaciones en color e intensidad que afectaron el análisis. Se eligieron negativos con características semejantes en cuanto a color y contraste y durante la adquisición se procuró compensar manualmente las diferencias.

3.2. Digitalización.

Los negativos fueron digitalizados en un escáner Canonscan D2400UF, en imágenes en color de 24 bits, con una resolución de 600 pixeles por pulgada, en formato TIF, el cual se escogió por ser compatible por la mayoría de los programas de procesamiento de imágenes, y no comprime el archivo con una pérdida significativa de información como puede ser el formato JPG. Las imágenes tienen aproximadamente 800 x 500 pixeles.

3.3. Realce.

Las imágenes digitalizadas reciben un realce preliminar justo antes de la digitalización, de tal modo que se maximice el contraste de los núcleos y micronúcleos, con respecto al fondo y al citoplasma celular, aprovechando todo el intervalo dinámico del sistema de adquisición.

Las imágenes en color son ahora convertidas a imágenes en escala de grises de 8 bits para continuar con el procesamiento; se utilizaron en la mayoría de las imágenes 3 combinaciones en color para obtener la imagen en escala de grises.

La primera combinación fue el promedio del canal rojo y el canal verde ($\omega_r = \frac{1}{2}$ $\omega_g = \frac{1}{2}$ $\omega_b = 0$). La figura 3.2 nos muestra una de estas imágenes descompuesta en sus componentes de color. Nótese como en la figura 3.2b (canal verde) tenemos un alto contraste en la imagen, sin embargo este alto contraste lo tenemos no solo en núcleos y micronúcleos, sino también en el citoplasma y demás objetos ajenos a nuestro interés en la imagen, mientras que en la figura 3.2a (canal rojo), aunque el contraste de núcleos y micronúcleos es bajo, al mismo tiempo es muy pequeño en el citoplasma y otras estructuras en la imagen. De este modo, al promediar ambos canales, observamos en la imagen 3.2d (promedio del canal rojo y verde) una imagen contrastada, pero al mismo tiempo hemos disminuido ligeramente el contraste del citoplasma y la textura del fondo.

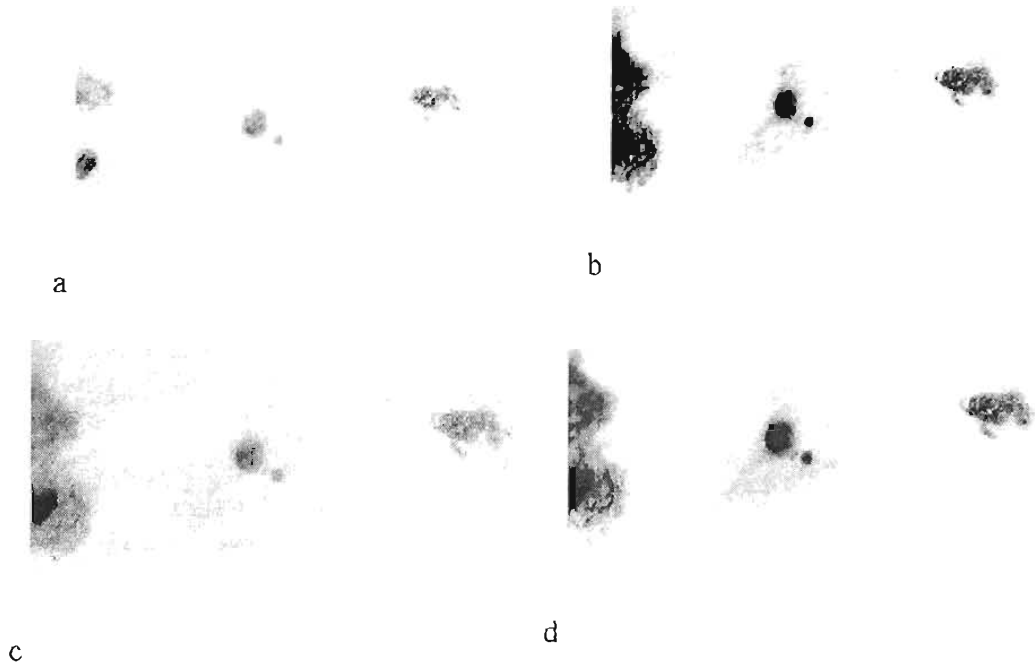


Figura 3.2. (a) Canal rojo de la imagen (b) Canal verde de la imagen (c) Canal azul de la imagen (d) Promedio del canal rojo y verde

La segunda combinación es el promedio del canal rojo y el azul ($\omega_r = \frac{1}{2}$ $\omega_g = 0$ $\omega_b = \frac{1}{2}$). La figura 3.3 nos muestra una de estas imágenes en sus componentes separados de color. Nótese que de nuevo el canal verde (figura 3.3b) es el más contrastado, sin embargo nótese también que el contraste del citoplasma es también relativamente grande. En este caso resulta mas conveniente promediar el canal rojo y el azul (figura 3.3a y 3.3c) y de este modo obtenemos una imagen con suficientemente contraste del núcleo y micronúcleo respecto del resto de la imagen (figura 3.3d).

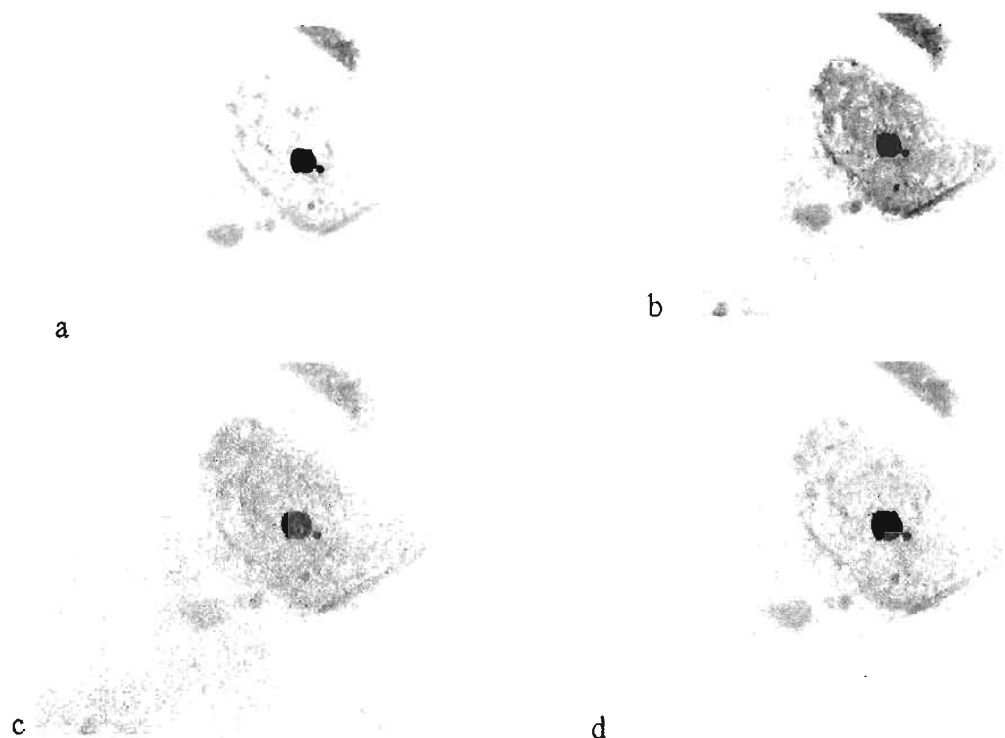


Figura 3.3 (a) Canal rojo de la imagen (b) Canal verde de la imagen (c) Canal azul de la imagen (d) Promedio del canal rojo y azul.

Finalmente, para la tercera combinación en la figura 3.4, observamos el último caso utilizado, que resulta del promedio del canal azul y verde ($\omega_r = 0$ $\omega_g = \frac{1}{2}$ $\omega_b = \frac{1}{2}$). En la figura 3.4.a observamos que el canal rojo casi no contiene información y que de hecho el núcleo y micronúcleo son muy difíciles de distinguir. Y aunque la imagen en el canal verde (3.4.b) está muy contrastada, se optó por promediar con el canal azul (figura 3.4 c), ya que así disminuimos el contraste del fondo y el citoplasma, lo cual quita varios objetos y basuras al momento de segmentar (figura 3.4.d).



Figura 3.4. (a) Canal rojo de la imagen (b) canal verde de la imagen (c) Canal azul de la imagen (d) Promedio del canal verde y azul.

De todas las imágenes a las que se les aplicó esta metodología, la frecuencia de los tres métodos antes mencionados se muestra en la figura 3.5.

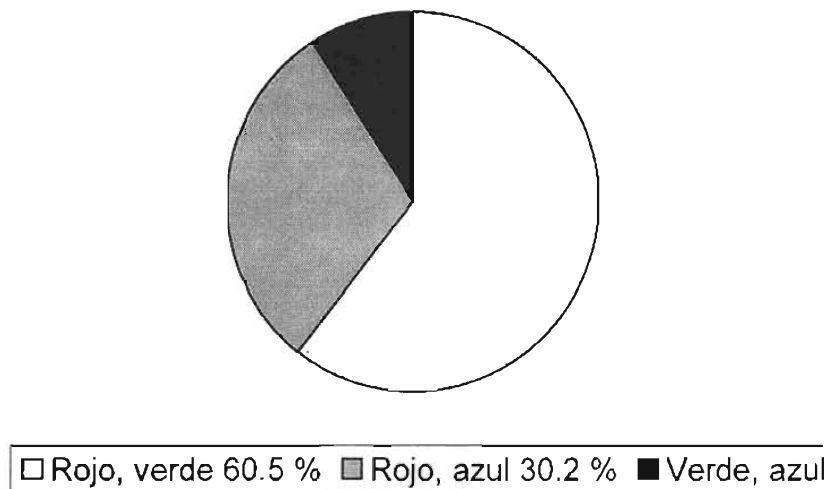


Figura 3.5. Combinaciones de color utilizadas en las imágenes para ser convertidas a imágenes en escala de gris.

Hay en la literatura formas de simplificar la selección, trabajando en otros espacios de color distintos al RGB, lo cual requiere de una transformación no-lineal para cada imagen. Uno de los espacios más usados es el HSL de matiz, saturación y luminosidad (*hue, saturation and luminosity*), que es usado por Ranefall et al., 1997, para segmentar células teñidas (en la literatura también se conoce como espacio HSV: *hue, saturation, value*; hay otros espacios o sistemas de color semejantes, tales como HSI y HSB). Hicimos algunas pruebas de conversión a HSL, pues el matiz se conserva ante algunos cambios de iluminación, pero la falta de uniformidad en el proceso de revelado influye negativamente en la definición de un matiz único, por lo que conservamos la metodología de combinación de canales, en espacio RGB.

3.4. Remoción de fondo.

Como se explicó en el capítulo 2, se requiere una remoción de fondo adecuada es requerida para el proceso de segmentación por umbral constante. Estamos obteniendo una imagen I_R que viene de:

$$I_R = I - (\alpha I_G) \quad (3.1)$$

Donde I es la imagen original e I_G es la imagen a la cual se le pasó un filtro gaussiano con $\sigma=20$ de radio 50 mientras que α es un valor constante en $[0,1]$ (ver sección 2.3). Ya que este tamaño de filtro es suficientemente grande respecto al de los objetos existentes en nuestras imágenes.

La figura 3.6 nos muestra una imagen de linfocitos y un perfil de la imagen sobre la línea negra. Notamos tres “pozos” en la parte central (entre los pixeles 200 y 300 en el eje X en la gráfica). El mayor es el pozo central que corresponde al núcleo celular del centro de la imagen, los dos pozos restantes, a los lados del pozo mayor, corresponden a dos micronúcleos.

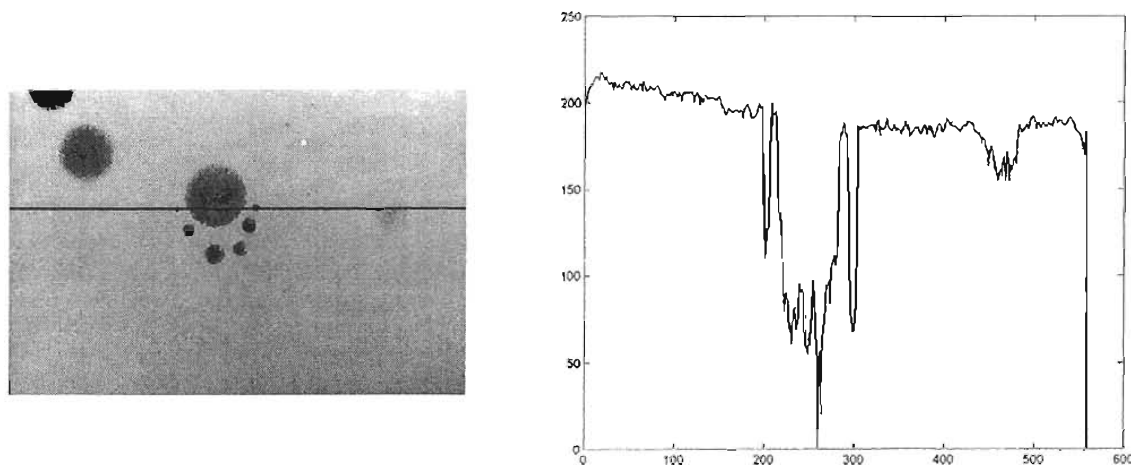


Figura 3.6. Imagen de linfocitos y un perfil sobre la línea negra.

La figura 3.7 nos muestra la misma imagen de la figura 3.6, pero en la figura 3.7 hemos aplicado la técnica de remoción de fondo antes descrita. Notamos en el perfil que de nuevo aparecen los tres pozos de la figura 3.6, con la diferencia de que esta vez los pozos son más profundos, el efecto práctico de esto a la hora de segmentar las imágenes, es que resulta más fácil separar los núcleos y micronúcleos celulares del resto de la imagen.

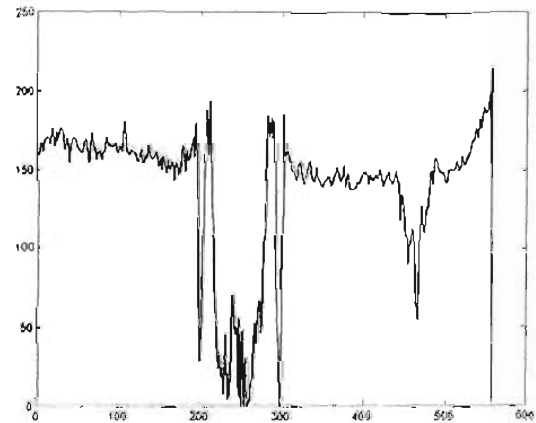
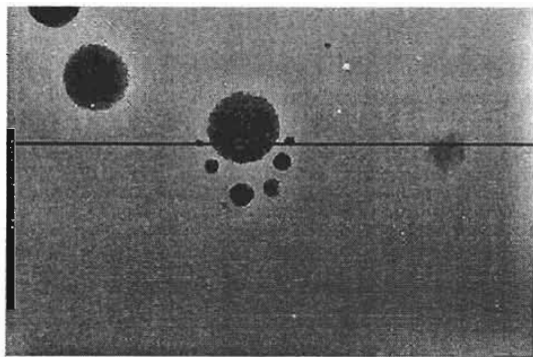


Figura 3.7. Figura de linfocitos a la que se le ha aplicado remoción de fondo y un perfil sobre la línea negra.

Nuevamente la figura 3.8a nos muestra una imagen de linfocitos y la figura 3.8b a los núcleos y micronúcleos de la figura 3.8a segmentados. Nótese un gradiente de luz en la figura 3.8. Este gradiente provoca que, al tratar de segmentar la imagen, aparezca en la figura 3.8b una mancha, abajo a la derecha, que corresponde a este gradiente de luz. En la figura 3.8 vemos a la misma imagen tras serle aplicada la técnica mencionada de remoción de fondo, y una de sus consecuencias es la desaparición del gradiente de luz, con lo que la imagen aparenta una iluminación más homogénea, por lo que al segmentar los núcleos y micronúcleos de la figura 3.8c vemos en la figura 3.8d que esa mancha extraña de la figura 3.8b no aparece más.

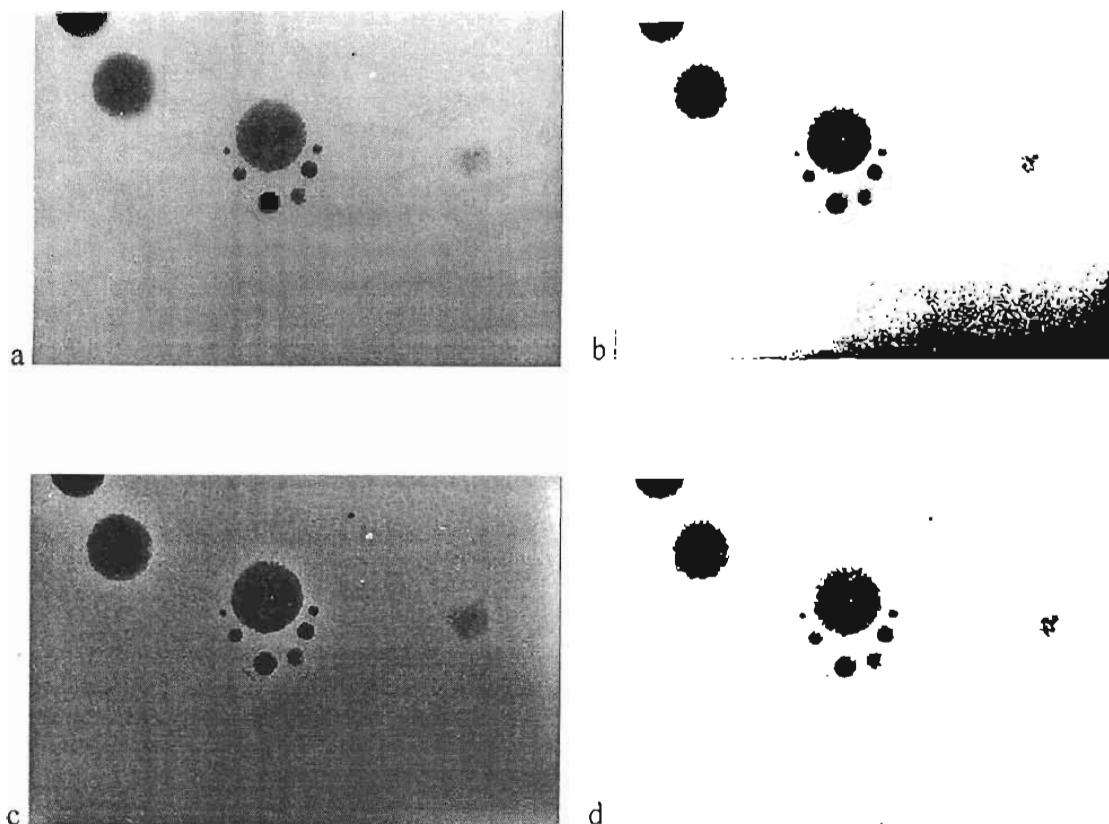


Figura 3.8. (a) Imagen de linfocitos sin remoción de fondo. (b) Núcleos y núcleos segmentados de la figura 3.8a. (c) Imagen 3.8a tras aplicarle la técnica de remoción de fondo mencionada en el texto con $\alpha=0.20$ y radio = 50 píxeles. (d) Núcleos y micronúcleos segmentados de la figura 3.8c. En ambos casos se utilizó un umbral [0-50] para la segmentación.

3.5. Segmentación de núcleos y micronúcleos.

En el capítulo 2 se explicó en qué consiste el método de segmentación por umbralaje (binarización) o por medio de intervalos de intensidad $[I_1, I_2]$ en los niveles de escala de gris, entre 0 y 255. Vemos aquí su aplicación para separar del fondo células y otros objetos.

La figura 3.9a muestra una imagen de células de tejido epitelial de cérvix, mientras que en la figura 3.9b la vemos segmentada en un intervalo de $[0,30]$, y observamos que apenas alcanzamos a distinguir el núcleo y micronúcleo. En la figura 3.9c el intervalo de segmentación es de $[0,100]$; en este caso el núcleo y micronúcleo están mezclados con diversas estructuras del fondo y el citoplasma lo cual tampoco es conveniente. La figura 3.9d, 3.9e y 3.9f nos muestra la imagen en intervalos de $[0,50]$, $[0,55]$ y $[0,60]$ respectivamente, en estos tres casos el núcleo y micronúcleo han sido segmentados de manera más adecuada. Nótese también que el intervalo adecuado no es un valor exacto, sino una gama de valores (por ejemplo en la figura 3.9a el umbral superior está alrededor de 55). Por otro lado, tras trabajar con gran cantidad de imágenes, esto facilita establecer, de manera empírica, un intervalo conveniente que segmente a la mayor cantidad de imágenes de manera adecuada. El intervalo elegido empíricamente para ese propósito es $[0,55]$.

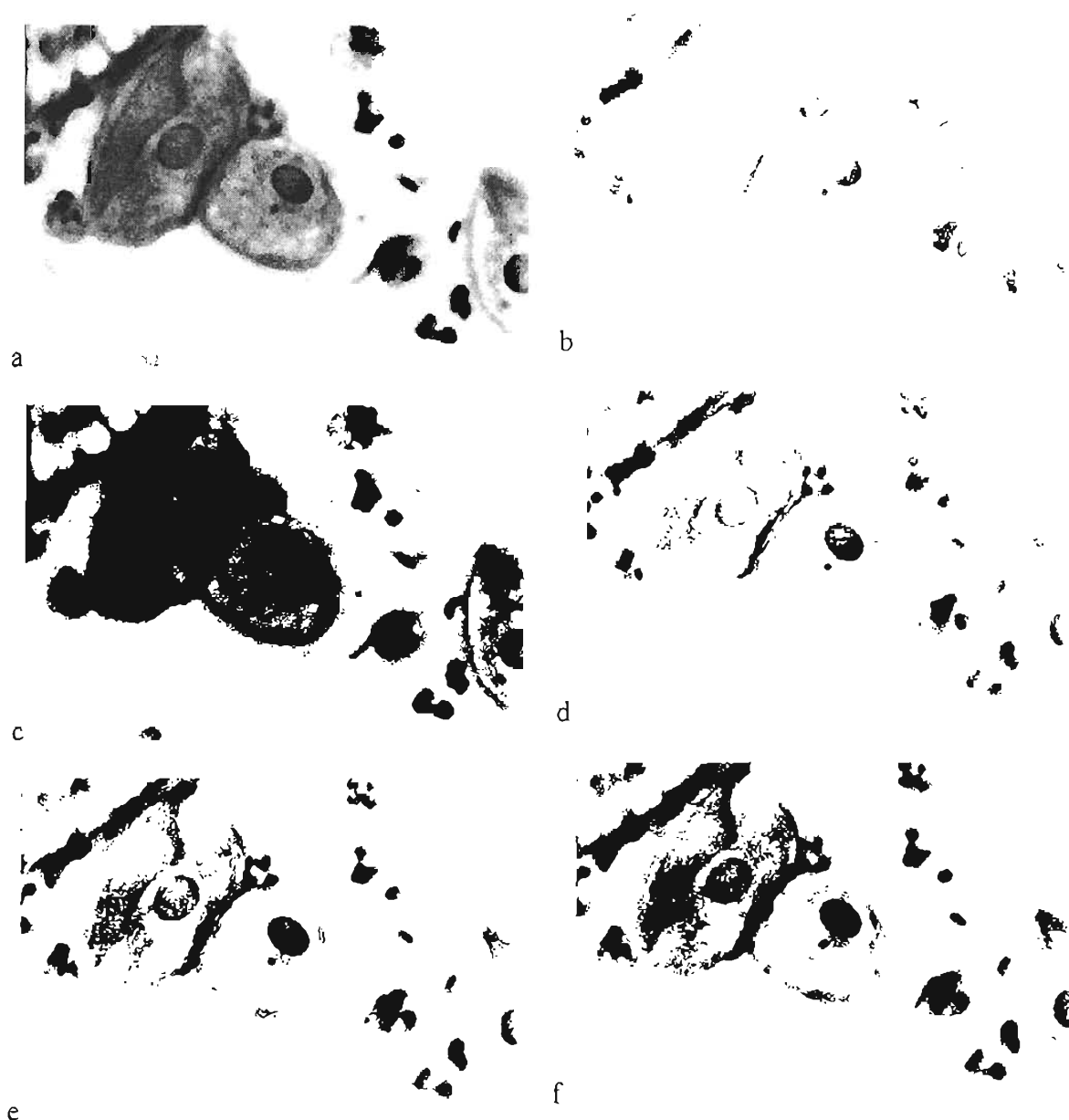


Figura 3.9. a) Figura de células epiteliales de cérvix. b) Imagen segmentada en un intervalo de $[0, 30]$. c) Imagen segmentada en $[0, 100]$. d) En un intervalo de $[0, 50]$. e) En un intervalo de $[0, 55]$ f) En un intervalo de $[0, 60]$.

3.6. Operaciones de restauración morfológica.

En el capítulo 2 (sección 2.5) se explicó en qué consiste la erosión y la dilatación morfológicas, y combinaciones de ambas.

Se utilizó la siguiente secuencia combinada de operaciones morfológicas: erosión-dilatación-dilatación-erosión, es decir una apertura y una cerradura, ambas de un píxel de radio:

$$(A \circ B) \bullet B \quad (3.2)$$

tal como se explicó en el capítulo 2; el resultado de este proceso es quitar los objetos muy pequeños (comúnmente basuras y artefactos que no son de nuestro interés) y rellenar los posibles huecos que se encuentren en los objetos (ver figuras 3.10 y 3.11).

Quitar el exceso de objetos pequeños es de suma importancia, ya que en el momento del conteo, el programa los puede confundir con micronúcleos, incrementando de manera errónea el número de micronúcleos detectados. La *apertura*, es especialmente útil para este propósito. Es posible eliminar un mayor número de objetos si utilizamos una apertura de dos píxeles de radio en vez de uno, pero la gran desventaja de esto es que también resulta muy probable que sean removidos micronúcleos de la imagen, ya que éstos generalmente quedan segmentados como objetos pequeños, y como éstos son el objetivo de nuestra detección, se debe hacer lo posible para que permanezcan en la imagen. Por tanto, es mejor trabajar con una apertura de un píxel de radio aunque permanezcan varias basuras, que trabajar con dos píxeles de radio y que sean removidos los micronúcleos. En la figura 3.10a observamos a un núcleo y un micronúcleo bien segmentados, indicados en la figura dentro del rectángulo, pero también observamos gran cantidad de pequeñas estructuras extrañas que sería conveniente eliminar, ya que podrían afectar el posterior conteo de micronúcleos. En la figura 3.10b hemos aplicado una apertura de un píxel de radio (erosión – dilatación), y observamos que no aparecen ya muchas pequeñas estructuras, pero todavía encontramos demasiadas de éstas. En la figura 3.10c se aplica una apertura, pero esta vez de dos píxeles de radio. Con esta apertura, ahora no encontramos ninguna estructura; aunque en principio el resultado parece ser mejor, se nota que esta vez desapareció también el micronúcleo, y como los micronúcleos son el objetivo de nuestro análisis, en este caso la mejor imagen para trabajar es la de la figura 3.10b, a pesar de las pequeñas estructuras que ésta todavía puede tener.

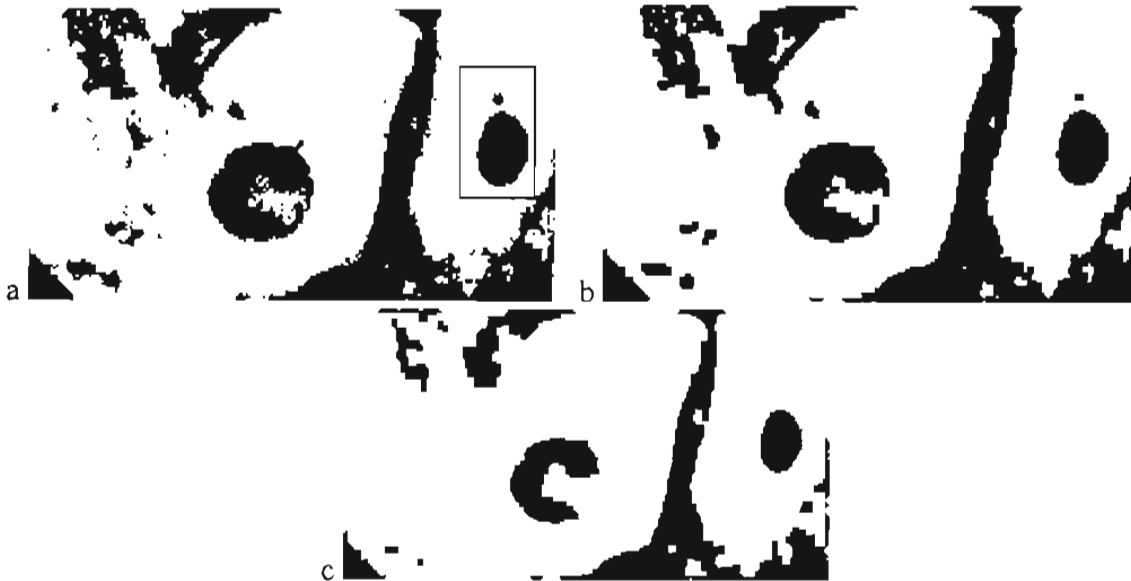


Figura 3.10. a) En esta imagen segmentada observamos dentro del rectángulo un núcleo y un micronúcleo b) Se le ha aplicado a la imagen una apertura de radio igual a uno. c) A esta imagen se le aplicó una apertura de radio dos.

En el caso de objetos de un mayor tamaño (como los núcleos) muchas veces inhomogeneidades en la textura producen al momento de segmentar huecos de tamaño variable (figura 3.11). Como posteriormente aplicaremos un criterio de circularidad para distinguir núcleos y micronúcleos de otras estructuras, los huecos pueden hacer perder circularidad a los núcleos, con lo cual el núcleo no será tomado en cuenta por el programa de conteo, por lo que es deseable “rellenar” esos huecos. La cerradura es especialmente útil para rellenar objetos en imágenes binarias. Al igual que en la apertura hemos utilizado el radio de un píxel para la operación, utilizar un radio más grande nos daría la ventaja de rellenar huecos más grandes que pudiéramos encontrar en los núcleos, pero debemos tener precaución, ya que otro de los efectos de la cerradura es el fusionar objetos muy cercanos. Esto sería ventajoso en el caso de basuras que se encuentren junto al núcleo; sin embargo, hay muchas imágenes donde el micronúcleo se encuentra muy pegado al núcleo: si se fusionan el núcleo y el micronúcleo en un solo objeto, este último no será detectado. En la figura 3.11a observamos a un núcleo y un micronúcleo segmentado; notemos que el núcleo tiene, en una gran parte de su superficie, un hueco en forma de espiral. En la figura 3.11b se ha aplicado una cerradura de un píxel de radio, se ha reducido el hueco a 4 agujeros más pequeños. En la figura 3.11c el radio de la cerradura es de dos píxeles y hemos reducido a tres los huecos presentes en el núcleo, y en la figura 3.11d el radio ha sido de tres píxeles, resultando esta vez que se han llenado por completo los huecos del núcleo, restaurándolo como objeto individual. Aunque en la figura 3.11b tenemos un resultado menos satisfactorio en cuanto al relleno de los huecos en el núcleo, notemos que el núcleo y el micronúcleo forman dos objetos distintos, mientras que en las figuras 3.11c y 3.11d el núcleo y el micronúcleo se han fusionado. Aunque en la figura 3.11d nos hemos deshecho de todos los huecos, de nada sirve si hemos perdido al micronúcleo al fusionarlo al núcleo.



Figura 3.11. a) Un núcleo y micronúcleo segmentados b) Se aplica una cerradura de un píxel de radio. c) Se aplica una cerradura de dos píxeles de radio. d) Se aplica una cerradura de tres píxeles de radio.

3.7. Separación de objetos en contacto

De último minuto se incluyó un procesamiento de morfología matemática adicional que permitió mejorar los resultados de conteo. Esta es la operación de “segmentación por vertientes”, o *Watershed*, en inglés y se encuentra entre las herramientas disponibles en el entorno de Matlab y con mejoras desarrolladas en el Laboratorio de Imágenes del CCADET. La descripción detallada del método puede hallarse en Russ, 2000. En la figura 3.12 se ilustra su efecto en dos núcleos que se tocan. Cabe aclarar que existen alteraciones donde estructuras similares a los micronúcleos, pero de distinto origen (tales como *broken eggs*, ver figura 1.5) donde existen estructuras en contacto con el núcleo, y estas alteraciones podrían ser confundidas con micronúcleos celulares usando esta metodología,

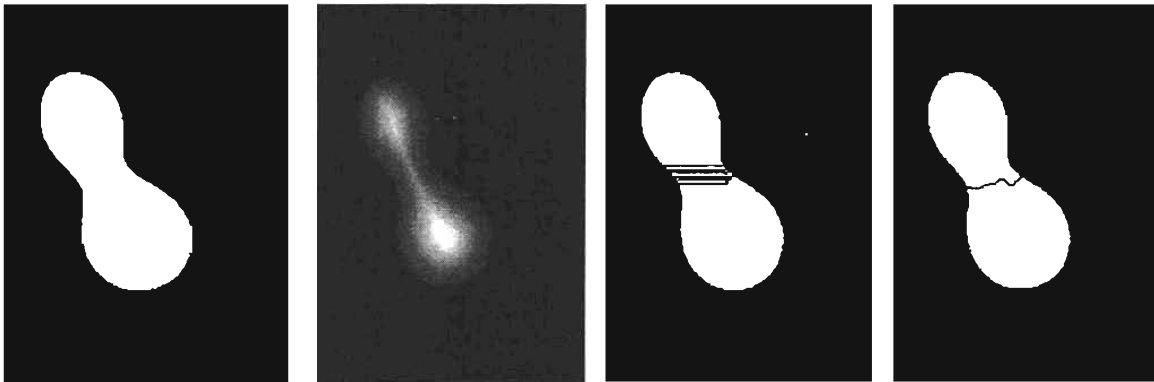


Figura 3.12. (Izquierda) Objetos en contacto y su correspondiente “campo de distancia”; a la derecha centro se muestra el resultado de un método convencional de segmentación por vertientes y a la izquierda el resultado mejorado.

3.8. Extracción de atributos.

Hasta el momento hemos expuesto una argumentación principalmente cualitativa de las imágenes celulares. Como programa de procesamiento de imágenes se usó *ImageJ v1.32* en una etapa inicial y posteriormente un script de *Matlab v 6.5*. Una vez obtenidas las imágenes binarias donde se muestren núcleos y micronúcleos segmentados, podemos obtener una tabla con datos de los objetos presentes en la imagen, y esta tabla de datos es transferida a un archivo de texto. La tabla 3.1 nos muestra un ejemplo del archivo de texto que se obtiene para analizar una imagen.

Tabla 3.1. Ejemplo del archivo de texto con los atributos de los objetos segmentados en una imagen binaria.

	Area	X	Y	Circ.
1	6.921	2.242	3.178	0.360
2	0.064	4.623	1.651	0.483
3	0.166	5.353	1.920	0.718
4	0.107	3.668	2.160	0.884
5	0.429	4.768	2.784	0.309
6	0.014	3.967	2.508	0.998
7	0.125	7.213	3.311	0.816
8	0.039	0.643	3.692	0.892

Todos los objetos, excepto los de los bordes, que en esta etapa permanezcan en la imagen, son analizados. La primera columna simplemente numera los objetos analizados y no es de mucha utilidad. La segunda columna muestra el área en pixeles de los objetos. La tercera y cuarta columna representan las coordenadas en el eje cartesiano X y Y respectivamente, del centroide, es decir el centro geométrico del objeto. El centro del eje cartesiano se encuentra en la esquina superior izquierda, y el valor del eje Y se incrementa hacia la parte inferior de la imagen. Finalmente la quinta columna se refiere a la circularidad, recordemos que la circularidad viene dada por la fórmula:

$$Circularidad = \frac{4\pi Area}{(Perimetro)^2} \quad (3.3)$$

Este valor varía entre 0 y 1, siendo 1 para un círculo y acercándose a cero para objetos alargados o con bordes irregulares, y también es cero para una línea. En la sección siguiente justificamos estos atributos morfométricos. Como la circularidad no está definida para objetos muy pequeños, de menos de 5 pixeles, a éstos el programa ImageJ les asigna el valor de -1.

3.9. Análisis de atributos.

Con los atributos obtenidos, podemos analizar estos datos para obtener el número de micronúcleos presentes en la imagen. Para ello hemos establecido una serie de criterios, para que a partir de los atributos de los objetos de la imagen, podamos identificar a un micronúcleo, de los muchos objetos presentes en la imagen.

El primer criterio, establecido por convención, es que los micronúcleos deben de ser, a lo sumo, de 1/3 del área del núcleo asociado. Esto se logra fácilmente al dividir las áreas de los objetos, que ya hemos obtenido directamente del archivo de texto anteriormente obtenido.

Debemos de tomar en cuenta que cada micronúcleo está asociado a un núcleo determinado, es decir, nunca encontraremos un micronúcleo aislado; tendremos primero a un núcleo en la imagen y ese núcleo puede tener uno o más micronúcleos. Esto lo podemos traducir geométricamente

como un criterio de distancias; en la figura 3.13 observamos un núcleo con 5 micronúcleos asociados, y un objeto extraño a la derecha de la imagen.



Figura 3.13.- Un núcleo con 5 micronúcleos asociados y un objeto extraño a la derecha.

El programa de conteo debe de ser capaz de distinguir entre esos cinco micronúcleos y ese sexto objeto. Para hacer tal distinción en este caso, el parámetro más lógico es la distancia. Aunque no contamos directamente con la distancia entre los diversos objetos que componen la imagen, recordemos que conocemos el centroide de los objetos; entonces la distancia entre dos objetos, de centroides (X_1, Y_1) y (X_2, Y_2) respectivamente, puede ser obtenida fácilmente como:

$$D = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2} \quad (3.4)$$

Si suponemos que los núcleos son círculos, su radio es de $\sqrt{\frac{Area}{\pi}}$. Esto es importante porque después de analizar la distancia entre diversos núcleos y micronúcleos hemos convenido en utilizar el criterio de que el objeto no debe de estar a más de 2.5 veces el radio del núcleo. Nótese que es un criterio de distancias relativo, lo cual es más recomendable que usar uno absoluto, ya que en el caso de usar un criterio absoluto este debe de ajustarse de acuerdo con la resolución y tamaño de campo de cada imagen. En la tabla 3.2 observamos parejas de objetos, núcleos y según sea el caso, micronúcleos u otros objetos, y se indica la distancia, en radios del núcleo, entre ambos objetos.

como un criterio de distancias; en la figura 3.13 observamos un núcleo con 5 micronúcleos asociados, y un objeto extraño a la derecha de la imagen.











Figura 3.13.- Un núcleo con 5 micronúcleos asociados y un objeto extraño a la derecha.

El programa de conteo debe de ser capaz de distinguir entre esos cinco micronúcleos y ese sexto objeto. Para hacer tal distinción en este caso, el parámetro más lógico es la distancia. Aunque no contamos directamente con la distancia entre los diversos objetos que componen la imagen, recordemos que conocemos el centroide de los objetos; entonces la distancia entre dos objetos, de centroides (X_1, Y_1) y (X_2, Y_2) respectivamente, puede ser obtenida fácilmente como:

$$D = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2} \quad (3.4)$$

Si suponemos que los núcleos son círculos, su radio es de $\sqrt{\text{Area}/\pi}$. Esto es importante porque después de analizar la distancia entre diversos núcleos y micronúcleos hemos convenido en utilizar el criterio de que el objeto no debe de estar a más de 2.5 veces el radio del núcleo. Nótese que es un criterio de distancias relativo, lo cual es más recomendable que usar uno absoluto, ya que en el caso de usar un criterio absoluto este debe de ajustarse de acuerdo con la resolución y tamaño de campo de cada imagen. En la tabla 3.2 observamos parejas de objetos, núcleos y según sea el caso, micronúcleos u otros objetos, y se indica la distancia, en radios del núcleo, entre ambos objetos.









Tabla 3.2. Distancia relativa, entre núcleos con micronúcleos y otros objetos. En todas las figuras el núcleo es el objeto de tamaño mayor (las imágenes no se encuentran a la misma escala).

Núcleo con:	Distancia (en radios del núcleo)	
Micronúcleo	1.42	
	1.71	
	1.73	
	1.75	
Otro objeto	2.73	
	4.76	
	6.28	
	6.85	

Al observar de nuevo la figura 3.13, notamos que aunque el núcleo y los micronúcleos no son círculos perfectos, son bastante redondos, sobre todo al compararlos con el objeto de la derecha. Por ello, un criterio que nos puede ayudar a distinguir entre núcleos y micronúcleos, con respecto a otros objetos es la circularidad. En la tabla 3.3 se pueden observar diversos objetos, como núcleos y micronúcleos, así como su circularidad respectiva. Se ha convenido para el presente trabajo que un objeto debe de tener una circularidad mayor que 0.75 (aproximadamente la mínima circularidad encontrada en núcleos y micronúcleos) para que el programa de conteo lo considere núcleo o micronúcleo. Cabe aclarar que, aunque este criterio nos ayuda a no confundir









gran cantidad de objetos con un núcleo o micronúcleo, los objetos extraños pueden tener cualquier circularidad, por lo que es muy posible que algunos objetos extraños tengan circularidades mayores a 0.75 y por tanto cumplan con este criterio.

Tabla 3.3. Objetos segmentados de imágenes celulares, se indica cuando se trata de núcleos o micronúcleos, u otros objetos (las imágenes no se encuentran a la misma escala).

	Circularidad	Objeto
Núcleo o micronúcleo	0.998	
	0.904	
	0.877	
	0.846	
Diversos objetos	0.718	
	0.644	
	0.601	
	0.309	

Los micronúcleos deben de tener una proporción de áreas menor a un tercio, respecto del núcleo ($[a/A] < 1/3$). La tabla 3.4 nos muestra proporción de áreas de micronúcleos respecto del núcleo, y de diversas parejas de objetos.

Tabla 3.4. Área relativa de distintos pares de objetos (las imágenes no se encuentran a la misma escala).

Tipo de pareja	Área Relativa	Pares de objetos
Núcleo- micronúcleo	0.053	
	0.071	
	0.111	
	0.157	
Diversos objetos	0.334	
	0.430	
	0.432	
	0.979	

En resumen, para que un objeto sea considerado micronúcleo debe de cumplir con los siguientes requisitos:

- **Cociente de áreas:** tener menos de un tercio del área que el área del núcleo $[A/a] < 1/3$.
- **Distancia:** estar a una distancia del núcleo menor de 2.5 veces el radio del núcleo.
- **Circularidad:** tanto el núcleo como el micronúcleo deben de tener una circularidad mayor a 0.75.

Estas condiciones se pueden ver como un tercer tipo de filtrado, el *filtrado morfométrico*, debido a que los criterios señalados dependen de medidas de forma, es decir de atributos morfométricos.

No se estableció un tamaño mínimo de micronúcleos ya que muchos de ellos después del filtrado morfométrico resultan con áreas muy pequeñas, de cerca de un píxel.

3.10. Conteo.

Para aplicar los criterios descritos en el paso anterior y estimar el número de micronúcleos presentes en la imagen y una vez adquirida la tabla de datos descrita en el paso 8 de la figura 3.1, donde se muestra un ejemplo en la tabla 3.1, ésta se carga en un programa (que es más exactamente un script), del entorno de *Matlab* que cuenta con la estructura mostrada en la figura 3.14.

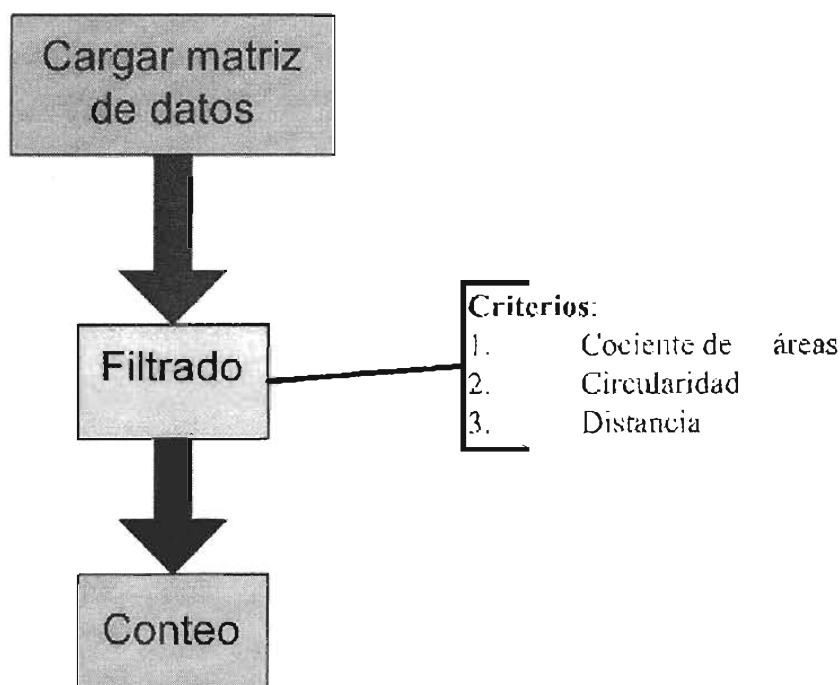


Figura 3.14. Diagrama simplificado del programa de conteo de micronúcleos

El programa, al comienzo, inicializa una variable a cero, que podemos llamar MN. A continuación, toma una pareja de objetos (cada renglón de la matriz en la tabla 3.1 corresponde a un objeto) y verifica si los datos de esta pareja cumplen cada uno de los tres criterios; si no cumple alguno de ellos, la variable MN permanece sin cambio, pero si los cumple todos la variable MN se incrementará en uno: $MN = MN + 1$. A continuación se examina la siguiente pareja preservando el valor actual de la variable MN, y así sucesivamente hasta analizar todas las parejas posibles. Sería deseable que todas las parejas núcleo/micronúcleo y solo estas parejas cumplan los tres criterios, en cuyo caso el valor que presente la variable MN, después de analizar todas las parejas, debería ser exactamente igual al número de micronúcleos presentes en la imagen.

Cabe señalar que durante el desarrollo del trabajo se detectaron defectos en el funcionamiento de ImageJ, tales como inconsistencias en el manejo de niveles de gris y de umbrales, la extracción de medidas de áreas, el formato de archivos, la conversión de color a gris o a otros espacios de color, y algunos otros problemas que dificultaron las pruebas. Esta fue una de las razones de cambiarse a Matlab, donde es posible controlar mejor las operaciones sobre las imágenes (ver figura 3.1).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados del trabajo descrito en el capítulo 3, así como una discusión acerca de estos resultados.

4.1. Detección y conteo

En la tabla 4.1 podemos ver los resultados al utilizar el programa de conteo automático de micronúcleos. El término “MN Observados” se refiere a los micronúcleos presentes en la imagen según una persona calificada, que es el dato que tomamos como referencia. El término “ImageJ” se refiere a los micronúcleos contados por el programa de conteo de micronúcleos, usando previamente el programa Imagen, (ver etapa 1 en la figura 3.1); Matlab se refiere a cuando el procesamiento de imágenes se realizó mediante un script en el entorno de Matlab (ver etapa 2 figura 3.1), “Watershed” se refiere cuando al “script” se le agregó una técnica de separación de objetos en contacto denominada “segmentación por vertientes” o *Watershed* (también dentro de la etapa 2 figura 3.1).

En nuestros análisis llamamos *falsos positivos* a todas aquellas parejas de objetos que se detectan sin ser alguno de los dos objetos micronúcleo.

Por otro lado, llamamos *falsos negativos* a todas aquellas parejas de objetos de núcleo-micronúcleo y que no son detectadas en el análisis.

En un sistema ideal de detección, la cantidad de falsos positivos y falsos negativos debe de ser cero.

Tabla 4.1. Validación del programa de micronúcleos. El término *ImageJ* se refiere a los micronúcleos contados por el programa de conteo de micronúcleos, usando previamente el programa Imagen, (ver etapa 1 en la figura 3.1); *Matlab* se refiere a cuando el procesamiento de imágenes se realizó mediante un script en el entorno de Matlab (ver etapa 2 figura 3.1), *Watershed* se refiere cuando al “script” se le agregó una técnica de separación de objetos en contacto denominada “segmentación por vertientes” o *Watershed* (también dentro de la etapa 2 figura 3.1). *MN Observados* es nuestra referencia de micronúcleos presentes en la imagen, Det son los micronúcleos detectados; FP, son los falsos positivos y FN los Falsos negativos.

MN observados	Image J			Matlab			Watershed		
	Det	FP	FN	Det	FP	FN	Det	FP	FN
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	4	3	0	0	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1	6	5	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	1	0	0	0	1	2	1	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
1	2	1	0	1	0	1	1	0	0
1	3	2	0	3	2	0	3	2	0
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
2	1	0	1	0	0	2	0	0	2
0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
1	3	2	0	0	0	1	0	0	1
1	0	0	1	1	0	0	2	1	0
0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
1	5	4	0	1	0	0	0	0	1
1	0	0	1	2	1	0	2	1	0
1	0	0	1	2	1	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1	5	4	0	1	0	1	2	1	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	8	7	0	2	1	0	5	4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	0	0	6	5	0
1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
1	1	0	0	1	0	0	2	1	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	2	1	0	3	2	0	3	2	0
1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	1	0	0	0	0	1

Continua en la siguiente pagina...

Tabla 4.1 Continua de la página anterior

MN observados	ImageJ			Matlab			con Watershed			
	Det	FP	FN	Det	FP	FN	Det	FP	FN	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
1	4	3	0	2	1	0	2	1	0	
1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	
1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1	3	2	0	0	0	1	3	2	0	
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1	2	1	0	1	0	0	0	0	1	
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
1	0	0	1	0	0	1	6	5	0	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	
1	2	1	0	0	0	1	0	0	1	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
1	2	1	0	1	0	0	2	1	0	
1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
1	3	2	0	1	0	0	2	1	0	
1	4	3	0	1	0	0	2	1	0	
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
1	1	0	0	0	0	1	6	5	0	
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	0	0	2	1	0	1	0	0	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
1	3	2	0	1	0	0	7	6	0	
1	4	3	0	3	2	0	3	2	0	
1	4	3	0	0	0	1	0	0	1	
Total	73	99	52	23	45	13	43	88	47	31

Con los datos obtenidos en la tabla 4.1 podemos hacer un análisis de resultados que se muestra en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Se muestra un análisis de resultados de los diversos métodos utilizados en el trabajo y mostrados en la tabla 4.1. Se puede encontrar la cantidad de falsos negativos y falsos positivos del total de micronúcleos contados. También se puede observar en que porcentaje de las imágenes hay presentes falsos positivos y falsos negativos.

	ImageJ	Matlab	con Watershed
Total de falsos positivos	64.2%	16.0%	58.0%
Total de falsos negativos	28.4%	53.1%	38.3%
Imágenes con falsos positivos	25.9%	11.1%	27.2%
Imágenes con falsos negativos	28.4%	50.6%	38.3%

4.2. Discusión

Los resultados obtenidos arrojan en total un alto nivel de falsos positivos y negativos. Aunque esto lo sabíamos de entrada, dados los resultados por expertos, reportados por Tolbert, descritos en la sección 1.8 (error neto de 48%), esperábamos que hubiera una mejora sustancial, al contar con un sistema automático. Debemos de tomar en cuenta varios factores para entender este bajo desempeño del protocolo y del programa en su fase actual, que dada la dificultad advertida en la literatura, constituye un estudio de factibilidad, además de establecer y probar un protocolo y estudiar la eficacia de distintos parámetros morfométricos sencillos.

Primero debemos de hacer la observación de que ajustar el protocolo para que realice el conteo de imágenes depende de más de una variable; cada uno de los pasos mostrados en la figura 3.1 es de suma importancia para obtener un resultado óptimo. Muchas de estas variables cambian mucho de una imagen a otra. Si la imagen no tiene la iluminación adecuada, tiene un fuerte gradiente de luz, la tinción no está lo suficientemente limpia, la foto es revelada de manera distinta en cada sesión (que fue nuestro caso), está digitalizada con el *scanner* de manera inadecuada (baja resolución, contraste sub-óptimo etc.), o todas estas condiciones varían en distintas imágenes, el programa no mostrará resultados satisfactorios, a pesar de que las partes siguientes a la digitalización, estén perfectamente ajustadas. Al segmentar una imagen, con supervisión del usuario, resulta relativamente fácil verificar que los núcleos y micronúcleos queden bien segmentados y se disminuya el número de objetos ajenos a nuestro interés. Sin embargo, al automatizar el método de segmentación, es necesario establecer un intervalo fijo de valores de gris para segmentar las imágenes; este intervalo funcionará bien para algunas imágenes y para otras no. El programa podría intentar encontrar de manera automática el umbral de segmentación más adecuado. Esto implicaría que se hiciera automáticamente un análisis previo de la imagen, como un histograma por ejemplo, y a partir de este histograma detectar los picos correspondientes a núcleos y micronúcleos, tal como se expuso en el capítulo 2. El problema radica en que herramientas de análisis como el histograma toman en cuenta toda la imagen, y si los núcleos y micronúcleos son una pequeña parte de la imagen, será muy difícil localizar, en el histograma, los puntos correspondientes a éstos. En la figura 4.1 observamos una imagen (con previa remoción de fondo) que contiene en el centro un núcleo con dos micronúcleos. En la figura 4.1b vemos a ese núcleo y sus dos micronúcleos bien segmentados en un intervalo de $[0, 80]$, y finalmente en la figura 4.1c observamos el histograma de la figura 4.1a. Nótese que debido a la gran cantidad de blanco que domina a la figura, es difícil deducir, a partir de éste, el intervalo adecuado de segmentación. Esto dificultaría enormemente que el programa

escogiera de manera automática el intervalo de segmentación. Por ahora la única opción para automatizar el sistema, es establecer el intervalo más representativo, en nuestro caso $[0, 55]$, y es inevitable que nuestra eficiencia de detección se vea afectada de manera negativa.

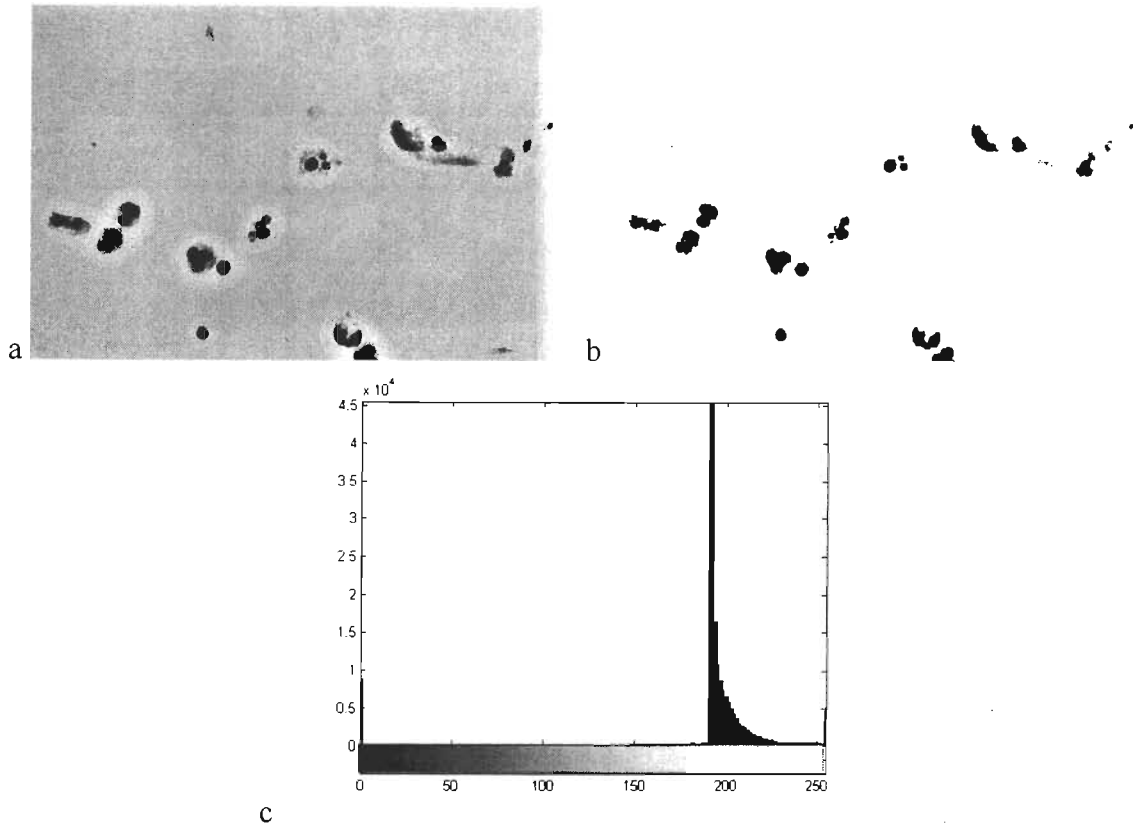




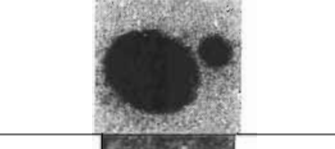



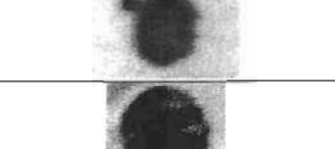

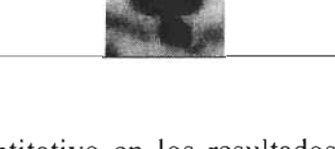



Figura 4.1. a) Imagen de células epiteliales de cérvix conteniendo al centro un núcleo con dos micronúcleos. b) Imagen 4.1a segmentada en un intervalo de $[0, 80]$. c) Histograma de la figura 4.1a.

Otro factor que se estudió como causante de deficiencia en la detección, es que en muchas ocasiones los núcleos se fusionan formando un solo objeto, con lo cual el núcleo no podrá ser detectado. La tabla 4.2 nos muestra seis imágenes de núcleos con un micronúcleo y vemos también su imagen segmentada y se muestra la distancia aproximada entre los bordes del núcleo y micronúcleo, medida en la imagen en escala de gris. Como es de esperarse, los micronúcleos más cercanos al núcleo son los que tienen más tendencia a fusionarse, pero es importante hacer notar que no es el único factor. Observamos una figura con distancia de 4 píxeles sin fusionarse mientras que encontramos una de 5 píxeles que está completamente fusionada. Esto es debido a que intervienen gran cantidad de factores para determinar si un micronúcleo se fusiona a su núcleo o no. Se debe de considerar si la imagen está bien enfocada durante la adquisición (nótese que la última figura de la tabla 4.2 está fusionado el micronúcleo, aun antes de la segmentación), el brillo, el contraste y el intervalo de segmentación, entre otros.

Tabla 4.2. Distancia entre los bordes de núcleos y micronúcleos (las imágenes no se encuentran a la misma escala).

Distancia aproximada entre los bordes (pixeles)	Imagen en escala de gris	Imagen segmentada
20		
16		
4		
2		
5		
0		

Aun más grave, desde el punto de vista cuantitativo en los resultados presentados, que no contar micronúcleos (falsos negativos), es el gran número de falsos positivos. Todos los pasos mostrados en la figura 3.1, hasta la restauración morfológica, deben de estar dirigidos a eliminar la mayor cantidad posible de objetos que no son de nuestro interés, pero en la mayoría de las imágenes segmentadas encontramos gran cantidad de objetos extraños y basuras. Los criterios de conteo, área, circularidad y distancia, nos ayudan a eliminar gran cantidad de objetos, pero no hay garantía de que un objeto, distinto a un micronúcleo, si cumpla los tres criterios utilizados, considerando que algunas imágenes tienen más de 150 objetos, no es de extrañar que tengamos un número de falsos positivos tan grande.

Como se ve en la tabla 4.2, el método utilizado con *ImageJ* produjo una gran cantidad de falsos positivos; al depender más de *matlab* aumentó significativamente la cantidad de falsos negativos, al considerar que esto podría ser producto de objetos en contacto se añadió al script técnicas de *watershed* con lo cual disminuyó significativamente la cantidad de falsos negativos, pero como era de esperarse al incrementarse la cantidad de objetos presentes en la imagen, también hubo un ligero incremento de la cantidad de falsos positivos. Las técnicas de *watershed* pueden ser de utilidad en trabajos futuros pero deben de utilizarse con precaución, ya que anomalías tales como *broken eggs* pueden ser confundidas con micronúcleos celulares.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El trabajo actual es un estudio de factibilidad y, de hecho, la etapa inicial para desarrollar un sistema de conteo automático de micronúcleos celulares mediante el análisis de imágenes digitales por computadora. Se observó que es necesario mejorar el sistema de captura de imágenes, al contar con equipos tales como una cámara digital de alta definición adaptada al microscopio. Ello eliminará la variación en el proceso de revelado de películas en color. Así mismo, por todo lo aquí expuesto, deben refinarse todos los pasos en la adquisición, tales como homogeneidad de la solución en la muestra, una iluminación más adecuada y más homogénea, etcétera, ya que de estos factores dependerá un mejor resultado en una detección eficiente de micronúcleos celulares. Los resultados aquí obtenidos muestran que la más ligera variación de estos detalles puede afectar de manera notoria la eficiencia de detección.

Es importante señalar que hasta donde pudimos investigar, no existe en la literatura un trabajo que reporte un conteo automatizado de parejas núcleo-micronúcleo. En el denominado *Human Micronucleus Project* (Fenech et al. 1999), se describe el estado del arte y las dificultades en la validación y estandarización de protocolos, usando aún conteos mediante expertos humanos.

El mayor inconveniente con los resultados obtenidos en este trabajo es el alto número de falsos positivos. Es de esperarse que al ser mejoradas las condiciones, en trabajos posteriores los resultados sean mejorados notablemente. En el peor de los casos, con los resultados obtenidos, si por ejemplo, una persona cuenta manualmente 3000 células y en éstas detecta 10 micronúcleos; implementando el protocolo de automatización en el estado actual contaría entre 15 y 20 micronúcleos. Esto resulta bastante inconveniente, sin embargo podemos pensar en que el programa guarde esas 20 imágenes para que sean analizadas por el experto. En este panorama, con una alta eficiencia de detección (muy cercana al 100% aun con falsos negativos) esta persona analizaría 20 células en vez de 3000, por lo cual, a pesar de los resultados actuales, el programa tiene una buena perspectiva ser desarrollado en un futuro cercano, debido a su conveniencia.

Entre las mejoras de análisis que hemos detectado se encuentran las siguientes:

- Con una mayor resolución de adquisición, el filtrado morfológico será más preciso, permitiendo incluir fragmentos o posibles micronúcleos que actualmente son representados por un solo píxel. Adicionalmente, todas las mediciones de forma, como circularidad, área y distancia, serán más exactas, aunque siempre se tendrán variaciones en la tinción..
- Al comprender mejor los diferentes objetos que pueden ser confundidos con micronúcleos, según la descripción de Tolbert, 1992 (ver sección 1.8), se podrían incluir parámetros adicionales de discriminación, tales como la textura, el color y relaciones espaciales entre los diferentes objetos que constituyen las aberraciones semejantes a una pareja núcleo-micronúcleo.
- El análisis de color, una vez uniformizada la adquisición, se debería hacer en el espacio de HSL (o semejantes), que permite deshacerse de las variaciones por iluminación y espesor de la muestra, al basarse sólo en la componente de matiz.

- El método de segmentación por vertientes, o *Watershed* fue probado ya al final de este trabajo y puede modificarse y adaptarse mejor. Pero cabe aclarar que de usarse debe de tenerse precaución de evitarse el confundir micronúcleos celulares con otras alteraciones tales como *broken eggs*. Esto implica contar con otros criterios (forma, textura, color, configuración espacial, etc.) que permitan caracterizar e identificar estos y otros casos excepcionales.
- En los trabajos reportados se consideran miles de células analizadas [Guzmán 1997]. Como en nuestro caso se usaron muestras obtenidas por fotografía, la muestra fue en extremo reducida. Una adquisición automatizada permitirá elevar considerablemente la población bajo estudio.
- Evaluar el uso de técnicas distintas de segmentación al umbralaje. Por ejemplo Mouroutis, 1997 reporta un método de segmentación basado en la transformada de Hough para segmentación de núcleos celulares. Sin embargo nosotros elegimos el método de umbralaje ya que por su simplicidad resulta ideal para un trabajo de evaluación preliminar como el presente y no todas las células son perfectamente circulares y presentan bordes muy irregulares que sería necesario alisar.

Con las mejoras como las arriba señaladas, futuros trabajos con el mismo objetivo o similares, podrían obtener mejores resultados, para lo cual se requiere de un mejor equipo y reajustar muchas de las variables aquí utilizadas. Incluir un mayor número de criterios o pasos en el procesamiento de imágenes, podría en un momento determinado ser un factor importante para un mejor conteo.

Finalmente, debe tomarse en cuenta que Tolbert, 1992 reporta una muy baja confiabilidad en el conteo manual de micronúcleos (76% intra-observador, 47% inter.-observador); esto revela no solo que el problema no es sencillo, sino además que los resultados obtenidos no están demasiado por debajo de lo que se obtiene con un conteo manual, donde no sólo los criterios no son definitivos, sino que hay otras aberraciones que pueden pasar por micronúcleos.

ANEXO A. Programa de análisis de imágenes ImageJ

ImageJ es un paquete de programas para procesamiento de imágenes, basado en el lenguaje de programación *Java*. Puede editar, analiza, procesar guardar e imprimir imágenes de 8, 16 y 32 bits. Puede leer imágenes en muchos formatos, incluyendo TIF, GIF, JPEG, DICOM; FITS y “raw”. Puede calcular área y estadísticas basadas en píxeles definidas por el usuario. Puede medir distancias y ángulos. Puede crear histogramas y perfiles de imágenes. Maneja funciones comunes de procesamiento de imágenes tales como manipulación de contraste, perfilado, suavizado, detección de bordes y filtro mediana (ver figura A.1).

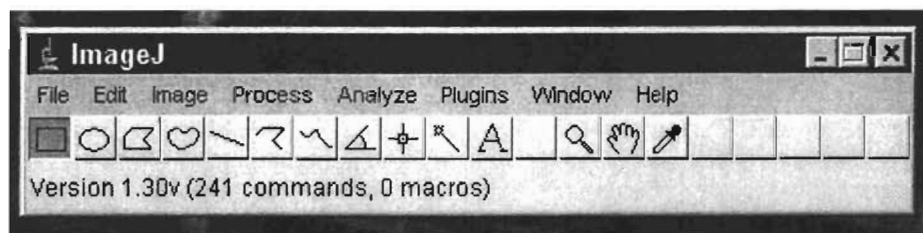


Figura A.1 Ventana del menú principal del programa ImageJ.

Para una adquisición, análisis y procesamiento particular, de acuerdo con las necesidades del usuario, se pueden desarrollar “plugins” (piezas de software que ayudan a manipular los objetos de una aplicación), usando el editor y compilador en java incluido en el programa (ver figura A.2).

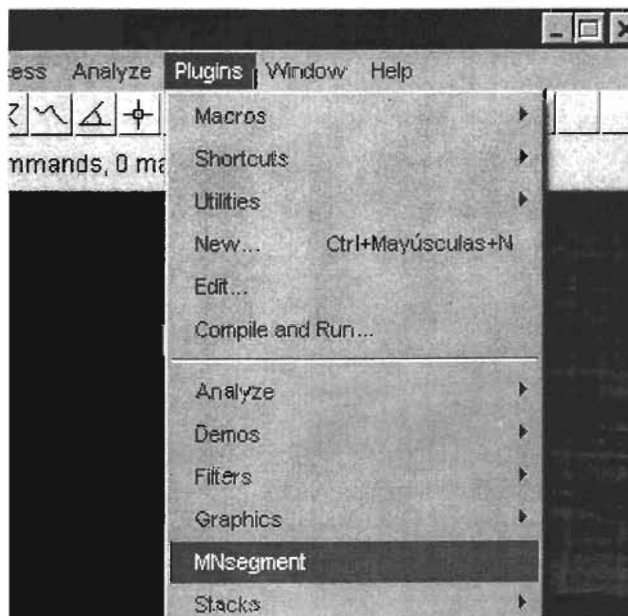


Figura A.2 Herramientas de “plugins” para imageJ

Como señalamos en el capítulo 3, durante el desarrollo del trabajo se fueron detectando anomalías en el funcionamiento de ImageJ, del cual usamos primero la versión 1.25, y luego otras, en las cuales había mejoras o correcciones a problemas anteriores, pero a la fecha siguen existiendo y son importantes cuando se trata de realizar un trabajo completo, incluyendo morfometría, como fue nuestro caso. Los programas en Matlab permitieron resolver una por una las dificultades encontradas.

ANEXO B. Programa de Conteo de Micronúcleos de en Matlab vers. 6.5 (se aprovecharon algunas funciones del *toolbox*)

```

% Este programa cuenta todos los micronúcleos de imágenes que se
% encuentren en una misma carpeta en el disco duro de acuerdo a
% las siguientes instrucciones:
% Poner la ruta del directorio donde están las imágenes
% en la variable "dirnom" El programa procesará todas las imágenes
% .tif de ese directorio y mostrará los resultados
(sugerencia: los resultados se pueden copiar
% pegar y guardar en un archivo de Texto)
dircontenido=dir(strcat(dirnom,'/*.tif'));
[numarchi,n]=size(dircontenido);
TotalMN=0;
for archi=1:numarchi
% Abrir una imagen con nombre en la variable "a" y cargarla en la
matriz "original"
a=strcat(dirnom,'\',dircontenido(archi).name);
matriz_resultante{archi,1}=dircontenido(archi).name;
original=imread(a);
original=im2double(original);
% Se aplica el filtro gaussiano y se le resta la mitad de este a
la imagen original
filtro=fspecial('gaussian',50,20);
gaus=imfilter(original,filtro,'replicate');
procesada=original-(0.5*gaus);
% Segmentación
umbral=graythresh(procesada);
procesada=im2bw(procesada,umbral);
% Se cambia el fondo por los objetos
procesada=1-procesada;
% apertura y cerradura
SE=strel('disk',3,0);
procesada=imopen(procesada,SE);
procesada=imclose(procesada,SE);

% se quitan los objetos de los bordes
procesada=imclearborder(procesada);
% Watershed
compe=1-procesada;
D=bwdist(compe);
D=medfilt2(D,[7 7]);
L=watershed(-D);
W=L==0;
procesada=procesada - W;
% se etiquetan los objetos
[etiqueta,numobjeto]=bwlabeled(procesada);

```



```
        end
    end
end
end;
matriz_resultante{archi,2}=MN_detectados;
TotalMN=TotalMN+MN_detectados;
Hecho=strcat(dircontenido(archi).name,' Analizada');
Hecho
end
matriz_resultante
TotalMN
```

REFERENCIAS

Anward y Rosin 1993

Anwar, W.A. & Rosin, M.P., 1993. *Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel*. Mutation Res 298 pp. 3, 179-85.

Ballarin 1992

Ballarin, C., Farto F., Giacomelli L., Battista Bartolucci G. & Clonfero E., 1992. *Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers*, Mutation Res., 280 pp:1-7.

Cairos, J. ,1975

Cairos, J. (1975) *Mutational selection and the natural history of cancer*, Nature, London, 255. pp 197-200.

Evans y cols., 1959

Evans, H. J.; G. J. Neary y F. S. Williams (1959) *The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen*. Chromosome damage: the production of micronuclei. Int J. Radiat Biol. pp 216-229.

Fenech y cols., 1999

Fenech Michael, Holland Nina, Chang Wushou P., Zeiger Errol, Bonassi Stefano. (1999) *The HUMAN MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleous technique for measuring DNA damage in humans*. Mutation Research 428, pp. 271-283.

Fontham 1986

Fontham, E., Correa P., Rodriguez E. & Lin Y., (1986). *Validation of smoking history with the micronuclei test*, In: *Mechanism in Tobacco Carcinogenesis*, Hoffman, D and Harris, C.C. (Eds.), Cold Spring Harbor, N.York, pp. 113-119.

Gonsebatt, 2000

Gonsebatt María Eugenia Bonaparte, Guzmán Dora Patricia Bazan, Blas Juliana, (2000) *Cytogenetic and cytotoxic damage in exfoliated cells as indicators of effects in humans*, Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2. Butterword, Kluwer Academic Plenum Publishers, New York,. pp. 317.

Gonzales, 2004

Gonzales Rafael C; Richard E. Woods; Steven L. Eddins; (2004) *Digital Image Processing Using Matlab*; Prentice Hall 2004 by Pearson Education, Inc. pp. 378, 359-362.

González Cid 1991

González Cid, M., Loria D., Vilensky M., Miotti J.L. & Matos E., 1991. *Leather tanning workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine*, Mutation Res., 259 pp:197-201.

Guzmán, 1997

Guzmán Dora Patricia Bazan, (1997). *Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica a arsénico*. pp 3-5.

Heddle, 1973

Heddle, J. A. (1973) *A rapid in vivo test for chromosomal damage*. Mutat. Res.18.

Hulka, 1990

Hulka, B. S. (1990) *Overview of biological markers*. En Biological Markers in Epideiology, eds. B. Hulka , T Wilkinson, y J. Griffith,. New York. Oxford University Press. pp 1-15.

Jähne, 2002

Jähne Bernd, (2002). *Digital image processing*, Berlin: Springer,. pp 427.

Lewin, 1997

Lewin, B. *Genes VI*, Oxford University Press, London, 1997, 4, pp 79-80.

Lodish 1999

Lodish Harvey, Berk Arnold, S. Zipursky Lawrence, Matsudatra Paul, Baltimore David, Darnell James, (1999). *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company. pp 320-329.

Livingston 1990

Livingston, G., Reed R., Olson B. & Lockey J., (1990). *Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa*, Environ. Mol. Mutagen., 15 pp. 136-144.

Mandard 1987

Mandard, A.M., Duigou F., Marnay J., Masson P., Qiu S.L, J.S. Yi, Barrellier P. & Lebigot G., (1987). *Analysis of the results of the micronucleus test in patients presenting upper digestive tract cancers and in non-cancerous subjects*. Int. J. Cancer, 39 pp.442-444.

Matter y Schmid, 1971

Matter B., y Schmid W (1971). *Trenimon induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronuclei test* Mutat Res, 12.

Mouroutis, 1997

Mouroutis T., Roberts S. J., Bharath A. & Alusi G. (1997). *Compact Hough Transform and Maximum Likelihood Approach to Cell Nuclei Detection*. Proceedings of 13th International Conference on Digital Signal Processing DSP'97, 2-4 July 1997, Santorini, Greece, pp. 869-872.

Naib, 1996

Naib, Z. M. (1996). *Cytophatology*, Little Brown & Co.Boston. pp 1-14.

Raafat 1984

Raafat, M., El-Gerzawi. S. & Stich H.F., (1984). *Detection of mutagenicity in urothelial cells of bilhardizial patients by the "micronucleus test"*, J. Egypt. Natl. Cancer Inst., 1:63-67 .

Ranefall, 1997

Ranefall P., Egevad L., Nordin B., Bengtsson E. (1997): *A new method for segmentation of colour images applied to immunohistochemically stained cell nuclei*, Analytical Cellular Pathology, 15, pp. 145-156.

Ribeiro, 1990

Ribeiro L.R., Cerqueira E.M.M., Salvadori D.M.F, Barbosa H.S. & Whorton E.B Jr., 1990. *Monitoring of individuals occupationally exposed to aromatic amines: Mutation and the Environment*, Part C, Mendelsohn and Albertini (Eds.) Wiley-Liss, N.York, pp.387-396.

Rosin 1989

Rosin, M.P., Ochs H.D., Gatti R.A. & Boder E., (1989). *Heterogeneity of chromosomal breakage levels in epithelial tissue of ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes*, Hum Genet., 83 pp. 133-138.

Rosin y German 1985

Rosin, M.P. & German J., (1985). *Evidence for chromosome instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells*, Hum. Genet., 71 pp. 187-191.

Russ, 2000

Russ J.C. (2002): *The Image Processing Handbook*, Fourth edition, CRC Press pp. 425-434.

Sarto 1987

Sarto F., Finotto S., Giacomelli L., Mazzotti D., Tomanin R. & Levis A.G., (1987). *The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa*, Mutagenesis 2, pp. 11-17.

Sarto 1990b

Sarto F., Tomanin R., Giacomelli L., Iannini G. & Cupiraggi A.R., 1990b. *The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide*, *Mutation Res.*, 244 pp:345-351

Stich 1985

Stich, H.F. & Rosin M.P., (1983). *Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronuclei test on human buccal mucosa cells*, Int. J. Cancer, 31, pp. 305-308.

Tolbert, 1992

Tolbert Paige E: Carl Shy M and Allen James W.. (1992). *Micronuclei and other nuclear anomalies in bucal smears: methods development*. Mutation Research 271. pp. 69-77.

Tomanin 1990

Tomanin, R., Sarto F, D. L. Mazzotti, Giacomelli, Raimondi F. & C. Trevisan, (1990). *Louis-Bar syndrome: spontaneous and induced chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells*, Hum. Genet, 85 pp. 31-38.

Vine, 1990

Vine, M. F.,(1990). *Micronuclei*. En: Biological markers in Epidemiology, eds. B. Hulka, T. IloWicolski y J. Griffith,. New York. Oxford University press. pp 125-146.

Yamamoto y Kikuchi, 1980

Yamamoto, K. I., y Kikuchi Y., (1980). *A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons*. *Mutat. Res.*, 71.