	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 1 de 177

FECHA	jueves, 16 de marzo de 2017
--------------	-----------------------------

Señores

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

BIBLIOTECA

Ciudad


SEDE/SECCIONAL/EXTENSIÓN	Sede Fusagasugá
---------------------------------	-----------------

DOCUMENTO	Trabajo De Grado
------------------	------------------

FACULTAD	Ingeniería
-----------------	------------

NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO	Pregrado
---	----------

PROGRAMA ACADÉMICO	Ingeniería Electrónica
---------------------------	------------------------

	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 2 de 177

El Autor(Es):

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS	NO. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN
Rodríguez Barrero	Cesar Mauricio	1079617913
Romero Gabalan	Lyle Alberto	1069750138


Director(Es) del documento:

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS
Roa Guerrero	Edgar Eduardo

TÍTULO DEL DOCUMENTO
DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS MEDIANTE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

SUBTÍTULO (Aplica solo para Tesis, Artículos Científicos, Disertaciones, Objetos Virtuales de Aprendizaje)

TRABAJO PARA OPTAR AL TITULO DE: Aplica para Tesis/Trabajo de Grado/Pasantía
Ingeniero Electrónico


	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 3 de 177

AÑO DE EDICION DEL DOCUMENTO	NÚMERO DE PÁGINAS (Opcional)
19/05/2017	169

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLES: (Usar como mínimo 6 descriptores)	
ESPAÑOL	INGLES
1. Leucograma	Leukogram
2. Espacio del color	Color Space
3. Redes de funciones de Base radial	Radial Base Function Networks
4. Identificación de glóbulos blancos	Identification of white blood cells
5. Descriptores Morfológicos.	Morphological Descriptors
6. Segmentacion	Segmentation

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLES: (Máximo 250 palabras – 1530 caracteres):

En el campo de la medicina el análisis de sangre es uno de los exámenes más importantes para determinar el estado fisiológico de un paciente. Dentro del análisis de la muestra de sangre, un proceso importante es el recuento y clasificación de los glóbulos blancos el cual se realiza de manera manual, siendo esta, una actividad exhaustiva y propensa a errores a causa de la fatiga física que genera, al tratarse de un método que consume largos lapsos de tiempo al profesional. Por esta razón, el propósito de la investigación fue desarrollar una herramienta computacional para la identificación y clasificación de glóbulos blancos, haciendo uso del software MATLAB®. La metodología implementada se basó en el cambio de espacio de color RGB a YCbCr, seguidamente para obtener mejor calidad del proceso de segmentación del núcleo de los glóbulos blancos, se realizó mediante las redes neuronales de base radial (RBFN), posteriormente se clasifican mediante descriptores morfológicos, color y distancia entre objetos. Finalmente, la identificación se visualiza en pantalla, mediante una interfaz gráfica de usuario. Los resultados de la validación de la herramienta demostraron a través del coeficiente de determinación, una precisión de 92,6% de efectividad en la clasificación de los glóbulos blancos respecto al profesional experto. De esta manera, el sistema propuesto se convierte en un soporte tecnológico confiable que contribuye al mejoramiento del análisis para identificación de glóbulos blancos y por consiguiente beneficiaría los centros hematológicos de bajo nivel, así como a los procesos de investigación en el área de medicina.

	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 4 de 177

AUTORIZACION DE PUBLICACIÓN


Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado un alianza, son:

Marque con una "x":

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La conservación de los ejemplares necesarios en la Biblioteca.	X	
2. La consulta física o electrónica según corresponda.	X	
3. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer.	X	
4. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet.	X	
5. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones.	X	
6. La inclusión en el Repositorio Institucional.	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho

	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 5 de 177

lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.


Para el caso de las Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, de manera complementaria, garantizo(garantizamos) en mi(nuestra) calidad de estudiante(s) y por ende autor(es) exclusivo(s), que la Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi(nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí (nuestra) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, *“Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”*, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Universidad de Cundinamarca está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: (Para Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía):

Información Confidencial:


	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 6 de 177

Esta Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de la investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. **SI __x_ NO __**. En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

LICENCIA DE PUBLICACIÓN

Como titular(es) del derecho de autor, confiero(erimos) a la Universidad de Cundinamarca una licencia no exclusiva, limitada y gratuita sobre la obra que se integrará en el Repositorio Institucional, que se ajusta a las siguientes características:

- a) Estará vigente a partir de la fecha de inclusión en el repositorio, por un plazo de 5 años, que serán prorrogables indefinidamente por el tiempo que dure el derecho patrimonial del autor. El autor podrá dar por terminada la licencia solicitándolo a la Universidad por escrito. (Para el caso de los Recursos Educativos Digitales, la Licencia de Publicación será permanente).
- b) Autoriza a la Universidad de Cundinamarca a publicar la obra en formato y/o soporte digital, conociendo que, dado que se publica en Internet, por este hecho circula con un alcance mundial.
- c) Los titulares aceptan que la autorización se hace a título gratuito, por lo tanto, renuncian a recibir beneficio alguno por la publicación, distribución, comunicación pública y cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente licencia y de la licencia de uso con que se publica.
- d) El(Los) Autor(es), garantizo(amos) que el documento en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro(aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAR113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 7 de 177

e) En todo caso la Universidad de Cundinamarca se compromete a indicar siempre la autoría incluyendo el nombre del autor y la fecha de publicación.

f) Los titulares autorizan a la Universidad para incluir la obra en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

g) Los titulares aceptan que la Universidad de Cundinamarca pueda convertir el documento a cualquier medio o formato para propósitos de preservación digital.

h) Los titulares autorizan que la obra sea puesta a disposición del público en los términos autorizados en los literales anteriores bajo los límites definidos por la universidad en las “Condiciones de uso de estricto cumplimiento” de los recursos publicados en Repositorio Institucional, cuyo texto completo se puede consultar en biblioteca.unicundi.edu.co

i) Para el caso de los Recursos Educativos Digitales producidos por la Oficina de Educación Virtual, sus contenidos de publicación se rigen bajo la Licencia Creative Commons : Atribución- No comercial- Compartir Igual.




j) Para el caso de los Artículos Científicos y Revistas, sus contenidos se rigen bajo la Licencia Creative Commons Atribución- No comercial- Sin derivar.



Nota:

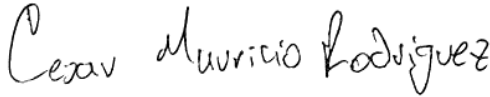

Si el documento se basa en un trabajo que ha sido patrocinado o apoyado por una entidad, con excepción de Universidad de Cundinamarca, los autores garantizan que se ha cumplido con los derechos y obligaciones requeridos por el respectivo contrato o acuerdo.

La obra que se integrará en el Repositorio Institucional, está en el(los) siguiente(s) archivo(s).

	MACROPROCESO DE APOYO	CODIGO: AAAr113
	PROCESO GESTION APOYO ACADEMICO	VERSION:1
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	PAGINA: 8 de 177

Nombre completo del Archivo Incluida su Extensión (Ej. Título Trabajo de Grado o Documento.pdf)	Tipo de documento (ej. Texto, imagen, video, etc.)
1. DesarrolloDeUnaHerramientaComputacional ParaLaldentifiacionDeGlobulosBlancos.pdf	PDF

En constancia de lo anterior, Firmo (amos) el presente documento:

APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	FIRMA
Rodríguez Barrero Cesar Mauricio	
Romero Gabalan Lyle Alberto	

DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS MEDIANTE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

CESAR MAURICIO RODRIGUEZ BARRERO

Estudiante Ingeniería Electrónica

LYLE ALBERTO ROMERO GABALAN

Estudiante Ingeniería Electrónica

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

Ingeniería Electrónica

Facultad de Ingeniería

Fusagasugá, Colombia

2017

DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS MEDIANTE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
Ingeniero Electrónico

CESAR MAURICIO RODRIGUEZ BARRERO

Estudiante Ingeniería Electrónica

LYLE ALBERTO ROMERO GABALAN

Estudiante Ingeniería Electrónica

Director:

EDGAR EDUARDO ROA GUERRERO

MsC. Automatización y Control Industrial

Línea de investigación:

Software, sistemas emergentes y nuevas tecnologías

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

Ingeniería Electrónica

Facultad de Ingeniería

Fusagasugá, Colombia

2017

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Fusagasugá ____ de _____ del ____

Dedicatoria

A nuestras familias y personas supremamente importantes, por brindarnos su tiempo y apoyo incondicional.

Pero, sobre todo, a todas esas personas que creen y ven el lado bueno de una situación.

Agradecimientos

A nuestro director de tesis, Edgar Roa Guerrero, que con su conocimiento y simpatía nos apoyó en todo momento, para culminar con éxito todo nuestro trabajo investigativo.

A las doctoras, Nancy Magally Santos y Claudia Patricia Nieto, por abrirnos las puertas del laboratorio clínico y brindarnos toda la ayuda posible en la parte de medicina para el desarrollo del proyecto.

A todos los docentes que, a lo largo de nuestras vidas, aportaron con su conocimiento, en nuestra formación académica, para forjar un presente de numerosos logros.

A todos nuestros compañeros de estudio y de nuestras vidas, con quienes compartimos momentos valiosos, en especial a Felipe.C, quien fue la persona que nos ayudó a encontrar el equilibrio entre las horas arduas de trabajo y el ocio. A todos y en todo momento, muchas gracias.

Contenido

Resumen	19
Abstract	21
Introducción	22
1. El problema	24
1.1. Planteamiento del problema.....	24
1.2. Objetivos del estudio	25
1.2.1. Objetivo general.....	25
1.2.2. Objetivos específicos.....	25
1.3. Justificación	26
1.4. Alcances y limitaciones.....	27
2. Marco teórico	28
2.1. Fundamentos teóricos	28
2.1.1. Hemograma.....	28
2.1.2. Leucograma	28
2.1.3. Recuento total de leucocitos.....	28
2.1.4. Recuento diferencial de leucocitos	29
2.1.5. Fundamentos de la visión artificial	29
2.1.6. Imagen Digital.....	30
2.1.7. Algoritmos de filtrado de imágenes	30
2.1.8. Algoritmos de segmentación	31
2.1.9. Algoritmos de clasificación de objetos.....	31
2.1.10. Redes neuronales de base radial.....	32
2.2. Estado del arte	33
3. Diseño metodológico	47
3.1. Preparación y tinción del frotis sanguíneo	47
3.2. Adquisición y pre-procesado de las imágenes.....	49
3.3. Segmentación de los Núcleos de las Células.....	49
3.3.1. Redes neuronales de base radial.....	49
3.3.2. Objetos n conectados y detección de áreas.....	50
3.4. Clasificación de las células	50
3.4.1. Descriptores Morfológicos	51

3.4.2. Medición de distancias entre objetos	52
3.5. Interfaz gráfica de usuario	53
3.6. Validación de la herramienta.....	53
4. Análisis de resultados y discusión	55
4.1. Procesamiento de imágenes	55
4.1.1. Segmentación de Núcleos de Glóbulos Blancos	56
4.1.2. Clasificación de las células de glóbulos blancos.....	58
4.2. Validación de la herramienta.....	61
4.3. Análisis estadístico.....	62
5. Conclusiones y trabajos futuros	69
Apéndice 1: Manual de usuario de la herramienta	71
A.1.1. Funcionamiento.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS	78

Índice de figuras

Figura 1. Árbol de problemas de la situación. Elaborada por los autores.....	24
Figura 2. Poblaciones de glóbulos blancos. Tomada de practicasdehematologiaycitologia.wordpress.com	29
Figura 3. Definición de una imagen. Tomada de Fraga, 2011.....	30
Figura 4. Imagen filtrada. Tomada de Mathworks de MatLab.....	31
Figura 5. Imagen segmentada. Tomada de González & Woods, 2002	31
Figura 6. Clasificación de células por método de descriptores morfológicos. Elaborado por los autores.	32
Figura 7. Arquitectura de una red de tipo RBFN, Tomado de www.ibiblio.org.....	32
Figura 8. Estructura del dispositivo. Tomada de Zhang, Bai, Wu, & Ying, 2015.....	35
Figura 9. Principio de Funcionamiento. Tomada de Zhang, Bai, Wu, & Ying, 2015.....	35
Figura 10. Contornos resaltados de las células. Tomada de Theerapattanakul, Plodpai, & Pintavirooj, 2014.	36
Figura 11. Segmentación del glóbulo blanco aplicando el método de contorno activo tipo Snake. Tomada de Theerapattanakul, Plodpai, & Pintavirooj, 2014.....	36
Figura 12. Imagen segmentada utilizando el método OTSU. Tomada de Gautam, Bhadauria, & Garhwal, 2014.	37
Figura 13. Segmentación de células blancas utilizando el método de región creciente. Tomada de Lin & Hsinchu, 2012.....	38
Figura 14. Diagrama del proceso para realizar la detección de bordes. Tomada de Jha, Das, & Dutta.....	38
Figura 15. Segmentación de los glóbulos mediante la detección de sus bordes a) imagen del frotis de sangre en escala de grises b) segmentación de los núcleos de las células blancas. Tomada de Jha, Das, & Dutta.....	39
Figura 16. Segmentación de las células a) Imagen original b) Ajuste de contraste c) Aplicación de contorno. Tomada de Wang Xiaozhang & Xiang Zhang, 2010.....	40
Figura 17. Grafica de análisis estadístico del conteo y clasificación de los glóbulos blancos. Tomada de (Theera-Umpon & Gader, 2000.....	41
Figura 18. Imagen observada desde los ejes hiperespectrales. Tomada de Qingli, Yiting, Hongying, Jianbiao, & Fangmin, 2013.	41
Figura 19. Segmentación de las células. Tomada de Qingli, Yiting, Hongying, Jianbiao, & Fangmin, 2013.....	42
Figura 20. Diagrama de flujo del algoritmo. Tomada de Mostafa Mohamed & Guaily, 2012. 43	
Figura 21. Segmentación de diferentes células blancas. Tomada de Mostafa Mohamed & Guaily, 2012.	43

Figura 22. Diagrama de flujo del algoritmo. Tomada de Mostafa Mohamed, 2012.....	44
Figura 23. Segmentación de las células. Tomada de Mostafa Mohamed, 2012.....	45
Figura 24. Segmentación aplicando el método. Tomada de Mohamed & Far, 2014.	45
Figura 25. Segmentación total de los núcleos de las células blancas. Tomada de Mohamed & Far, 2014.....	46
Figura 26. Diagrama etapas de la metodología. Elaborada por los autores.	47
Figura 27. Extendido del frotis de sangre. Tomada de Rodak, 2005.....	47
Figura 28. Extendido de sangre método de dos portaobjetos. Tomada de Rodak, 2005.....	48
Figura 29. Campana de gauss, Tomada de http://www.acsendo.com	50
Figura 30. Descriptor morfológico Solidez, Elaborada por los Autores.....	51
Figura 31. Células de Glóbulos Blancos a) Monocito y b) Eosinófilo. Elaborada por los Autores.	52
Figura 32. Distancia entre dos puntos de la imagen. Elaborada por los Autores.....	53
Figura 33. Diagrama de flujo del Algoritmo. Elaborado por los autores.....	55
Figura 34. Conversión de Espacio de color. A) Imagen original. B) Imagen en YCbCr. Elaborada por los autores.	56
Figura 35. Segmentación basada en redes neuronales de base radial. Elaborada por los autores.....	57
Figura 36. Aplicación de operadores morfológicos. Elaborado por los autores.	58
Figura 37. Análisis de características morfológicas. Elaborada por los autores.	58
Figura 38. Calculo distancia entre objetos. Elaborado por los autores.	59
Figura 39. Clasificación de Células de Glóbulos Blancos. Elaborada por los autores.	60
Figura 40. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 1. Elaborada por los autores.	63
Figura 41. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 2. Elaborada por los autores.	64
Figura 42. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 3. Elaborada por los autores.	65
Figura 43. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 4. Elaborada por los autores.	66
Figura 44. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 5. Elaborada por los autores.	67
Figura 45. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas de todos los individuos. Elaborada por los autores.	68
Figura 46. Comparación de resultados de la identificación de células de glóbulos blancos, realizado por el experto y la herramienta computacional. Elaborada por los autores.	68

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados de las características morfológicas. Tomada de Wang Xiaozhang & Xiang Zhang, 2010.	40
Tabla 2. Porcentaje de resultados obtenidos. Tomada de Mohamed & Far, 2014.	46
Tabla 3. Valores descriptores morfológicos. Elaborada por los autores.	59
Tabla 4. Resultados análisis manual obtenidos por el experto en hematología. Elaborada por los autores.	61
Tabla 5. Resultados análisis por parte de la herramienta computacional. Elaborada por los autores.....	62
Tabla 6. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 1. Elaborada por los autores.	62
Tabla 7. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 2. Elaborada por los autores.	63
Tabla 8. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 3. Elaborada por los autores.	64
Tabla 9. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 4. Elaborada por los autores.	65
Tabla 10. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 5. Elaborada por los autores.	66
Tabla 11. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta de los cinco individuos. Elaborada por los autores.	67

Resumen

En el campo de la medicina el análisis de la sangre es uno de los exámenes más importantes para determinar el estado fisiológico de un paciente, como lo son, las enfermedades, el contenido de minerales, presencia de drogas entre otras (International Association of Providers of AIDS (CARE), s.f.). Dentro del análisis de la muestra de sangre, un proceso importante es el recuento y clasificación de los glóbulos blancos el cual se realiza de manera manual, siendo esta, una actividad exhaustiva y propensa a errores procedente de la fatiga física que genera al tratarse de un método que consume largos periodos de tiempo al profesional. Por esta razón, las técnicas de procesamiento de imágenes y vídeo se han convertido en una alternativa para la detección de patrones en objetos diminutos presentes en imágenes durante procesos repetitivos.

El propósito de la investigación fue desarrollar una herramienta computacional para la clasificación de glóbulos blancos, haciendo uso del software MATLAB®, la cual cuenta con una interfaz gráfica compuesta por herramientas, funciones y aplicaciones de procesamiento de imágenes, proporcionando así, un soporte tecnológico al profesional durante el análisis hematológico.

La herramienta computacional estará dividida en 5 fases: inicialmente se hará el proceso de adquisición de imágenes correspondiente a cada muestra de sangre, seguidamente se realizará un cambio de espacio de color RGB a YCbCr para hacer más notorias las características de los núcleos frente a los demás objetos presentes en la sangre, luego del proceso de filtrado se procede a realizar la extracción de objetos presentes en la imagen correspondientes a las células de glóbulos blancos, posteriormente, se realizará el proceso de clasificación de las células basado en descriptores morfológicos y del color. Finalmente, se realizará la evaluación y comparación de los resultados obtenidos de la herramienta computacional con respecto a los resultados obtenidos por parte del profesional experto.

Los resultados de la validación de la herramienta demostraron a través del coeficiente de determinación un buen desempeño, con un 92,6% de efectividad en la clasificación de los glóbulos blancos respecto al profesional experto. Siendo el índice más alto de 98% y el más bajo de 79,1%.

En último lugar, el desarrollo del proyecto permitirá a los programas de ingeniería electrónica y de enfermería contar con una herramienta computacional programable,

capaz de identificar y clasificar los glóbulos blancos, también proporcionará un soporte tecnológico al análisis manual realizado por parte de profesionales expertos en los diferentes laboratorios especializados.

Abstract

In medicine, the analysis of the blood is one of the most important tests to determine the physiological state of a patient, such as diseases, mineral content, presence of drugs among others (International Association of Providers of AIDS (CARE), sf). Within the analysis of the blood sample, an important process is the white blood cell count and classification, which is performed manually, this being an exhaustive activity and prone to errors because of the physical fatigue it generates when it comes to A method that consumes long laxes of time to the professional. For this reason, image and video processing techniques have become an alternative for detecting patterns in minute objects present in images during repetitive processes.

The purpose of the research was to develop a computational tool for the classification of white blood cells, using MATLAB® software, which has a graphical interface composed of tools, functions and applications of image processing, thus providing a technological support to the During the hematological analysis.

The computational tool will be divided into 5 phases: initially the image acquisition process will be done corresponding to each blood sample, followed by a change of RGB color space to YCbCr to make more noticeable the characteristics of the cores compared to the others Objects present in the blood, after the filtering process is carried out to extract objects present in the image corresponding to the cells of white blood cells, later, the cell classification process will be performed based on morphological and color descriptors. Finally, the evaluation and comparison of the results obtained from the computational tool with respect to the results obtained by the expert will be carried out.

The results of the validation of the tool showed a good performance with a coefficient of determination, with a 92.6% effectiveness in the classification of the white blood cells with respect to the expert professional. The highest index was 98% and the lowest was 79.1%.

Finally, the development of the project will allow the electronic engineering and nursing programs to have a programmable computational tool capable of identifying and classifying white blood cells. It will also provide a technological support to the manual analysis performed by professionals who are experts in the Different specialized laboratories.

Introducción

El hemograma es el examen que proporciona información relevante para el diagnóstico patológico de un paciente, el análisis se encarga de observar y realizar recuentos celulares con la finalidad de encontrar alteraciones morfológicas de interés (Torrens, 2015). Dentro del análisis se encuentra el leucograma o recuento de leucocitos (glóbulos blancos), este procedimiento consiste en determinar la cantidad de glóbulos blancos presentes en una determinada unidad de volumen de sangre, este recuento se realiza de forma diferencial y total, la primera contempla las diferentes clases de glóbulos blancos y la segunda a través del recuento de todas las poblaciones. Este examen es indispensable para conocer los valores de concentración y morfología de los glóbulos blancos, brindando información asociada a una amplia gama de enfermedades presentes en el organismo (Maya Campuzano, 2007).

En la actualidad, los centros y laboratorios de hematología de alto nivel realizan un gran número de análisis hemáticos por día, por esta razón, realizan el recuento y clasificación de los leucocitos empleando técnicas automatizadas (García & Bermejo, 2004), a fin de reducir el tiempo que requiere cada examen. Sin embargo, esta técnica requiere de sofisticados y costosos equipos con tecnología importada de difícil acceso a los centros hematológicos de bajo nivel, además requieren de la calibración constante por parte de especialistas (Freitas & Fernández, 2002). Por esta razón, muchos de estos centros optan por realizar el análisis de manera manual.

Dentro de las herramientas utilizadas para dar solución a los factores expuestos anteriormente, se encuentra el tratamiento de imágenes como una propuesta de bajo costo para brindar soporte al profesional técnico en el análisis de recuento y clasificación de las células blancas. Las investigaciones y trabajos realizados en el campo de la visión por computador han permitido extraer y reconocer patrones u objetos en imágenes poco perceptibles para la visión humana, de igual manera realizar la actividad en menor tiempo y disminuyendo los errores que se puedan producir por la medición manual por parte del profesional experto en el caso de la clasificación de las células blancas.

En el presente trabajo se observa el funcionamiento y resultados de una herramienta para la clasificación de los glóbulos blancos a partir de las características morfológicas que presentan los núcleos de las diferentes clases de células blancas. Para su desarrollo, se realizó la adquisición de imágenes a partir del frotis de sangre periférica, las cuales se adecuan utilizando el espacio de color YCbCr, y así extraer los núcleos

y clasificarlos, haciendo uso de las funciones propias del tratamiento digital de imágenes y diseñando a partir del entorno MATLAB® una interfaz gráfica que asista de soporte al experto durante el procedimiento de identificación de glóbulos blancos. Finalmente, los resultados de la clasificación de las células blancas son comparados con un profesional hematológico con el objetivo de analizar estadísticamente el desempeño de la herramienta.

1. El problema

1.1. Planteamiento del problema

Dentro de los exámenes de laboratorio, el análisis del hemograma aporta información relevante sobre el cuadro sanguíneo del paciente. Como parte importante del examen se encuentra el leucograma o análisis de glóbulos blancos, a fin de descartar algún tipo de evolución infecciosa que se esté presentando en el paciente (Aliz & Fernández, 2011). El análisis consiste en determinar la cantidad de glóbulos rojos presentes en una determinada unidad de volumen de sangre, este recuento se realiza de forma diferencial el cual contempla las diferentes clases de glóbulos blancos y el total a través del conteo de toda la población.

Hoy en día a nivel nacional el recuento y clasificación de los glóbulos blancos continua realizándose de forma manual en hospitales y laboratorios especializados. Dicho método presenta poca precisión en los resultados y se encuentra en constante riesgo de inexactitud en comparación con los sistemas automatizados. Además de ser un procedimiento que consume demasiado tiempo al profesional generando fatiga visual, también depende de la calidad del extendido de la sangre y su coloración. Así mismo, la fidelidad en el pronóstico y calidad de los resultados se encuentra limitado a los conocimientos propios del especialista, presentando un impacto negativo debido a la baja repetitividad de los diagnósticos para una misma muestra de sangre. Por consiguiente, es posible afirmar que el hemograma llevado a cabo de manera convencional basado en la inspección visual del especialista podría llegar a ser poco confiable. En la figura 1 se resume brevemente la causa-efecto del problema.

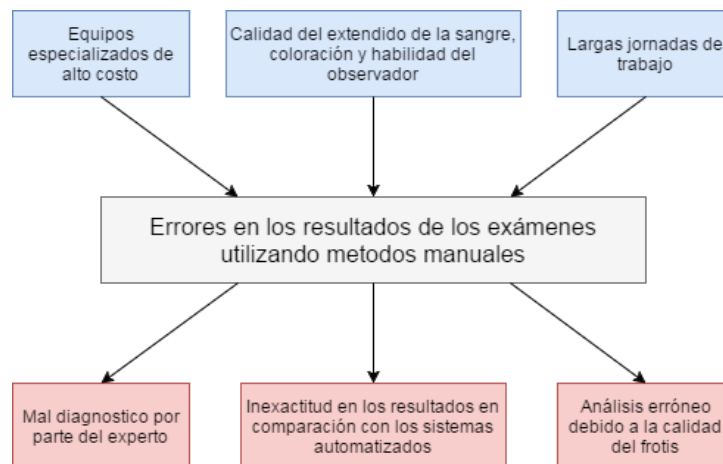


Figura 1. Árbol de problemas de la situación. Elaborada por los autores.

1.2. Objetivos del estudio

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar una herramienta computacional para la identificación de glóbulos blancos mediante procesamiento digital de imágenes.

1.2.2. Objetivos específicos

- Definir una técnica para la adquisición y pre-procesado de imágenes
- Identificar un método de segmentación a partir de las características morfológicas de los diferentes tipos de glóbulos blancos presentes en las imágenes.
- Establecer una técnica para la clasificación de los glóbulos blancos a partir de sus características morfológicas y color de los mismos.
- Evaluar y comparar los resultados obtenidos en la identificación de los glóbulos blancos con respecto a los resultados por parte de un experto.

1.3. Justificación

Hoy en día el reconocimiento de patrones y la visión por computador ha permitido extraer y reconocer objetos diminutos en las imágenes poco perceptibles para la visión humana. Por esta razón, la visión artificial surge como una propuesta prometedora para realizar actividades propias en el campo de la medicina, para facilitar al especialista la obtención de diagnósticos y pronósticos de enfermedades (García Nuevo, 2003).

Conforme a lo anterior, el presente estudio, tiene como finalidad contribuir con una herramienta computacional, para brindar soporte tecnológico al técnico profesional en el proceso de clasificación de glóbulos blancos, identificándolos de manera semiautomática a partir de imágenes obtenidas de un microscopio, empleando el software de cálculo MATLAB® y sus diferentes herramientas de procesamiento de imágenes. Por otra parte, permite mitigar el error cuantitativo y cualitativo que se puede presentar en el diagnóstico proveniente de técnicas manuales, a causa de la fatiga visual que genera las largas jornadas de trabajo durante el proceso, como también de la habilidad por parte del especialista. De igual modo, al tratarse de una herramienta computacional, es competente con los equipos especializados de análisis hemático, de modo tal que disminuirá el tiempo y subjetividad en el análisis, realizándolo por medio de procesos matemáticos precisos con resultados confiables (Maya Campuzano, 2007).

En última instancia, la investigación realizada será de gran ayuda y aporte académico en las áreas de medicina e ingeniería electrónica en su línea de investigación relacionada con la visión artificial en la Universidad de Cundinamarca, aparte de brindar la posibilidad de realizar futuros trabajos y propiciar la investigación interdisciplinar en el área de la medicina y la ingeniería.

1.4. Alcances y limitaciones

Este proyecto va dirigido a los laboratorios de hematología y laboratorios relacionados para la obtención de hemogramas en el municipio de Fusagasugá, cumpliendo con la finalidad de asistir al experto en el procedimiento de clasificación de los glóbulos blancos presentes en una muestra de sangre.

Las imágenes adquiridas de las muestras de sangre, serán provistas por centros especializados y su calidad dependerá del extendido y tinción de la sangre periférica en el portaobjetos, como también de la habilidad del especialista para realizar los ajustes de enfoque con un objetivo de 100x.

Por otra parte, el algoritmo está condicionado para operar imágenes con una resolución de 1600x1200 pixeles. De esta manera la velocidad de ejecución de la herramienta se verá limitada a la capacidad de procesamiento que posea la computadora que ejecute la herramienta.

2. Marco teórico

2.1. Fundamentos teóricos

En el presente capítulo se expondrán los conceptos más importantes que se hicieron partícipes en el desarrollo de la investigación.

2.1.1. Hemograma

El hemograma es el conjunto de exámenes que evalúan los diferentes elementos celulares de la sangre tales como glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas; además de cómo estos interactúan con el plasma. Un hemograma es el análisis cualitativo y cuantitativo de los diferentes componentes de la sangre (Maya Campuzano, 2007). Existen diferentes metodologías y variaciones en este examen lo cuales definen el tipo de hemograma realizado, variando el número de datos aportados, índice de precisión de exactitud y precisión, de acuerdo a esto existen 6 tipos de hemograma definidos y codificados por la Sociedad Colombiana de Patología los cuales coinciden con los definidos por el Colegio Americano de Patólogos.

2.1.2. Leucograma

Es la fracción de hemograma que se encarga de analizar las alteraciones de los leucocitos comúnmente conocidos como glóbulos blancos. El examen comprende el análisis cualitativo estudiando la morfología que presentan las células blancas y cuantitativo haciendo referencia al recuento diferencial y total de dichas células (Maya Campuzano, 2008).

2.1.3. Recuento total de leucocitos

Este valor determina la cantidad de leucocitos presentes por unidad de volumen de sangre periférica. El recuento puede variar dependiendo de múltiples factores como lo son: la edad, género y raza de paciente tratado. De igual manera el resultado del recuento define si el paciente presenta leucocitosis o exceso de glóbulos blancos y leucopenia o ausencia de los mismo (Maya Campuzano, 2008).

2.1.4. Recuento diferencial de leucocitos

Este recuento corresponde a la concentración de las diferentes subpoblaciones de glóbulos blancos en la sangre como se observa en la Figura 2. El recuento diferencial se constituye de 5 tipos de células que son: polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos. Los niveles de cada población de glóbulos permiten un diagnóstico clínico, estos valores tienen un estándar que varía según el laboratorio clínico, el lugar, los instrumentos, etc. Por lo cual cada laboratorio debe definir estos valores en su manual de procedimientos (Maya Campuzano, 2013).

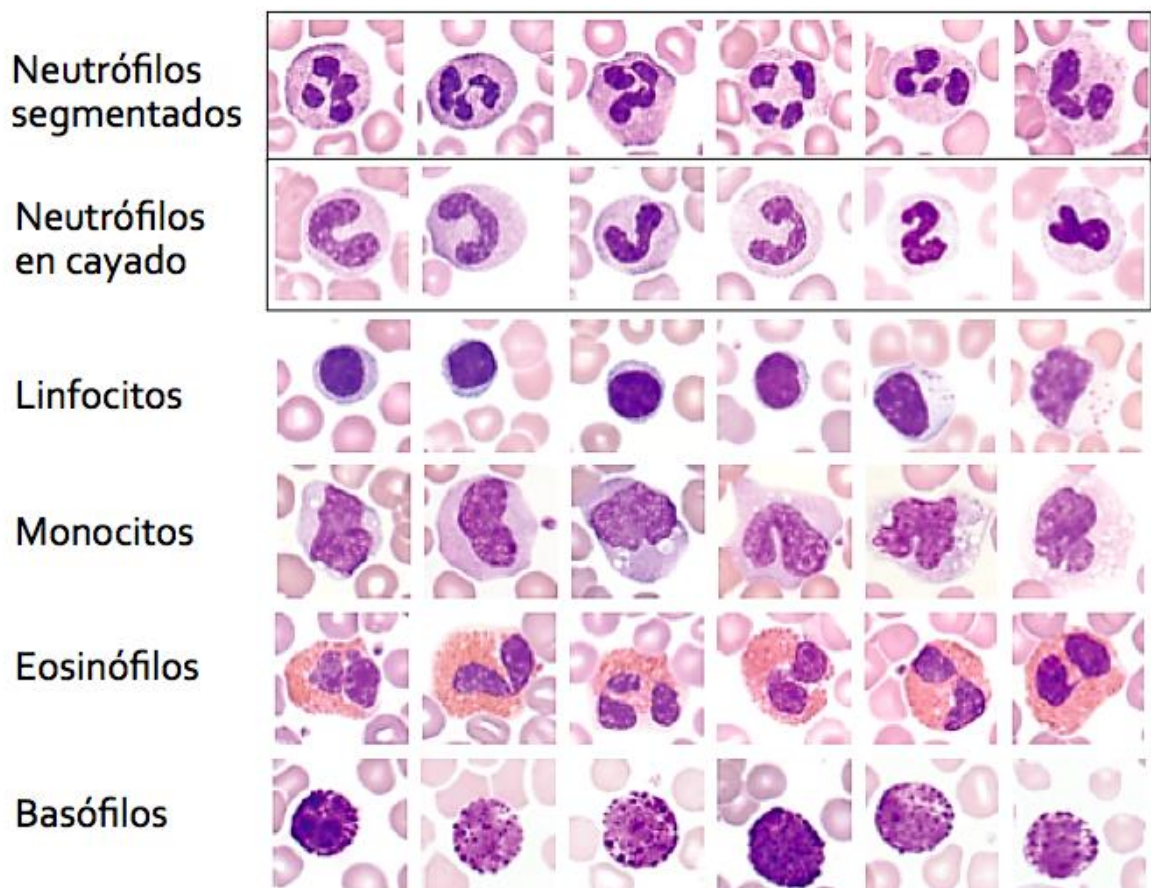


Figura 2. Poblaciones de glóbulos blancos. Tomada de practicadehematologiaycitologia.wordpress.com

2.1.5. Fundamentos de la visión artificial

La visión artificial es un área derivada de la inteligencia artificial, en la cual sistemas informáticos tienen como objetivo simular el comportamiento de sistema de visión humano. Estos sistemas se orientan a realizar tareas como inspección, control de

calidad y procesos. Este sistema se basa en la utilización del procesamiento de imagen en el cual es posible detectar la presencia o ausencia de características sobresalientes como lo son los defectos, formas, colores, etc. Este tipo de sistemas mejoran la calidad de procesos, logrando automatizar líneas de producción generando reducción de costos en procesos repetitivos (Namesny, 2003).

2.1.6. Imagen Digital

Una imagen es una representación de un objeto de 2 o 3 dimensiones en un arreglo matricial de tamaño $N \times M$, como se puede observar en la Figura 3, esta imagen está definida por una función $f(x,y)$ en donde x y y definen las coordenadas espaciales y f como un valor que puede ser la intensidad de brillo en ese punto cuando se trabaja una imagen monocromática. La intensidad en ese punto varía según la resolución de la imagen (Fraga, 2001). Normalmente estas imágenes están compuestas de píxeles que varían entre 0 y 255 de acuerdo a la intensidad, además cuando la imagen está en algún espacio de color como por ejemplo RGB (Red, Green, Blue) la representación de la imagen consta de un arreglo matricial de 3 componentes.

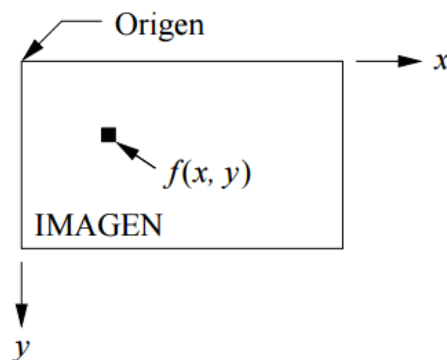


Figura 3. Definición de una imagen. Tomada de Fraga, 2011.

2.1.7. Algoritmos de filtrado de imágenes

Comúnmente las imágenes tomadas sin importar el método de adquisición, presentan imperfecciones que son ocasionadas por defectos en la adecuación de espacio al momento de ser capturadas, como se aprecia en la Figura 4. Como solución a esto, en una etapa denominada pre-procesado de imágenes, se aplican filtros con el propósito de reducir el ruido en la imagen, además de suavizar los objetos y bordes presentes en ella. Cabe resaltar que para algunos algoritmos de filtrado es necesario trabajar en un solo espacio de color en vista de que son diseñados para imágenes monocromáticas (González & Woods, 2002).

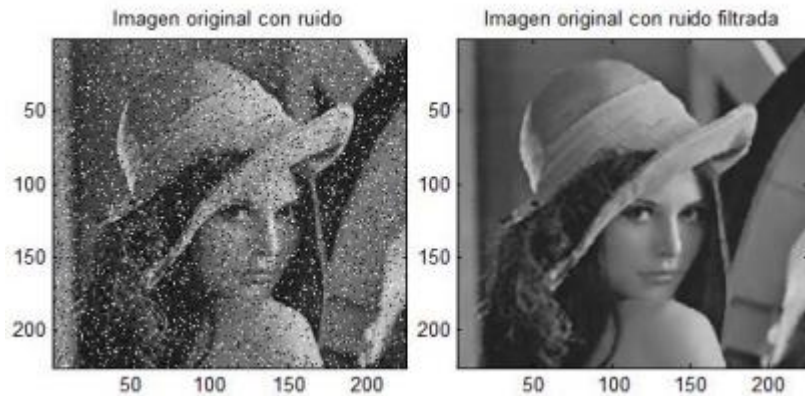


Figura 4. Imagen filtrada. Tomada de Mathworks de MatLab (MathWorks, 2017).

2.1.8. Algoritmos de segmentación

Es el proceso de subdividir las imágenes reconociendo y extrayendo los diferentes objetos presentes para trabajar con las partes de interés como se muestra en la figura 5 (Palomino & Concha, 2009). Existen distintas técnicas de segmentación ya sea utilizando imágenes en escala de grises o en algún espacio de color, algunas de estas técnicas son la umbralización del histograma, la detección de bordes, la aplicación de las redes neuronales de base radial, entre otras.

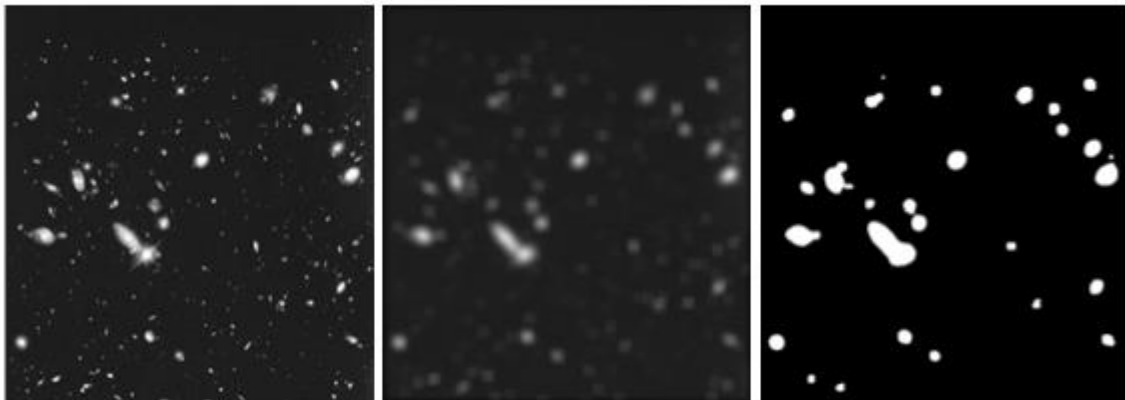


Figura 5. Imagen segmentada. Tomada de González & Woods, 2002

2.1.9. Algoritmos de clasificación de objetos

Cuando a una imagen ya se le ha aplicado el proceso de segmentación es necesario clasificar los objetos presentes en ella, entre las técnicas más destacadas para la clasificación de objetos se encuentra la técnica de agrupación Clustering, descriptores morfológicos y objetos N-conectados. La Figura 6 muestra un ejemplo de clasificación de células.

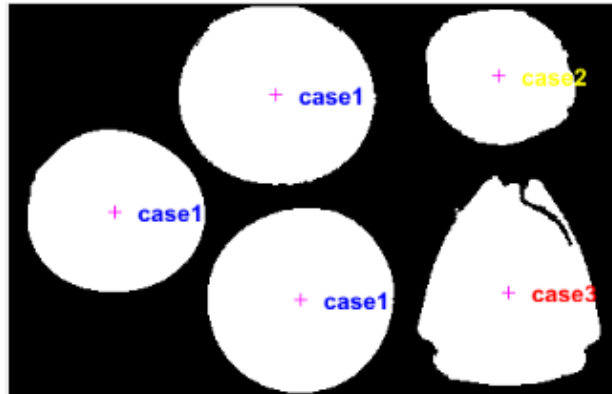


Figura 6. Clasificación de células por método de descriptores morfológicos. Elaborado por los autores.

2.1.10. Redes neuronales de base radial

Estas redes funcionan mediante tres capas como se visualiza en la Figura 7, una primera capa de entrada que recibe los patrones a segmentar, la segunda capa es donde se realizan las operaciones matemáticas empleando distancias en el espacio entre el valor del centro de la neurona y el valor del patrón de entrada, y una tercera capa que es la aplicación de un modelo lineal o no lineal como una función sigmoidea.

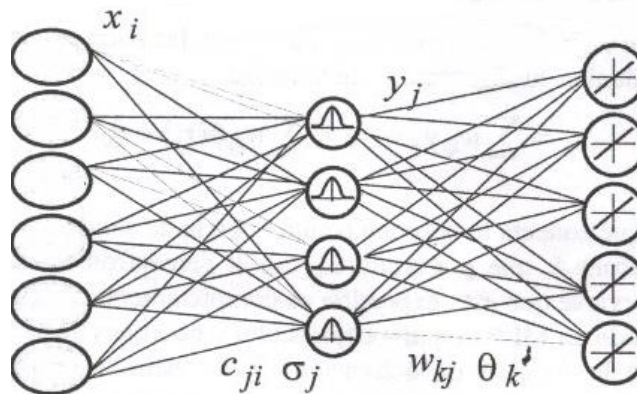


Figura 7. Arquitectura de una red de tipo RBFN, Tomado de www.ibiblio.org

2.1.11. Entorno Matlab

El uso de la herramienta informática y matemática conocida como MATLAB® nos ofrece un entorno de desarrollo integrado, el cual está formado por un conjunto de herramientas de programación dedicados a un lenguaje M.(pie de pag) Este lenguaje es sencillo pero potente y rápido, esto debido a que contiene muchas funciones

matemáticas y de aplicación ya sea en el análisis estadístico, optimización o diseños en ingeniería, las cuales se encuentran predefinidas en toolboxes. Esto permite la aplicación de esta herramienta en el mundo empresario o científico debido a que ofrece amplias posibilidades de trabajo como procesamiento de imágenes, de señales, de video, sistemas de control, etc.

Para interactuar los resultados obtenidos mediante el algoritmo de identificación de los glóbulos blancos, es necesario y muy importante expresar estos resultados en una interfaz cómoda, rápida y sencilla, que brinde al usuario la facilidad de observar, analizar e interpretar estos resultados en su posterior análisis. Por lo cual se hace uso de las GUI o también conocidas como interfaces graficas de usuario. Las Apps de MATLAB® permiten al usuario el uso de paneles gráficos para la automatización de una tarea ya que estas GUI incluyen controles como menús, barras de herramientas, botones, etc.

Para la interfaz gráfica se implementa la herramienta de interacción de usuario GUIDE de MATLAB® este entorno de desarrollo permite diseñar gráficamente la interfaz de usuario. Y con el fin de realizar un mayor control en el diseño y desarrollo de la herramienta, se crea un código que define las propiedades y comportamientos de todos los componentes que contiene la interfaz ya sean controles como lo son los botones y barras deslizantes, así como también recuadros para la visualización de resultados.

Dentro de los recursos que cuenta la Universidad de Cundinamarca, se encuentra la licencia del software de caculo MATLAB®. Es por esto que el desarrollo del proyecto se realizó en la plataforma de programación MATLAB®. Además, de tener el respaldo de la compañía MathWorks. Por ser un proyecto desarrollado para el ámbito medicinal. Posteriormente se tiene planteado pasar el algoritmo a plataformas de software libre para extender la investigación y servir de apoyo inicial para posteriores investigaciones.

2.2. Estado del arte

Hoy en día la identificación automática de las células blancas presentes en la sangre es un tema ampliamente explorado, con miras a detectar enfermedades cardiovasculares, leucemia, anemia entre otras alteraciones del cuerpo humano, a través del recuento y clasificación de los leucocitos.

En la revisión de literatura se encontraron diferentes métodos para procesar imágenes de las células, estos permiten extraer las características morfológicas pertenecientes de cada tipo de célula blanca para su posterior recuento y clasificación. En la actualidad, el recuento de glóbulos blancos ha permitido conocer con precisión el estado de salud de las personas y la detección inmediata de anomalías que generalmente son causadas por una infección, cáncer u otra condición que desencadene una inflamación de manera sistemática (Mostafa & Guaily, 2012). Este examen hematológico también puede proporcionar información predictiva sobre la incidencia de enfermedades tales como la diabetes tipo 2 o incluso cardiovasculares (Maya Campuzano, 2013). De esta manera, si una persona se realiza chequeos médicos con regularidad se pueden tomar medidas preventivas y mejorar el estado de salud de la misma.

En los últimos años, el recuento de glóbulos blancos se realiza en laboratorios especializados y se requiere de un experto, que en muchas ocasiones realiza este conteo de forma manual. La implementación de técnicas manuales para desarrollar esta actividad resulta ser muy tediosa, debido a que el experto en la materia puede llegar a realizar este proceso repetidamente en una jornada laboral, causando así un agotamiento físico por lo general visual, que origina errores en la valoración y resultados. Para mejorar la eficiencia y calidad de este examen, se han buscado diversas maneras de automatizar este proceso ya sea utilizando sistemas electrónicos incluso técnicas de procesamiento de imágenes.

Un método planteado por (Zhang, Bai, Wu, & Ying, 2015) busca atrapar células en papel para realizar el recuento de glóbulos blancos, este método se basa en retener las células de glóbulos blancos en un papel mediante un flujo vertical para ser contadas y posteriormente son teñidas con anticuerpos que poseen nano partículas de oro. Luego de ser teñidas pasan por un pequeño orificio haciendo que se concentren para que puedan ser atrapadas en el papel, asemejándose a una malla. Por último, el conteo es realizado a partir de la cantidad de nano partículas de oro atrapadas en la superficie de los glóbulos. Este método logra distinguir entre un 10% y 15% la diferencia en el número de células. Este dispositivo de bajo costo y de fácil portabilidad determina el conteo en 15 μ L de sangre; gracias a que este dispositivo es portable permite a los pacientes realizarse pruebas con regularidad, conociendo si el conteo se ha desviado de sus valores de referencia o estándar y así buscar asistencia médica de ser necesario, previniendo el desarrollo de posibles enfermedades. La Figura 8 nos permite ver la estructura del dispositivo funcional donde se aprecia su tamaño reducido.

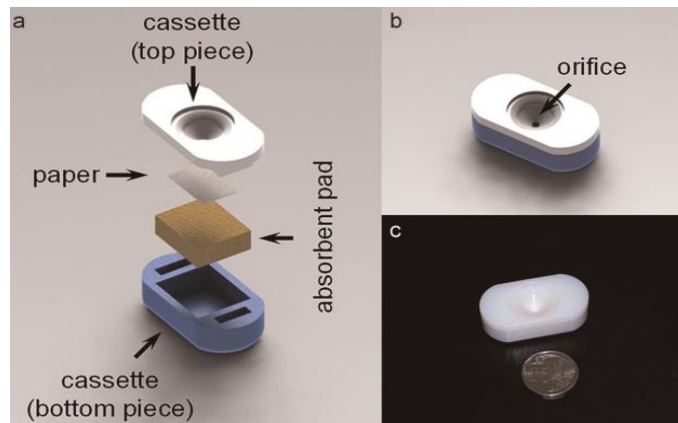


Figura 8. Estructura del dispositivo. Tomada de Zhang, Bai, Wu, & Ying, 2015.

Luego de tener las células atrapadas en el papel, la prueba es examinada visualmente para evaluación semi-cuantitativa. La intensidad media de la prueba es obtenida en relación con el tamaño del orificio. En la Figura 9 se observa un análisis del funcionamiento con imágenes microscópicas. Como resultado se obtuvo un dispositivo capaz de hacer el conteo de glóbulos blancos en el cual se afecta su sensibilidad y rango dinámico por diversos factores como tipo de papel y el tamaño del orificio. La lectura colorimétrica generada era visible a simple vista, eliminando la necesidad de instrumentos de adquisición de datos.

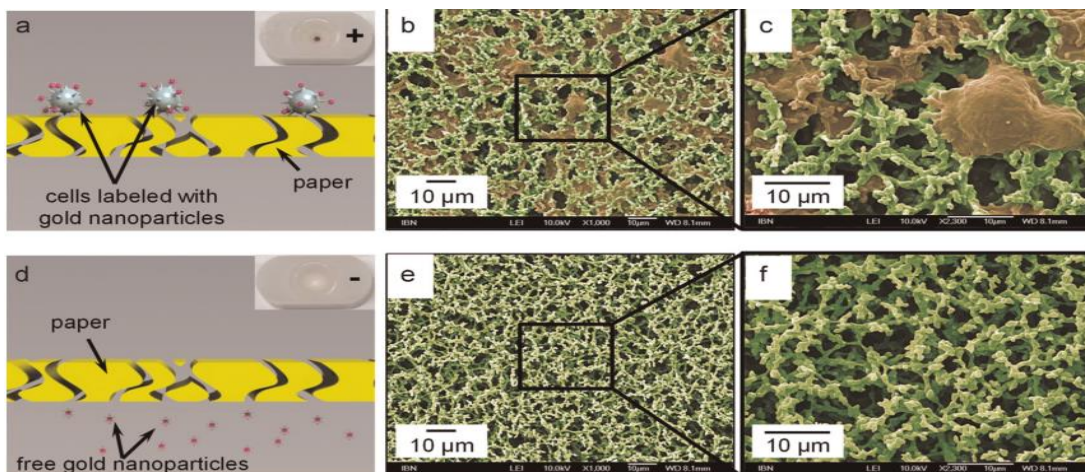


Figura 9. Principio de Funcionamiento. Tomada de Zhang, Bai, Wu, & Ying, 2015.

Otra manera de hacer este proceso de manera automatizada es mediante el procesamiento de imágenes, que se basa en tomar las imágenes y realizarle cierto tipo de arreglo para lograr resaltar cualidades de interés. Los autores (Theerapattanakul, Plodpai, & Pintavirooj, 2014) plantean un método eficiente para la segmentación automática de glóbulos blancos en la sangre, para realizar el conteo de los glóbulos blancos, aplicando un método de segmentación de toda la célula,

mediante la utilización del contorno activo. Esto lo hacen en una serie de pasos, primero se pasa la imagen de la muestra a imagen binaria, luego aplica un contorno activo tipo (snake) el cual resaltara los contornos del núcleo de los glóbulos blancos y contornos de las demás células como se puede observar en la Figura 10.

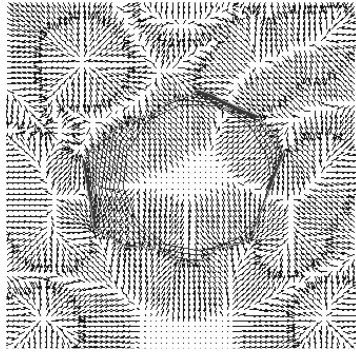


Figura 10. Contornos resaltados de las células. Tomada de Theerapattanakul, Plodpai, & Pintavirooj, 2014.

Finalmente, separa la célula blanca de las células rojas. Al realizar la segmentación utilizando el contorno activo (snake), hay que tener en cuenta la posición inicial y el radio de contorno puesto que al ser muy pequeño no existiría cambio alguno para segmentar, de lo contrario al ser demasiado grande tomara más de la célula deseada y su resultado sería inexacto. En la Figura 11 se observa el resultado después de la segmentación nótese que la célula es contorneada de manera satisfactoria.

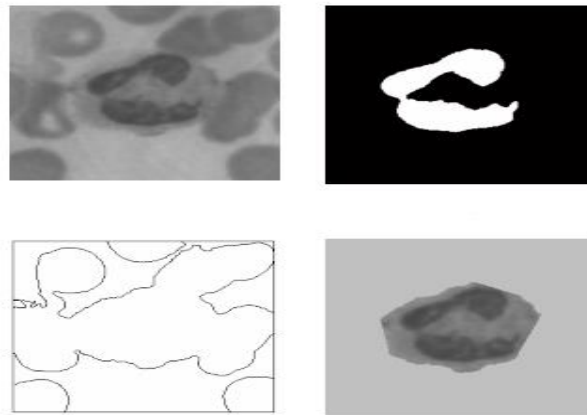


Figura 11. Segmentación del glóbulo blanco aplicando el método de contorno activo tipo Snake. Tomada de Theerapattanakul, Plodpai, & Pintavirooj, 2014.

Otro método de segmentación utilizado es el método de OTSU planteado por los autores (Gautam, Bhadauria, & Garhwal, 2014). En la investigación realizan la segmentación del glóbulo blanco mediante la utilización de técnicas de umbralización automática luego de convertir la imagen a grises, en esta parte se extraen varios

elementos de la muestra, que luego pasa por un tratamiento matemático para eliminar todos los demás componentes excepto el núcleo, luego se aplica la técnica de OTSU, se aplica la técnica matemática morphing para suavizar y resaltar los núcleos y finalmente se obtienen las características de perímetro, área y excentricidad. La Figura 12 muestra el resultado de la segmentación para esta investigación, la clasificación arrojó un rendimiento general del 73%, donde la identificación de células blancas linfocitos presenta una precisión del 100% y monocitos el valor más impreciso con un porcentaje del 50%

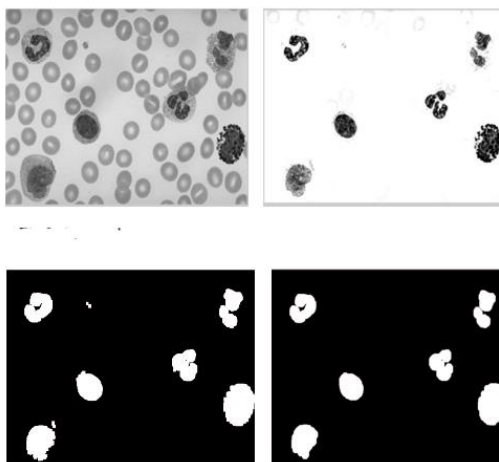


Figura 12. Imagen segmentada utilizando el método OTSU. Tomada de Gautam, Bhadauria, & Garhwal, 2014.

Los autores (Lin & Hsinchu, 2012) plantean un método de región creciente buscando una buena segmentación en imágenes que presentan una degeneración en la muestra de sangre, debido a la realización de la toma de muestra y agentes extraños presentes en ella. Se utilizan una serie de pasos: primero se transforma el espacio de color RGB para obtener la imagen de saturación y luego establecer un umbral dinámico, el cual se ajusta a cualquier tipo de color, esto es posible con el método interactivo de región creciente, como se observa en la figura 12a el umbral se escoge de 0.7, mientras que en la 12b se realiza el método iterativo, segundo se segmentan los núcleos para lo cual se debe tener en cuenta que muchos de los tipos de células blancas tienen múltiples lóbulos lo que significa que un solo lóbulo no necesariamente conforma un solo núcleo por esta razón se debe segmentar de acuerdo a esta afirmación, por último la clasificación se realiza dependiendo de características de la textura y la forma.

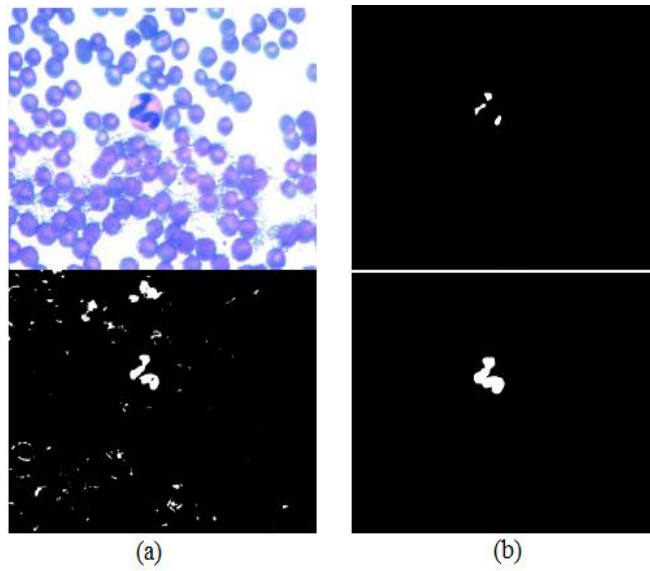


Figura 13. Segmentación de células blancas utilizando el método de región creciente. Tomada de Lin & Hsinchu, 2012.

Al final, comparan los resultados de la segmentación del núcleo de los glóbulos blancos con los datos de un experto, este proceso se realiza segmentando los núcleos a diferentes distancias, unos separados y otros integrados, el algoritmo es robusto, aun cuando presenta una densidad alta del número de células, en cuanto a la clasificación de los núcleos, el algoritmo arroja un porcentaje mediano de precisión del 89.75%, siendo la menor para los basófilos con 76.47% de precisión y el más alto para los neutrófilos con 95.5% de exactitud.

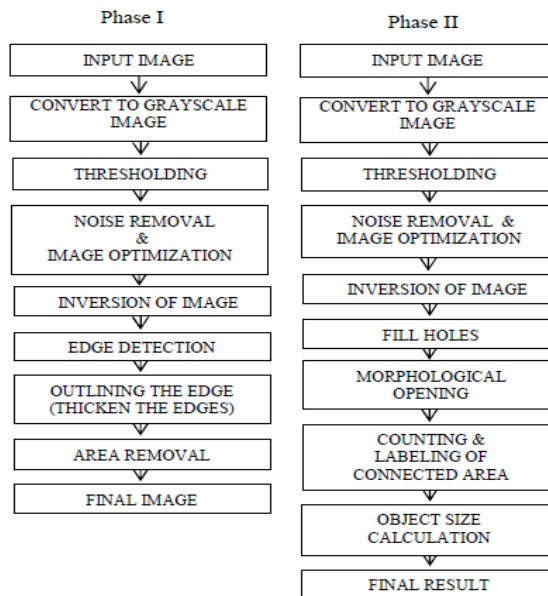


Figura 14. Diagrama del proceso para realizar la detección de bordes. Tomada de Jha, Das, & Dutta.

Por otra parte, los autores (Jha, Das, & Dutta) implementan un método de detección de bordes similar. El trabajo propuesto se divide en dos fases como se puede observar en el diagrama de flujo de la Figura 14, la primera fase se utilizó para identificar los diferentes tipos de núcleo de las células blancas, y la fase dos para realizar el recuento y la detección de células anormales. Al realizar la segmentación del núcleo, luego de pasar la imagen a escala de grises y aplicar el filtro de mediana, se invirtió la imagen umbralizada y binaria para no perder información vital del borde, puesto que al realizar el filtro redondea al valor medio de los 9 píxeles analizados; obteniendo finalmente la segmentación que se observa en la Figura 15.

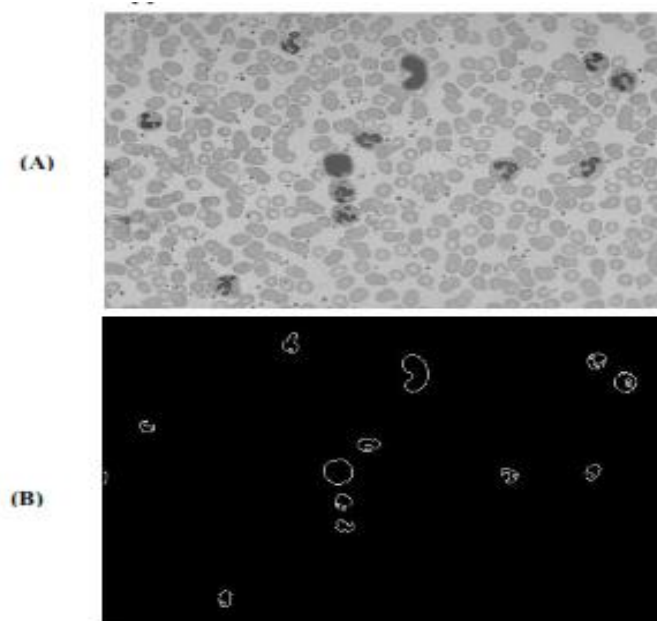


Figura 15. Segmentación de los glóbulos mediante la detección de sus bordes a) imagen del frotis de sangre en escala de grises b) segmentación de los núcleos de las células blancas. Tomada de Jha, Das, & Dutta.

Un método alternativo se planteó por (Wang Xiaozhang & Xiang Zhang, 2010) el cual se basó en la segmentación de las células, eliminando los demás objetos. Para lo cual, se creó un canal por el cual se hace pasar la sangre tratada con anticoagulantes, y la cual será captada en video después de varios minutos para captar el momento en que el flujo sea constante, este experimento se completa durante las 6 horas después de tomada la muestra para evitar cambios morfológicos en las células, luego se procesa las imágenes obtenidas del flujo, En la Figura 16-a, se puede notar lo difícil que sería segmentar a partir de esta imagen, para esto, se eliminan los demás elementos con la ayuda de tecnología de operación FFT y convolución, obteniendo la imagen que se observa en la Figura 16-b. Finalmente se segmenta y se observa la orientación

haciendo un elipsoide que describa el contorno de la célula para su posterior análisis como se muestra en la figura 16-c.

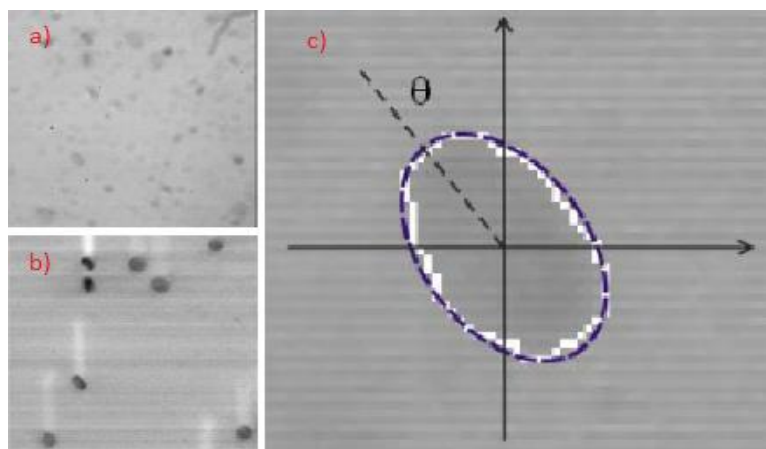


Figura 16. Segmentación de las células a) Imagen original b) Ajuste de contraste c) Aplicación de contorno. Tomada de Wang Xiaozhang & Xiang Zhang, 2010.

Estos autores registraron los resultados en la tabla 1, se identificó las medidas de eje menor y eje mayor, el perímetro y el ángulo teta para observa la orientación de las células.

Tabla 1. Resultados de las características morfológicas. Tomada de Wang Xiaozhang & Xiang Zhang, 2010.

Cell	Area S	Perimeter C	Long axis b	Short axis a	Tiling Angle θ	Center coordination
1	546	83	15.4	11.7	114.6	(67.5,315.0)
2	509	74	16.2	10.2	126.7	(120.5,287.5)
3	593	91	15.1	12.8	35.6	(397.0,563.5)
4	578	88	16.6	10.9	100.5	(126.0,202.5)
5	639	90	15.5	13.6	138.1	(255.5,261.0)
6	443	73	14.4	10.1	128.5	(126.0,181.0)
7	691	88	15.2	15.2	90	(217.0,221.0)
8	467	74	12.5	12.1	90	(351.0,269.5)

Aplicando redes neuronales en la práctica para mejorar resultados, los autores (Theera-Umpon & Gader, 2000) buscan una solución para el conteo de las células blancas en la medula ósea, puesto que es un proceso tedioso y difícil por la complejidad de las imágenes, donde manualmente la tarea realizada por un experto tiene un margen del 15% de error. Con la aplicación de redes neuronales para el conteo de células blancas, con retro propagación y derivada de la pendiente del gradiente. Se entrena una red neuronal para el conteo de células blancas por sus características morfológicas, la red realiza el conteo dependiendo de la cantidad de características que se ingresan, arrojándonos salidas que serán las clases de células.

El error se minimiza cuando las celdas que componen la red pueden contar células que no son de su clasificación, pero que fueron omitidas por otras celdas, en este caso, aunque la red de clasificación obtiene un rendimiento inferior que, en la clasificación por un experto, el conteo tiene un gran porcentaje de exactitud (Figura 17), que es lo que finalmente el objetivo de esta investigación.

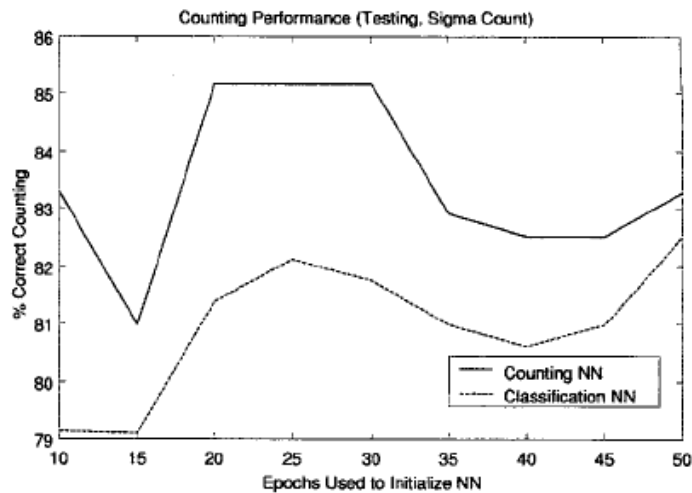


Figura 17. Grafica de análisis estadístico del conteo y clasificación de los glóbulos blancos. Tomada de (Theera-Umpon & Gader, 2000).

Las imágenes obtenidas de las manchas de sangre en color o escala de grises, contienen muchas veces defectos en cuanto a la uniformidad de la luz, lo que hace que la segmentación del núcleo, citoplasma y fondo sea complicada, por eso estos autores (Qingli, Yiting, Hongying, Jianbiao, & Fangmin, 2013) plantearon un procesamiento de imágenes hiperespectrales de las células blancas, el cual se puede visualizar como un cubo de tres dimensiones, en donde la profundidad es la longitud de onda del espectro (Figura 18) .

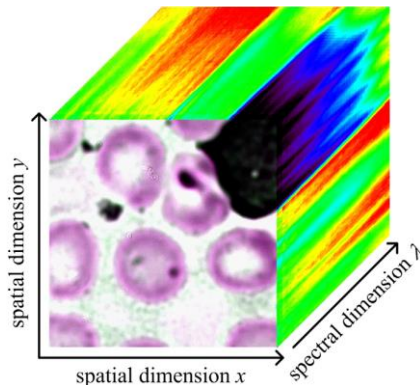


Figura 18. Imagen observada desde los ejes hiperespectrales. Tomada de Qingli, Yiting, Hongying, Jianbiao, & Fangmin, 2013.

Se propone un algoritmo en el cual se incorpora métodos de contorno activo con mapas de espectro de ángulo mejorado (ISAM) para encontrar el ángulo que existe entre dos espectros de una imagen. Luego de obtener las imágenes hiperespectrales como se observa en la primera columna de la Figura 19, estas se procesan con los algoritmos de contorno activo y se eliminan los objetos no deseados o que no pertenezcan a la célula, de esta manera obtener los resultados que se evidencian en la tercera columna de la Figura 19. Finalmente, se puede comparar los resultados de la segmentación total de la célula con su núcleo, con los resultados manuales que se contempla en la última columna de la Figura 19, demostrando así, el buen rendimiento de este método para la segmentación de los glóbulos blancos.

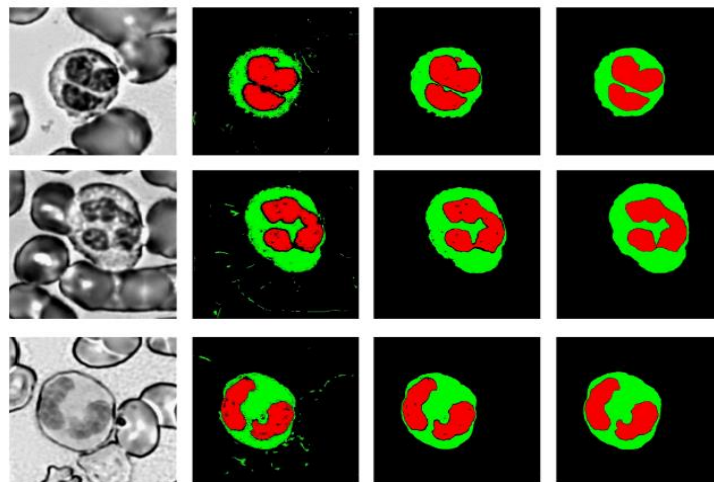


Figura 19. Segmentación de las células. Tomada de Qingli, Yiting, Hongying, Jianbiao, & Fangmin, 2013.

Una técnica eficaz para la segmentación automática de los núcleos de glóbulos blancos en la sangre propuesta por (Mostafa & Guaily, 2012), utiliza una técnica efectiva para la segmentación automática, la técnica se basa en la mejora de contraste en escala de grises y un proceso de filtrado; además una segmentación de tamaño para eliminar objetos no deseados, en la figura 20 se observa el método utilizado mediante un diagrama de flujo. El rendimiento evaluado en las pruebas es de alrededor del 79.7%. Siendo un rendimiento alto en comparación con otras técnicas; el resultado más bajo en eficiencia es para los Eosinofilos del 69.3% y el más alto para los monocitos que fue del 86.3%. Este método tiene algunas limitaciones en eficacia como se nota en la Figura 21 con errores en la segmentación.

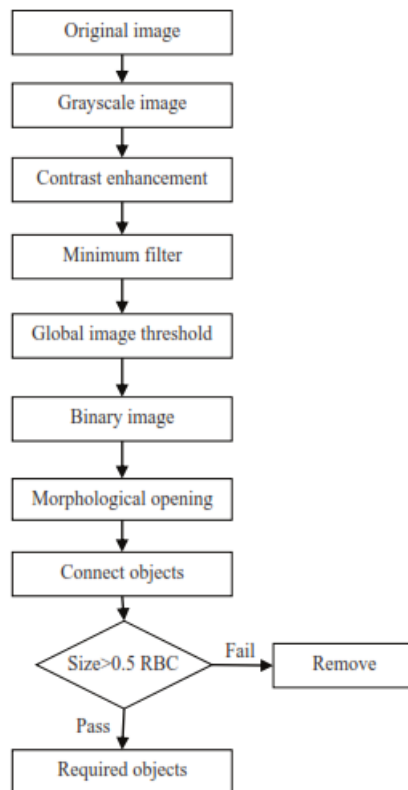


Figura 20. Diagrama de flujo del algoritmo. Tomada de Mostafa Mohamed & Guaily, 2012.

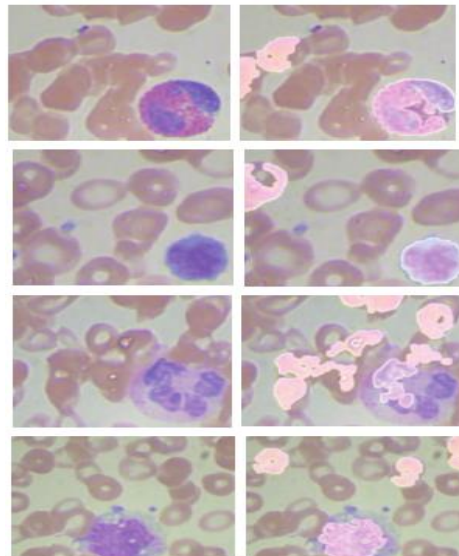


Figura 21. Segmentación de diferentes células blancas. Tomada de Mostafa Mohamed & Guaily, 2012.

Una técnica mejorada basada en umbral para la segmentación automática de glóbulos blancos en la sangre propuesta por (Mostafa Mohamed, 2012). Presenta leves

mejoras en el rendimiento, este se basa en el filtrado y mejora del contraste de la imagen en la escala de grises y los objetos que no son necesarios se quitan con un segmento mínimo de tamaño como se ve en el diagrama de la Figura 22. Alrededor de 365 imágenes fueron utilizadas para examinar la eficacia de esta técnica de segmentación, logrando una exactitud del 80.6%. Los autores plantean que esta técnica en comparación a otras técnicas de segmentación fue muy superior. Al realizar la prueba de manera aislada, es decir a cada tipo de célula se encontró que los Eosinofilos tienen una precisión del 71% y los monocitos siendo el resultado más alto con 85.9%. Los autores introducen una limitación de tamaño mínimo de 50% para rechazar objetos no deseados. Los monocitos tienen una mayor facilidad a la hora de segmentar por su mayor tamaño, y los Eosinofilos una menor precisión en segmentación por su color oscuro en el citoplasma muy cercano al color del núcleo, la Figura 23 muestra los resultados de la segmentación.

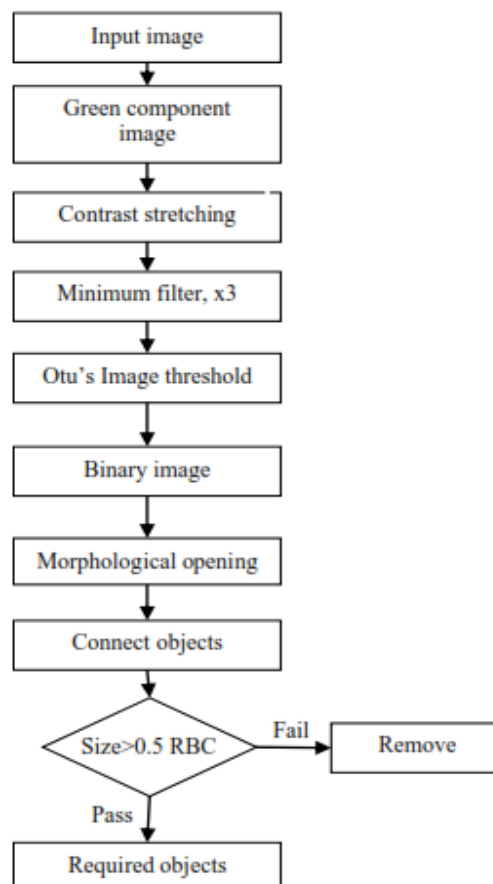


Figura 22. Diagrama de flujo del algoritmo. Tomada de Mostafa Mohamed, 2012.

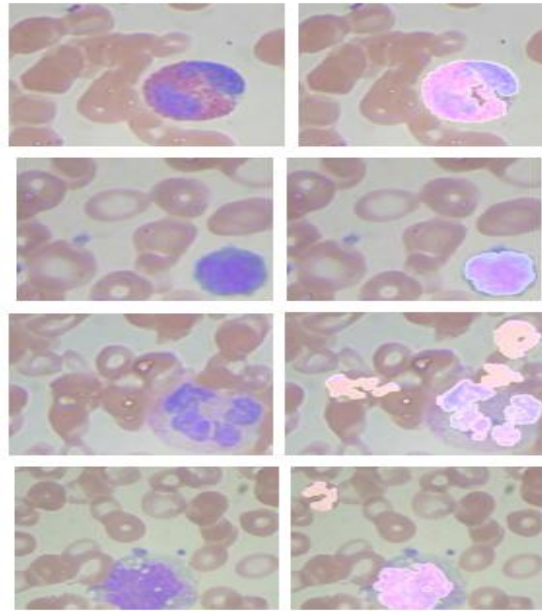


Figura 23. Segmentación de las células. Tomada de Mostafa Mohamed, 2012.

(Mohamed & Far, 2014) Segmentación mediante la conversión de la imagen por el método de ortogonalización de Gram-Schmidt. Se pasa la imagen del glóbulo blanco a escala de gris mediante el uso de la ortogonalización de Gramm Schmidt (Figura 24), que luego se le aplica un filtro de paso mínimo para después calcular un umbral de la manera OTSU y obtener una imagen binaria y eliminar pixeles no deseados mediante técnicas morfológicas, y segmentar la máscara de núcleo resultante en la imagen original.

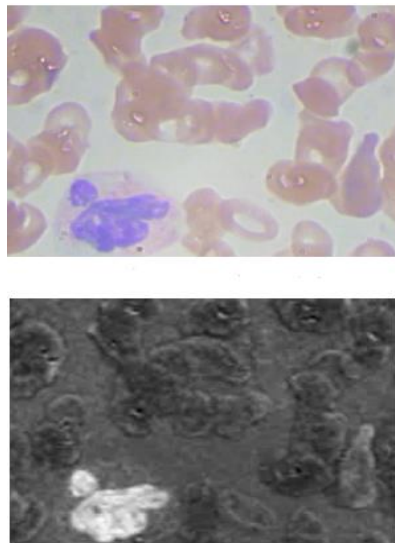


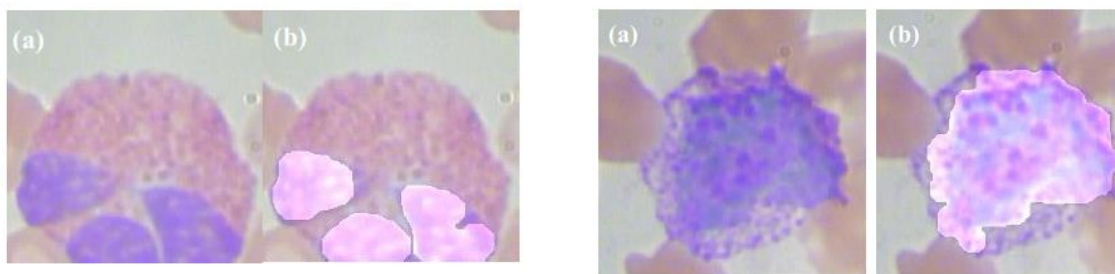
Figura 24. Segmentación aplicando el método. Tomada de Mohamed & Far, 2014.

Los resultados obtenidos en cuanto al área de los núcleos segmentados se compararon con el área de la segmentación manual, en donde podemos observar el porcentaje de precisión de la segmentación automática mediante este método (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de resultados obtenidos. Tomada de Mohamed & Far, 2014.

Technique	WBC cell type					
	<i>Basophil</i>	<i>Eosinophil</i>	<i>Lymphocyte</i>	<i>Monocyte</i>	<i>Neutrophil</i>	<i>Total</i>
Proposed	0.786	0.901	0.783	0.830	0.858	0.854

La segmentación que mejor resultados arrojó fueron las de las células *Eosinophil* con un 90.1% de exactitud, mientras que las de menor rendimiento fueron las *Basophil* y *Lymphocyte* con 78.6% y 78.3% respectivamente (Figura 25).



Eosinophil segmentation, (a) original image, (b) segmented imaged by the proposed method

8. Basophil segmentation, (a) original image, (b) segmented imaged by the proposed method

Figura 25. Segmentación total de los núcleos de las células blancas. Tomada de Mohamed & Far, 2014.

3. Diseño metodológico

Las etapas de trabajo planteadas para la realización de la herramienta computacional en la identificación de células de glóbulos blancos, se pueden observar en el diagrama de la Figura 26.

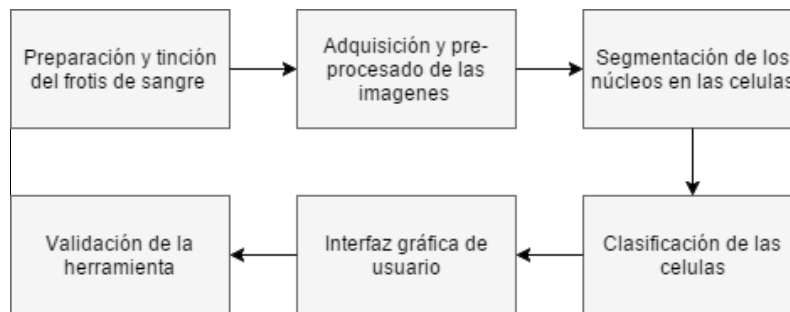


Figura 26. Diagrama etapas de la metodología. Elaborada por los autores.

3.1. Preparación y tinción del frotis sanguíneo

La primera actividad es la disposición de las muestras del frotis de sangre de los individuos mediante un proceso establecido por los laboratorios hematológicos, siendo muy importante este proceso, ya que puede influir drásticamente en los resultados del análisis de la sangre (Rodak, 2005). El frotis periférico de la sangre se utiliza para el estudio de las características citológicas de la sangre, para la realización de este frotis se siguen una serie de pasos establecidos por los manuales de dermatografía. Lo primero es la extracción de la muestra de sangre venosa de los individuos realizado por un especialista; para las tomas de la sangre se usan tubos tapa lila que contienen anticoagulante EDTA¹ los cuales crean un estado pre hemorrágico evitando que la sangre se coagule.



Figura 27. Extendido del frotis de sangre. Tomada de Rodak, 2005

¹ EDTA, conocido también como Acido Etilendiaminotetraacético es el anticoagulante preferido para los recuentos celulares y los estudios morfológicos cuando nos es posible hacer directamente extensiones a partir de sangre fresca.

Para la preparación del frote periférico se utiliza la técnica manual de dos portaobjetos en ángulo que es una de las técnicas más utilizadas por los especialistas. Para la realización de esta técnica se debe ubicar una gota de sangre con un radio de alrededor 2mm, es importante que el portaobjetos se encuentre totalmente limpio libre de impurezas, se aplica la gota de sangre en un extremo del portaobjetos. Seguido a esto se sostiene una lamita extensora la cual posee un borde libre de imperfecciones, esta se sostiene con un ángulo un poco menor a los 45° y se lleva hacia a atrás hasta tocar la gota de la sangre, luego que la gota se disperse por todo el ancho del borde en la lámina. Posteriormente, esta se desplaza con suavidad y rapidez hacia delante hasta el final del portaobjetos para así crear el extendido, como se muestra en la Figura 28. Finalmente, se deja secar por unos minutos.

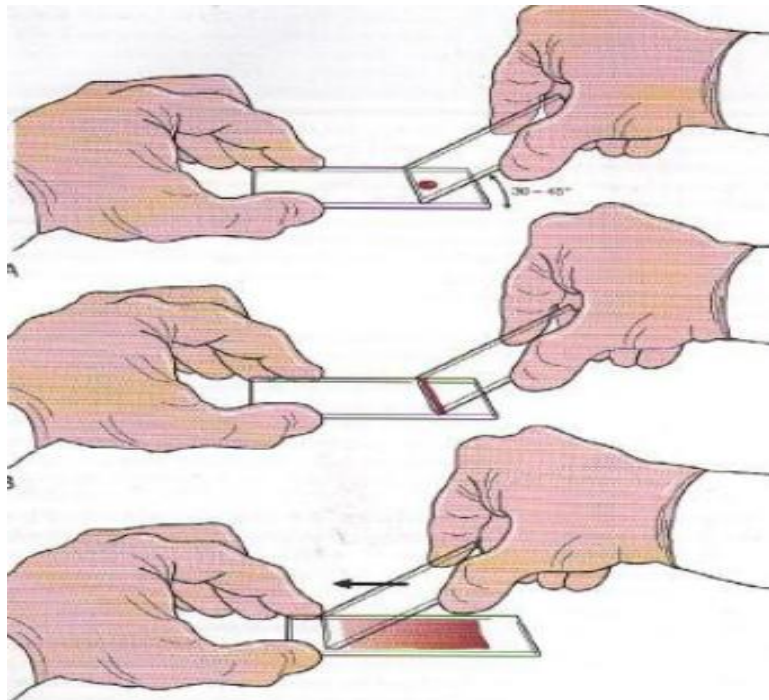


Figura 28. Extendido de sangre método de dos portaobjetos. Tomada de Rodak, 2005

Para el proceso de tinción, la información fue suministrada gracias a la colaboración de la doctora Nancy Magally Santos Garcia en su laboratorio clínico ubicado en la ciudad de Fusagasugá. El método empleado utiliza la técnica de coloración Wright cuyo colorante está compuesto de un azul de metileno y eosinas disueltos en metanol; además de un buffer de fosfatos que rehidrata a las células después de la exposición al metanol. Una vez los frotis de las muestras de sangre se encuentren secos se le aplica el colorante Wright cubriendo la superficie totalmente y seguidamente se aplica el buffer de fosfatos. Cuando la muestra se encuentre totalmente cubierta por esta mezcla se procede a soplar hacia arriba con una pipeta de manera que se mezclen

estas dos sustancias, este proceso de soplado se realiza cada 45 segundos hasta completar un tiempo aproximado de 5 minutos. Por último, se enjuaga cuidadosamente con agua, se seca con un algodón o gasa el dorso del portaobjetos para eliminar cualquier resto de colorante y se deja secar al aire libre.

3.2. Adquisición y pre-procesado de las imágenes

Con los frotis de sangre ubicados en el microscopio de contraste de fase con cámara USB, se enfoca con un lente de x100 y en el PC se ejecuta un software controlador de la cámara *Leica LAS EZ* para capturar imágenes en las siguientes características:

- Formato: JPG
- Resolución: 1600x1200 pixeles
- Profundidad de bits: 23

Cada imagen capturada en el espacio de color RGB es guardada en el ordenador, posteriormente es convertida a otro espacio de color conocido como YCbCr, el cual permite resaltar mejor los objetos presentes en la imagen para posteriores procesos.

3.3. Segmentación de los Núcleos de las Células

En esta etapa se aplican modelos de segmentación mediante redes neuronales de base radial RBFN, para ello es necesario realizar una base de datos que contiene los valores correspondientes a la intensidad de color de los pixeles pertenecientes a los núcleos de las células, a través de un promedio de color obtenido de la captura de los valores de los píxeles de forma aleatoria en un conjunto de 300 imágenes correspondientes a los diferentes tipos de glóbulos blancos.

3.3.1. Redes neuronales de base radial

Una vez obtenidos los valores promedio de los pixeles presentes en el núcleo de la célula, se aplica el criterio de la distancia euclidiana mediante la ecuación 1, con el fin de representar la diferencia entre cada valor del píxel perteneciente a la imagen (R_i G_i B_i), con respecto al píxel promedio (R_{pm} G_{pm} B_{pm}) hallado con la base de datos.

$$D = \sqrt{(R_i - R_{pm})^2 + (G_i - G_{pm})^2 + (B_i - B_{pm})^2} \quad (1)$$

Seguido a esto se evalúa la distancia D en una función de base radial gaussiana para cada pixel mediante la ecuación (2), donde α corresponde a la cantidad de valores

que puede tener cada pixel en este caso 255. Con esto se obtiene un valor de 0 a 1 que después es umbralizado mediante el uso de una campana de gauss Figura 29.

$$E = e^{-\frac{D}{\alpha}} \quad (2)$$

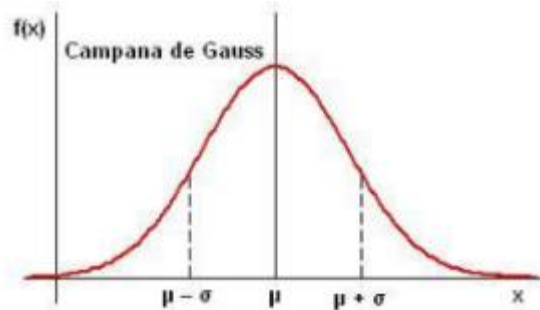


Figura 29. Campana de gauss, Tomada de <http://www.acsendo.com>

De esta manera se toman los valores con un coeficiente de desviación muy bajo con respecto al valor central de la neurona en la campana, para así segmentar los objetos de interés en este caso los núcleos de los glóbulos blancos con una mayor precisión.

3.3.2. Objetos n conectados y detección de áreas

Después de obtener la imagen umbralizada, se aplica el método de objetos n conectados para determinar si dos pixeles son adyacentes en una imagen binaria (Gonzalez & Woods, 2002). En la imagen cada agrupación de pixeles conectados corresponde a los núcleos de las células, pero debido a que las plaquetas presentes en las imágenes poseen valores de pixel muy semejantes a los de los núcleos estas también son segmentadas. Por lo cual se hace necesario hacer uso de operaciones morfológicas como la eliminación de áreas pequeñas pertenecientes al ruido u objetos indeseados en la imagen segmentada con el fin de mejorarla para un análisis posterior de sus componentes.

3.4. Clasificación de las células

La clasificación por tipo de las células de glóbulos blancos (WBC) se realiza analizando sus características morfológicas buscando aquella que logre diferenciar cada tipo de célula (Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos, Basófilos) y además basándose en el color del citoplasma para diferenciar dos tipos de WBC. Las

técnicas usadas y su aplicación en la herramienta serán explicadas brevemente a continuación.

3.4.1. Descriptores Morfológicos

Al analizar las imágenes se debe extraer la información significativa de estas, como por ejemplo identificar colores, localizar formas, contar o medir propiedades de los objetos. Al medir las propiedades del objeto se usan descriptores morfológicos los cuales permiten encontrar una relación de forma y tamaño, con el fin de hacer una clasificación, entre las medidas que se destacan podemos encontrar la excentricidad, solidez, elongación entre otros. Además, permiten conocer el centroide, que son las coordenadas del centro del objeto o núcleo sobre la imagen. De acuerdo a las diferentes medidas se hace un análisis de las características morfológicas de cada tipo de células, con el fin de encontrar cual característica permite una diferenciación de clases, siendo la solidez la característica con más variación entre cada tipo de célula.

La solidez es un descriptor que permite encontrar objetos con un alto grado de compactación como se muestra en la Figura 30, este usa una relación matemática entre el área y área convexa del objeto. Si el objeto es muy compacto su valor se encontrará cercano al 1 en caso contrario que el objeto no es compacto su valor se encontrara cercano al 0.

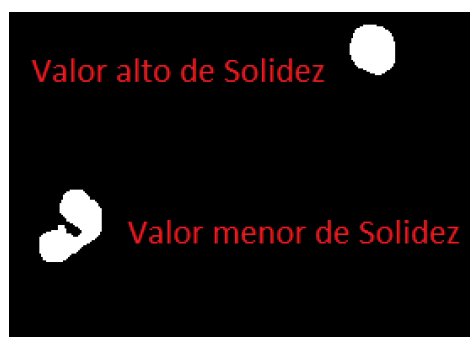


Figura 30. Descriptor morfológico Solidez, Elaborada por los Autores

Además, del uso de descriptores morfológicos en la clasificación también se implementa una medición del color perteneciente al núcleo y del citoplasma de la célula, con el fin de hacer que la herramienta sea más robusta a la hora de clasificar permitiendo diferenciar los Monocitos y Eosinofilos, los cuales son dos tipos de células que presentan características muy similares en la forma del núcleo pero con variación de color como se evidencia en la Figura 31. Por lo cual mediante la ubicación de las

coordenadas del objeto en la imagen original se hace una medición de los pixeles en dicha posición con el fin de identificar el color del citoplasma de la célula.

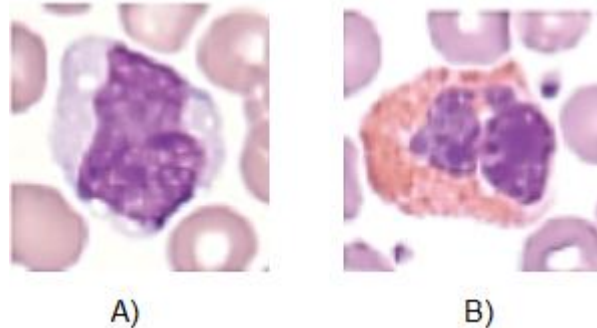


Figura 31. Células de Glóbulos Blancos A) Monocito y B) Eosinófilo. Elaborada por los Autores.

3.4.2. Medición de distancias entre objetos

Consiste en encontrar un valor de distancia entre dos coordenadas que representan dos objetos encontrados en la imagen. Esto se hace mediante un proceso matemático basado en el teorema de Pitágoras (ecuación 3) donde el valor de la hipotenusa es interpretado como la distancia.

$$c^2 = a^2 + b^2 \quad (3)$$

Para aplicar este concepto se deben conocer las coordenadas del centro del objeto en la imagen, una vez obtenidos estos valores se grafica un triángulo rectángulo entre estos dos puntos para así poder aplicar el teorema de Pitágoras como se observa en la Figura 32, donde se tienen dos puntos con los cuales se obtienen el valor de los catetos para encontrar el valor de la hipotenusa la cual representa la separación entre los objetos.

En la herramienta esta distancia se hace necesaria para determinar si se trata de un núcleo fragmentado, puesto que los neutrófilos se pueden encontrar en cayado o fragmentado. Con el valor por debajo de cierto umbral de distancia entre dos objetos en la imagen, la herramienta determina qué tipo de núcleo está presente a la hora de clasificar las células.

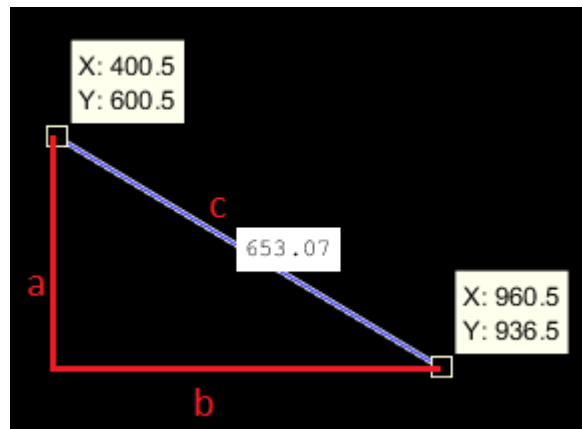


Figura 32. Distancia entre dos puntos de la imagen. Elaborada por los Autores

3.5. Interfaz gráfica de usuario

Para lograr interactuar los resultados obtenidos mediante el algoritmo de identificación de los glóbulos blancos, es necesario y muy importante expresar estos resultados en una interfaz cómoda, rápida y sencilla, que brinde al usuario la facilidad de observar, analizar e interpretar estos resultados en su posterior análisis. Por lo cual se hace uso de las GUI o también conocidas como interfaces graficas de usuario. Las Apps de MATLAB® permiten al usuario el uso de paneles gráficos para la automatización de una tarea ya que estas GUI incluyen controles como menús, barras de herramientas, botones, etc.

Para la interfaz gráfica se implementa la herramienta de interacción de usuario GUIDE de MATLAB® este entorno de desarrollo permite diseñar gráficamente la interfaz de usuario. Y con el fin de realizar un mayor control en el diseño y desarrollo de la herramienta, se crea un código que define las propiedades y comportamientos de todos los componentes que contiene la interfaz ya sean controles como lo son los botones y barras deslizantes, así como también recuadros para la visualización de resultados.

3.6. Validación de la herramienta

La herramienta computacional desarrollada cumplirá con el propósito de dar soporte al especialista en la clasificación de los glóbulos blancos dentro del correspondiente examen hematológico. La clasificación de los glóbulos blancos se enfoca en la distinción de 5 poblaciones distintas de leucocitos denominados: Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos y Basófilos. De esta manera el experto identifica el tipo de glóbulo y la población a la que pertenece. De acuerdo con lo anterior, la

herramienta computacional exhibe como resultado la identificación de los glóbulos blancos y su familia correspondiente de varias imágenes de frotis de sangre, a fin de ser comparada con los resultados provistos de un especialista que analiza las mismas imágenes. Finalmente, se emplean técnicas estadísticas para conocer matemáticamente el porcentaje de acierto de la herramienta, al segmentar y clasificar los tipos de glóbulos blancos.

4. Análisis de resultados y discusión

4.1. Procesamiento de imágenes

En esta sección se muestran los resultados de la aplicación de las diferentes etapas del procesamiento de imágenes del algoritmo propuesto en la Figura 33,

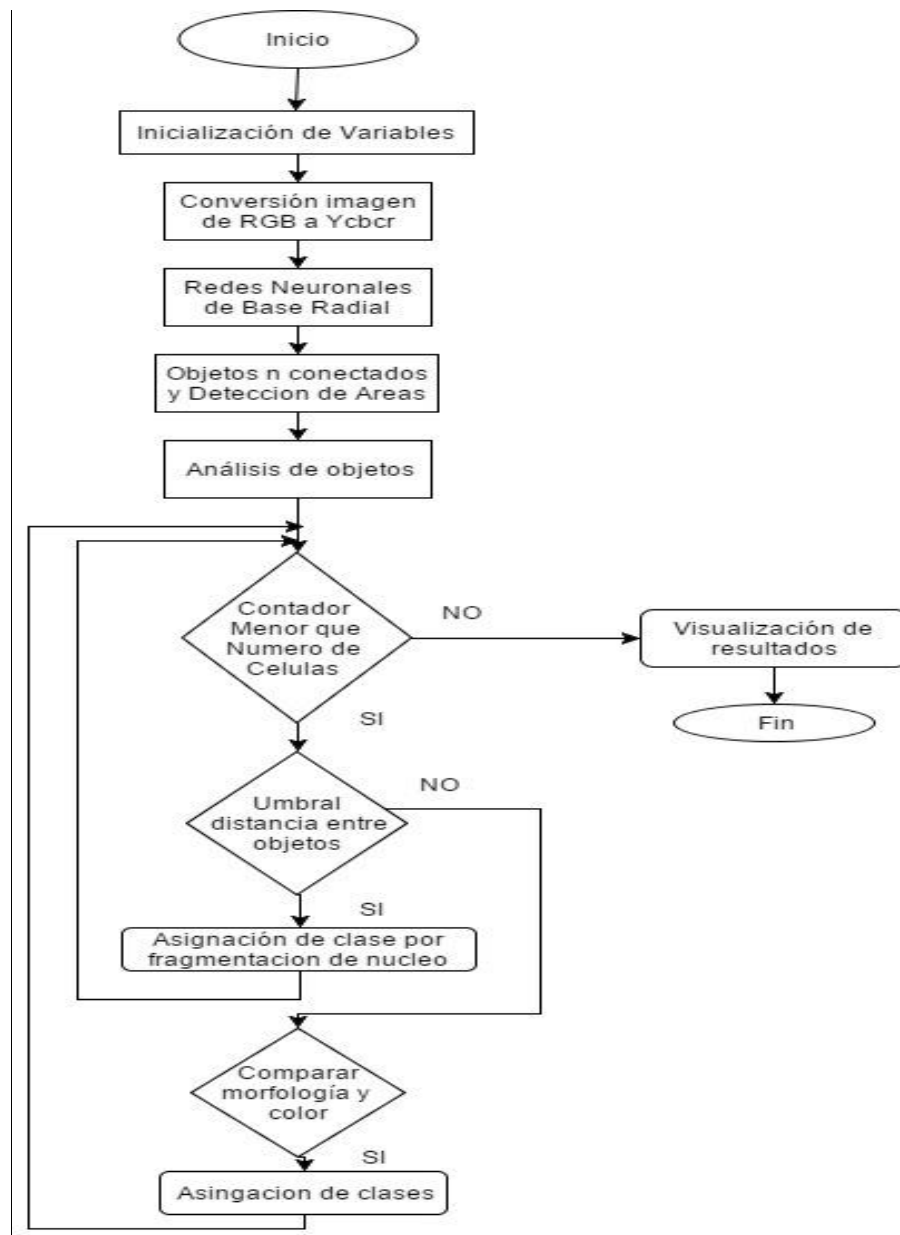


Figura 33. Diagrama de flujo del Algoritmo. Elaborado por los autores.

La conversión a otros espacios de color aplicados a la imagen original en RGB se realizó con el fin de ver su impacto en la definición de los núcleos con respecto al fondo para mejorar la etapa de segmentación. Se observó que en el espacio de color YCbCr una mejora en el contraste de los núcleos de las células con respecto al fondo lo cual facilita la segmentación por redes neuronales de base radial. La Figura 34 evidencia una mejoría en la definición del núcleo con respecto al fondo.

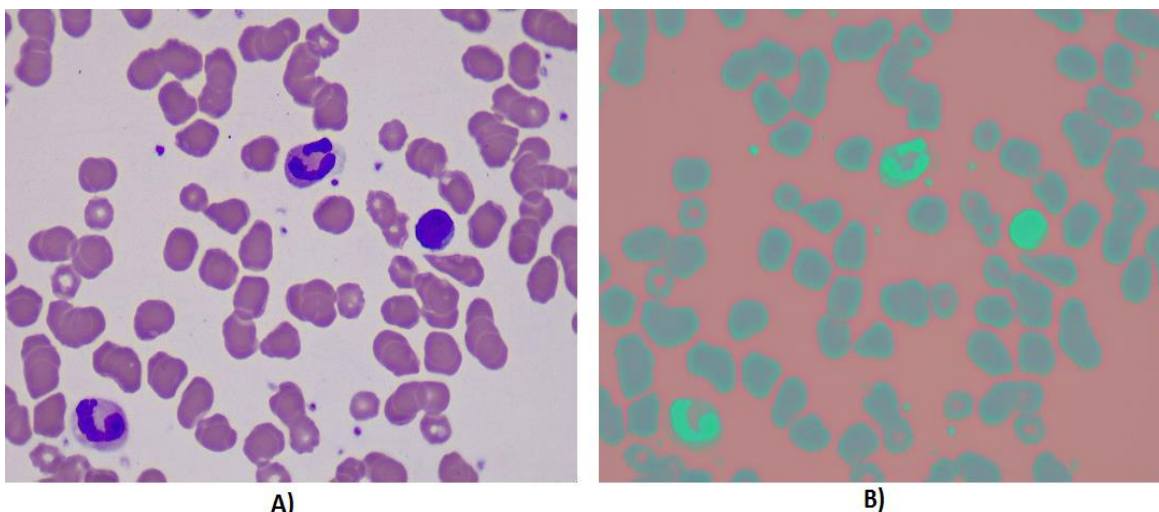


Figura 34. Conversión de Espacio de color. A) Imagen original RGB. B) Representación en RGB de la imagen en espacio de color YCbCr. Elaborada por los autores.

4.1.1. Segmentación de Núcleos de Glóbulos Blancos

El uso de redes neuronales de base radial en esta etapa de segmentación presento el resultado esperado como se muestra en las Figuras 35d a la 35f se observa una segmentación de los núcleos de células de glóbulos blancos y junto con estas pequeñas partículas que son plaquetas presentes en la sangre ya que estas presentan la misma tonalidad de color.

El usar técnicas de segmentación en imágenes de color presenta mejores resultados que al hacerlo en imágenes en escala de grises, debido a que el manejo de 3 componentes permite una mayor exactitud al extraer los objetos diferenciándolos del fondo, ya que si se hace en escala de grises este arreglo contiene un único valor por pixel lo cual genera una extracción de los objetos con mayores perturbaciones de ruido y partículas indeseadas.

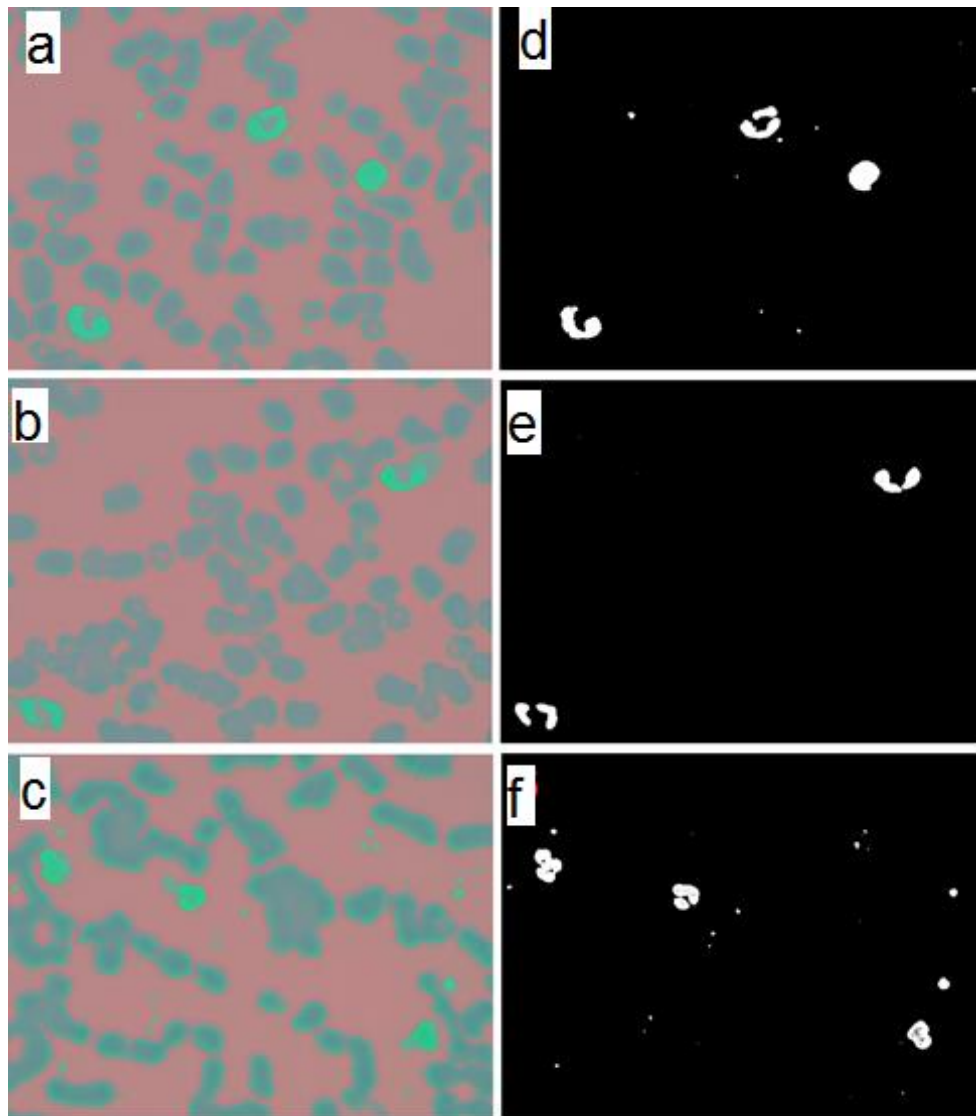


Figura 35. Segmentación basada en redes neuronales de base radial. Elaborada por los autores.

La imagen resultante de la segmentación contiene valores binarios (1 blanco y 0 negro), lo cual permite el uso de operadores morfológicos para eliminar pequeñas partículas generadas por las plaquetas. Mediante la herramienta desarrollada se eliminan aquellos objetos presentes cuya área sea menor a los 1500 píxeles para imágenes con una resolución espacial de 1200X1600, debido a que un núcleo de una célula presenta áreas mayores a este valor. Seguido a esto se aplica un operador de dilatación con un elemento estructurante de tipo disco con un radio de 3 píxeles, y por último se rellenan huecos de los núcleos esto con el fin de darle uniformidad esto se puede evidenciar en la Figura 36b.

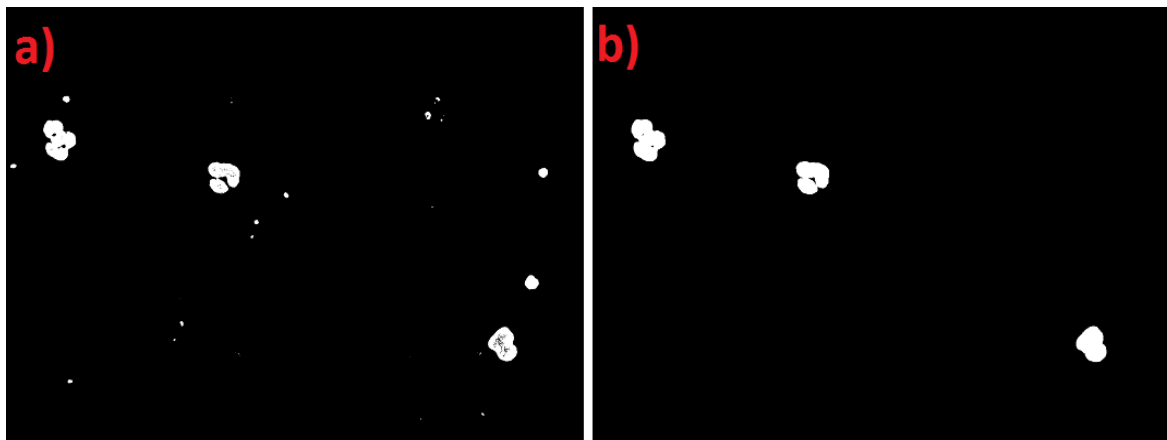


Figura 36. Aplicación de operadores morfológicos. Elaborado por los autores.

4.1.2. Clasificación de las células de glóbulos blancos

Una vez obtenidas las imágenes con los objetos pertenecientes a los núcleos de las células, se halla el valor de los centroides, esto con el fin de identificar la posición de cada una de estas células para posteriormente realizar un análisis de características morfológicas, distancia entre objetos y de la coloración del citoplasma, permitiendo realizar la clasificación según cada tipo de glóbulo blanco.

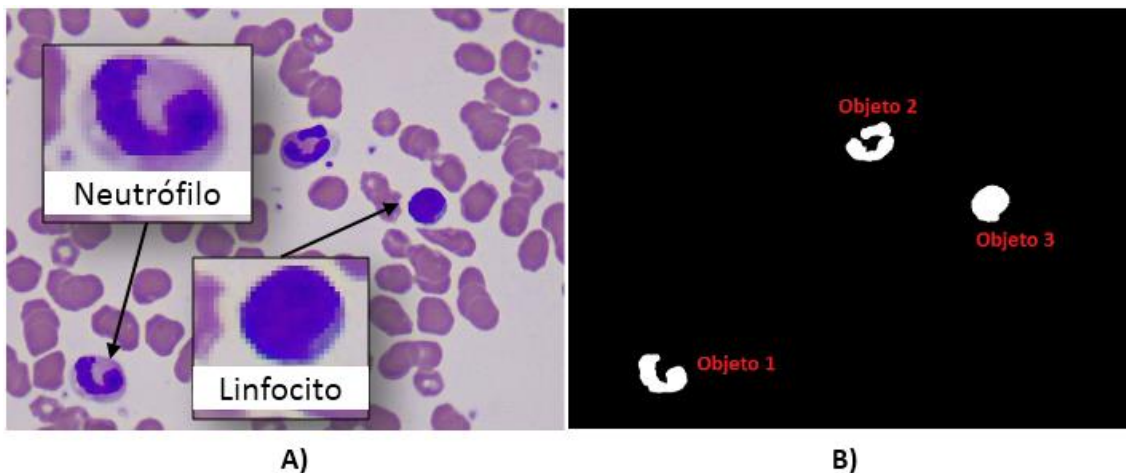


Figura 37. Análisis de características morfológicas. Elaborada por los autores.

Inicialmente, se realiza un barrido por toda la imagen calculando los valores de los descriptores morfológicos de cada objeto presente en ella como se observa en la Figura 37B. En la tabla 3, se analizan algunas de las características más relevantes que son usadas por el algoritmo en la identificación de las células. Los objetos 1 y 3 pertenecen a dos tipos de células distintos como lo son Neutrófilo y linfocitos, pero estas presentan valores en su morfología muy similares haciendo imposible su

identificación aplicando solo este análisis, por lo cual es necesario un análisis de la tonalidad del citoplasma de la célula ya que estos presentan una coloración distinta como se evidencia en la Figura 37A, este análisis se realiza conociendo las coordenadas de los objetos para así conocer los valores de las diferentes componentes de color en la imagen de color en el contorno del núcleo de la célula con el fin de hacer en conjunto con el análisis morfológico una identificación.

Tabla 3. Valores descriptores morfológicos. Elaborada por los autores.

	Objeto 1	Objeto 2	Objeto 3
Centroide	X=266 Y=1054	X=866 Y=394	X=1202 Y=563
Solidez	0,778	0,777	0,965
Área	9127	8549	8257
Perímetro	523,361	600,605	340,583

Algunas células de glóbulos blancos presentan núcleos fragmentados como se observa en la figura 38A, donde se encuentre un neutrófilo con un núcleo dividido en dos. Para evitar que el algoritmo tome los objetos segmentados como dos células diferentes por lo cual se realiza un cálculo de la distancia de los centroides de cada uno como en la Figura 38B. El cálculo se realiza mediante el uso del teorema de Pitágoras donde la hipotenusa del triángulo rectángulo formado por las coordenadas representa la distancia medida en píxeles. Esta medida entre los objetos permite determinar si estos pertenecen a una misma célula, si esta se encuentra por debajo de cierto umbral de 100 píxeles de distancia.

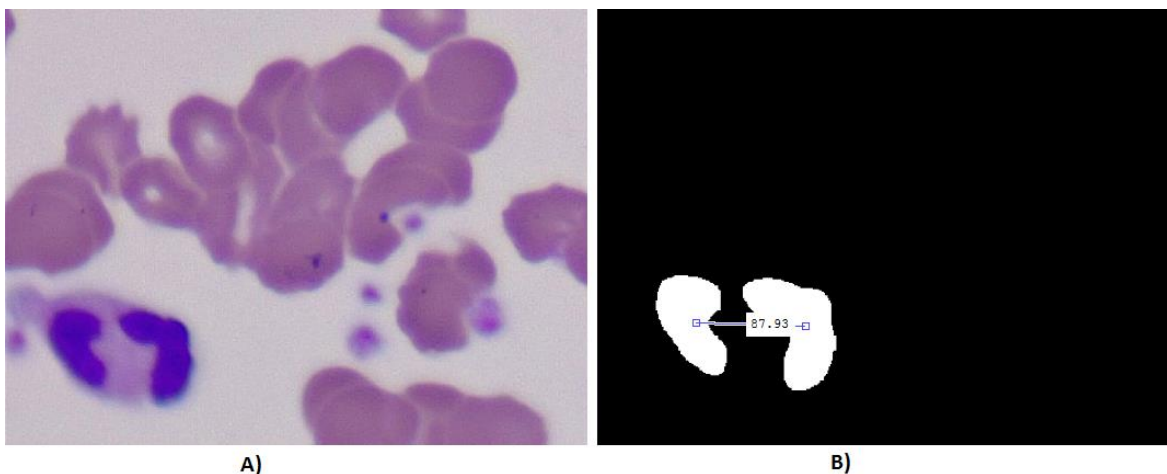


Figura 38. Calculo distancia entre objetos. Elaborado por los autores.

Aplicando un análisis en conjunto de los diferentes métodos mencionados anteriormente el algoritmo realiza la identificación de las células, clasificándolas en las

5 diferentes poblaciones (Neutrófilos, Basófilos, Monocitos, Eosinófilos y Linfocitos) de manera efectiva teniendo un buen rendimiento con poblaciones de células muy similares como se evidencia de la figura 3d a la 3f.

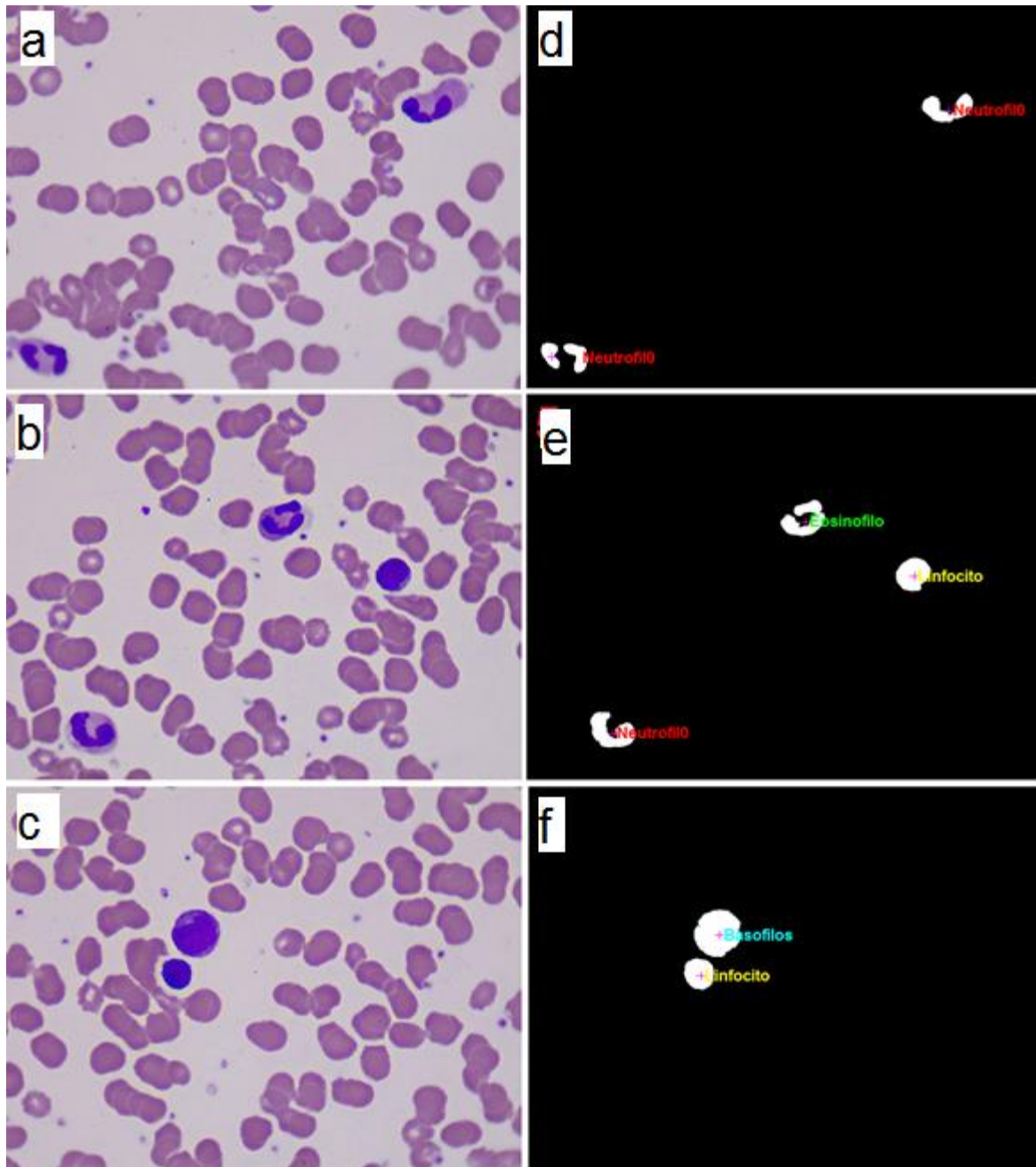


Figura 39. Clasificación de Células de Glóbulos Blancos. Elaborada por los autores.

4.2. Validación de la herramienta

La herramienta realizada tiene como finalidad contribuir en la identificación de los glóbulos blancos de manera semiautomática, a partir de las imágenes obtenidas del frotis de la sangre. Esta identificación se realizó a través de un análisis de las diferentes características de cada una de las células, con el fin de lograr una clasificación en cada una de sus poblaciones. La validación se realizó mediante la comparación de los resultados obtenidos por la herramienta computacional con respecto a los resultados emitidos por un especialista en Hematología. Encontrando así un índice de correlación entre los dos resultados para corroborar la precisión de la herramienta computacional.

La evaluación del experto se basó en la identificación de cada una de las cinco poblaciones de glóbulos blancos, presentes en cada campo de la imagen obtenida del frotis de la sangre. Los linfocitos poseen un núcleo de forma circular sólido, mientras que los Eosinófilos presentan un núcleo de forma irregular y citoplasma granulado de color distinto al de los demás glóbulos blancos, por otro lado, los basófilos tienen una coloración oscura y granulaciones, los monocitos son células de mayor tamaño con un citoplasma claro, por último, los neutrófilos poseen dos tipos de núcleos, pueden ser fragmentados o cayados de formas irregulares.

La validación se realizó a partir de un conjunto de 100 imágenes obtenidas de 5 individuos, de los cuales se observan y evalúan 20 imágenes para cada uno de ellos. En la Tabla 4 se muestra el número de células identificadas en cada clase por parte del experto en hematología.

Tabla 4. Resultado análisis manual obtenidos por el experto en hematología. Elaborada por los autores.

CÉLULA	INDIVIDUOS				
	1	2	3	4	5
Neutrófilo	23	16	19	17	24
Linfocito	13	7	13	13	16
Basófilo	2	0	0	0	1
Monocito	1	0	0	0	1
Eosinófilo	2	0	1	1	0
Total	41	23	33	31	42

De igual manera se realiza el análisis de las muestras de los frotis de sangre de los 5 individuos, ejecutando el algoritmo desarrollado para evidenciar los resultados en cuanto a la identificación de las células observadas por el experto. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos por la herramienta computacional.

Tabla 5. Resultado análisis por parte de la herramienta computacional. Elaborada por los autores.

CÉLULA	INDIVIDUOS				
	1	2	3	4	5
Neutrófilo	18	14	13	11	19
Linfocito	16	7	13	17	18
Basófilo	2	2	0	0	1
Monocito	2	0	2	0	1
Eosinófilo	3	0	5	3	3
Total	41	23	33	31	42

4.3. Análisis estadístico

Se lleva a cabo un análisis estadístico donde se comparan los datos obtenidos por el algoritmo y por el experto para cada individuo. De esta manera, se encontró el valor del coeficiente de determinación (R^2), indicando la asociación lineal entre variables pertenecientes a dos conjuntos de datos. El valor de este, oscila entre 0 y 1, donde un valor de R^2 cercano al 1 indica un alto grado de correlación entre los datos, evidenciando una elevada similitud entre los conjuntos; de manera contraria un R^2 cercano al 0 representa una diferencia significativa. En la tabla 6 podemos observar la comparación de los resultados obtenidos de la identificación de las células blancas, entre un experto y la herramienta en cuestión, en un total de 20 imágenes, para el individuo 1.

Tabla 6. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 1. Elaborada por los autores.

Individuo 1		
Célula	Identificación experto	Identificación herramienta
Neutrófilo	23	18
Linfocito	13	16
Basófilo	2	2
Monocito	1	2
Eosinófilo	2	3
Total	41	41

En la Figura 40, se evidencia la correlación de las células identificadas en cada clase para el experto y el algoritmo, en la muestra del frotis de sangre del individuo 1. Se encuentra que la herramienta presenta un alto índice de similitud con el experto, basado en el valor de $R^2=0.9171$.

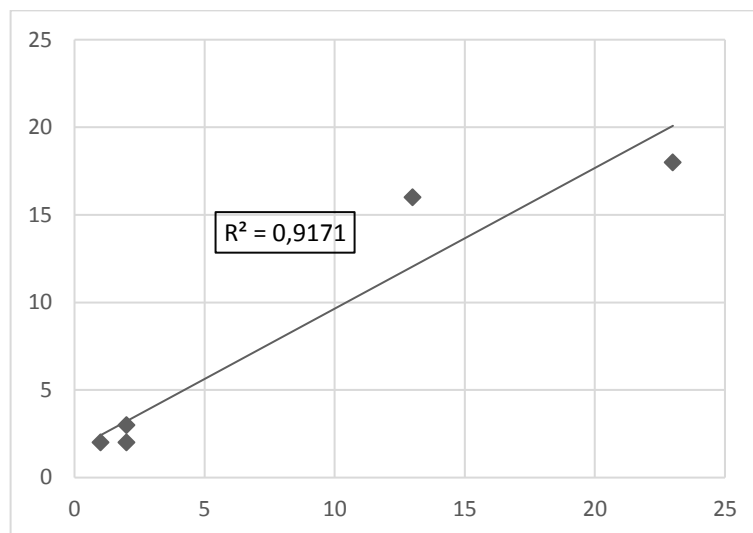


Figura 40. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 1.
Elaborada por los autores.

Para los resultados del análisis del frotis de sangre del individuo 2 registrados en la tabla 7, se obtuvieron unos resultados del índice de correlación buenos, como se muestra en la Figura 41, con un valor de $R^2=0.98$. Evidenciando un buen desempeño del algoritmo en la identificación de las células de este individuo.

Tabla 7. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 2.
Elaborada por los autores.

Individuo 2		
Célula	Identificación experto	Identificación herramienta
Neutrófilo	16	14
Linfocito	7	7
Basófilo	0	2
Monocito	0	0
Eosinófilo	0	0
Total	23	23

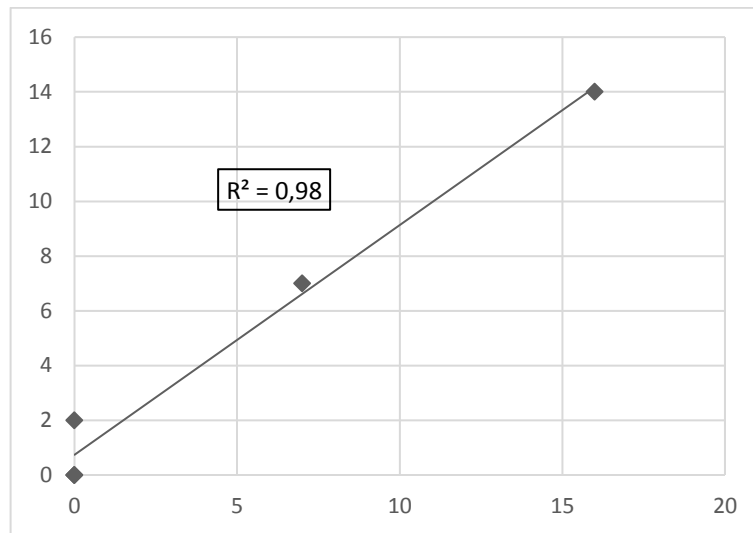


Figura 41. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 2.
Elaborada por los autores.

De igual manera se obtuvieron buenos resultados (Tabla 8) en la identificación de las células del frotis de sangre del individuo 3 como se observa en la Figura 42, donde se obtiene un valor de $R^2=0.8836$ indicado una similitud entre los datos obtenidos por el experto y la herramienta computacional.

Tabla 8. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 3.
Elaborada por los autores.

Individuo 3		
Célula	Identificación experto	Identificación herramienta
Neutrófilo	19	13
Linfocito	3	13
Basófilo	0	0
Monocito	0	2
Eosinófilo	1	5
Total	33	33

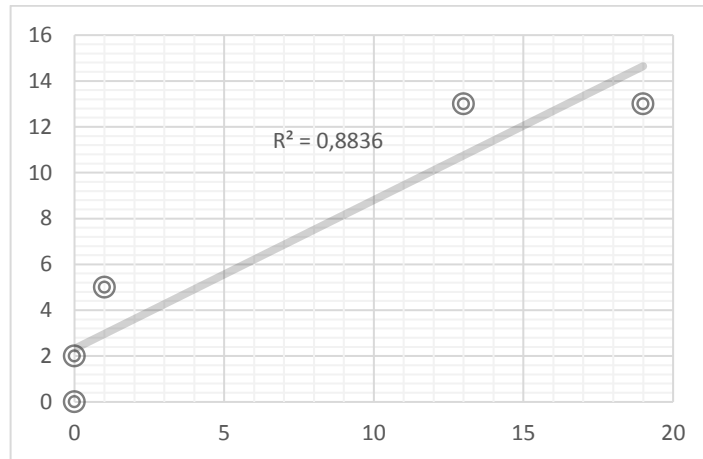


Figura 42. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 3.
Elaborada por los autores.

Se obtienen los resultados más bajos de correlación de los datos obtenidos del análisis del frotis de sangre del individuo 4 (Tabla 9) como se observa en la Figura 43. Esto es debido a que el proceso de tinción de la muestra no fue bueno, haciendo variar la coloración de las células observadas en las imágenes, obteniendo un valor de $R^2=0.7912$. Evidenciando que la herramienta presenta un buen rendimiento incluso con esta clase de imágenes.

Tabla 9. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 4.
Elaborada por los autores.

Individuo 4		
Célula	Identificación experto	Identificación herramienta
Neutrófilo	17	11
Linfocito	13	17
Basófilo	0	0
Monocito	0	0
Eosinófilo	1	3
Total	31	31

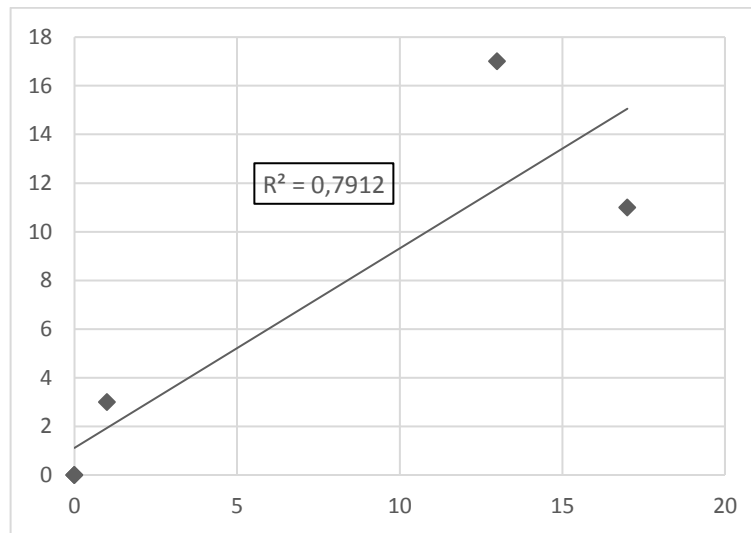


Figura 43. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 4.
Elaborada por los autores.

Por último, el análisis realizado en el frotis de sangre del individuo 5 por parte del experto y de la herramienta presenta un valor de $R^2=0.9362$, lo cual indica un buen índice de correlación entre los dos conjuntos de datos obtenidos de la identificación de las células (Tabla 10) como se muestra en la Figura 44.

Tabla 10. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta para el individuo 5.
Elaborada por los autores.

Individuo 5		
Célula	Identificación experto	Identificación herramienta
Neutrófilo	24	19
Linfocito	16	18
Basófilo	1	1
Monocito	1	1
Eosinófilo	0	3
Total	42	42

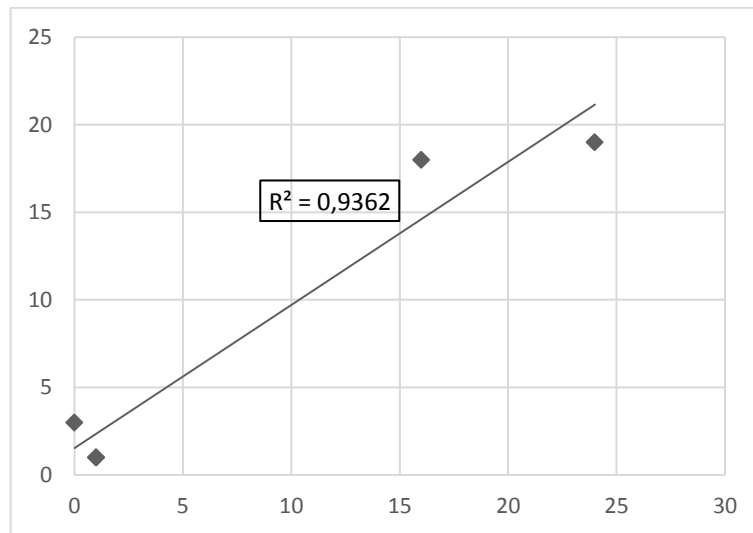


Figura 44. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas en el individuo 5. Elaborada por los autores.

La validación de los resultados de la herramienta computacional con respecto al análisis realizado por parte de un experto se observa en la Figura 45. Con un coeficiente de determinación $R^2=0.9269$, debido a la una alta correlación entre los datos. Por lo cual es posible decir que la implementación de este algoritmo de segmentación basada en redes neuronales de base radial y de clasificación mediante características morfológicas, tuvo un buen desempeño en la identificación de las células de glóbulos blancos, los datos estadísticos se observan en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación por tipo de célula blanca, entre el experto y la herramienta de los cinco individuos. Elaborada por los autores.

Identificación global		
Célula	Identificación total experto	Identificación total herramienta
Neutrófilo	99	75
Linfocito	62	71
Basófilo	3	5
Monocito	2	5
Eosinófilo	4	14
Total	170	170

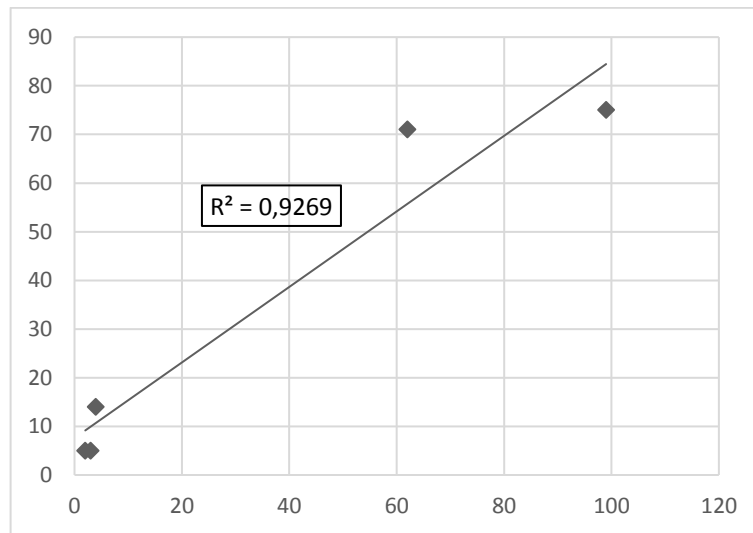


Figura 45. Regresión lineal y coeficiente de determinación de las células identificadas de todos los individuos. Elaborada por los autores.

Los resultados obtenidos a partir de la herramienta computacional tienen una buena correlación y siguen la tendencia de los resultados provenientes del análisis del experto en hematología, como se observa en la Figura 46.

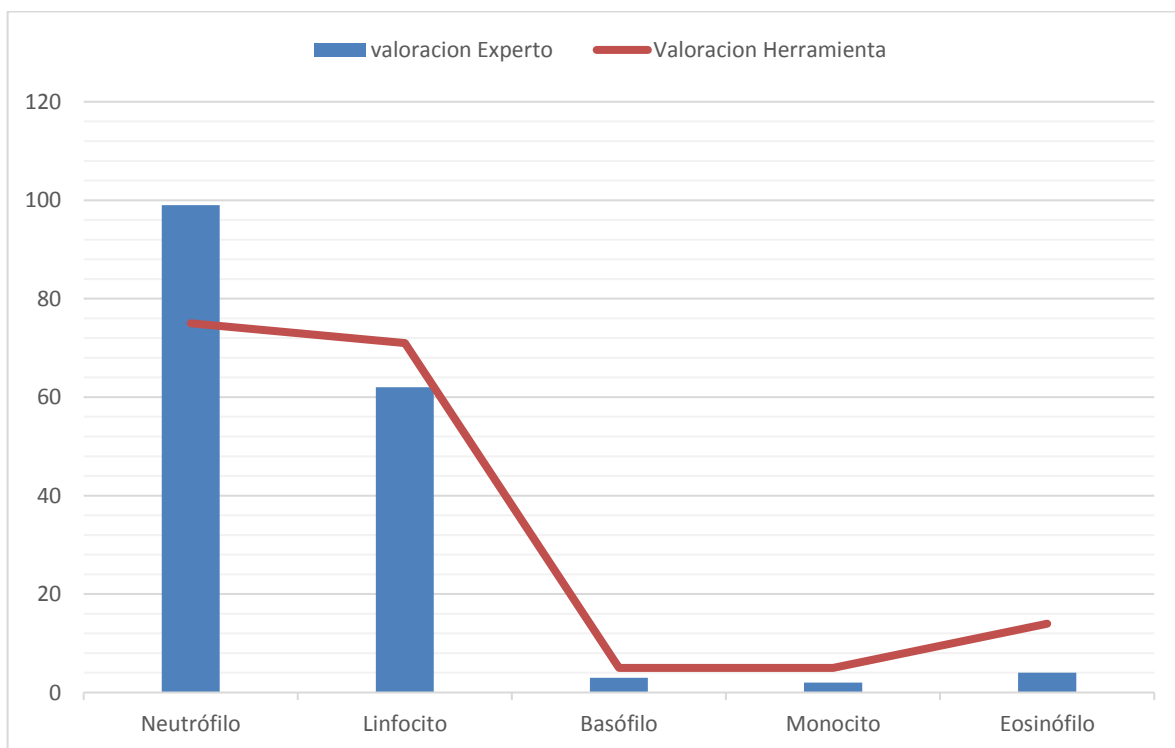


Figura 46. Comparación de resultados de la identificación de células de glóbulos blancos, realizado por el experto y la herramienta computacional. Elaborada por los autores.

5. Conclusiones y trabajos futuros

La investigación en el área, demostró la importancia de la visión por computador para automatizar procesos repetitivos que son realizados de forma manual a través de la observación, proporcionando un análisis objetivo con alta precisión, en cortos periodos de tiempo y a bajo.

El proceso de obtención de las muestras de sangre, se llevó a cabo por medio del protocolo estipulado en los manuales de análisis hematológicos, de igual modo, la tinción, juega un papel significativo puesto que resalta los glóbulos blancos de los demás objetos, esto permitió la correcta identificación de los glóbulos blancos a través de imágenes. Aunque, se presentaron inconvenientes con algunas muestras durante la adquisición de las imágenes, debido a que se debe tener en cuenta el espacio del extendido que se esté observando con el objetivo del microscopio, dado que la identificación de las células blancas, se realiza en los campos donde las células no se encuentran conglomeradas.

La aplicación de las redes neuronales de base radial en conjunto con descriptores morfológicos y la distancia entre objetos, arrojaron mejores resultados en la segmentación de los núcleos sobre otras técnicas de segmentación utilizadas, debido a que resalta y extrae completamente los núcleos conservando su forma sobre imágenes directamente en el espacio del color. No obstante, se debe de optimizar con una selección dinámica de los pixeles a comparar, puesto que las imágenes no presentan siempre la misma tonalidad.

Los resultados obtenidos en la validación de la herramienta, exponen el buen rendimiento que se logra en comparación con los resultados obtenidos a partir del análisis de un especialista. Sin embargo, cuando el individuo padece de algún tipo de proceso infeccioso o un tipo de patología, causa alteraciones directamente en los glóbulos blancos dificultando así la identificación precisa del tipo de células. Esto ocurre cuando los glóbulos blancos de tipo neutrófilos, presentan granulaciones en su citoplasma asemejándose a los eosinófilos, los cuales pertenecen a otro tipo de estas células. No obstante, el índice de correlación presentó porcentajes superiores a 79,12% para los individuos, en promedio la herramienta presentó 92,09% de precisión en la clasificación de los glóbulos blancos respecto al método manual del experto.

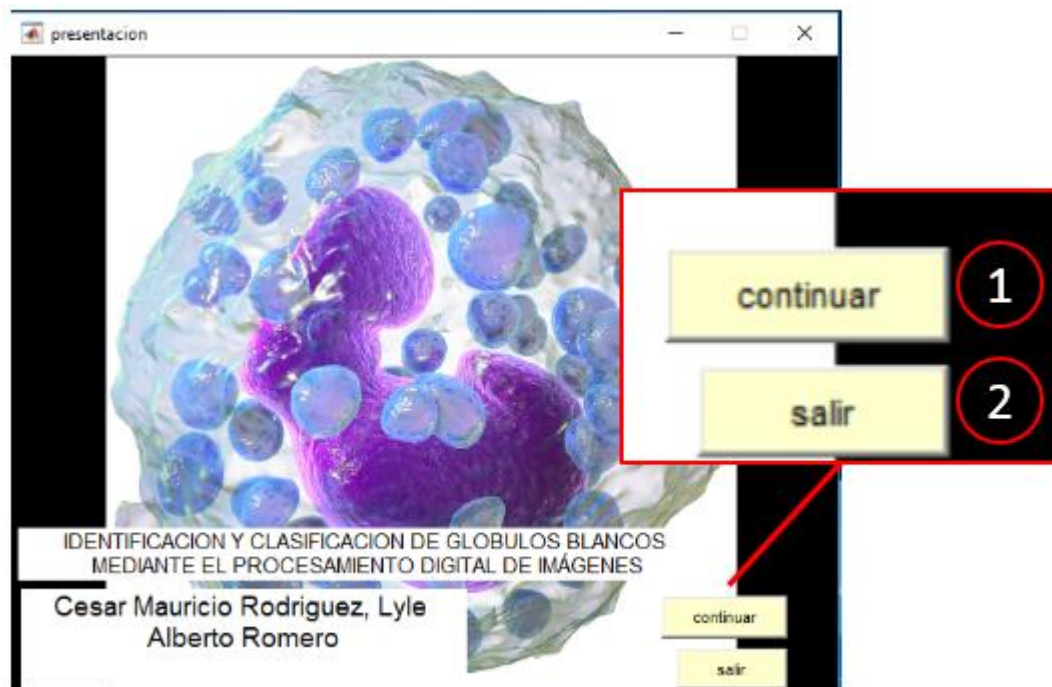
Finalmente, la herramienta computacional desarrollada para el análisis de glóbulos blancos permitió el soporte tecnológico al especialista, con la capacidad de disminuir los errores producidos por la subjetividad generada en la interpretación por parte del especialista y de esta manera proporcionar resultados confiables. En Colombia, esta herramienta brindaría una alternativa económica y accesible para el análisis en futuras investigaciones. Además, se propone expandir el estudio para realizar el recuento y clasificación completa de los glóbulos blancos, además de diagnosticar enfermedades asociadas a los rangos de referencia del examen, contribuyendo a los procesos de investigación en campos interdisciplinarios de la Universidad de Cundinamarca.

Apéndice 1: Manual de usuario de la herramienta

Este manual describe los diferentes aspectos de la herramienta computacional para la identificación de glóbulos blancos, así como los pasos necesarios para su funcionamiento.

A.1.1. Funcionamiento

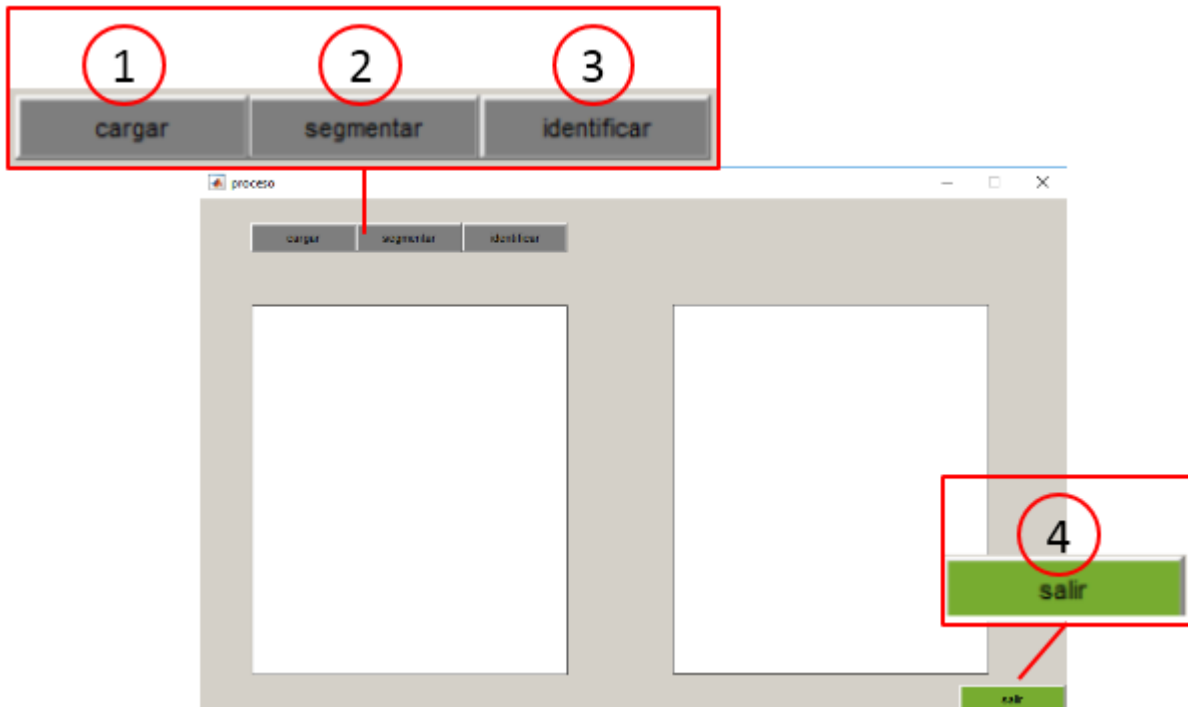
Al ejecutar el programa, se desplegará una ventana de inicio de presentación de la herramienta.



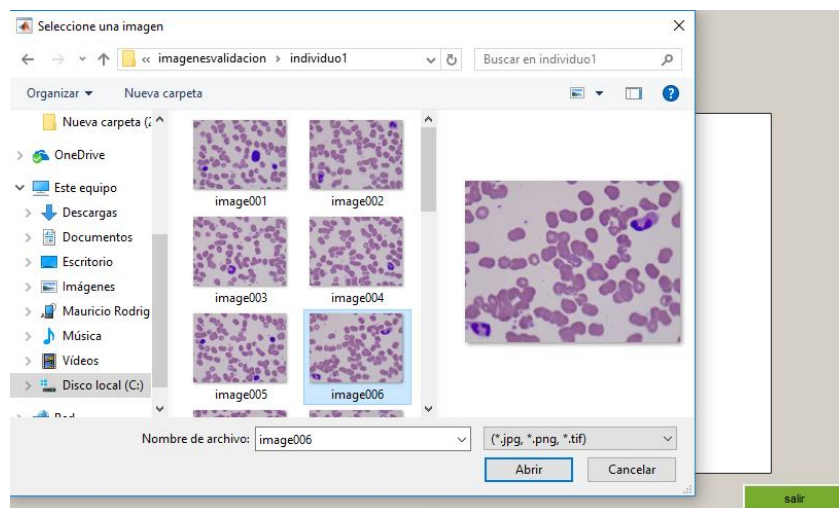
1. **Continuar.** Al oprimir en el botón, se pedirá una confirmación para ir a la ventana de funciones para la identificación.
2. **Salir.** Al oprimir en el botón, el programa finalizara su ejecución.

Ventana de funciones para la identificación.

Esta ventana permite cargar la imagen, segmentar los núcleos y una opción de identificación.

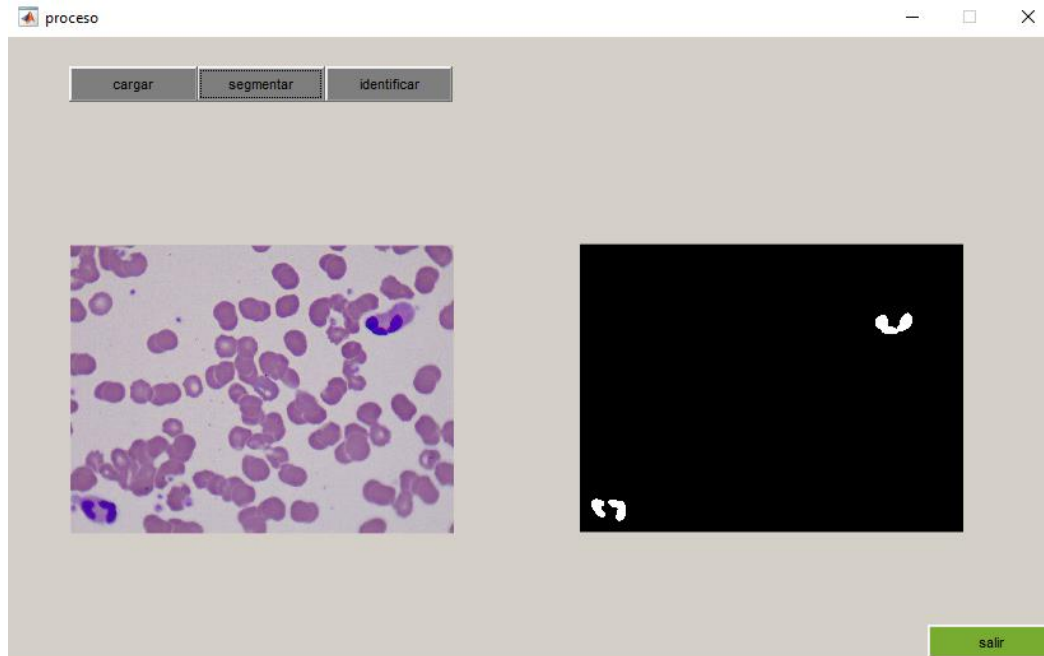


1. **Cargar.** permite cargar imágenes de formatos JPEG, PNG y TIF con una resolución de 1200x1600píxeles, para cargar las imágenes al dar clic en el botón cargar se abre una ventana en la cual se debe buscar la imagen y ser seleccionada.



Luego de ser seleccionada la imagen esta aparecerá en el recuadro de la izquierda para su visualización. Seguido a esto se debe dar clic en el botón segmentar.

2. **Segmentar.** Permite hacer una extracción de los núcleos de las células presentes en la imagen apareciendo en el recuadro de la derecha.

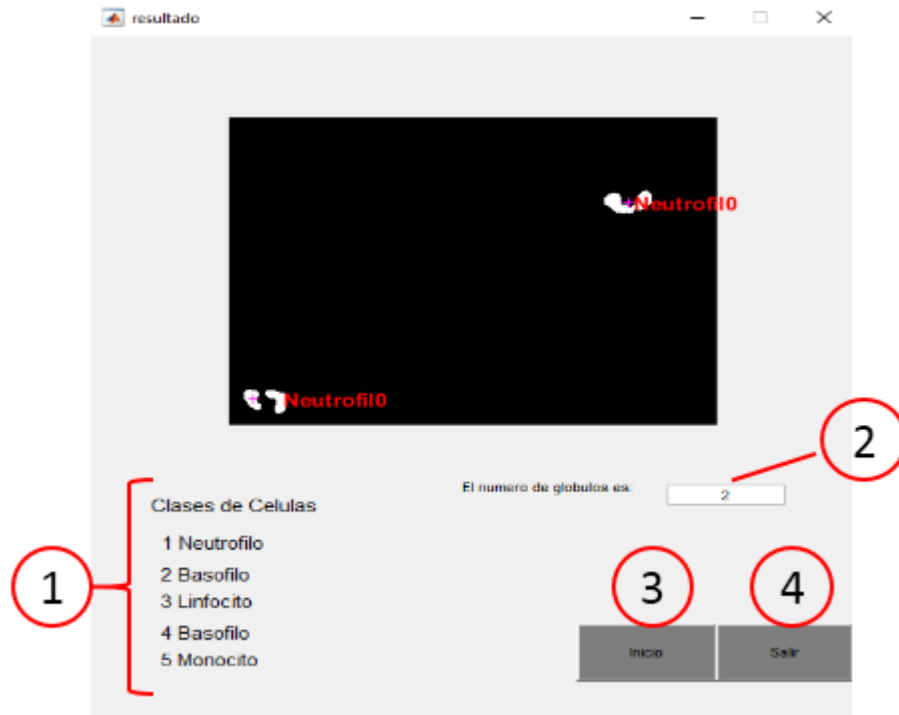


3. **Identificar.** Permite hacer la identificación de las células, al dale clic aparecerá una nueva ventana la cual permite la visualización de los resultados.
4. **Salir.** Este botón permite finalizar la ejecución del programa.

Ventana de visualización de resultados

Luego de oprimir el botón de **3. Identificar** aparece la ventana de visualización de resultados. Esta ventana permite la visualización de los núcleos de las células con el respectivo nombre de la clase a la cual pertenecen.

, además de esto una lista con los 5 tipos de células de glóbulos blancos como ayuda al usuario y un contador para saber cuántas células están presentes en la imagen.



1. Lista con los 5 tipos de células de glóbulos blancos como ayuda al usuario.
2. Contador para saber cuántas células están presentes en la imagen.
3. **Inicio**. Permitirá regresar a la ventana anterior para empezar nuevamente en proceso de identificación con una nueva imagen.
4. **Salir**. Permite darle cierre a la aplicación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliz, D. E., & Fernández, D. G. (2011). LEUCOGRAMA Y GLUCEMIA EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO. UTILIDAD DEL ÍNDICE LEUCOGLUCÉMICO . *CorSalud* .
- Brambila, E., Castillo-Guerra, R., & Lozano-Zarain, P. (2003). Comparación entre tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado. *BIOQUIMIA*.
- Fraga, L. G. (2001). *Introducción Curso: Procesamiento Digital de Imágenes*.
- Freitas, M. d., & Fernández, L. (2002). EVALUACIÓN DEL DIFERENCIAL LEUCOCITARIO REALIZADO POR EL COULTER STKS Y EL COULTER MAXM. *Revista de la Facultad de Medicina*.
- García Nuevo, M. (2003). *Procesamiento y Visualización Tridimensional de Imágenes Biomédicas del Microscopio Confocal*. Madrid.
- García, M. d., & Bermejo, M. J. (2004). *Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínicos*. España: Mad S.L.
- Gautam, A., Bhadauria, H., & Garhwal, P. (2014). Classification of White Blood Cells Based on Morphological Features . *IEEE*.
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2002). *Digital Image Processing* . Prentice Hall.
- International Association of Providers of AIDS (CARE). (s.f.). *aidsinfonet*. Obtenido de El recuento hemático completo: http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/121?lang=spa
- Jha, K. K., Das, B. K., & Dutta, H. S. (s.f.). Detection of Abnormal Blood Cells on the Basis of Nucleus Shape and Counting of WBC . *IEEE*.
- Lin, S.-F., & Hsinchu, Y.-B. H. (2012). Differential Count of White Blood Cell in Noisy Normal Blood Smear . *IEEE*.
- Maya Campuzano, G. (2007). Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*, 13(11-12), 511-550.
- Maya Campuzano, G. (2008). Utilidad del extendido de sangre periférica: los leucocitos. *La clínica y el laboratorio*.

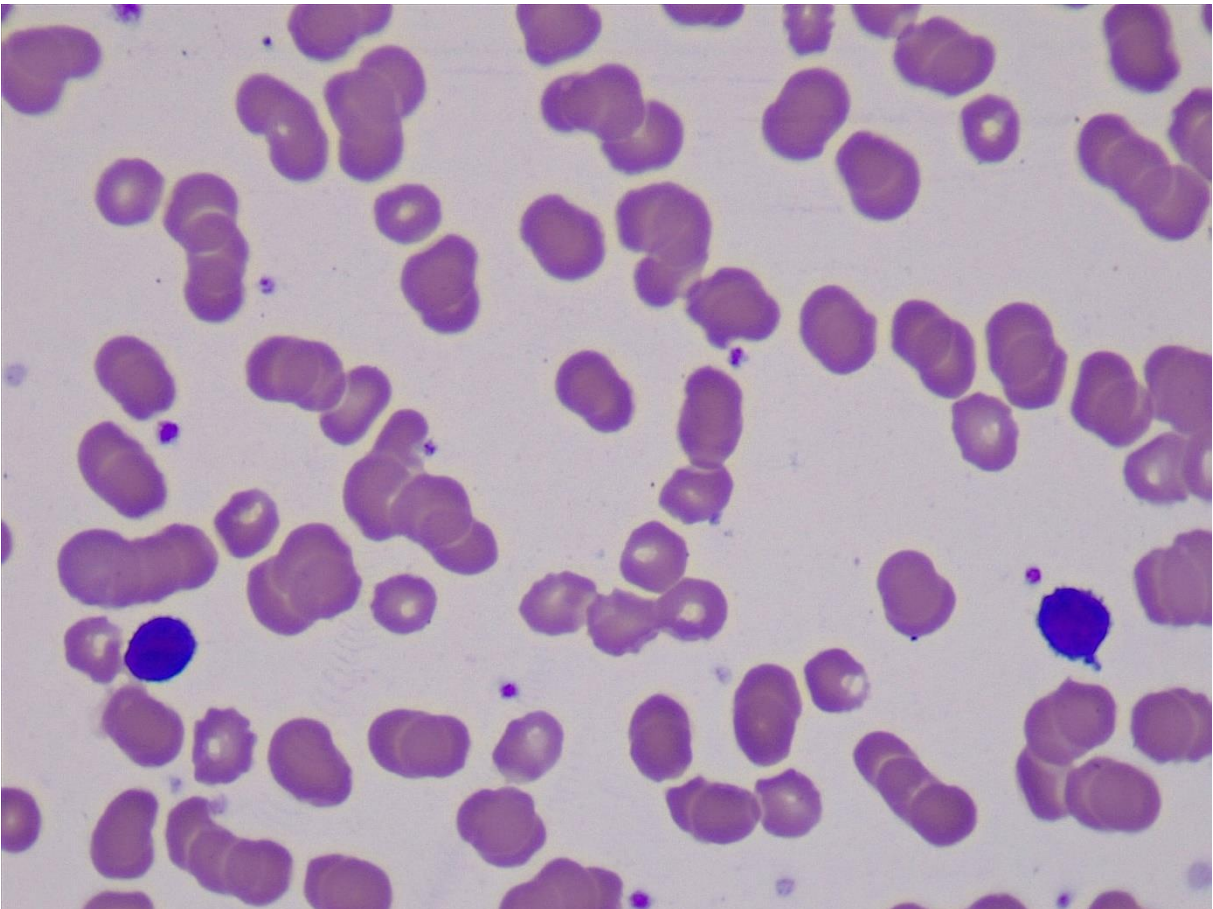
- Maya Campuzano, G. (2013). Interpretación del hemograma automatizado: claves para una mejor utilización de la prueba. *Medicina & Laboratorio*.
- Maya, G. C. (2007). Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*, 511-550.
- Mejía, G. Á., & Ramelli, M. Á. (2006). *Interpretación clínica del laboratorio*. Médica Panamericana.
- Mohamed, M. M., & Far, B. (2014). A Fast Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation Based on Gram-Schmidt Orthogonalization. *IEEE*.
- Mostafa Mohamed, B. F. (2012). An Enhanced Threshold Based Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation. *IEEE*.
- Mostafa, M. B., & Guaily, A. (2012). An Efficient Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation. *IEEE*.
- Namesny, A. (2003). Sistemas de vision artificial en industria agroalimentaria. *HORTICULTURA*, 24-26.
- Palomino, D. L., & Concha, L. R. (2009). Técnicas de Segmentación en Procesamiento Digital de Imágenes. *Revista de Ingeniería de Sistemas e Informática*.
- Qingli, L., Yiting, W., Hongying, L., Jianbiao, W., & Fangmin, G. (2013). A combined spatial-spectral method for automated white blood cells segmentation. *EL SRVIER*.
- Rodak, B. F. (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Theerapattanakul, J., Plodpai, J., & Pintavirooj, C. (2014). AN EFFICIENT METHOD FOR SEGMENTATION STEP OF AUTOMATED WHITE BLOOD CELL CLASSIFICATIONS. *IEEE*.
- Theera-Umpon, N., & Gader, P. D. (2000). Training Neural Networks to Count White Blood Cells via a Minimum Counting Error Objective Function . *IEEE*.
- Torrens, M. (2015). INTERPRETACIÓN CLÍNICA DEL HEMOGRAMA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 713-725.
- Wang Xiaozhang, W. C., & Xiang Zhang, F. Z. (2010). The Processing of Blood Cell Micro-flow Image and Objects Recognition. *IEEE*.

Zhang, Y., Bai, J., Wu, H., & Ying, J. Y. (2015). Trapping cells in paper for white blood cell count. *ELSEVIER*, 7.

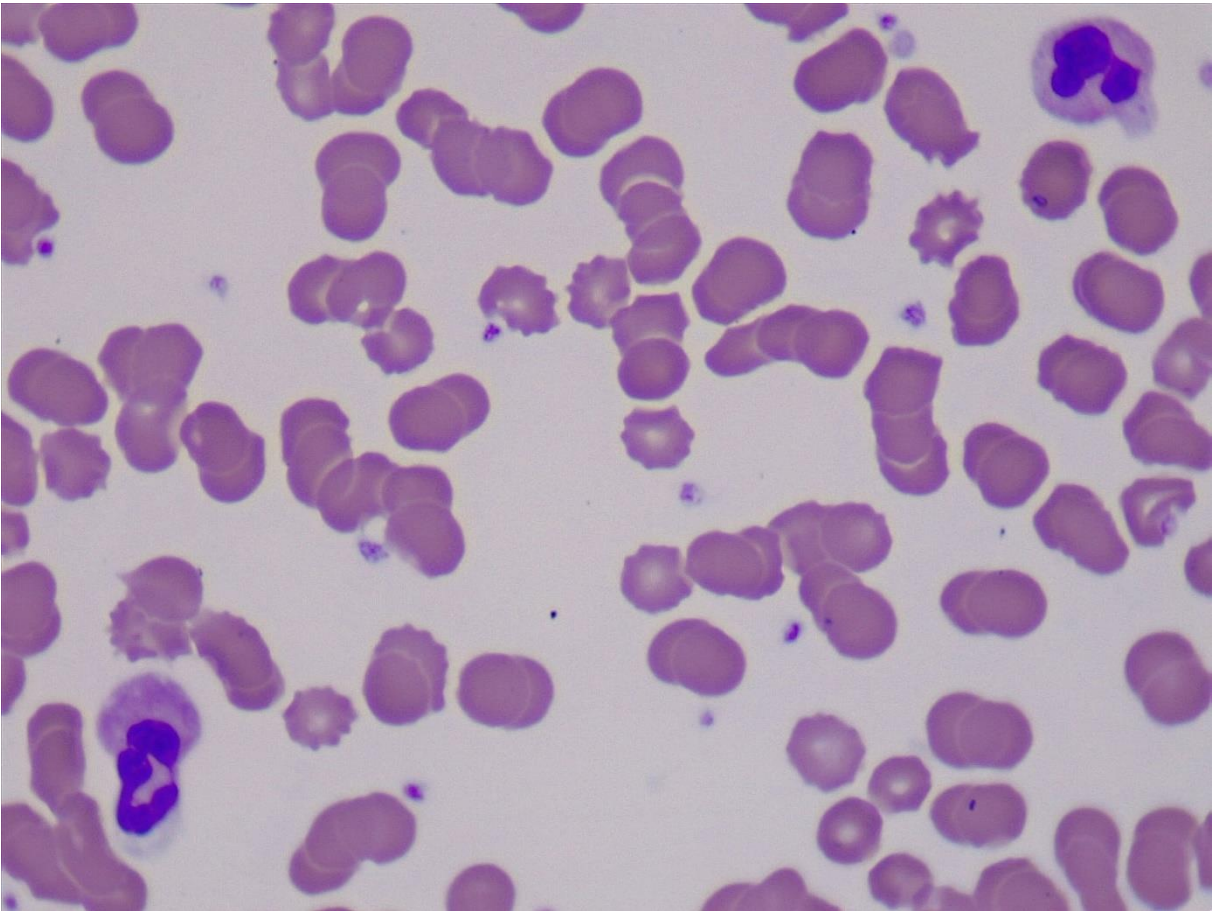
ANEXOS

A continuación, se presenta la base de datos de 100 imágenes que se utilizaron para la validación de la herramienta. Cada imagen con su respectiva tabla indicando la cantidad y tipo de glóbulos blancos identificados por el experto.

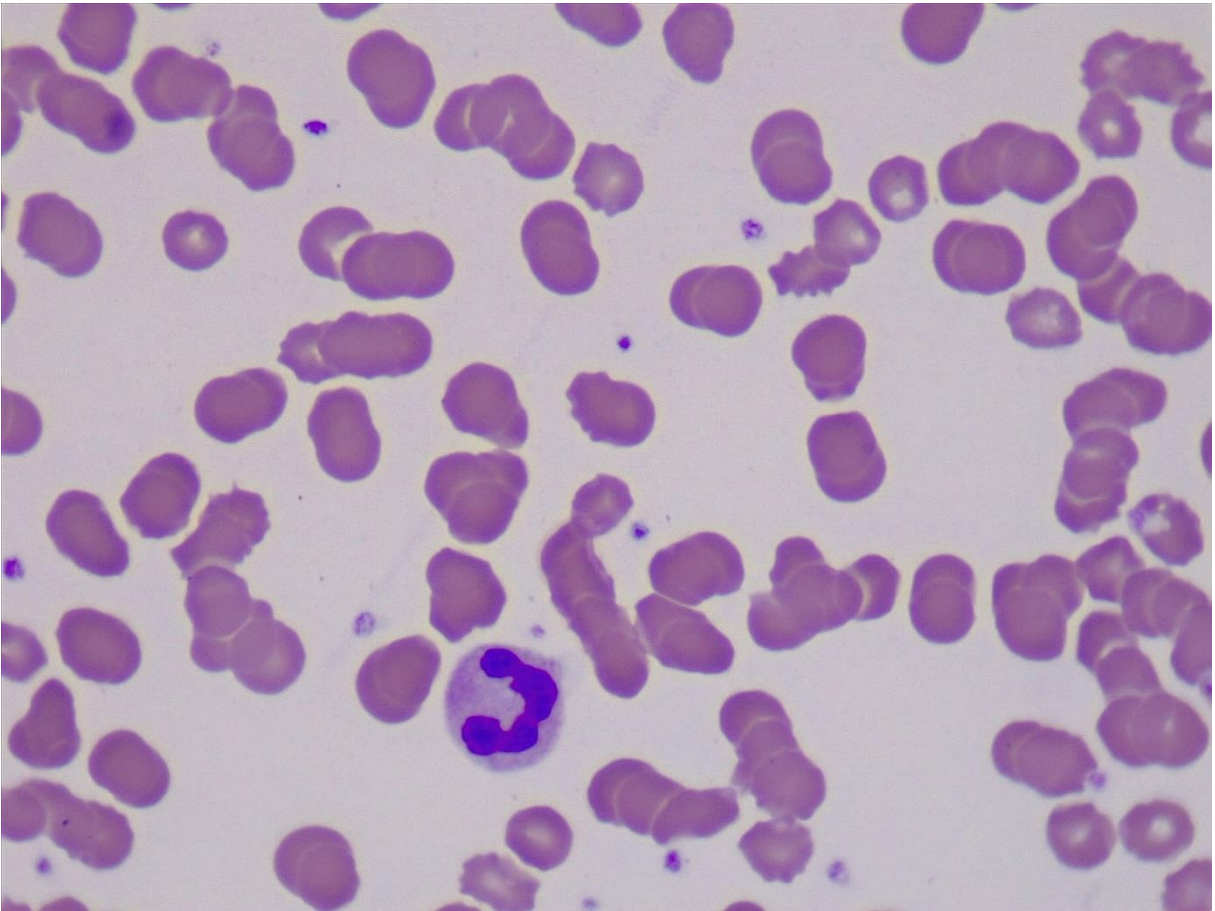
Individuo 1	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	1
Monocito	0
Eosinófilo	0



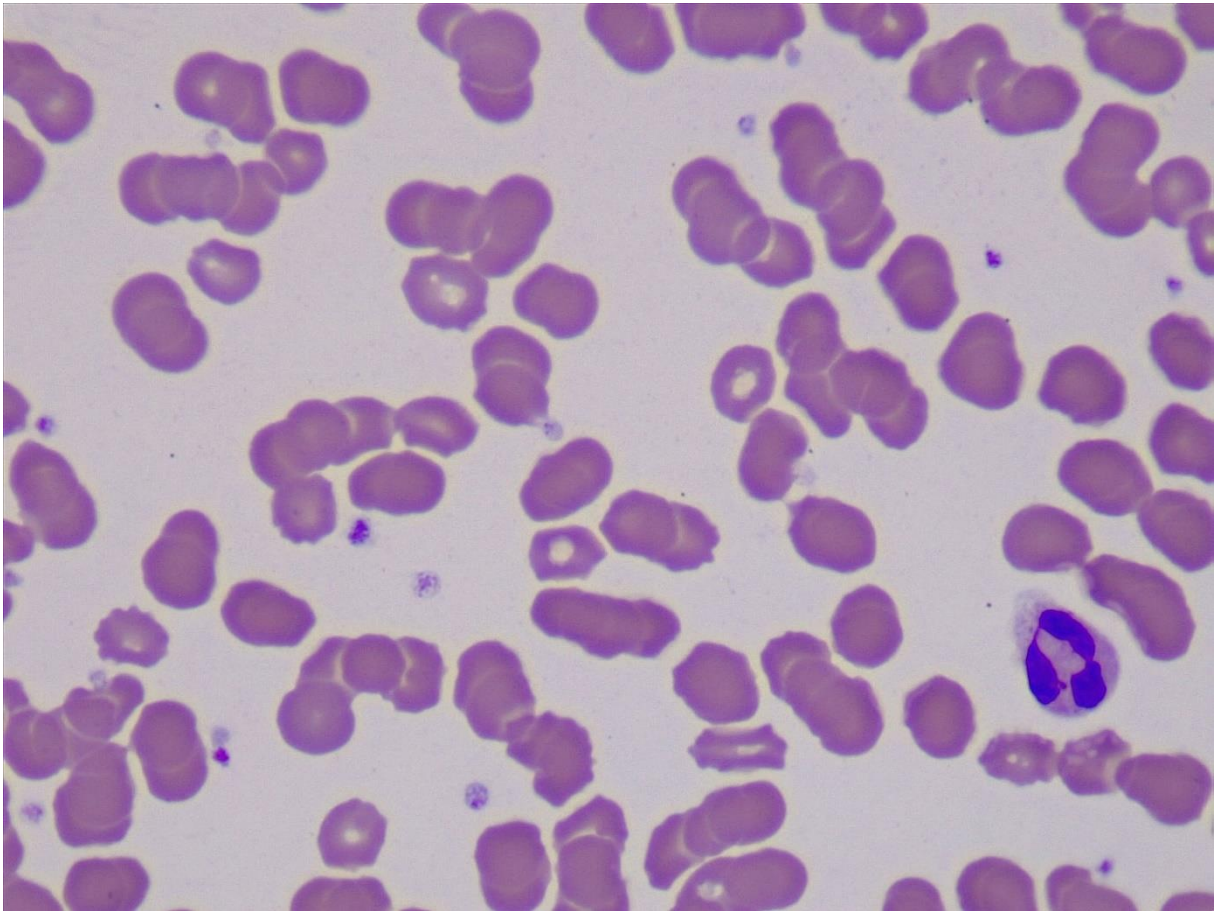
Individuo 1	Imagen 2
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



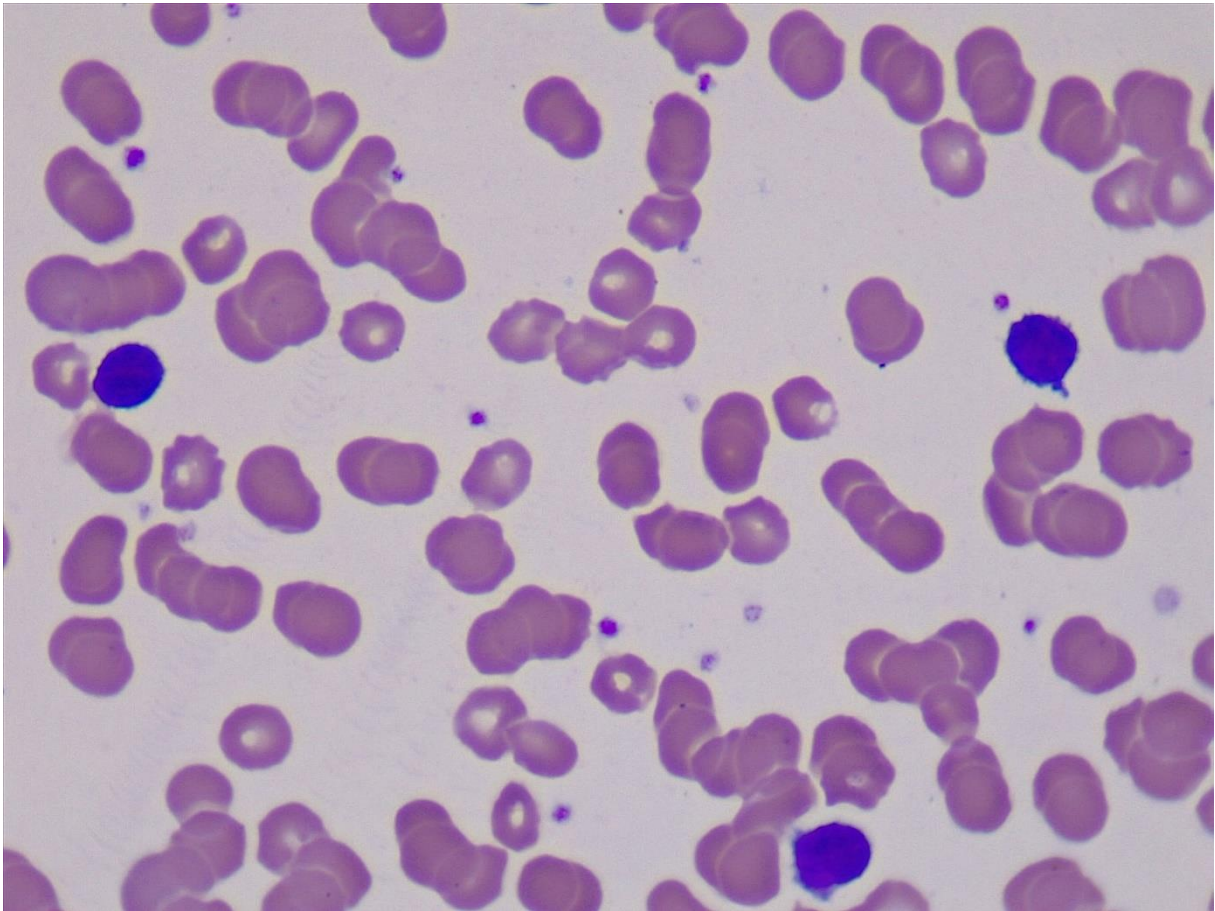
Individuo 1	Imagen 3
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



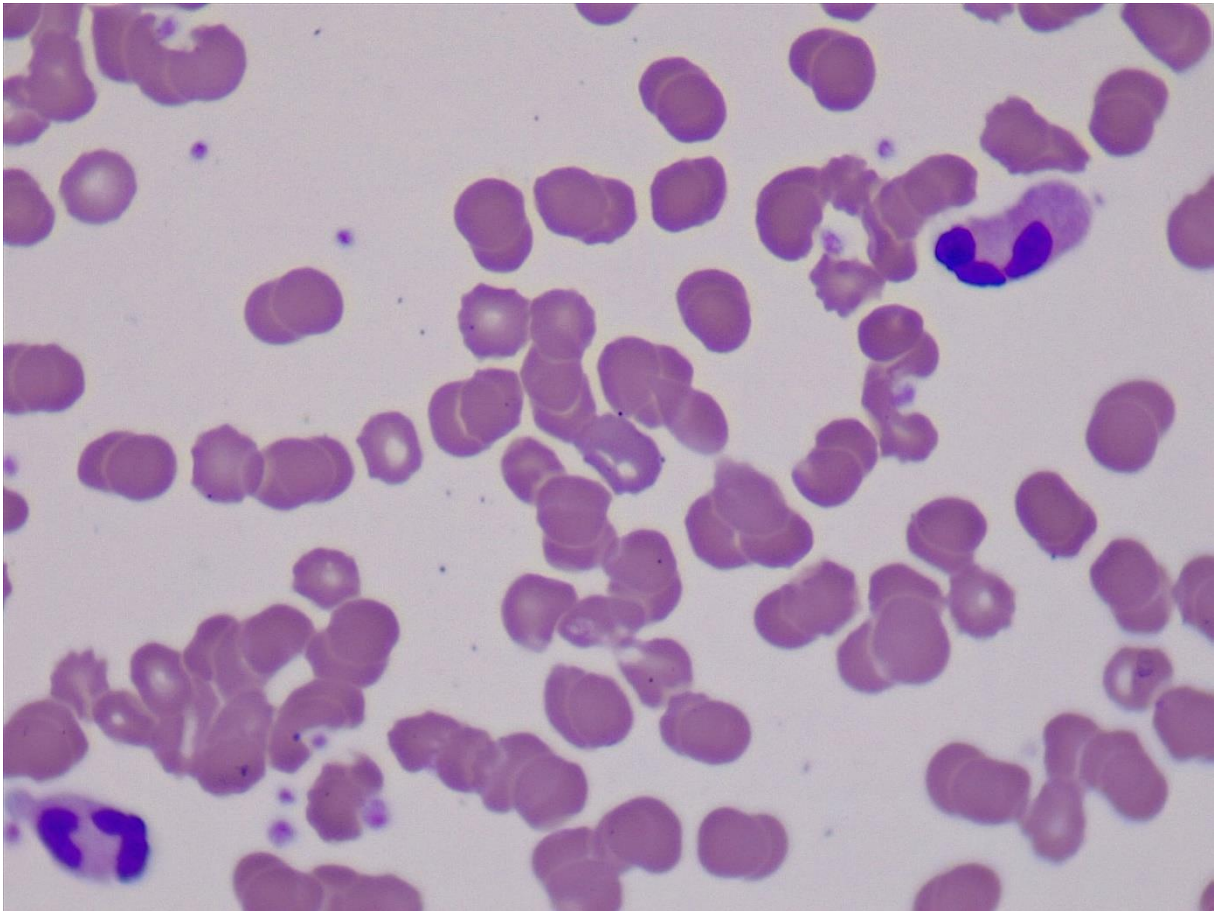
Individuo 1	Imagen 4
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



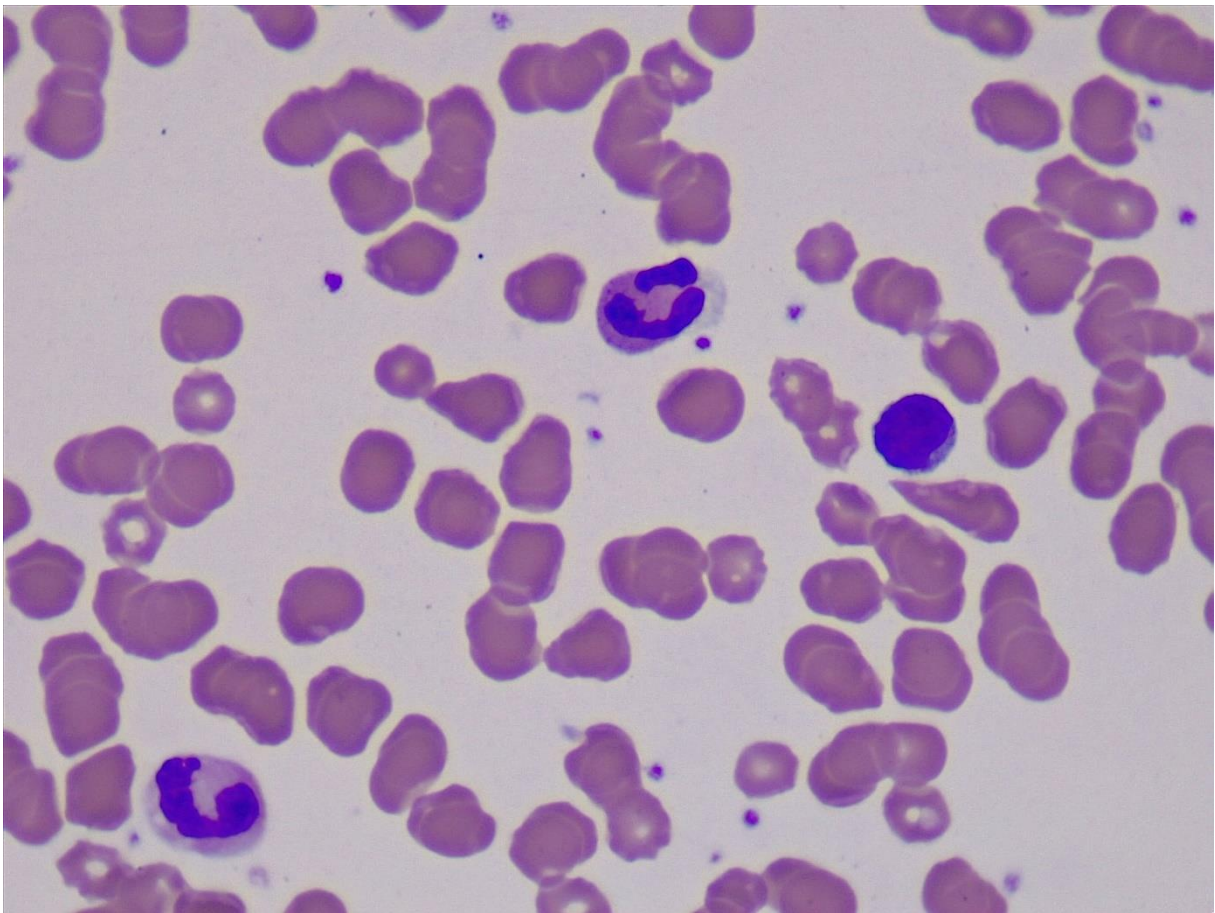
Individuo 1	Imagen 5
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	3
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



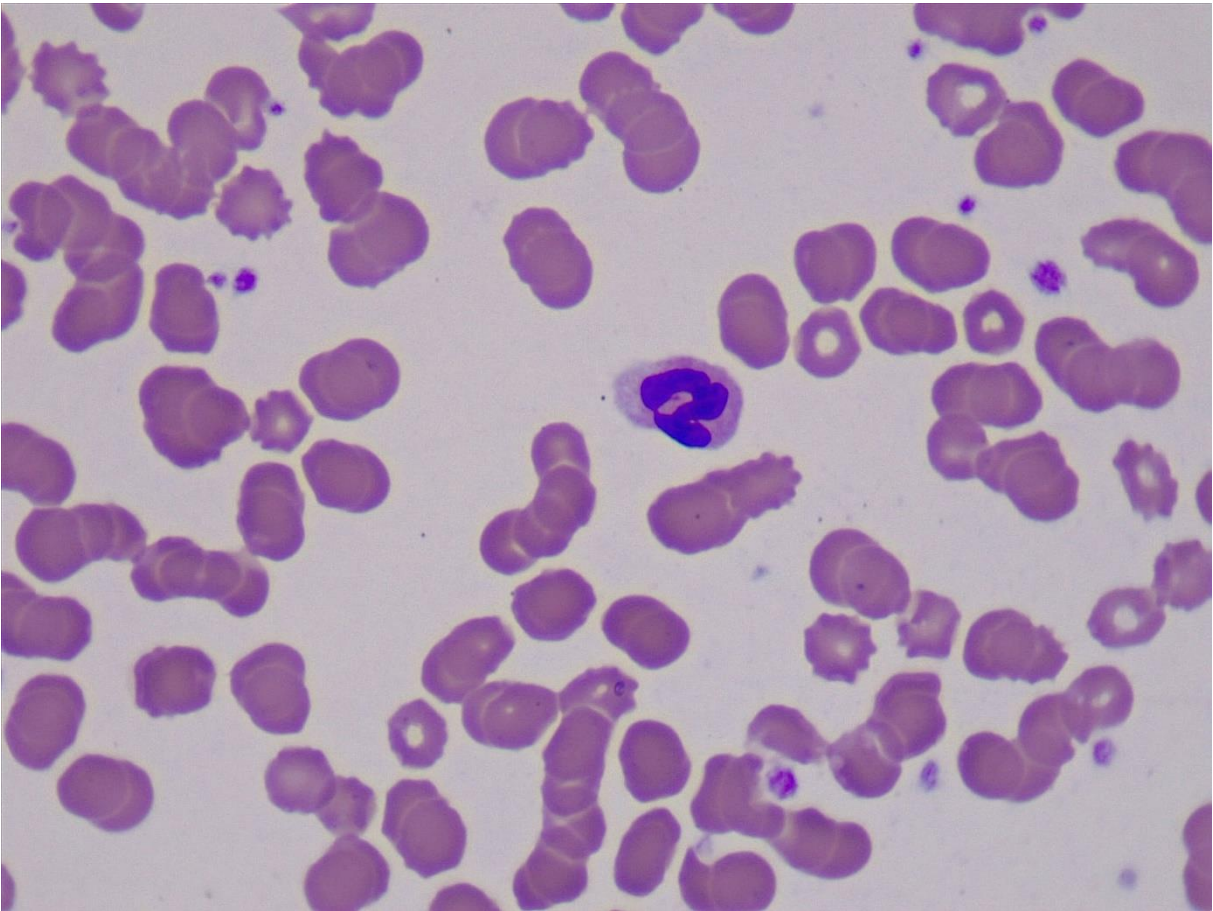
Individuo 1	Imagen 6
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



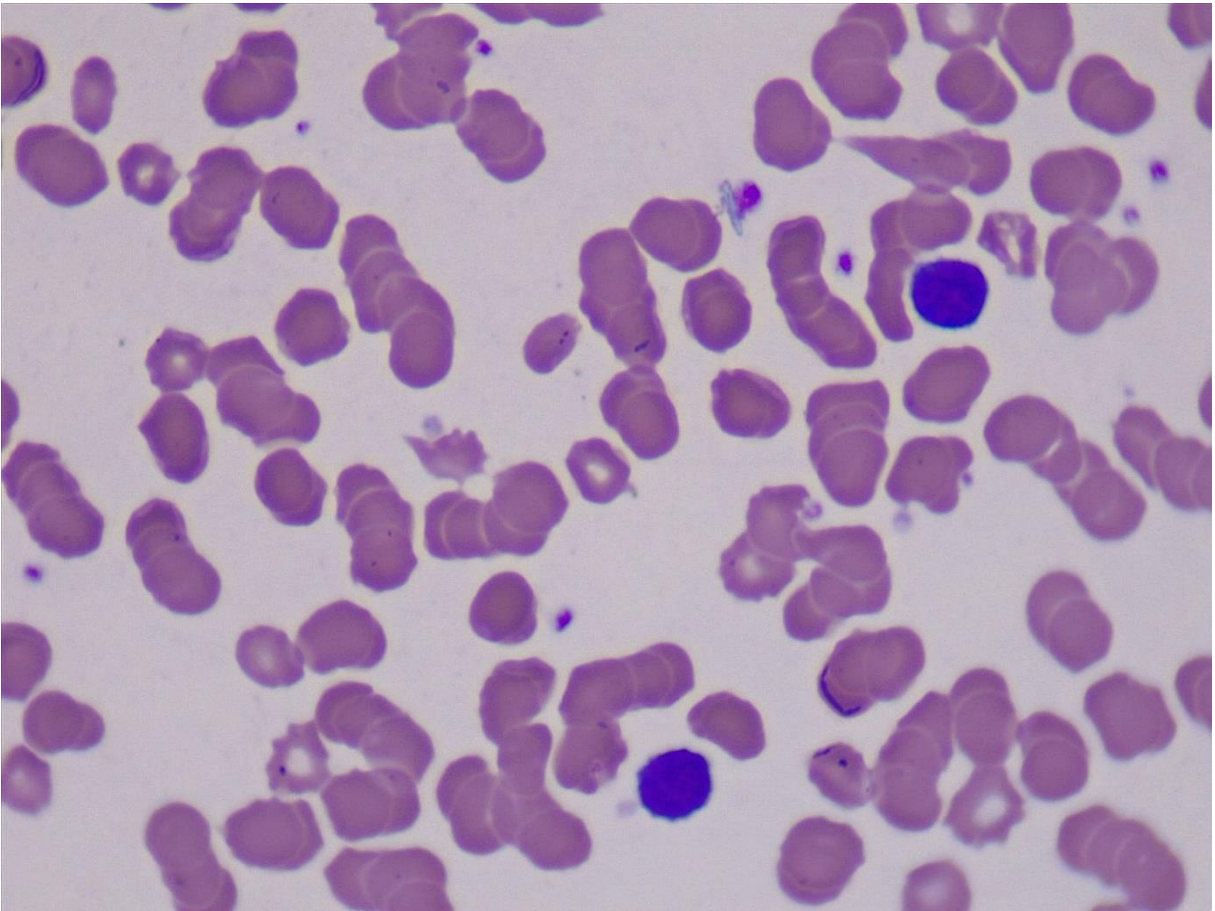
Individuo 1	Imagen 7
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



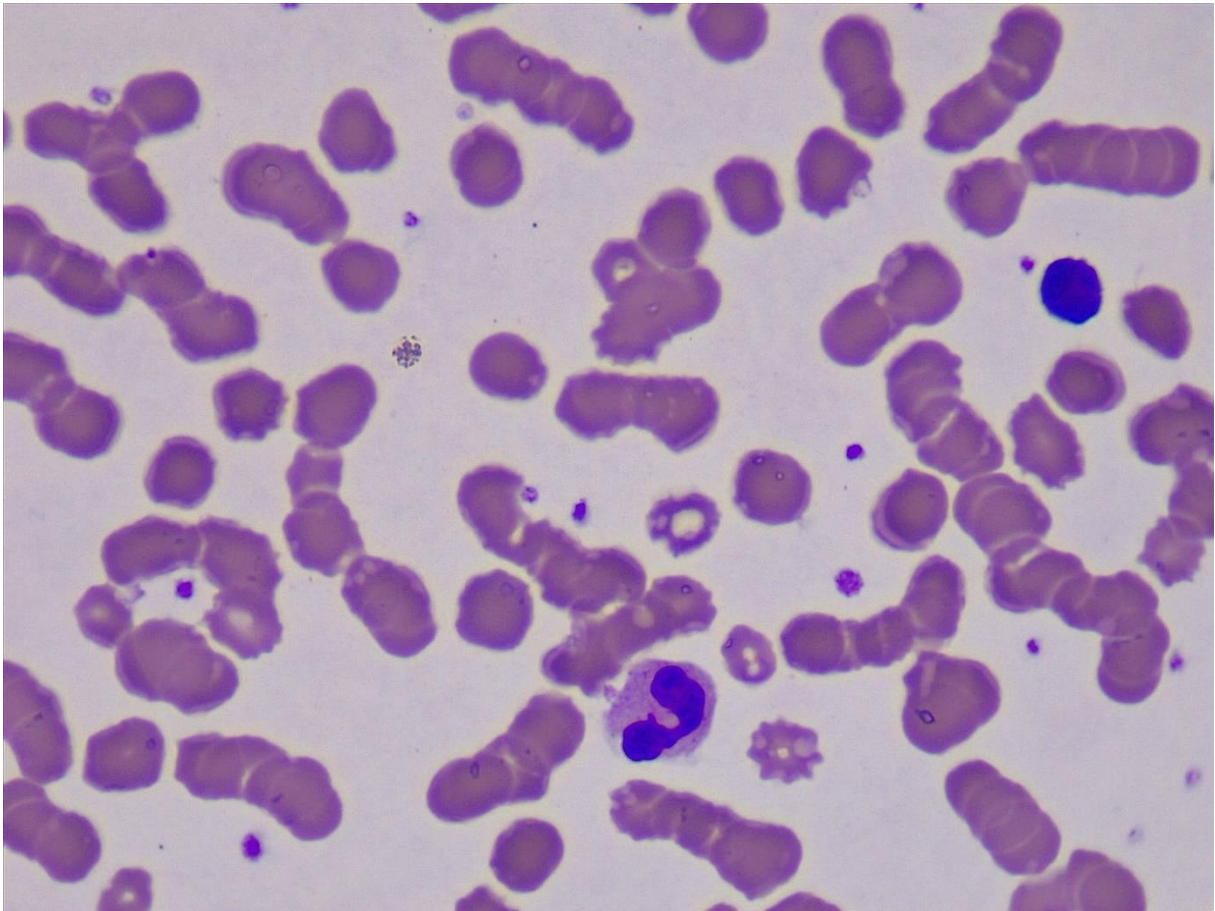
Individuo 1	Imagen 8
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



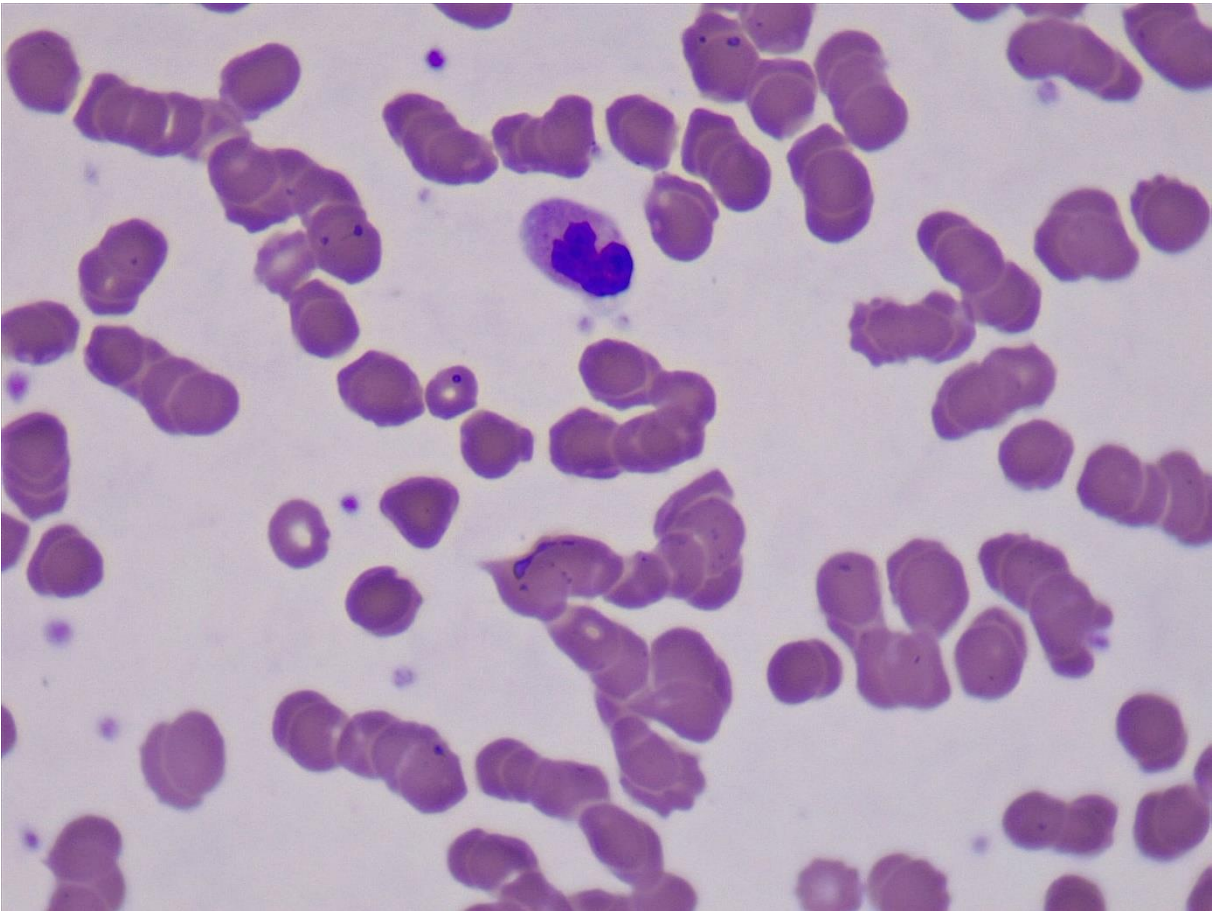
Individuo 1	Imagen 9
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



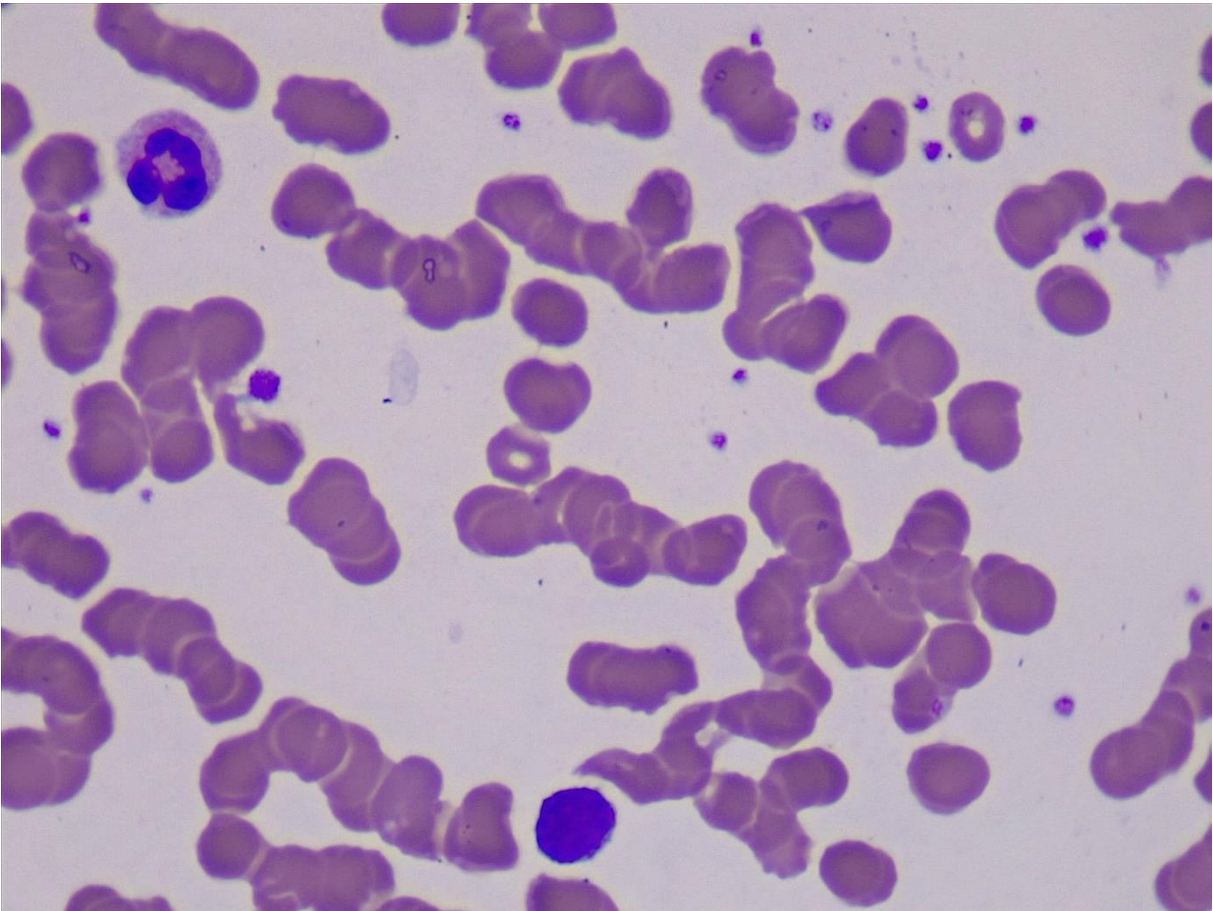
Individuo 1	Imagen 10
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



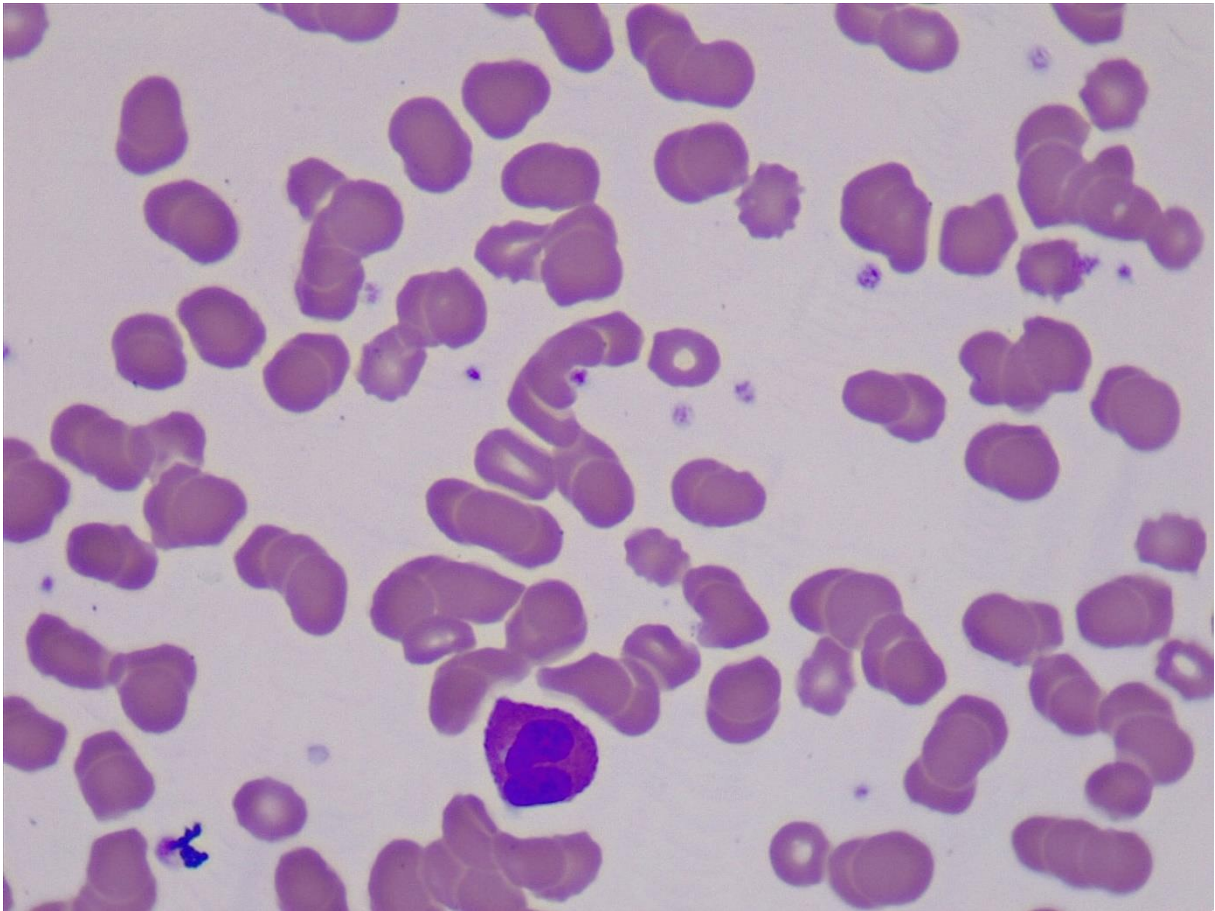
Individuo 1	Imagen 11
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



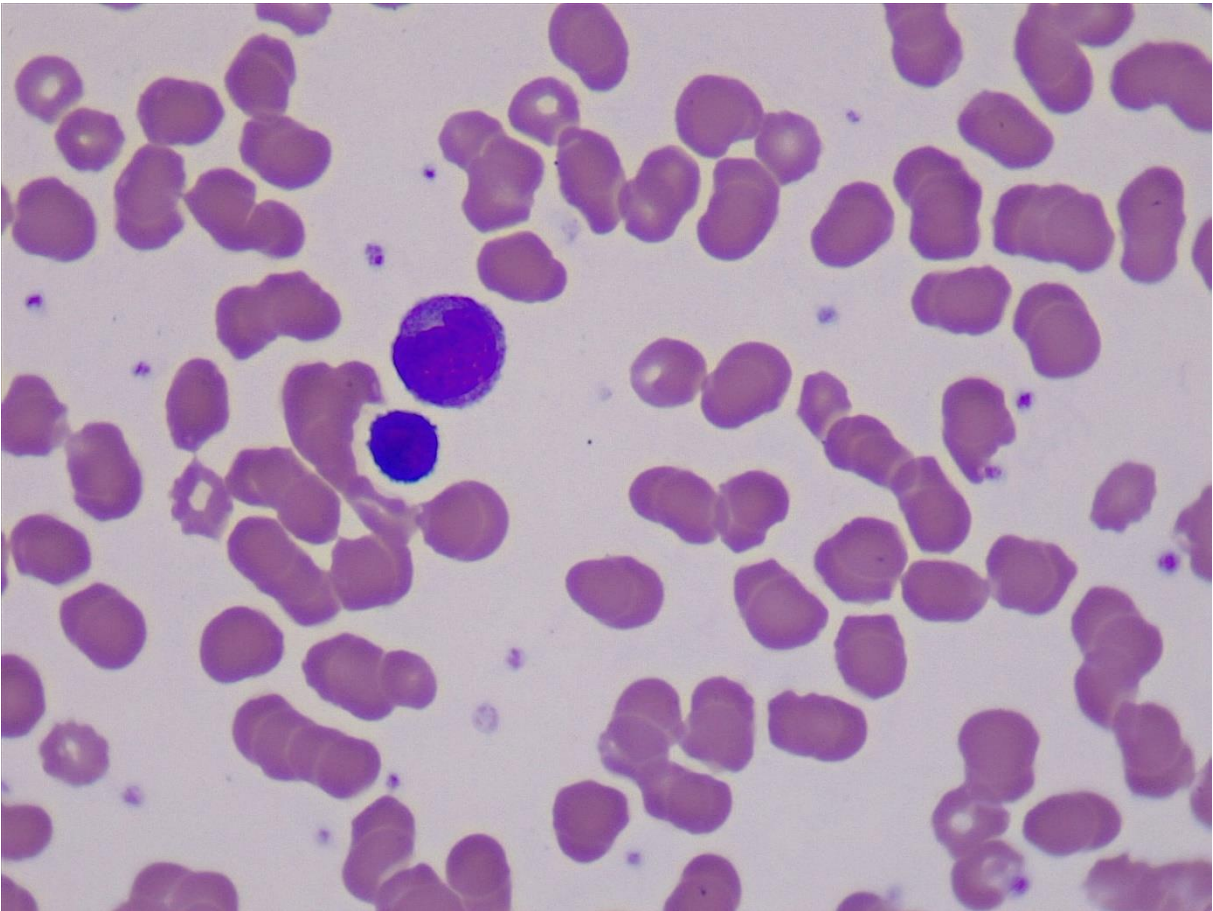
Individuo 1	Imagen 12
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



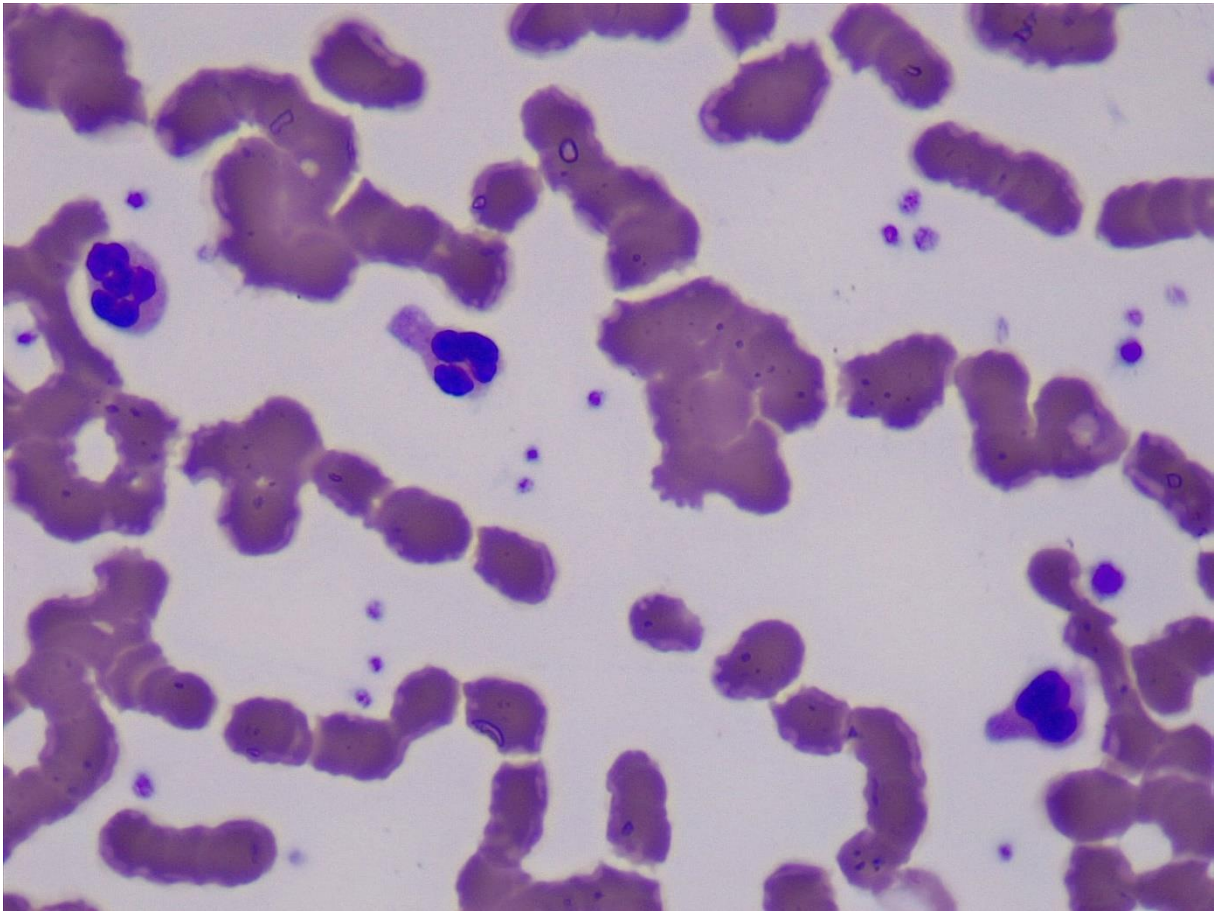
Individuo 1	Imagen 13
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	1



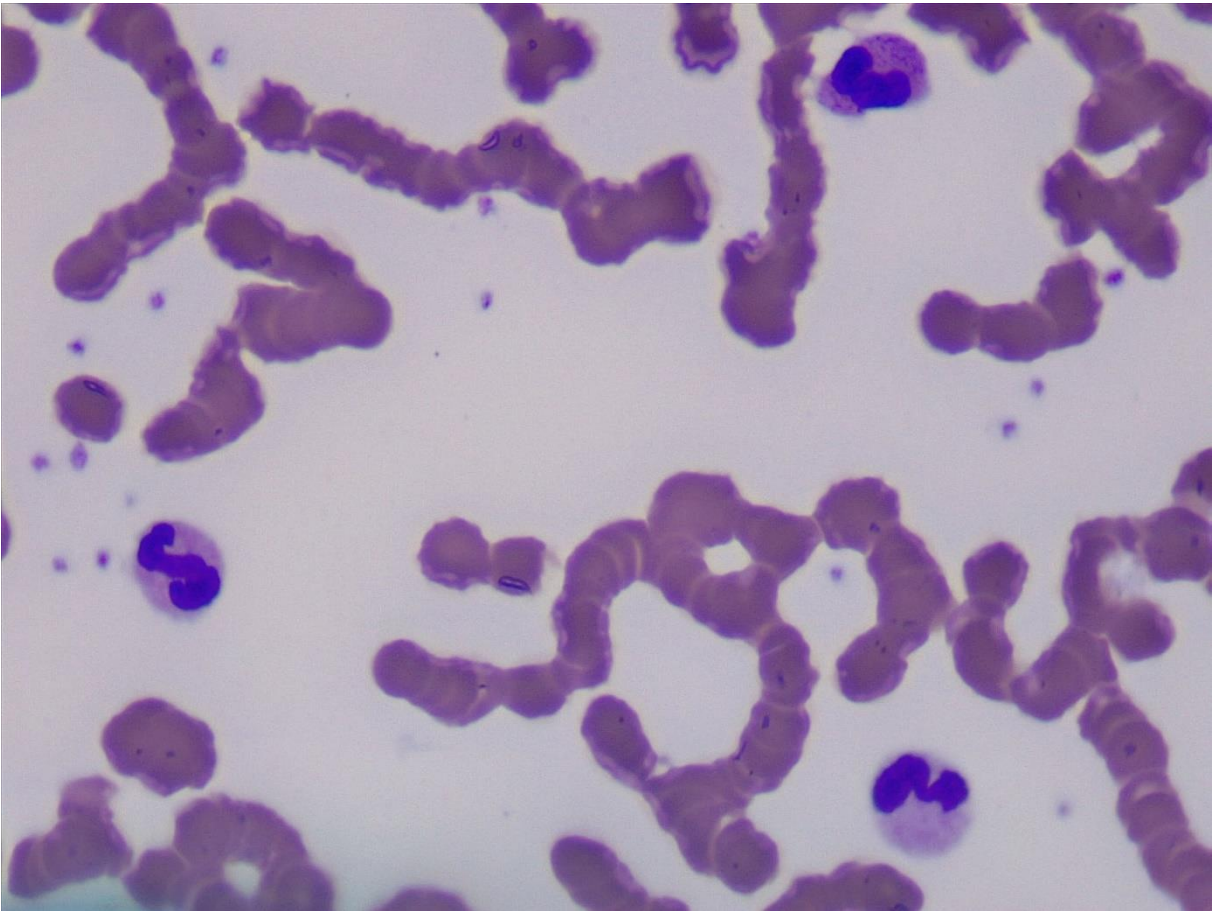
Individuo 1	Imagen 14
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	1
Monocito	0
Eosinófilo	0



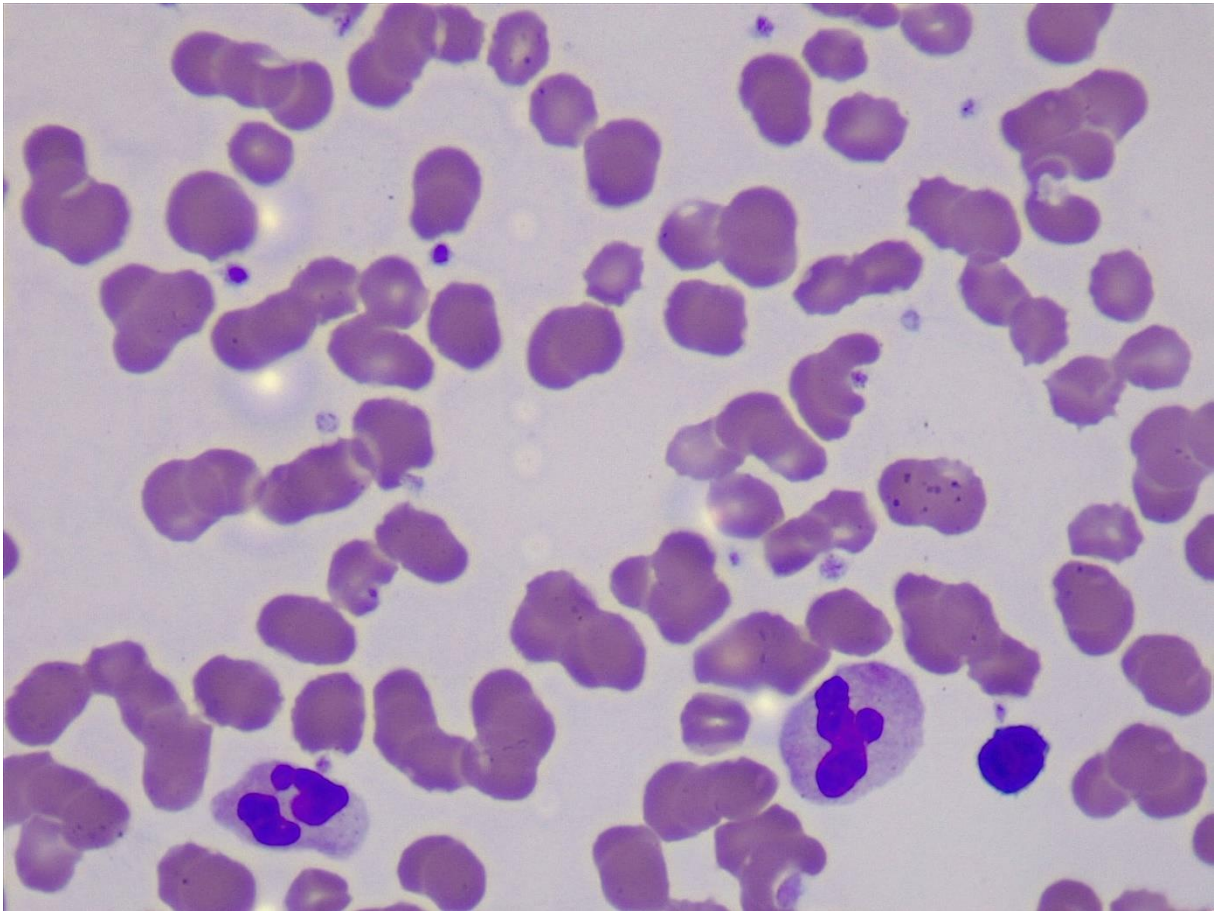
Individuo 1	Imagen 15
Célula	Cantidad
Neutrófilo	3
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



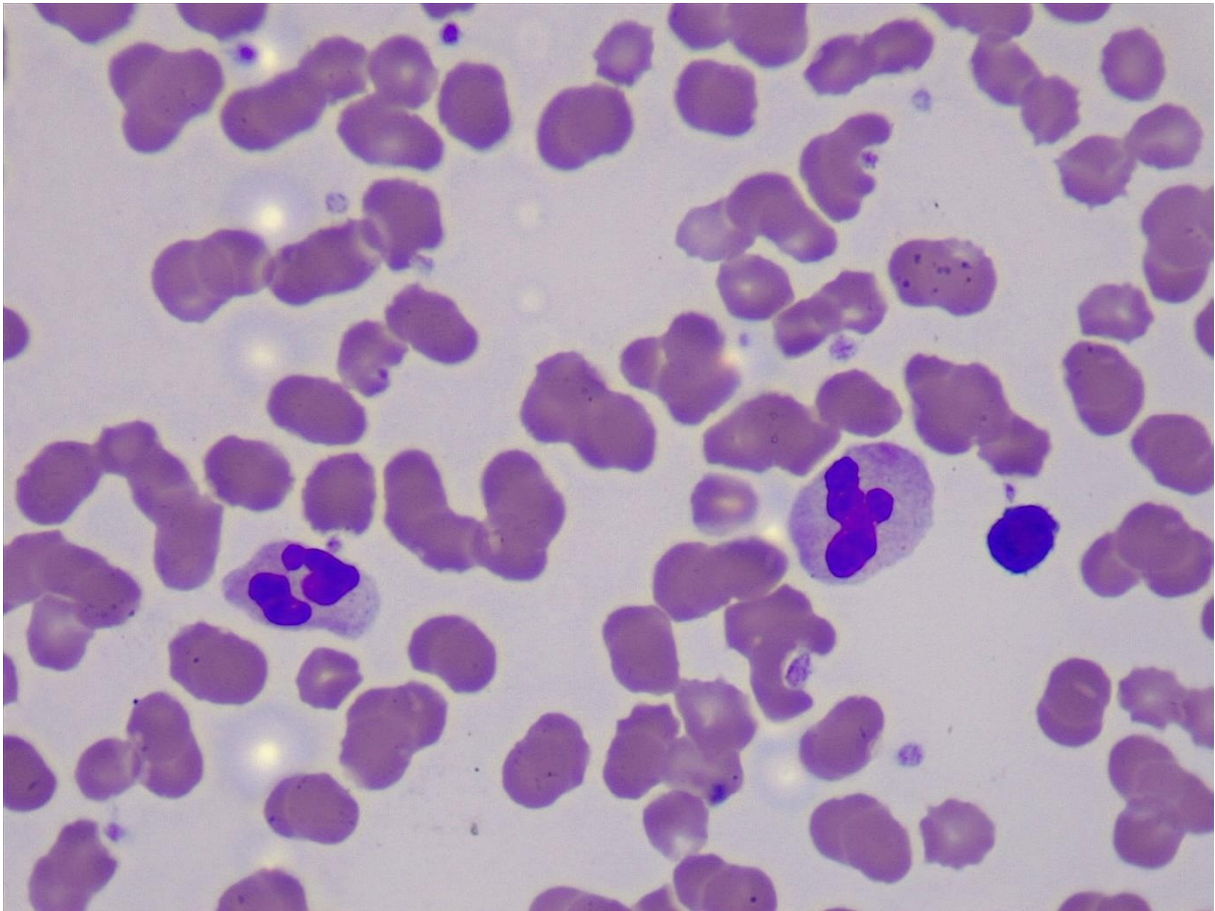
Individuo 1	Imagen 16
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	1



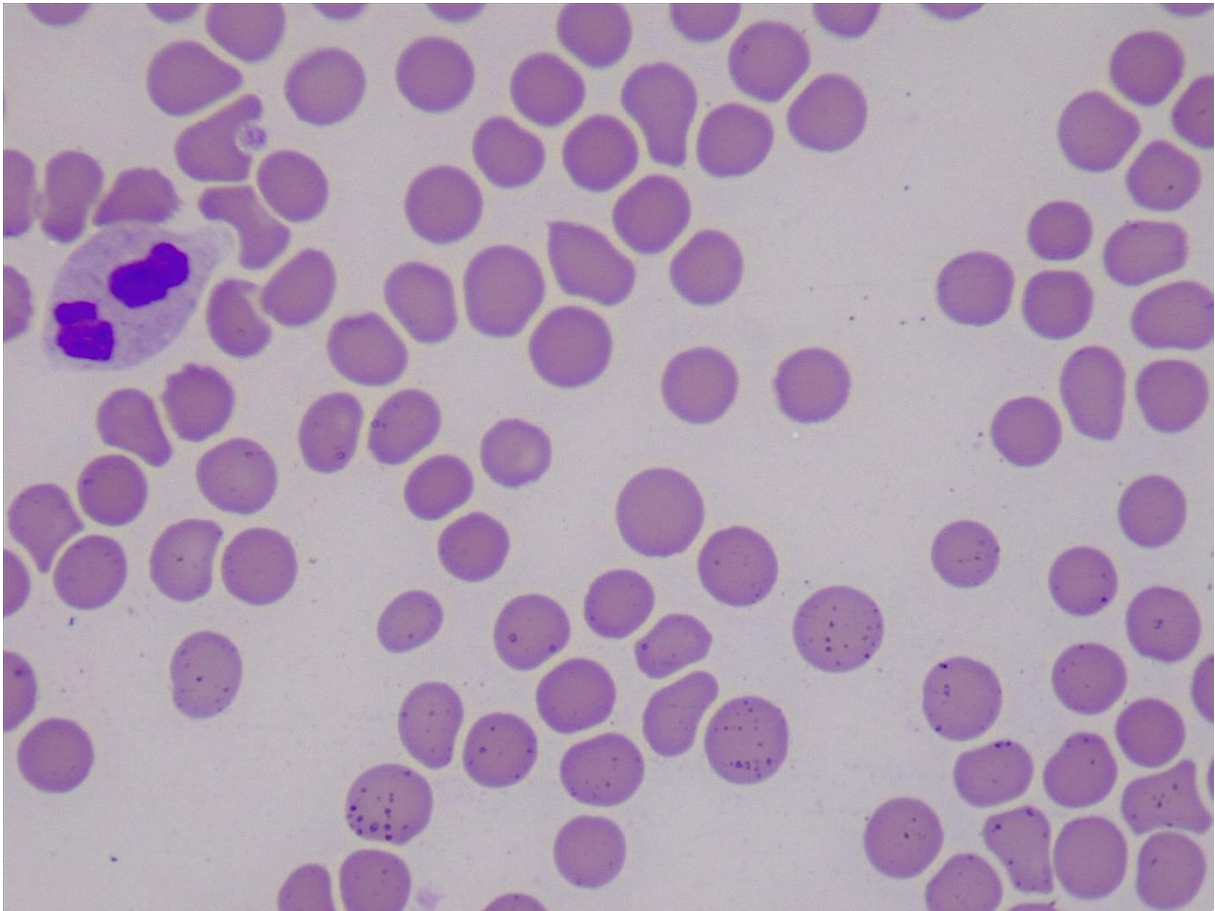
Individuo 1	Imagen 17
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



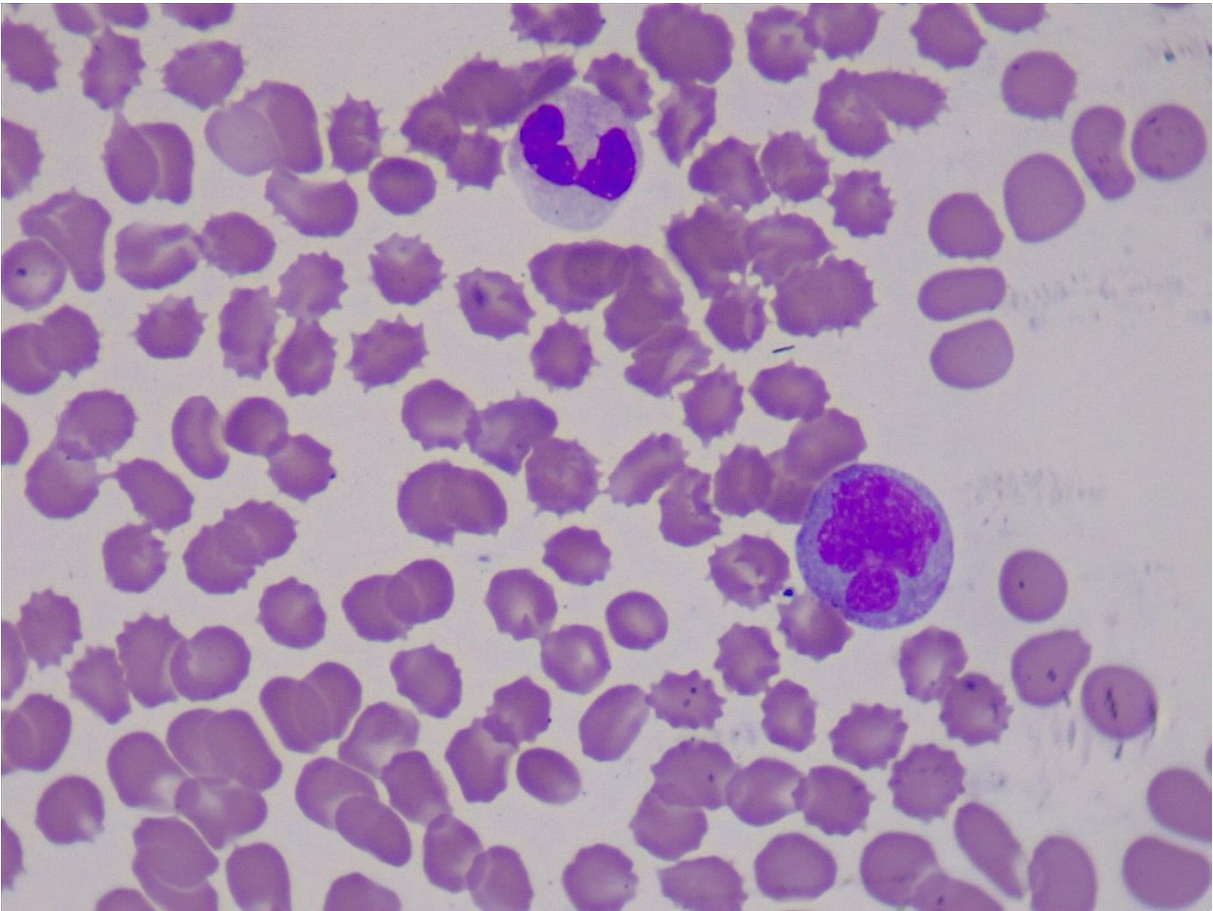
Individuo 1	Imagen 18
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



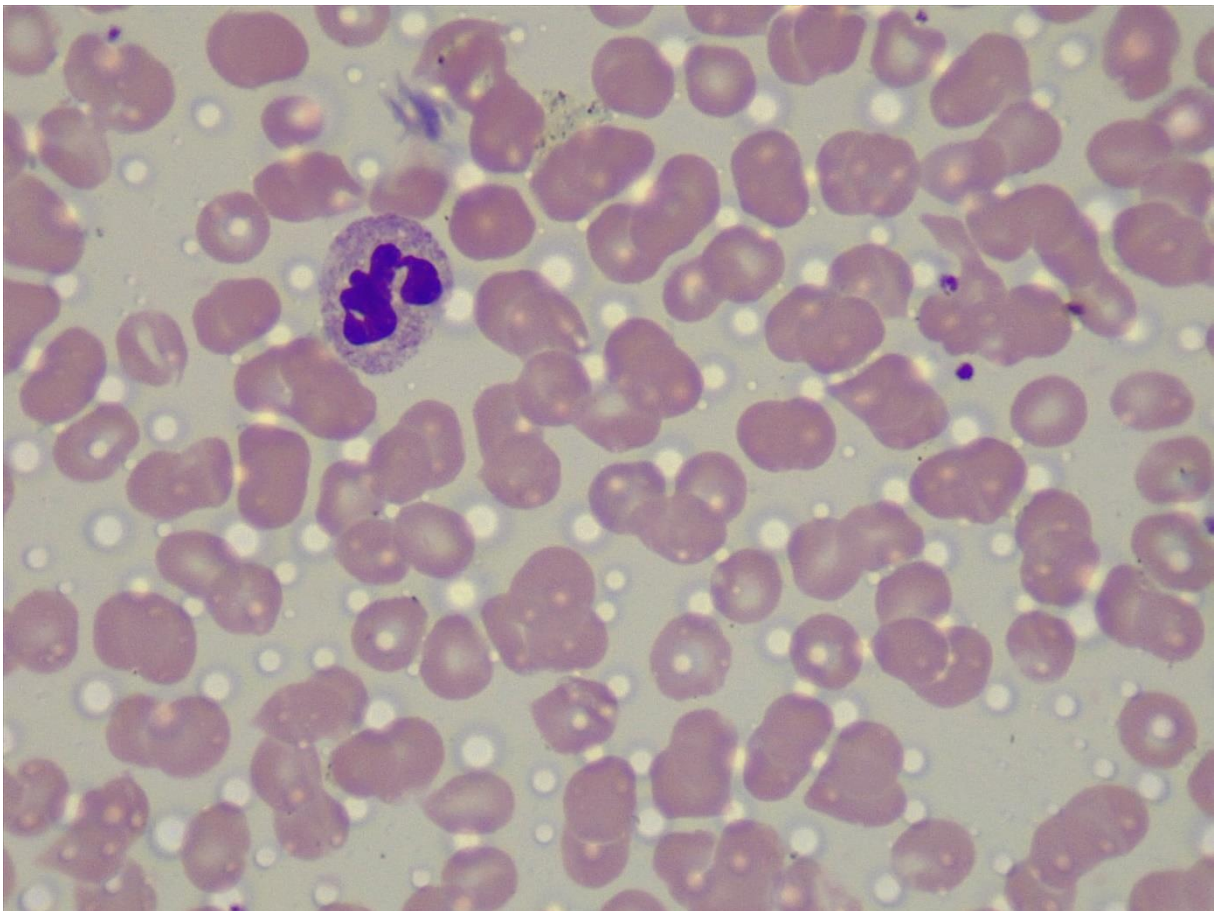
Individuo 1	Imagen 19
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



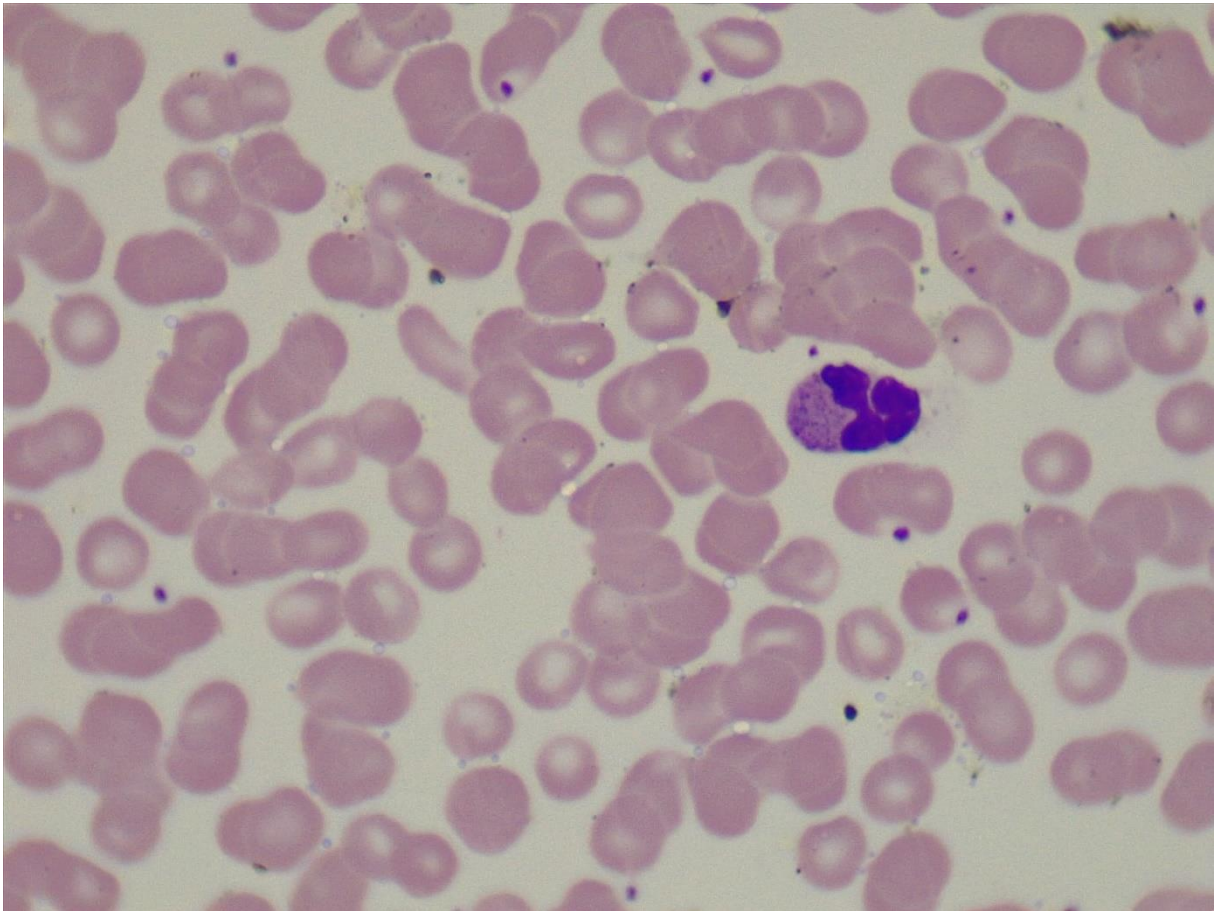
Individuo 1	Imagen 20
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	1
Eosinófilo	0



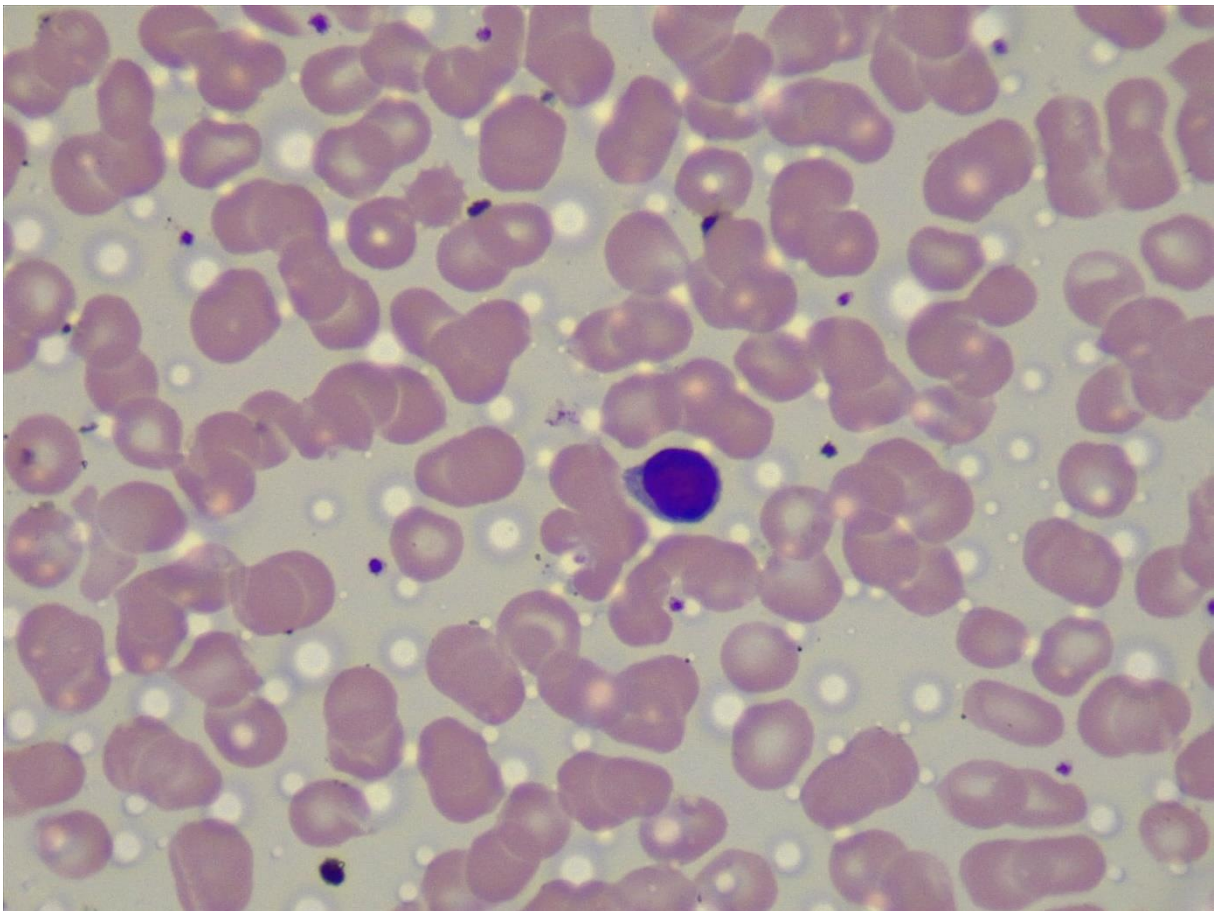
Individuo 2	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



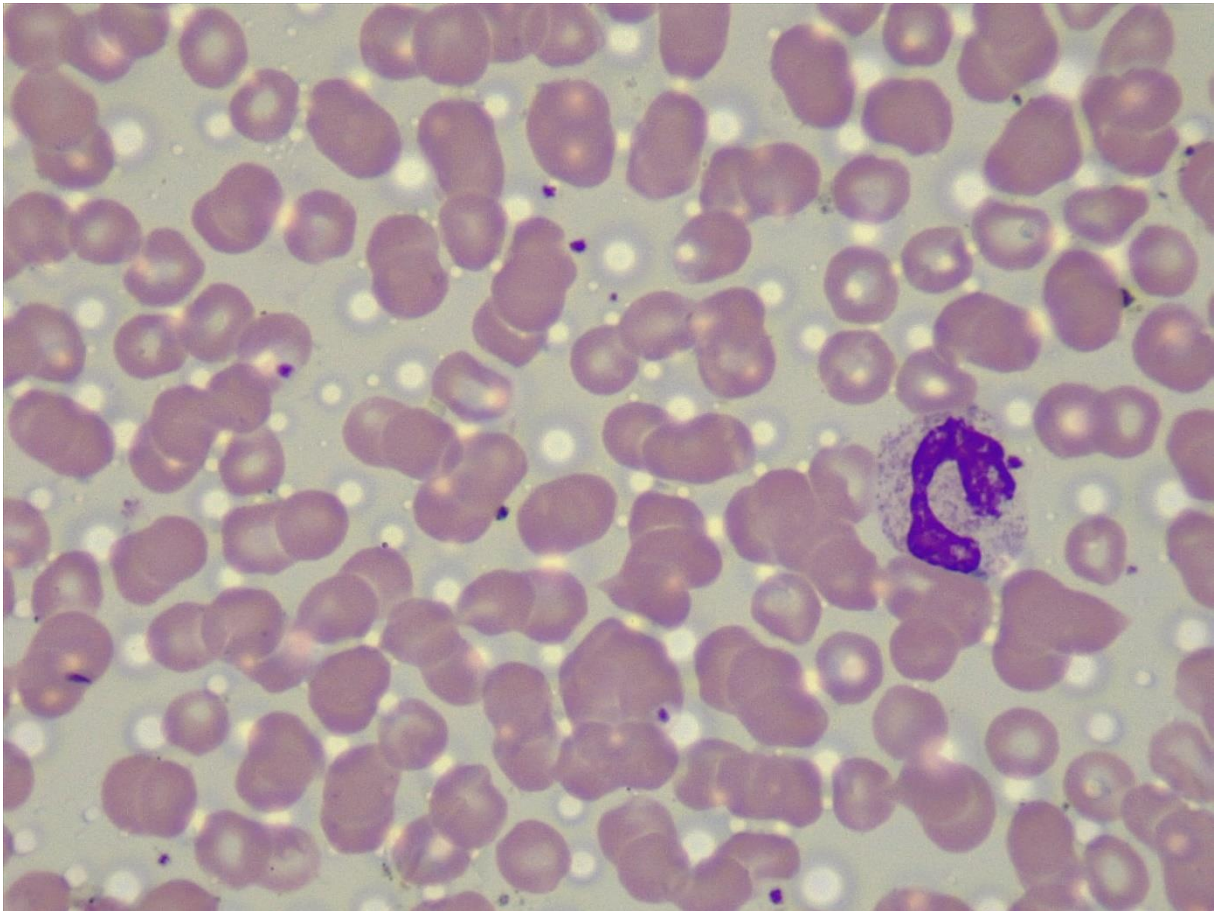
Individuo 2	Imagen 2
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



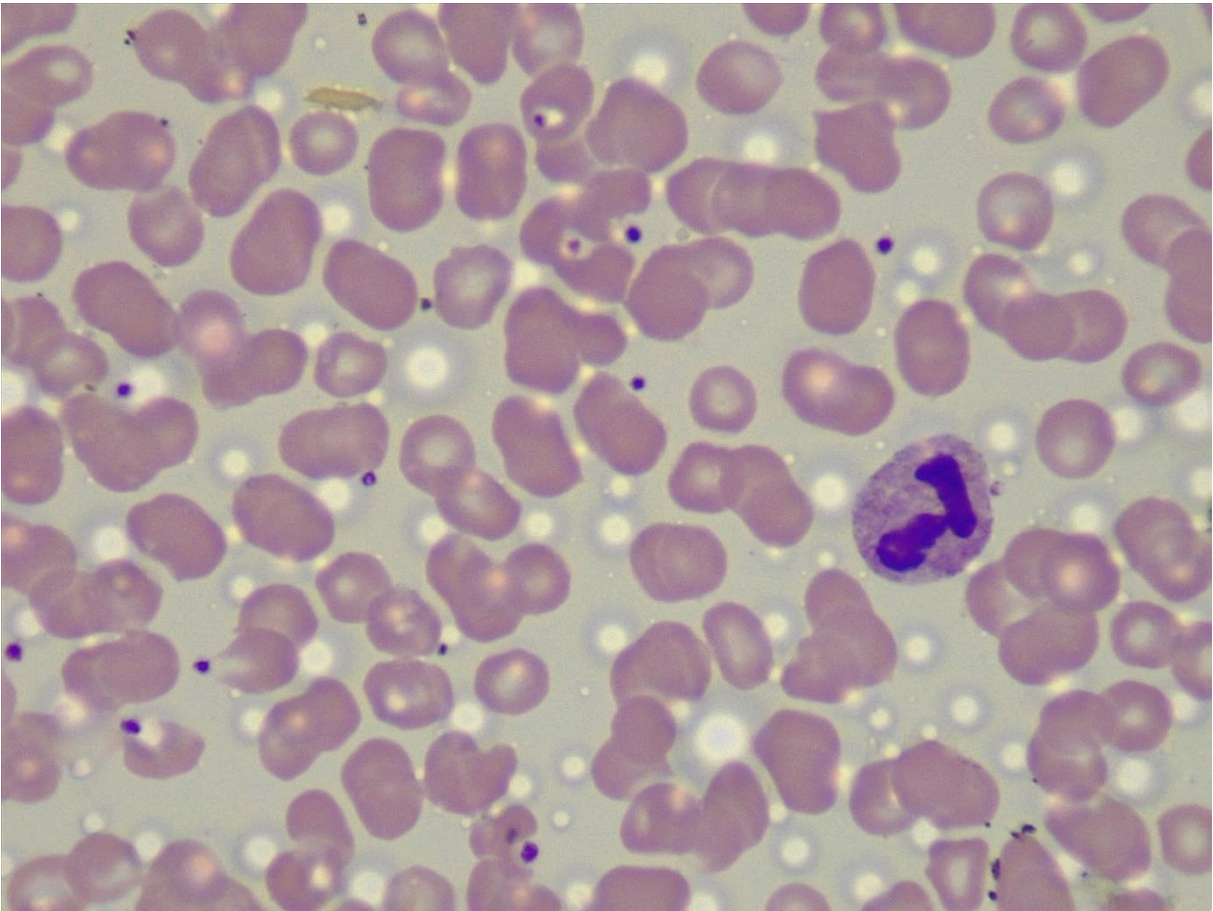
Individuo 2	Imagen 3
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



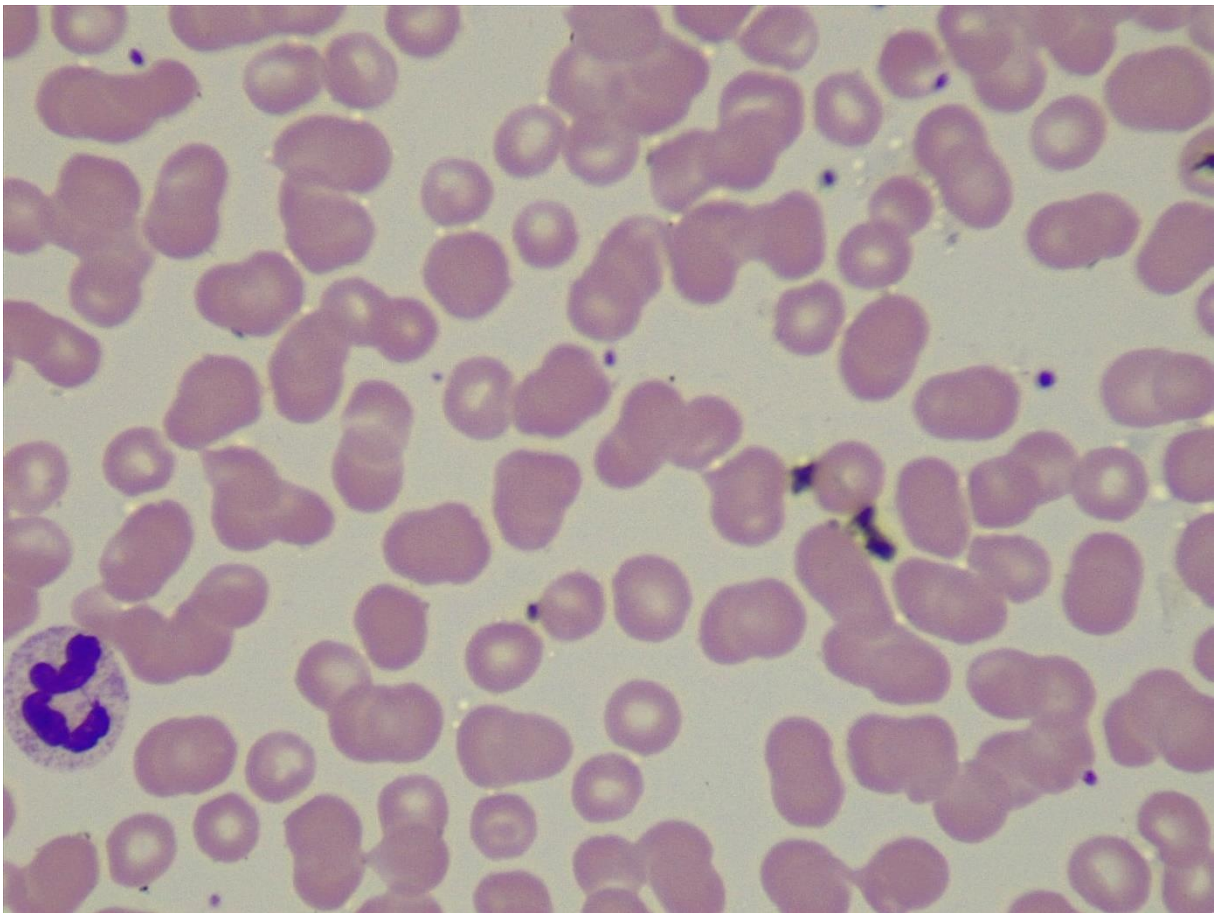
Individuo 2	Imagen 4
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



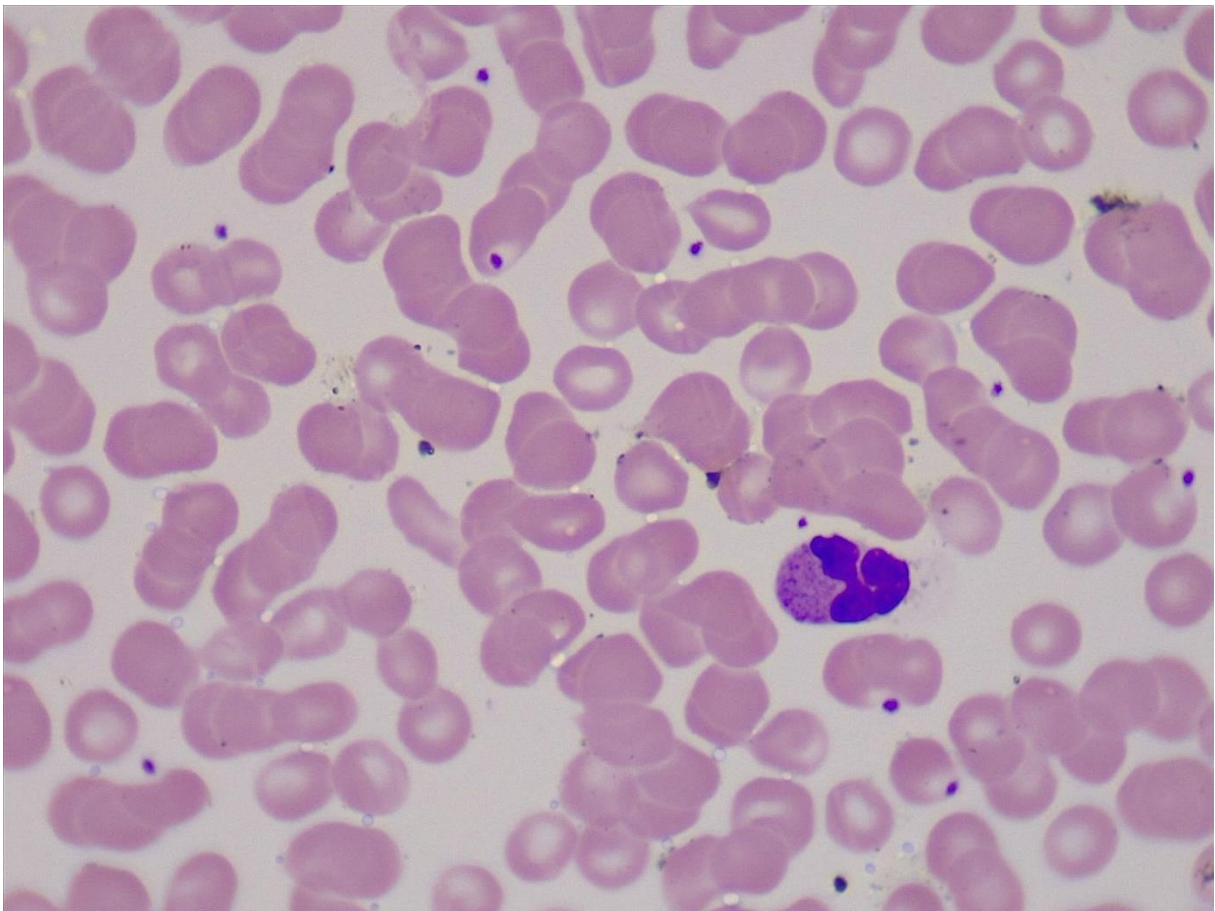
Individuo 2	Imagen 5
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



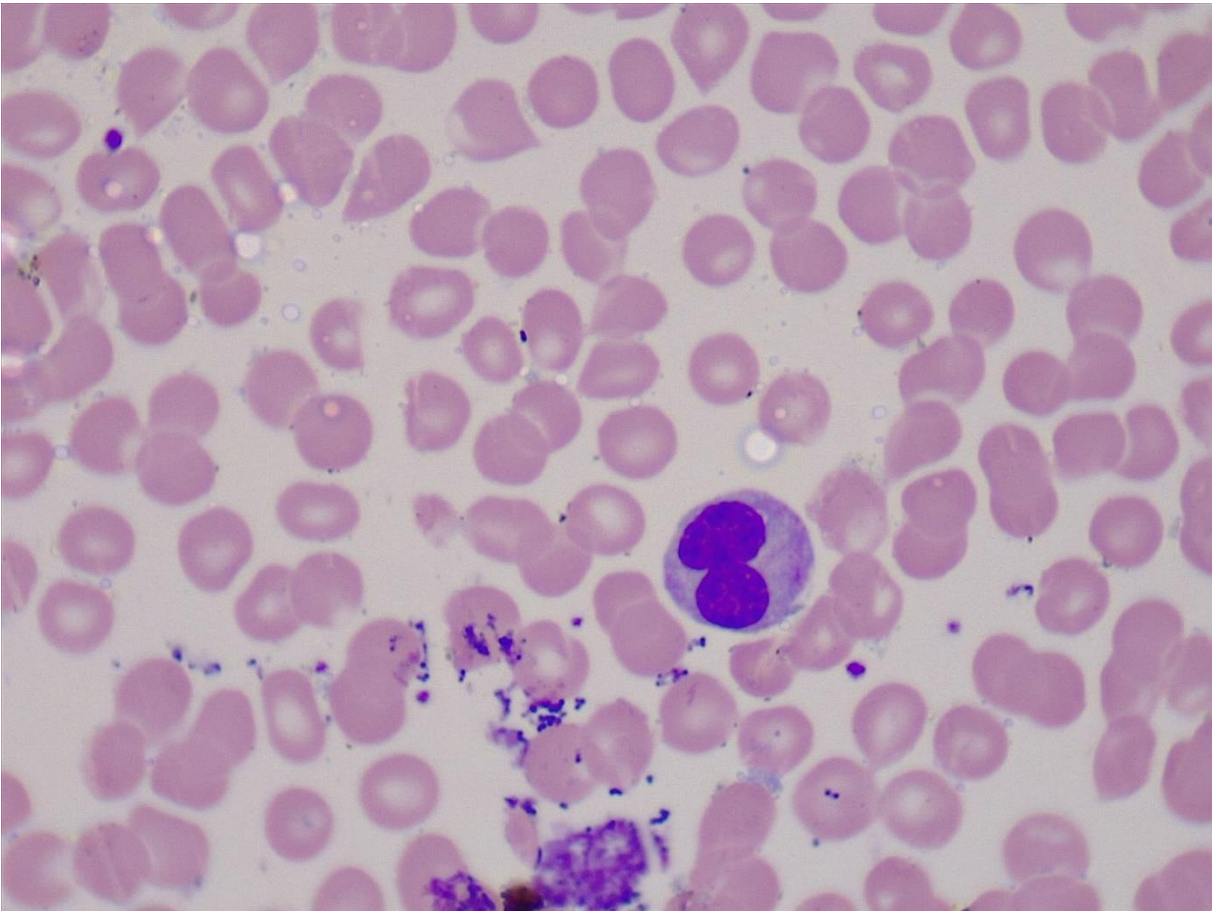
Individuo 2	Imagen 6
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



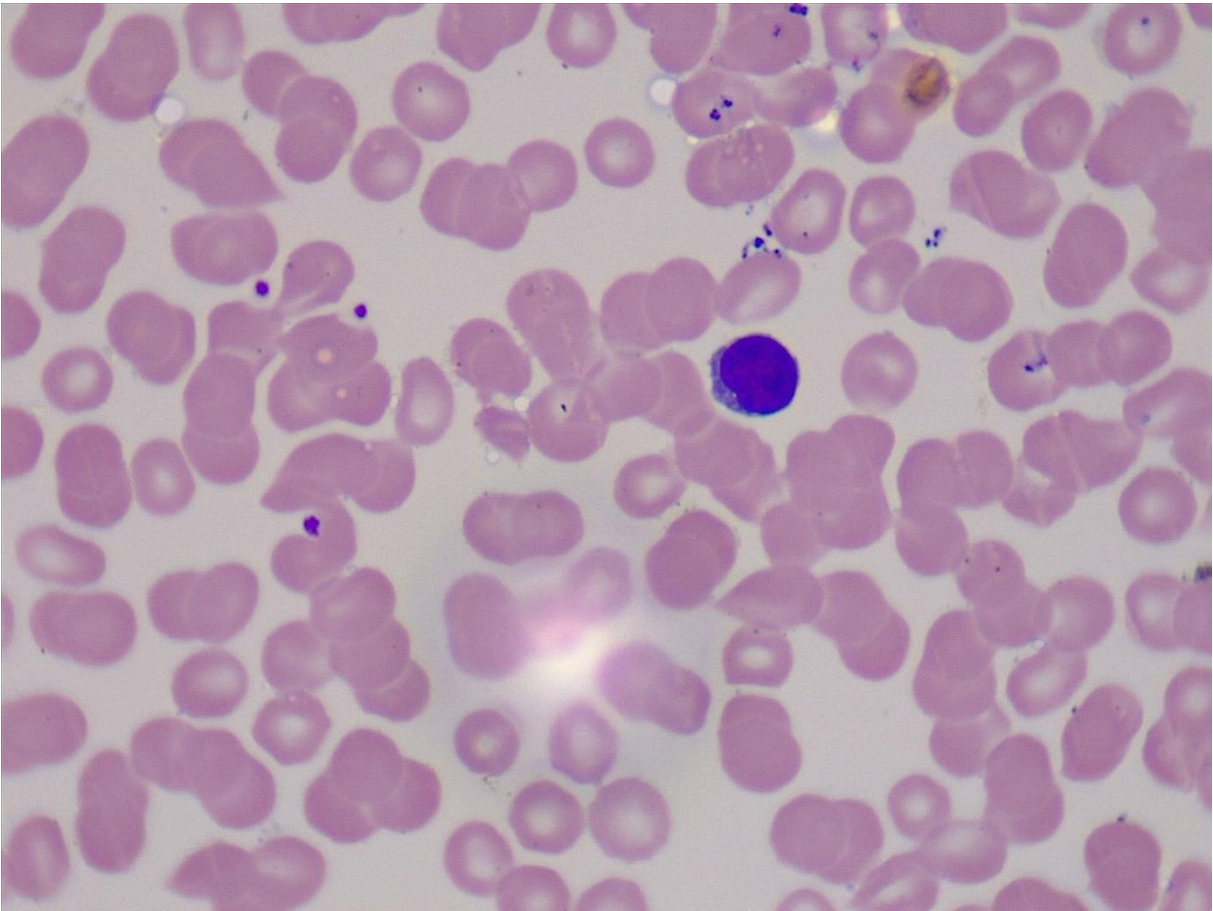
Individuo 2	Imagen 7
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



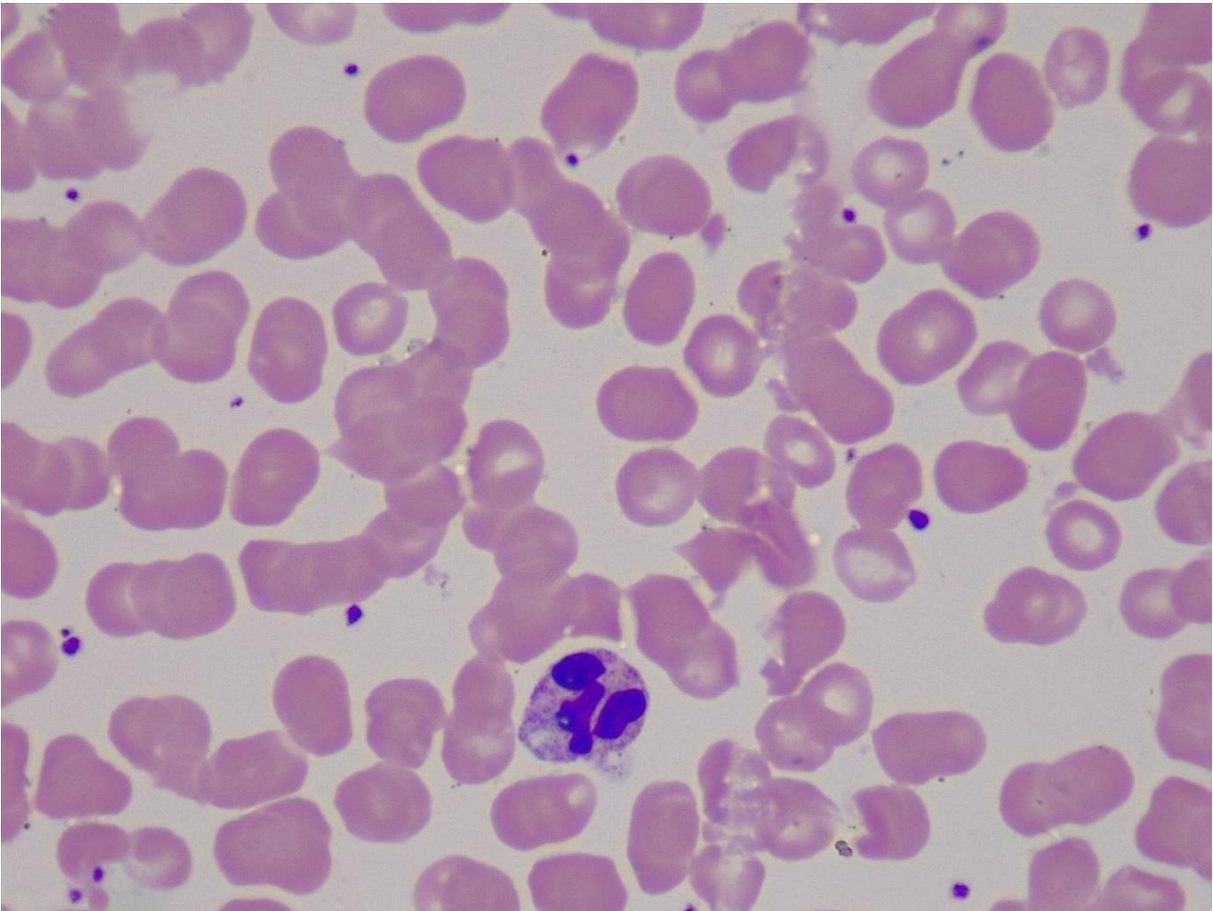
Individuo 2	Imagen 8
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



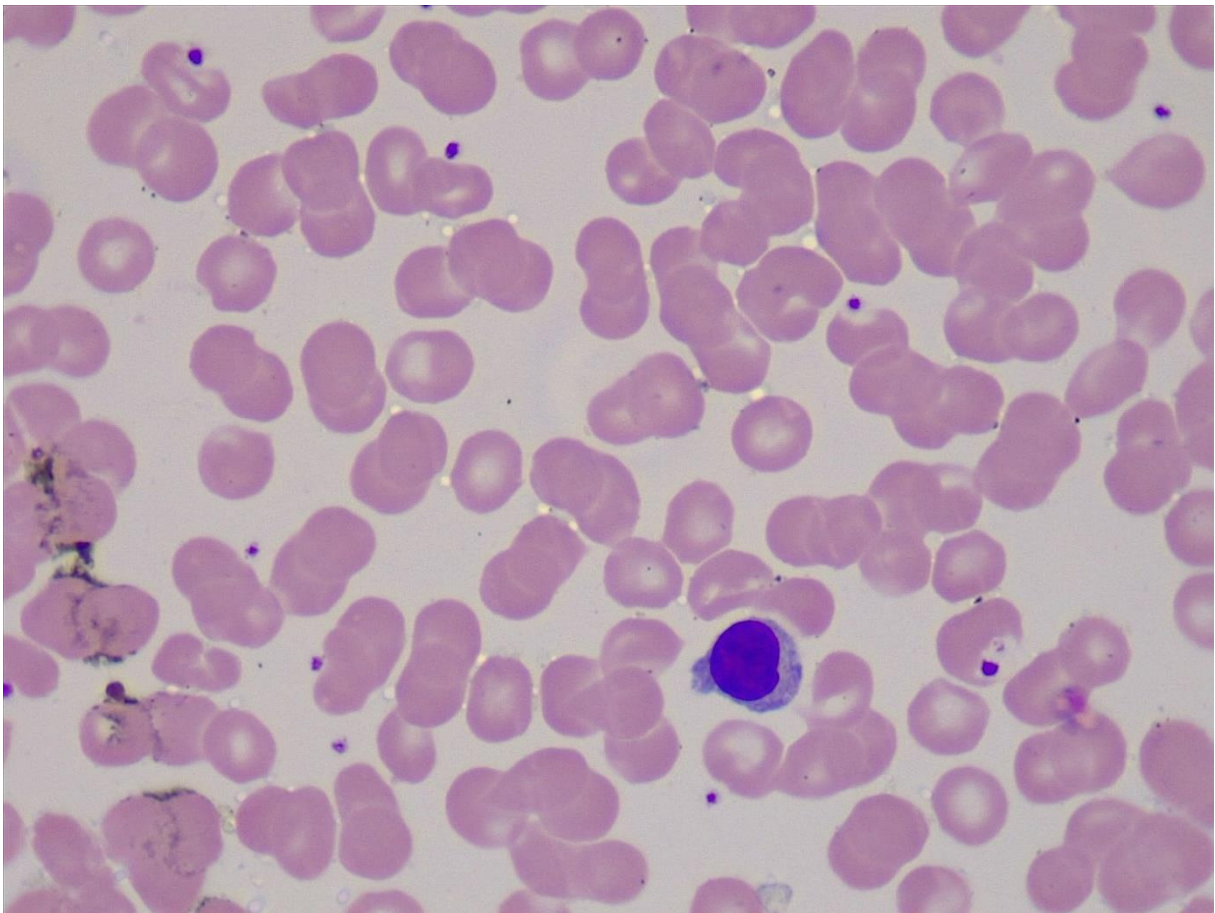
Individuo 2	Imagen 9
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



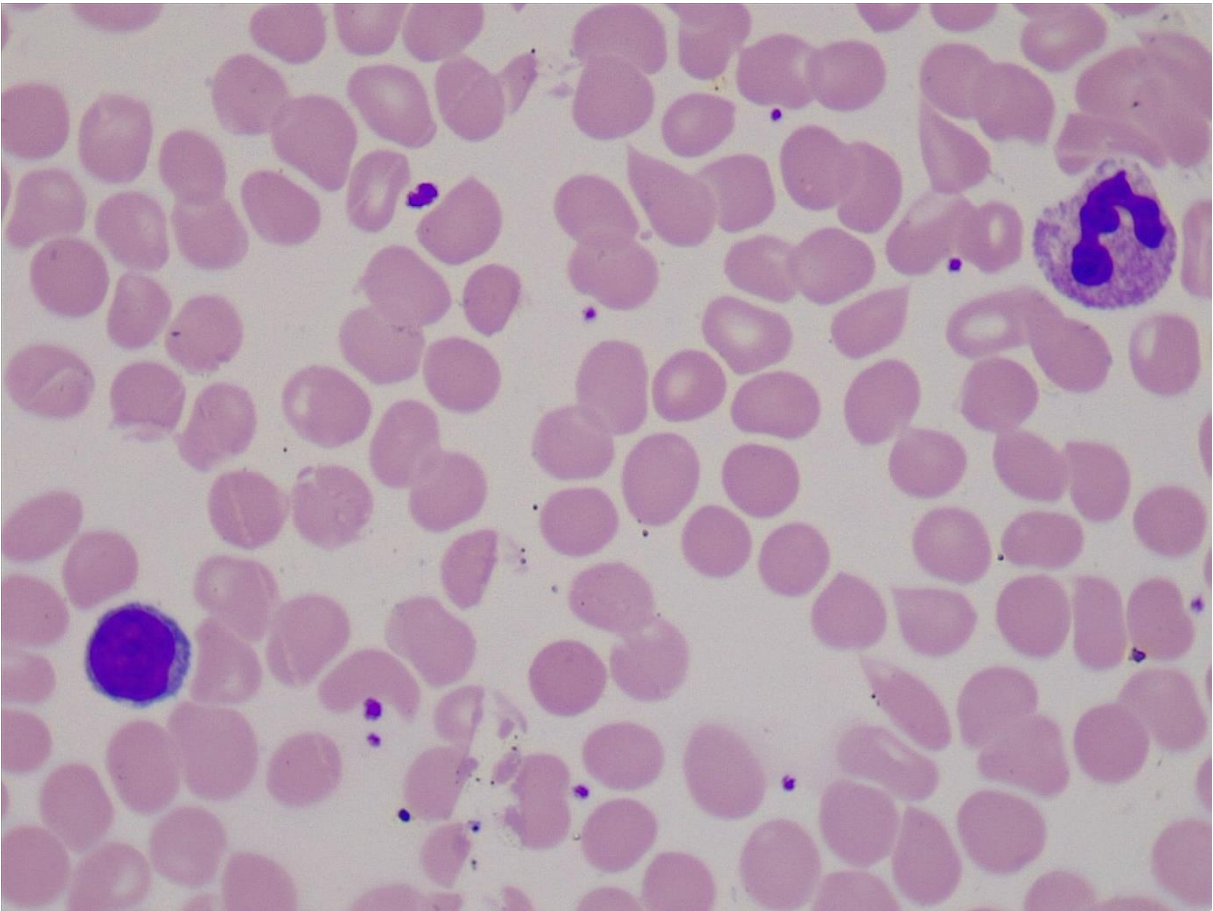
Individuo 2	Imagen 10
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



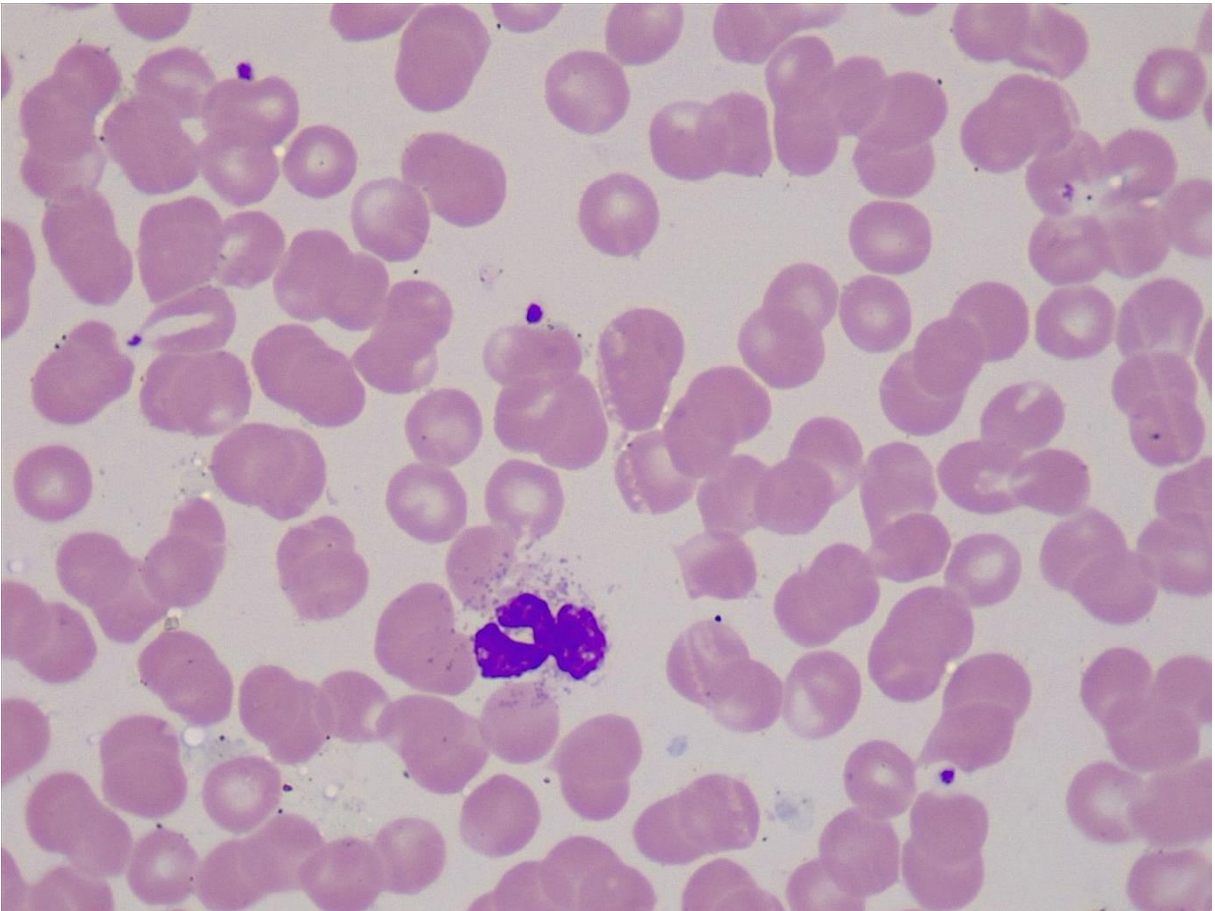
Individuo 2	Imagen 11
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



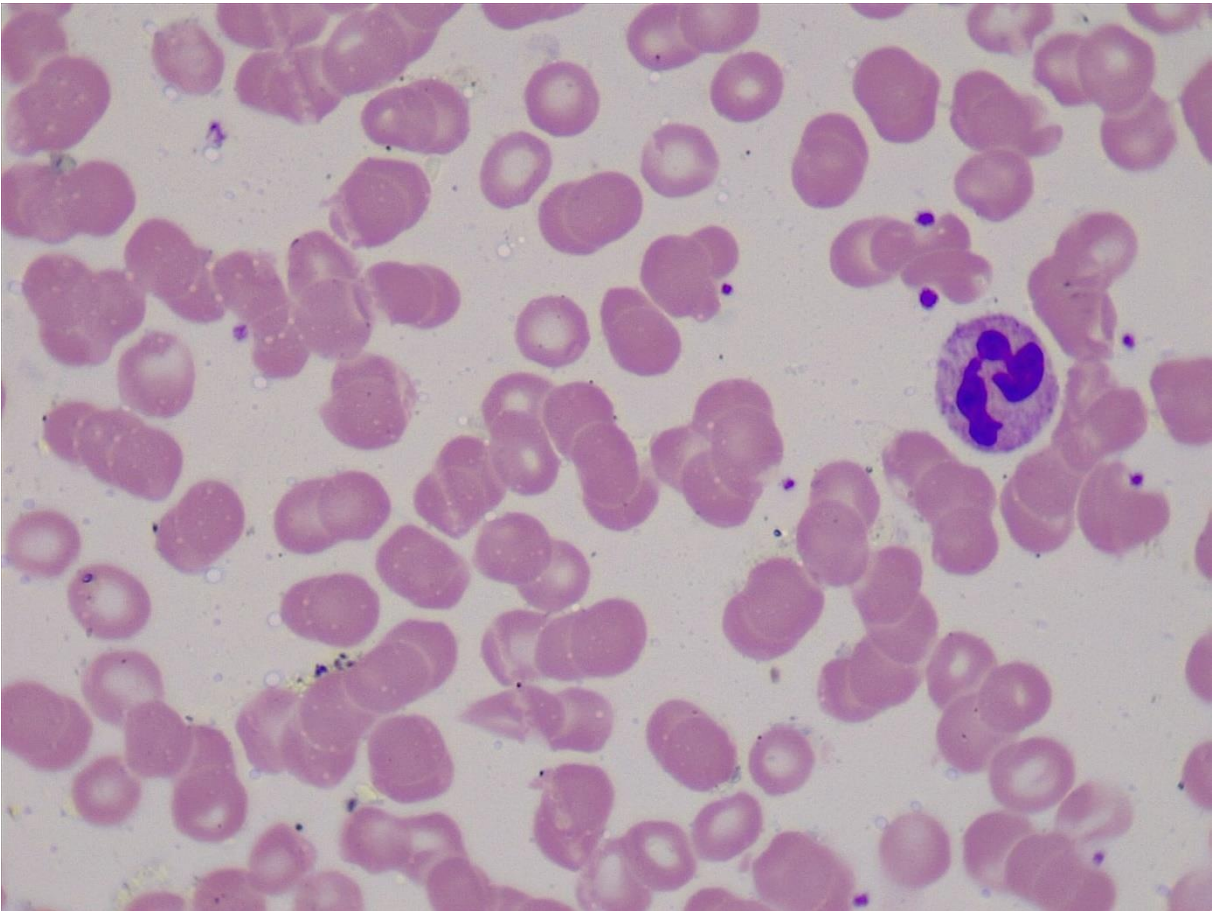
Individuo 2	Imagen 12
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



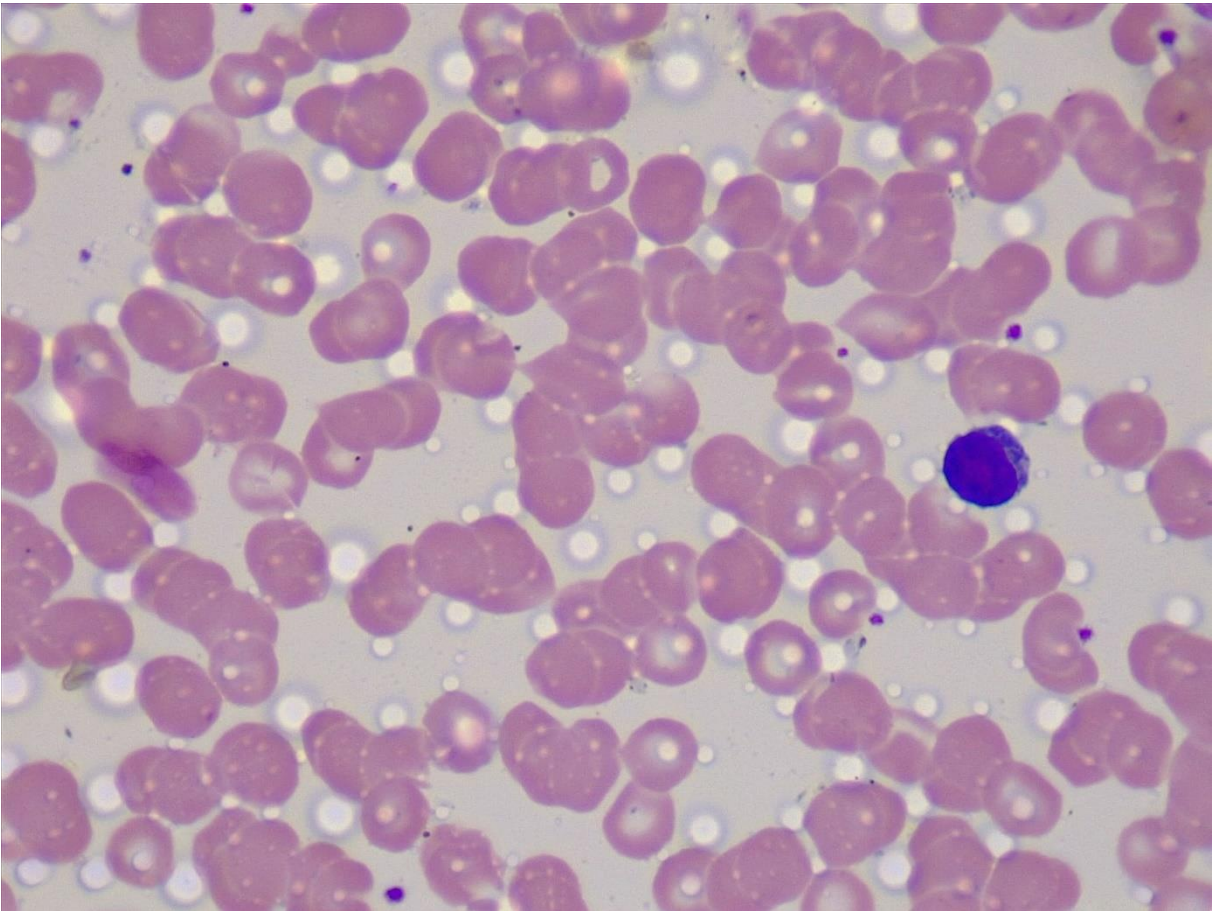
Individuo 2	Imagen 13
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



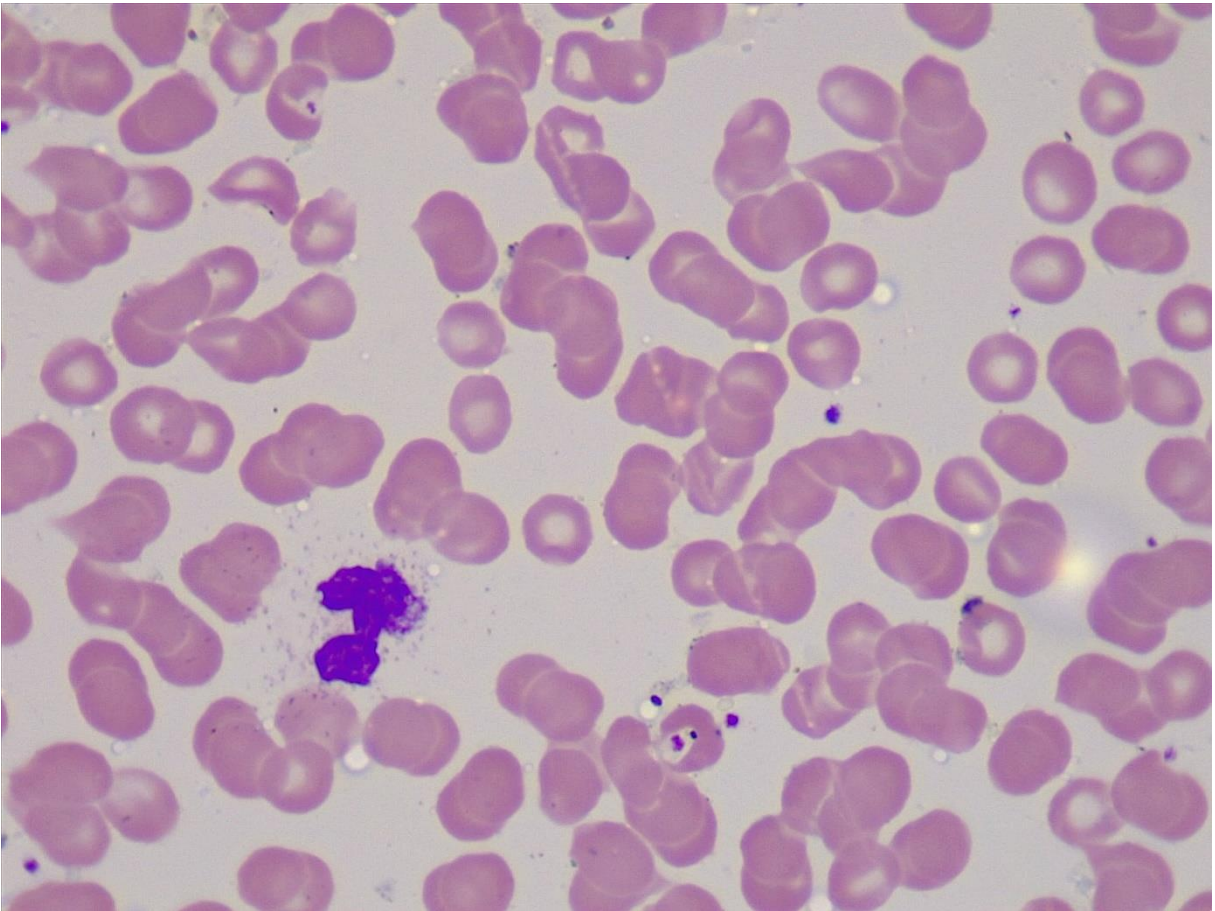
Individuo 2	Imagen 14
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



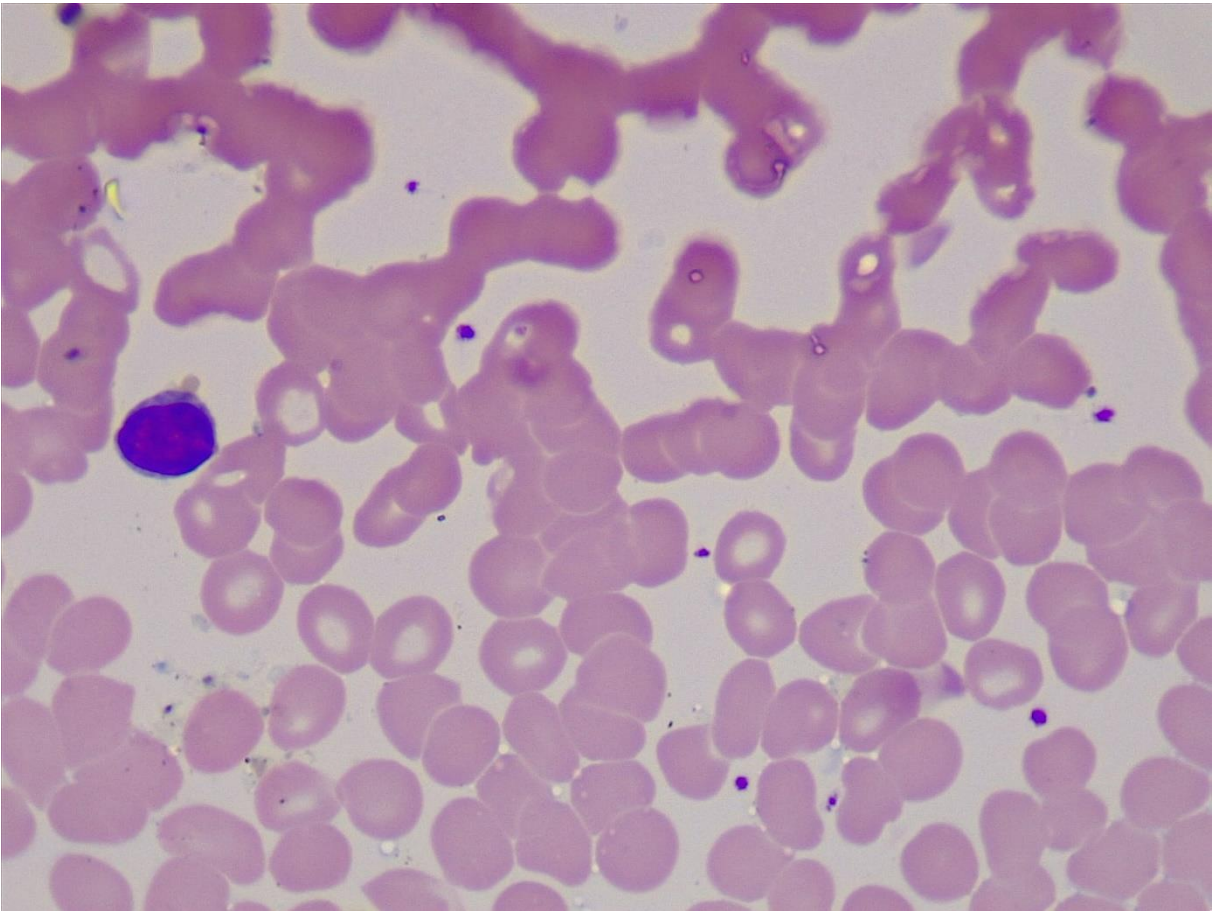
Individuo 2	Imagen 15
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



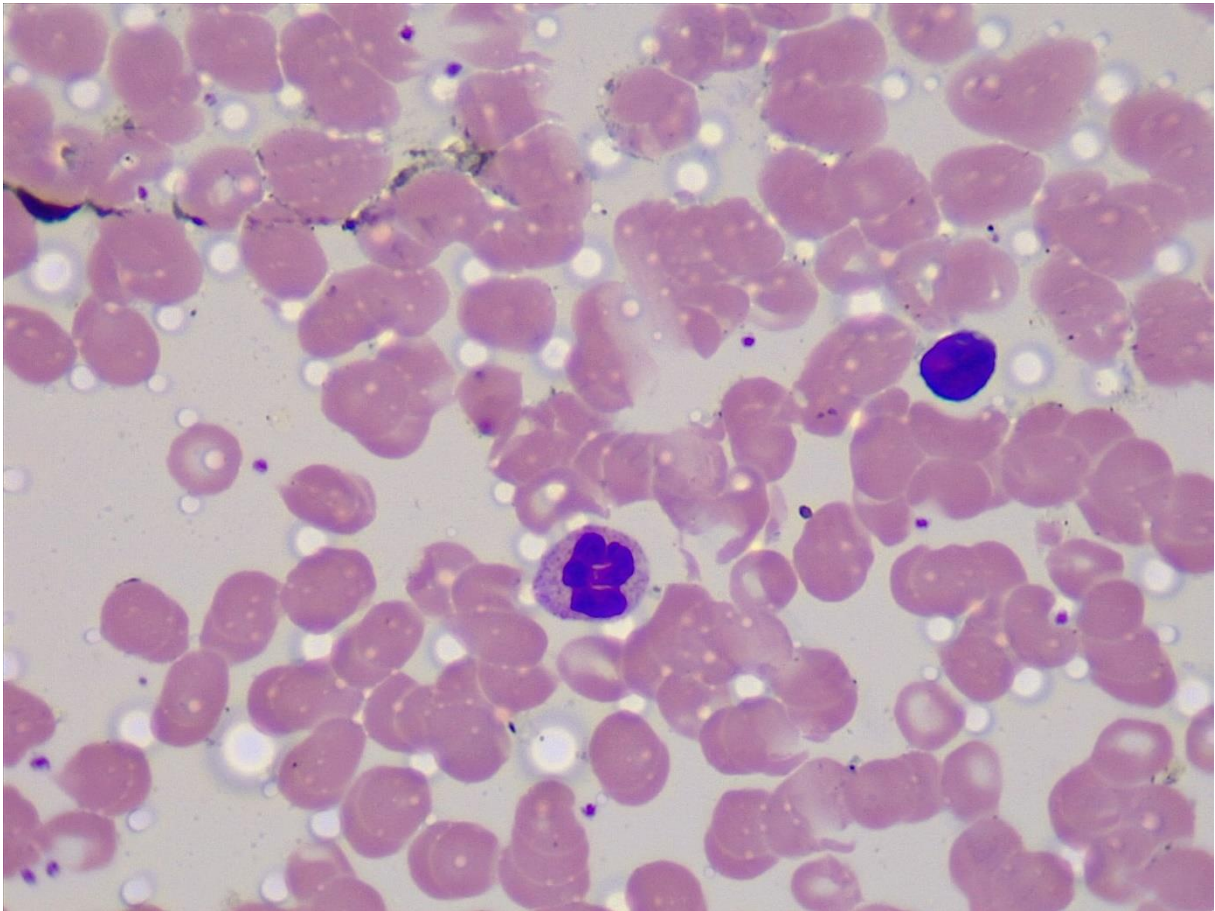
Individuo 2	Imagen 16
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



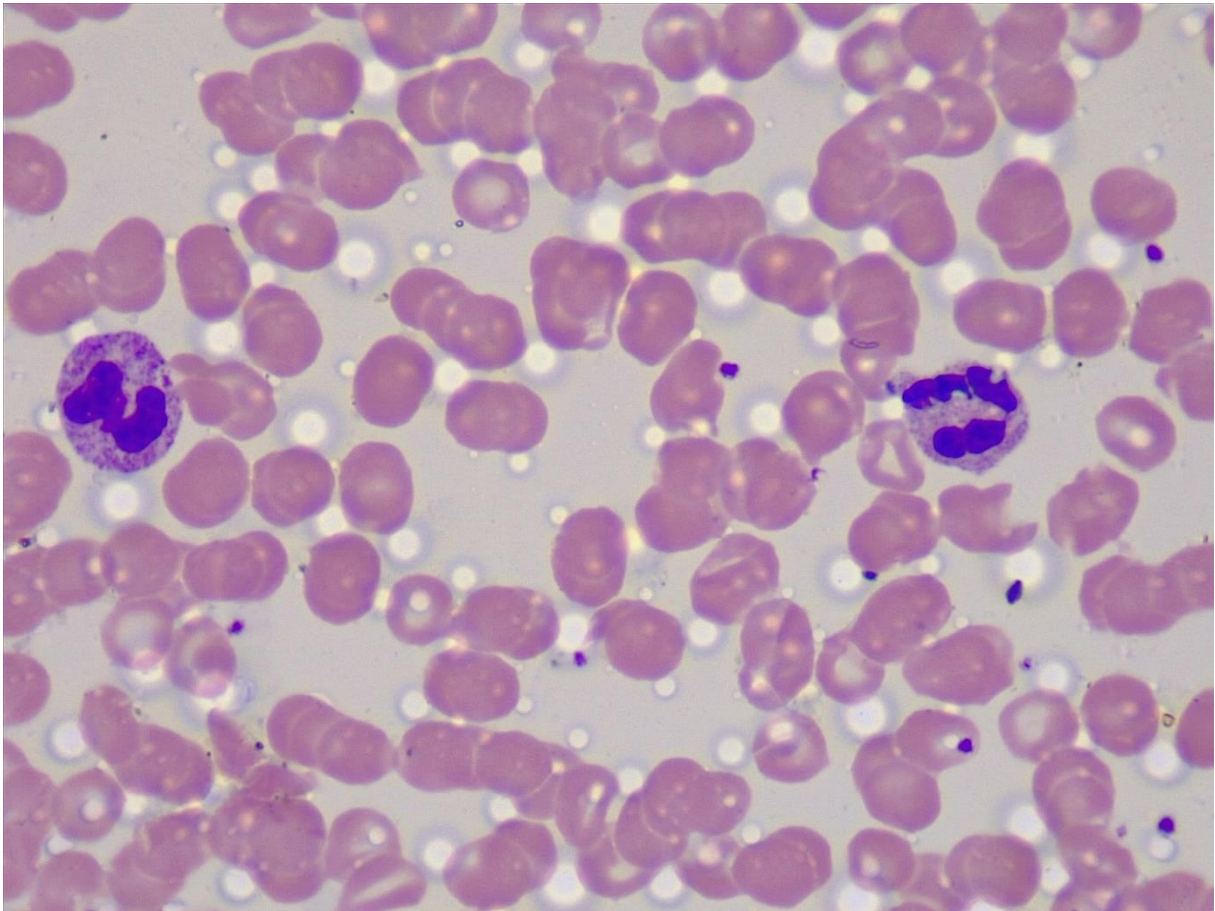
Individuo 2	Imagen 17
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



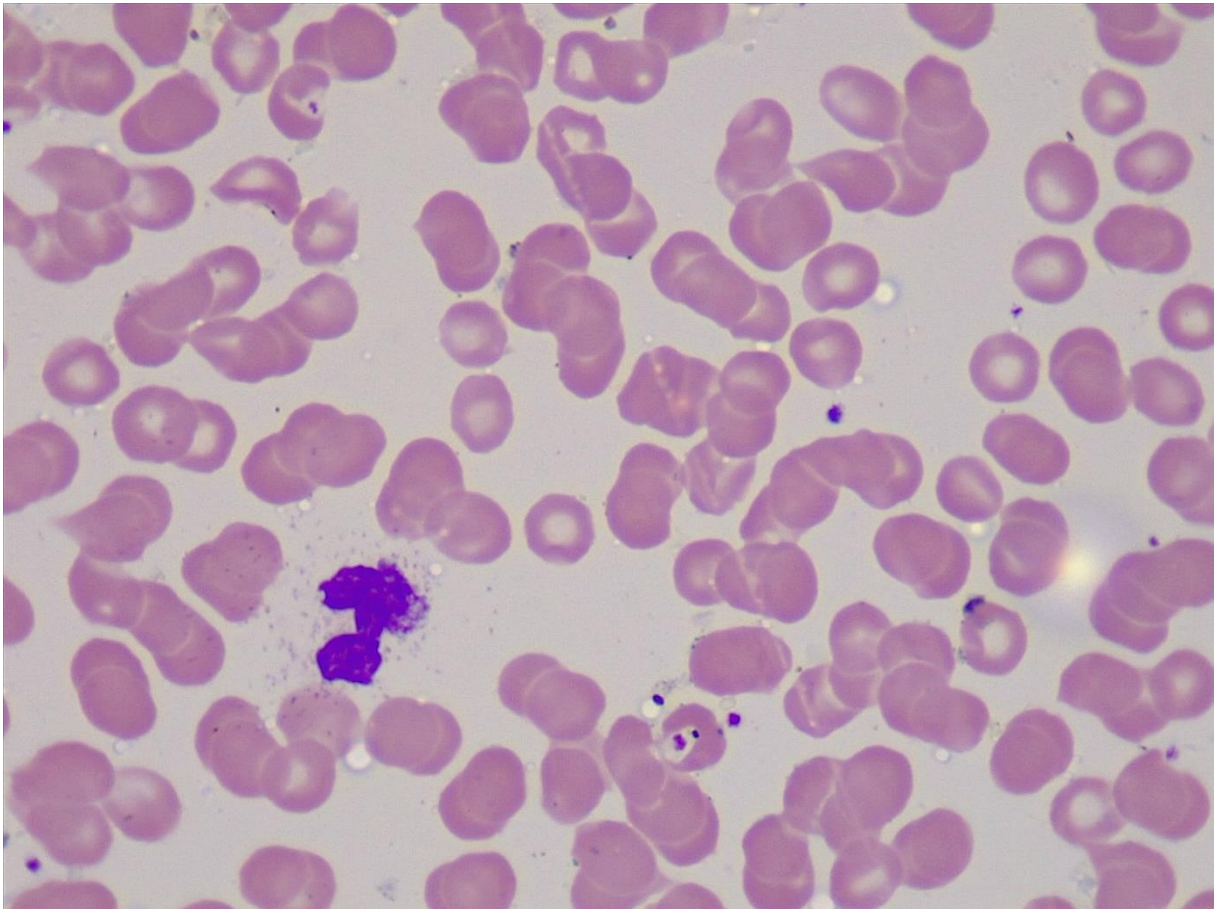
Individuo 2	Imagen 18
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



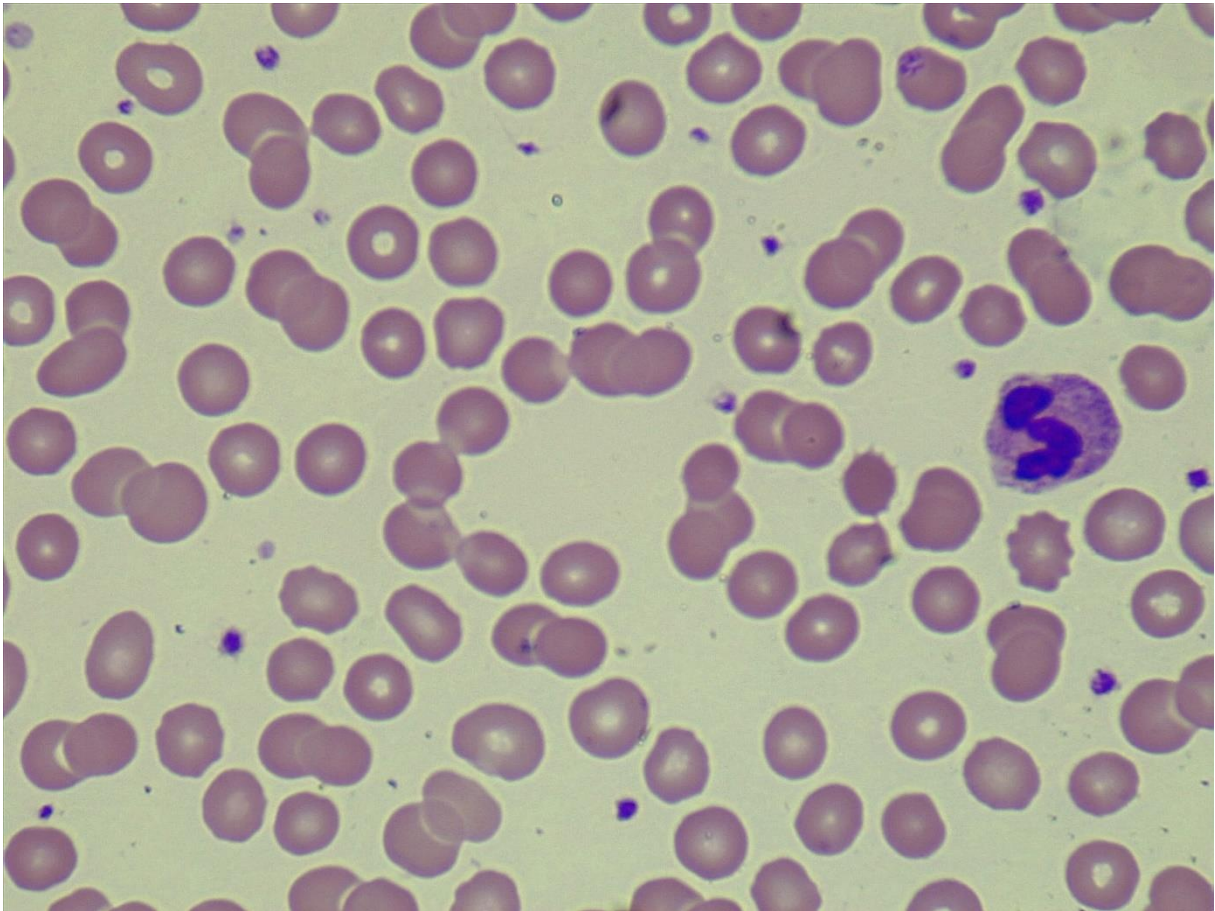
Individuo 2	Imagen 19
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



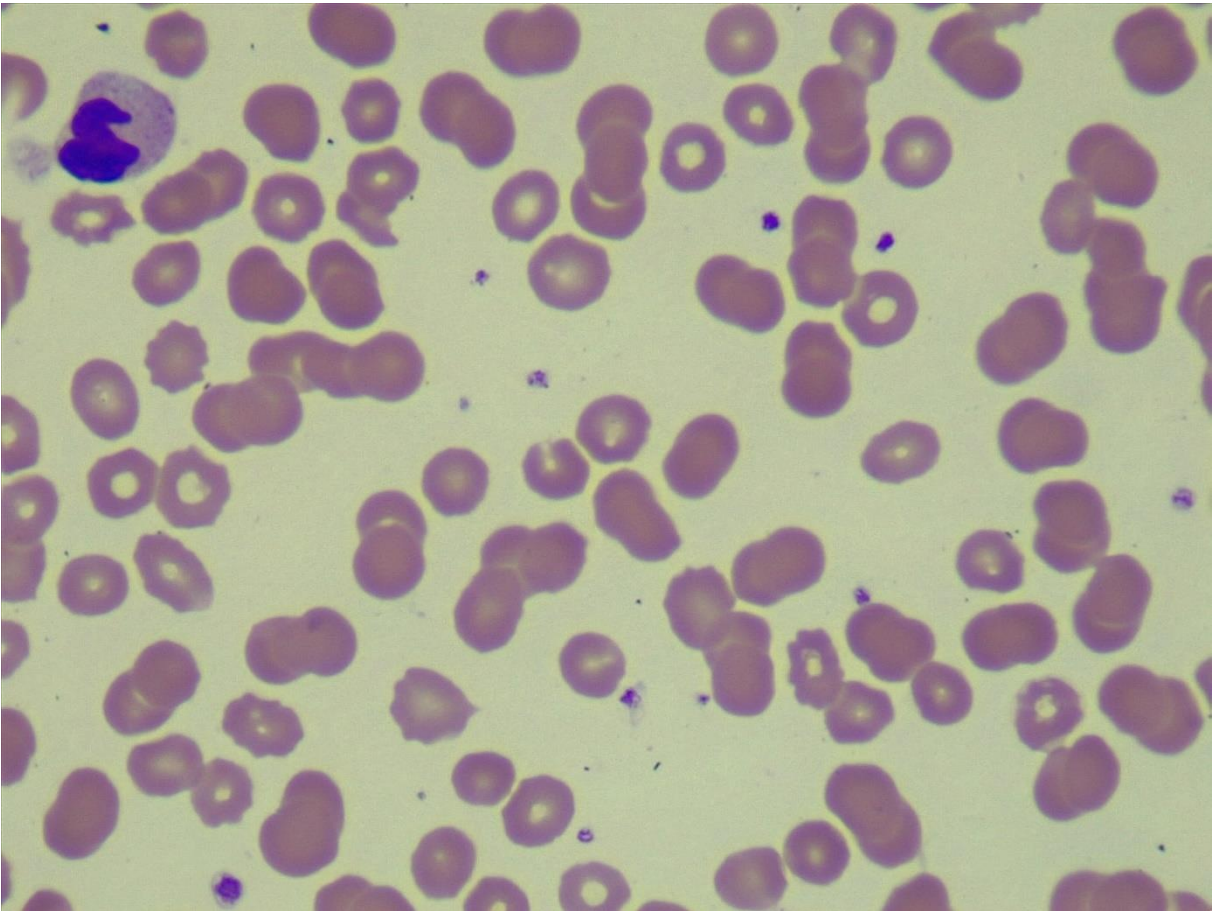
Individuo 2	Imagen 20
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



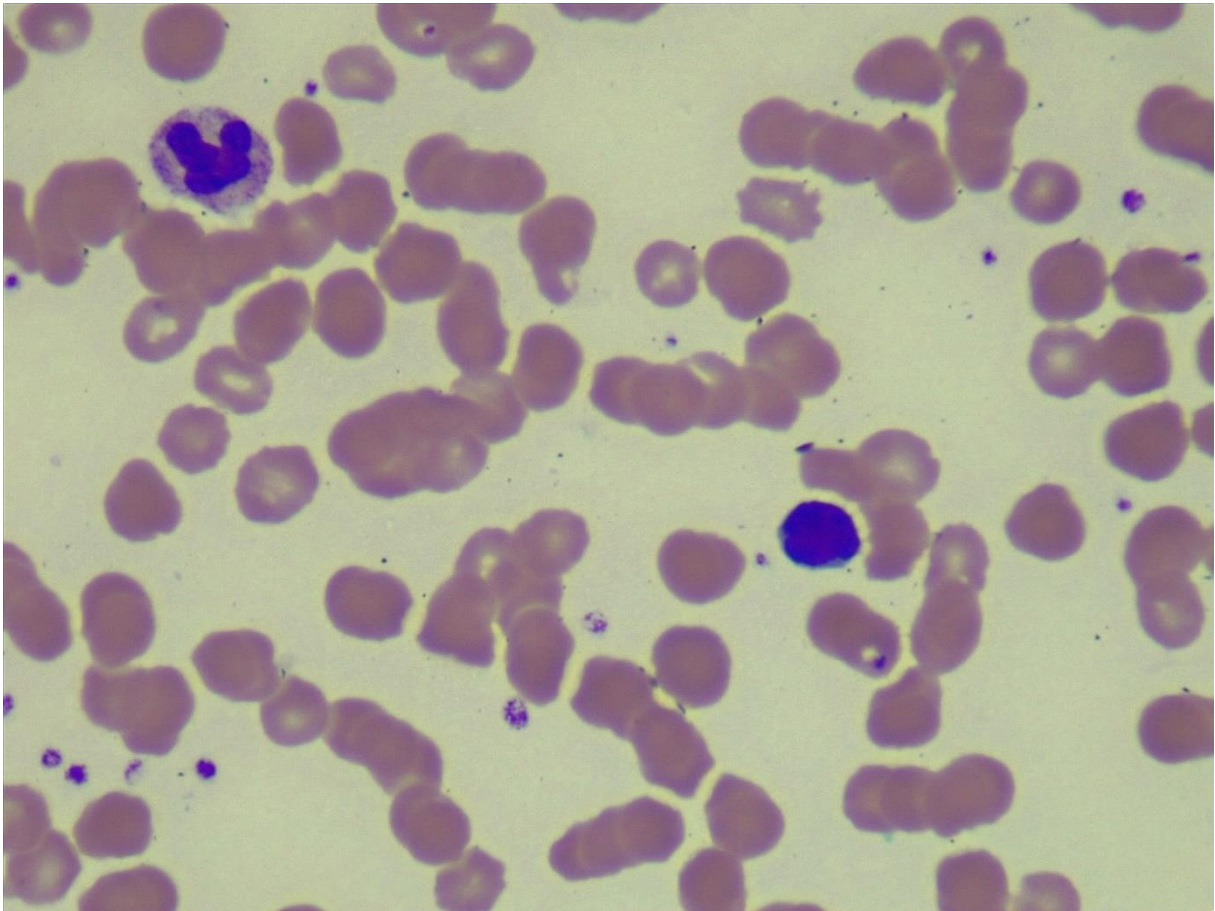
Individuo 3	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



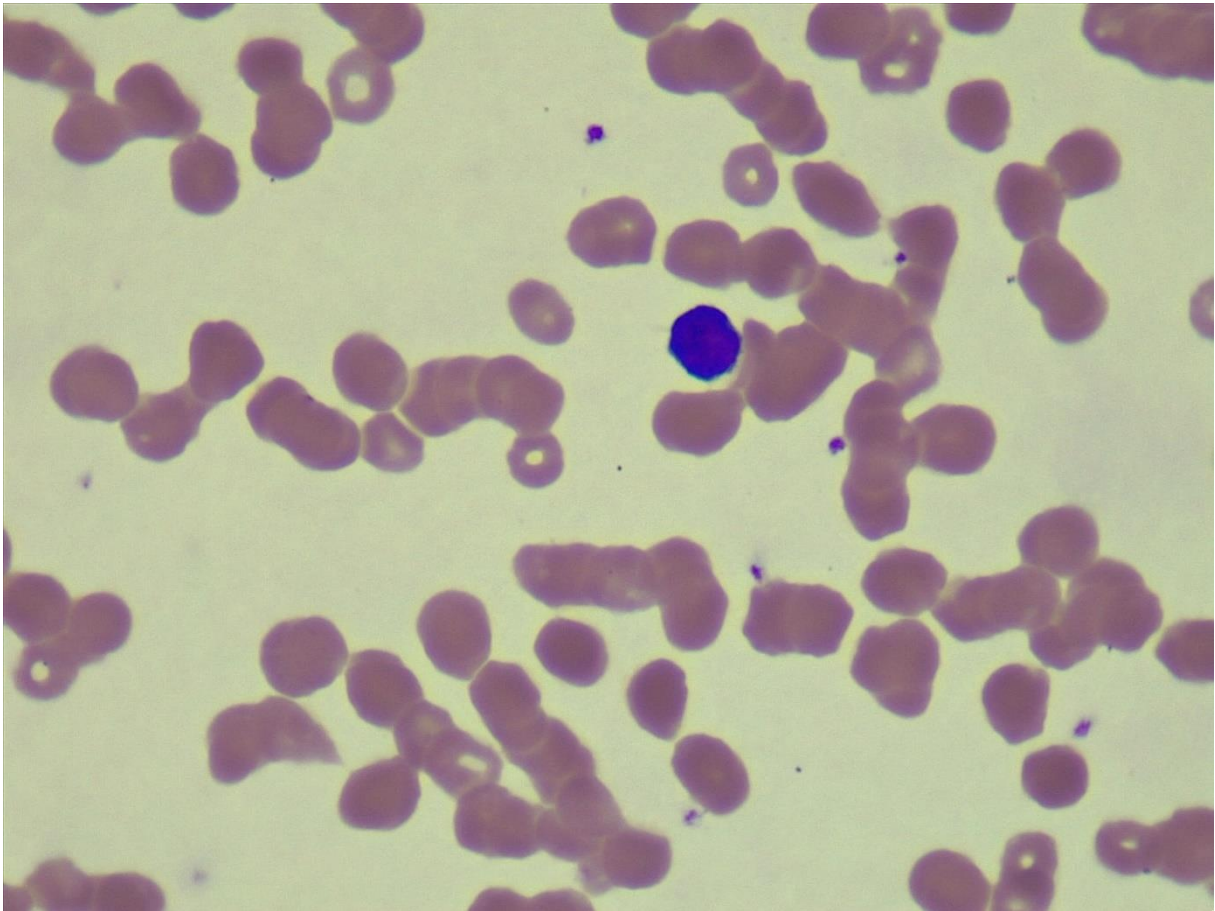
Individuo 3	Imagen 2
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



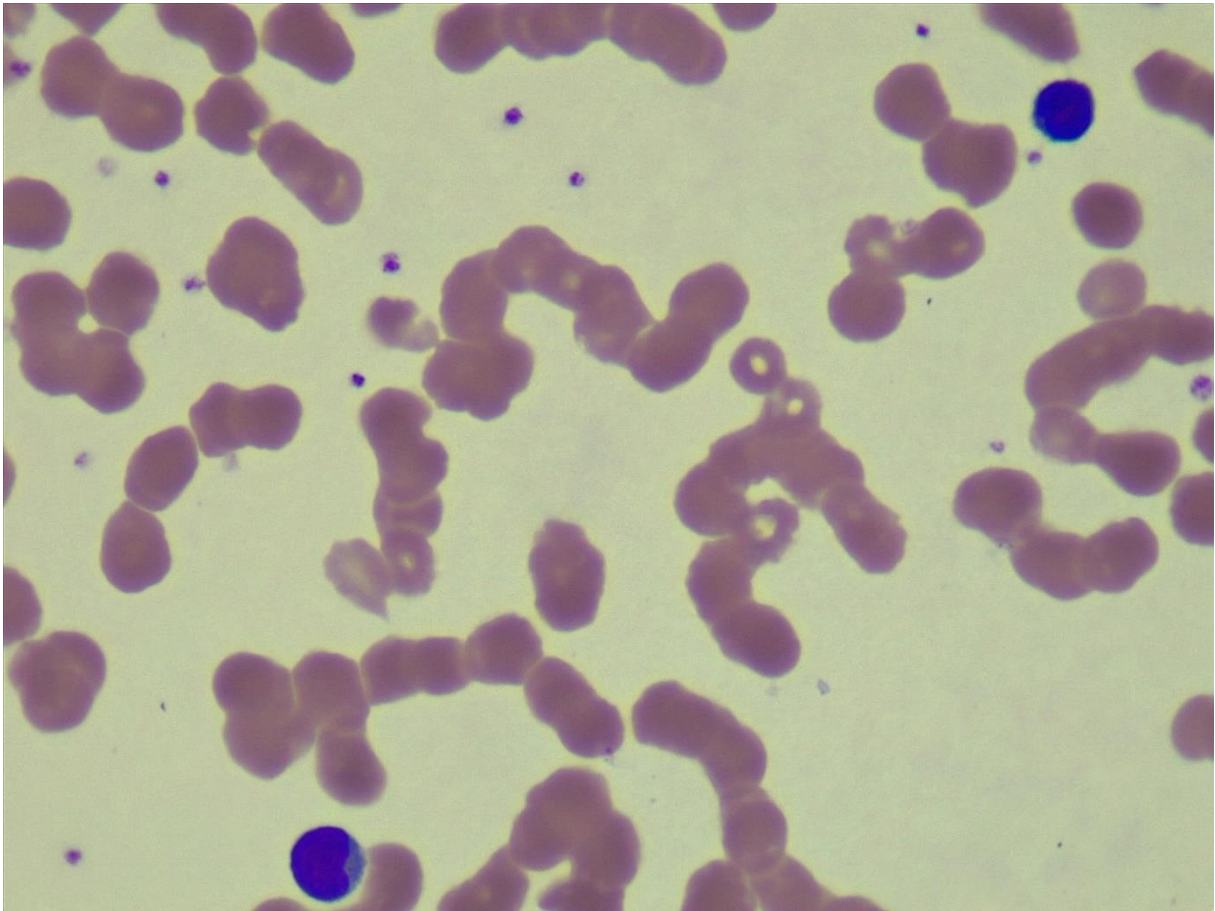
Individuo 3	Imagen 3
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



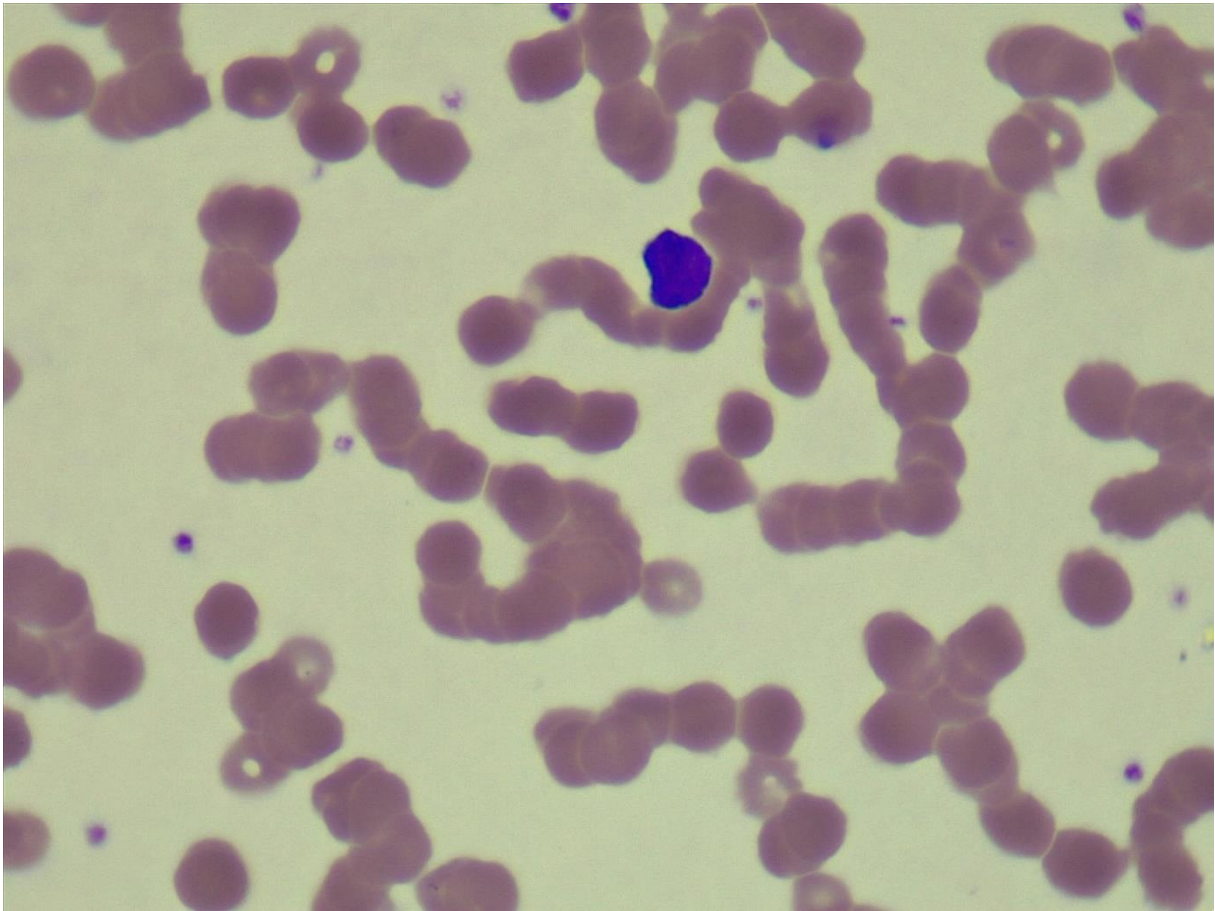
Individuo 3	Imagen 4
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



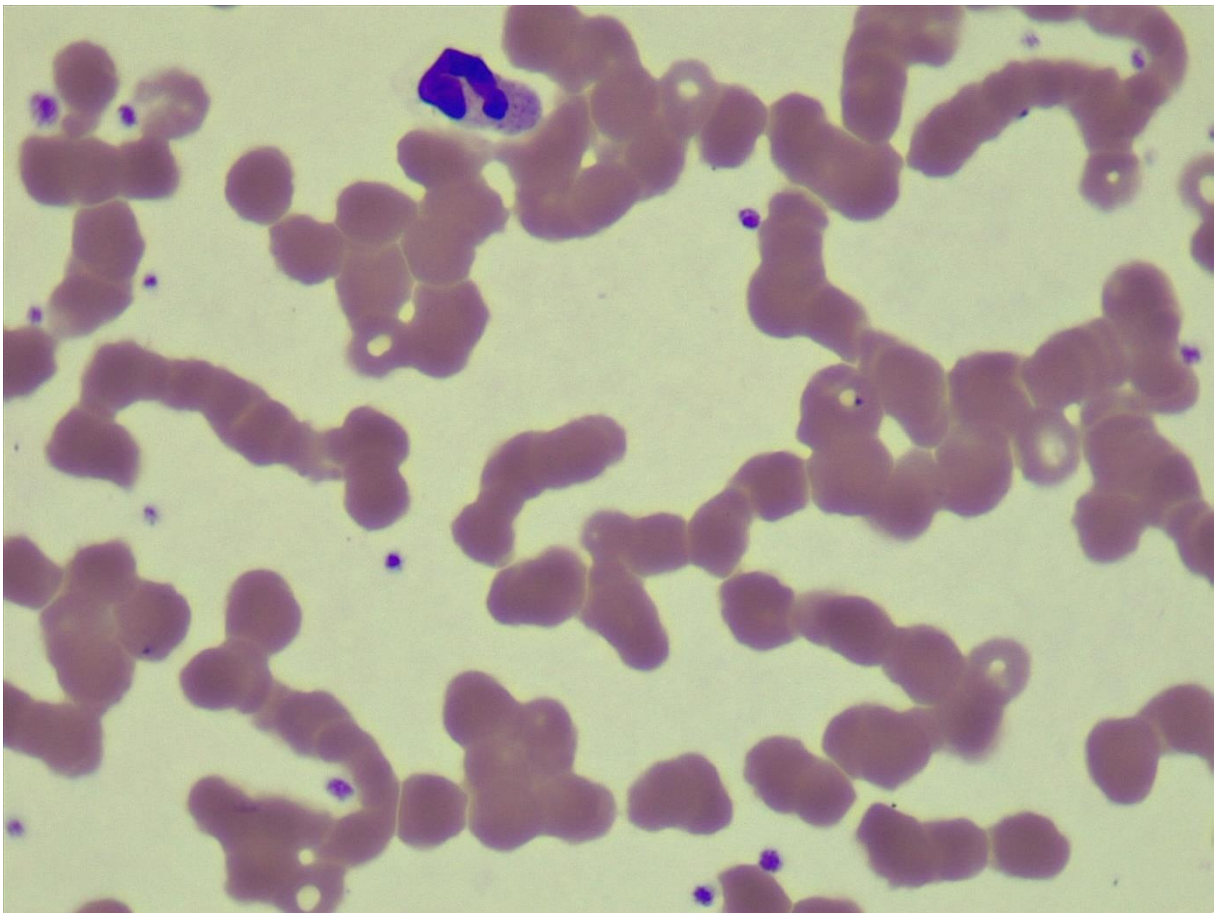
Individuo 3	Imagen 5
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



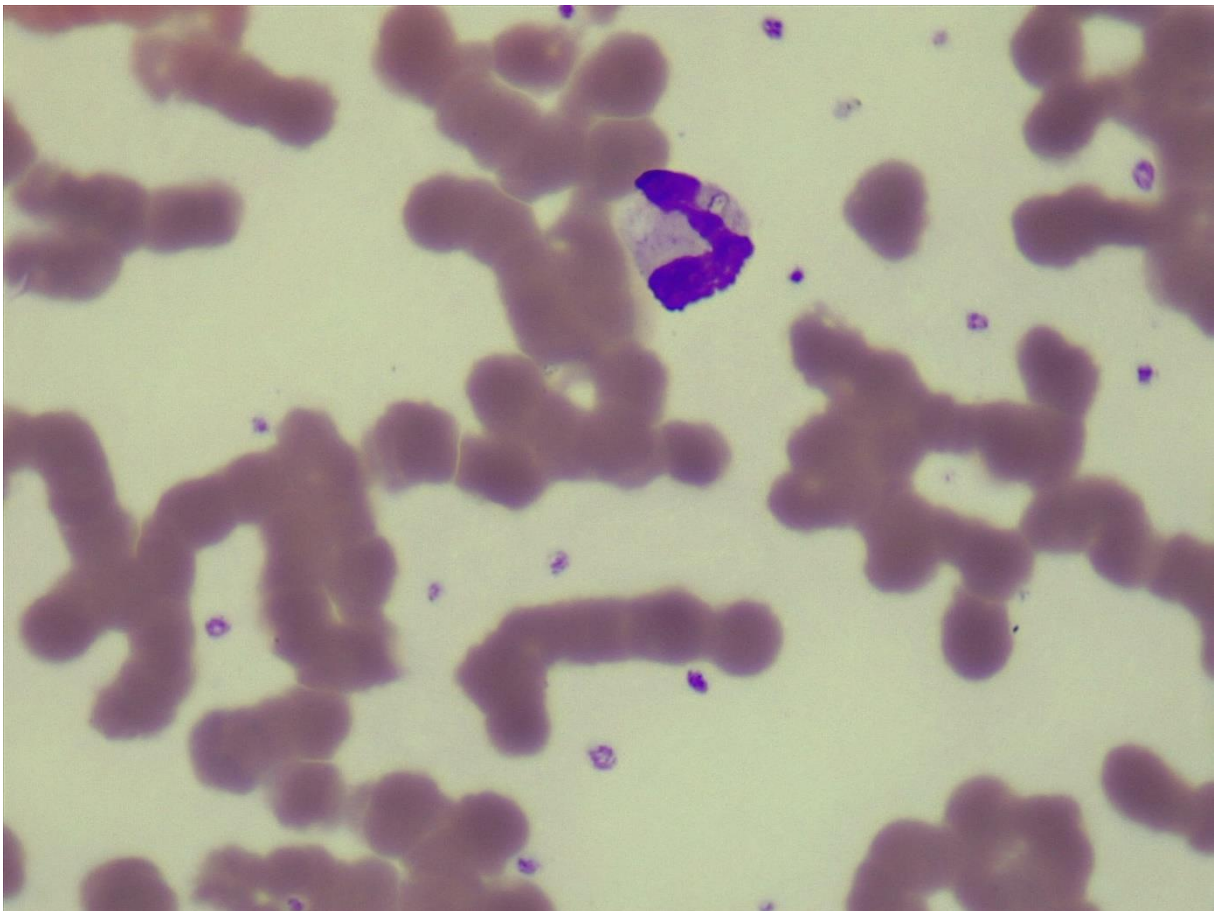
Individuo 3	Imagen 6
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



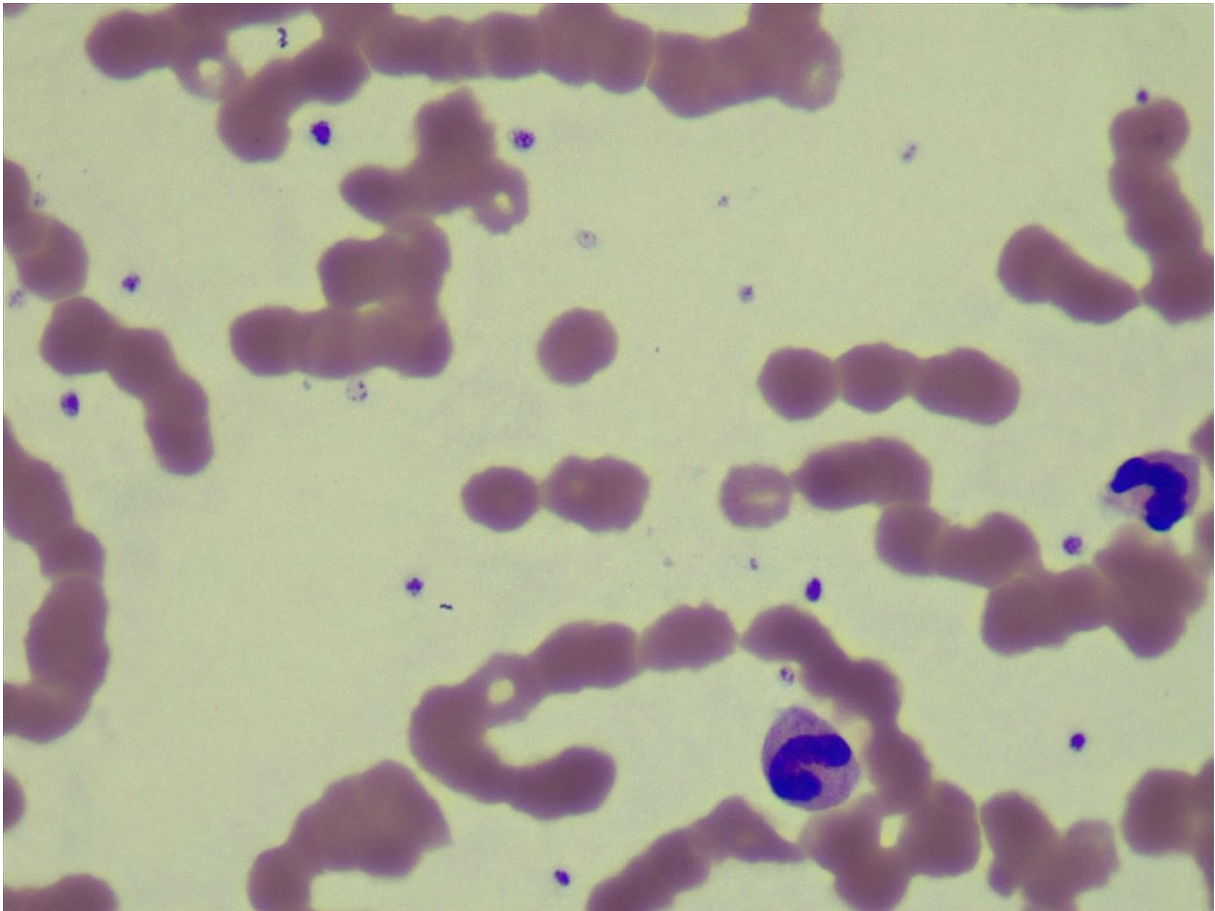
Individuo 3	Imagen 7
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



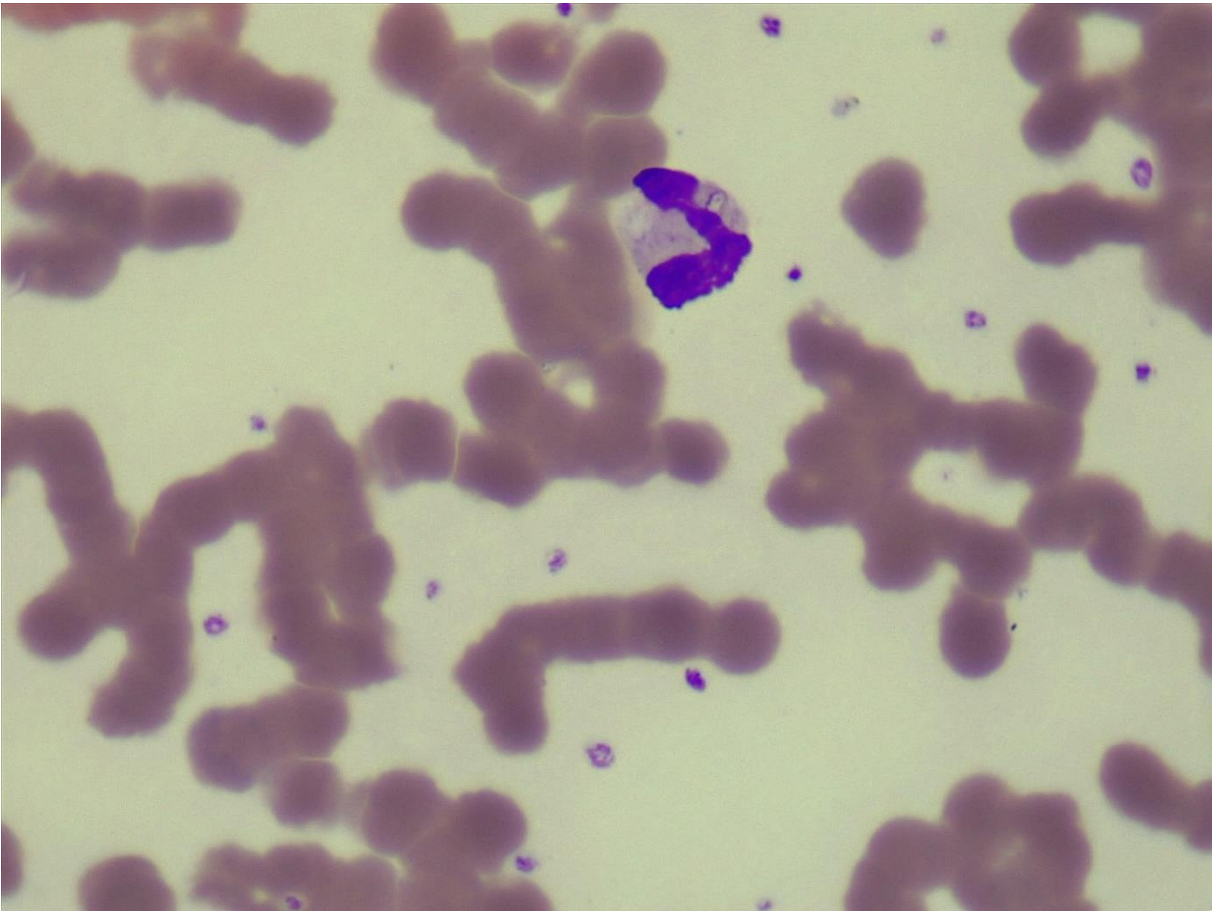
Individuo 3	Imagen 8
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



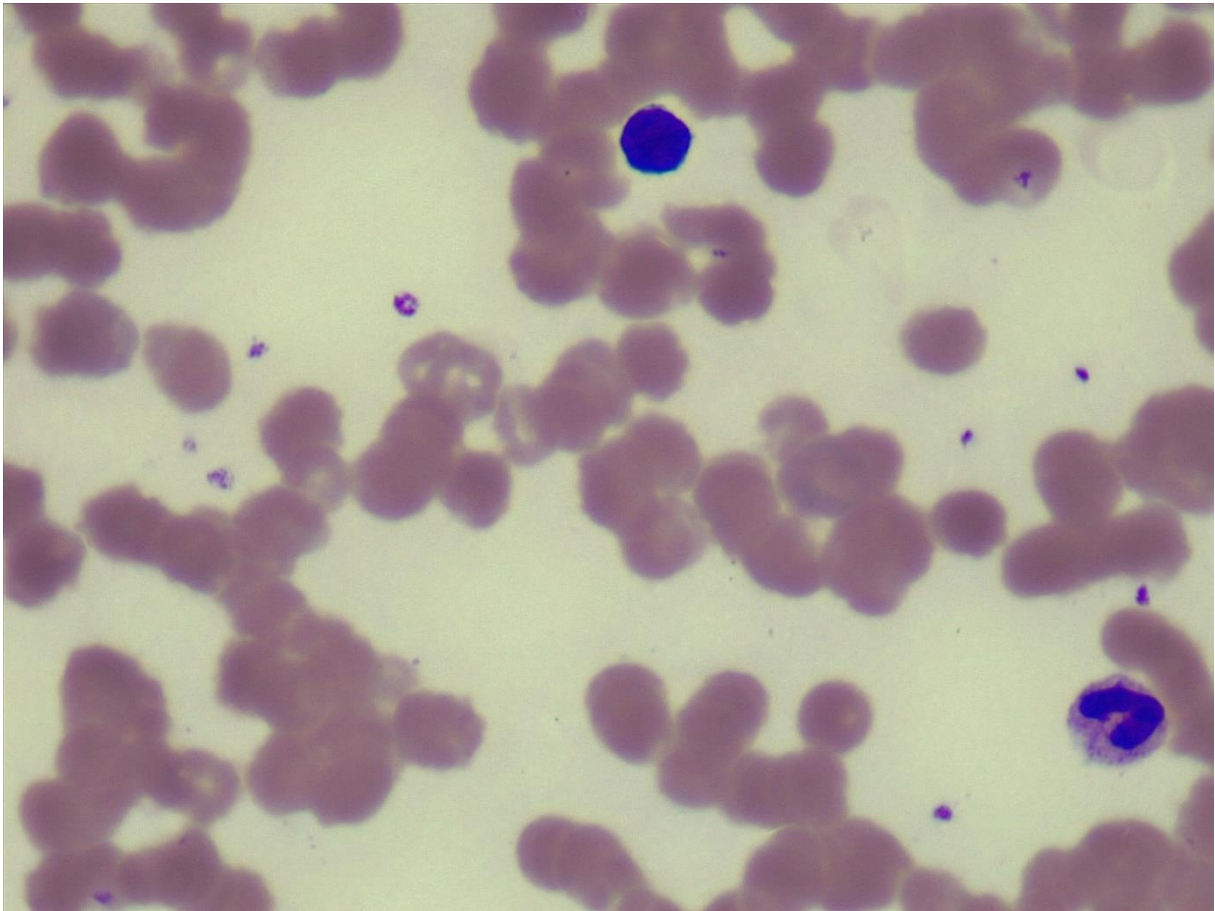
Individuo 3	Imagen 9
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



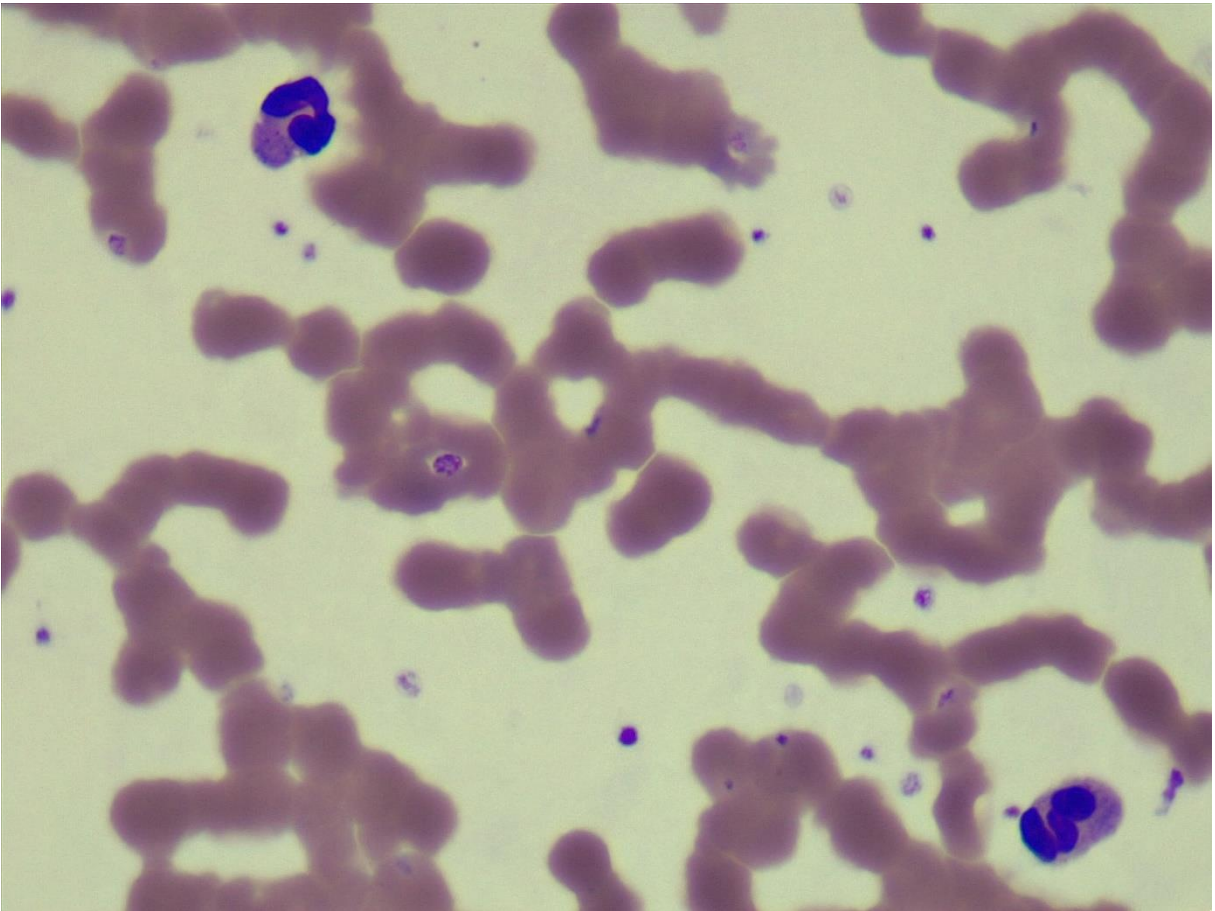
Individuo 3	Imagen 10
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



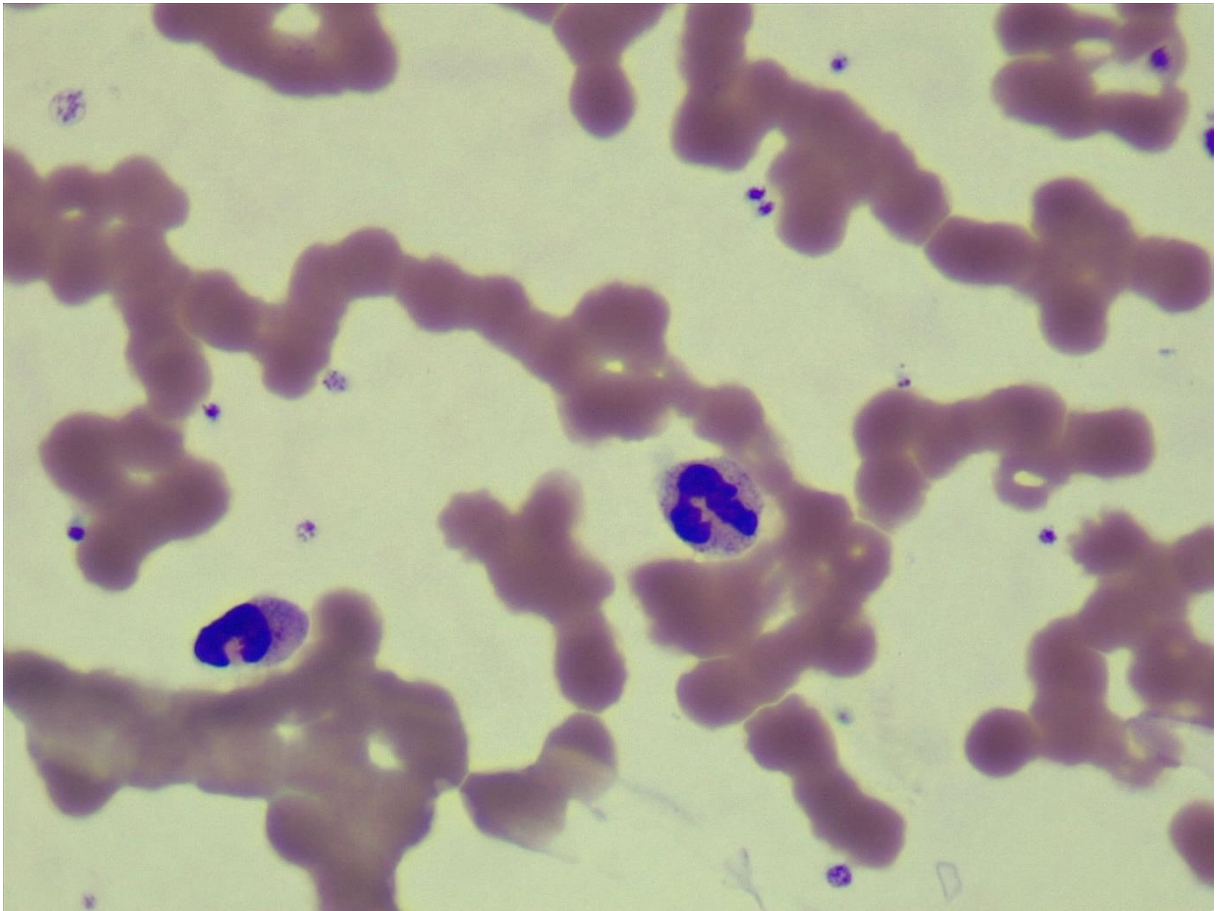
Individuo 3	Imagen 11
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



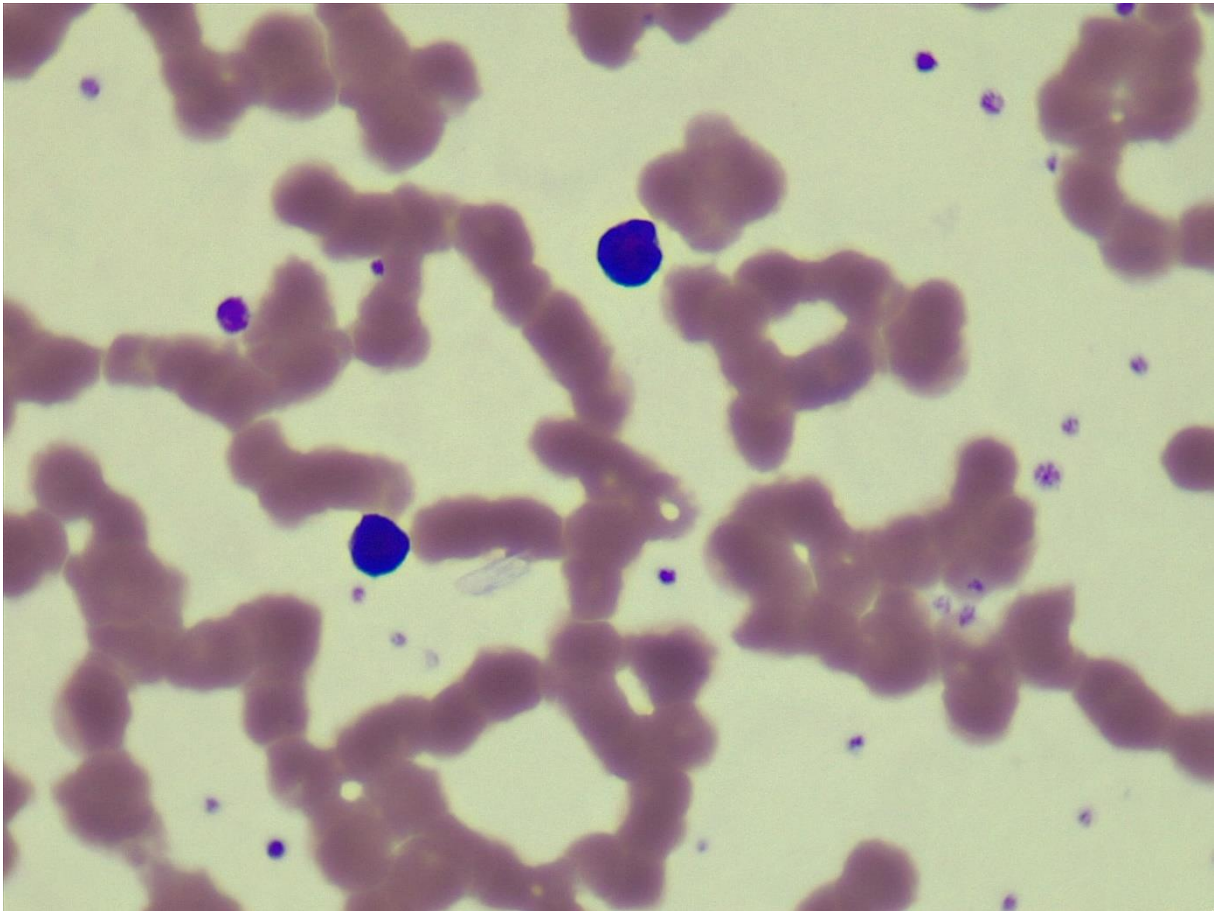
Individuo 3	Imagen 12
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



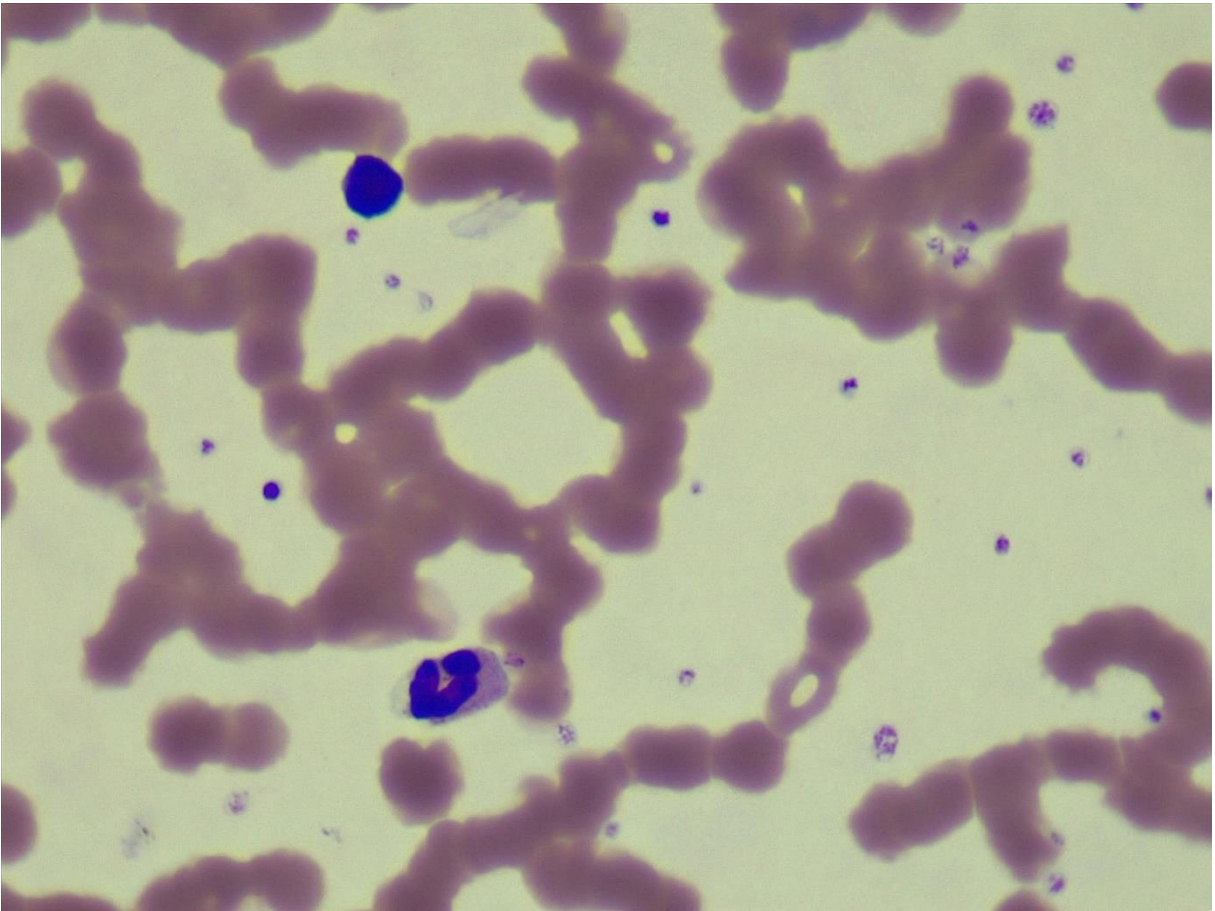
Individuo 3	Imagen 13
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



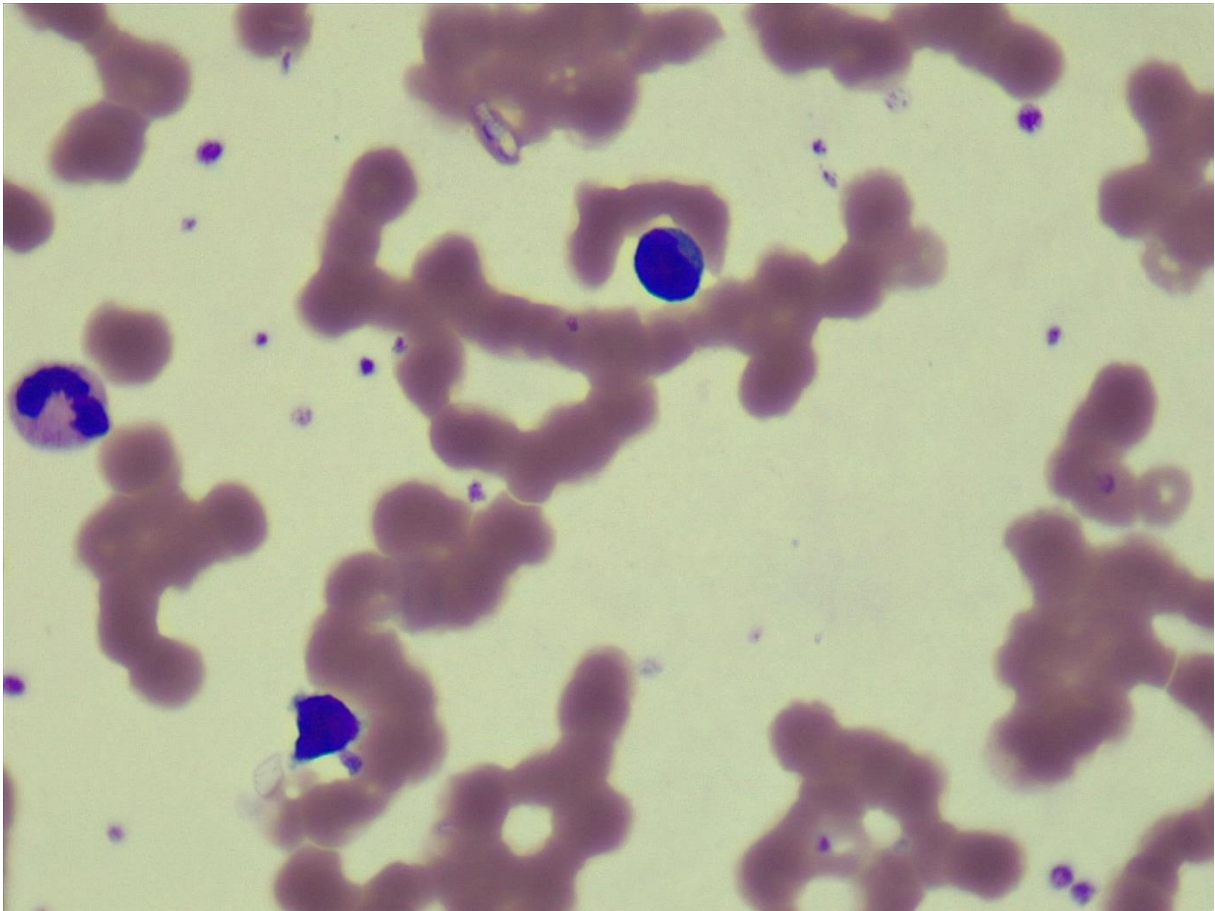
Individuo 3	Imagen 14
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



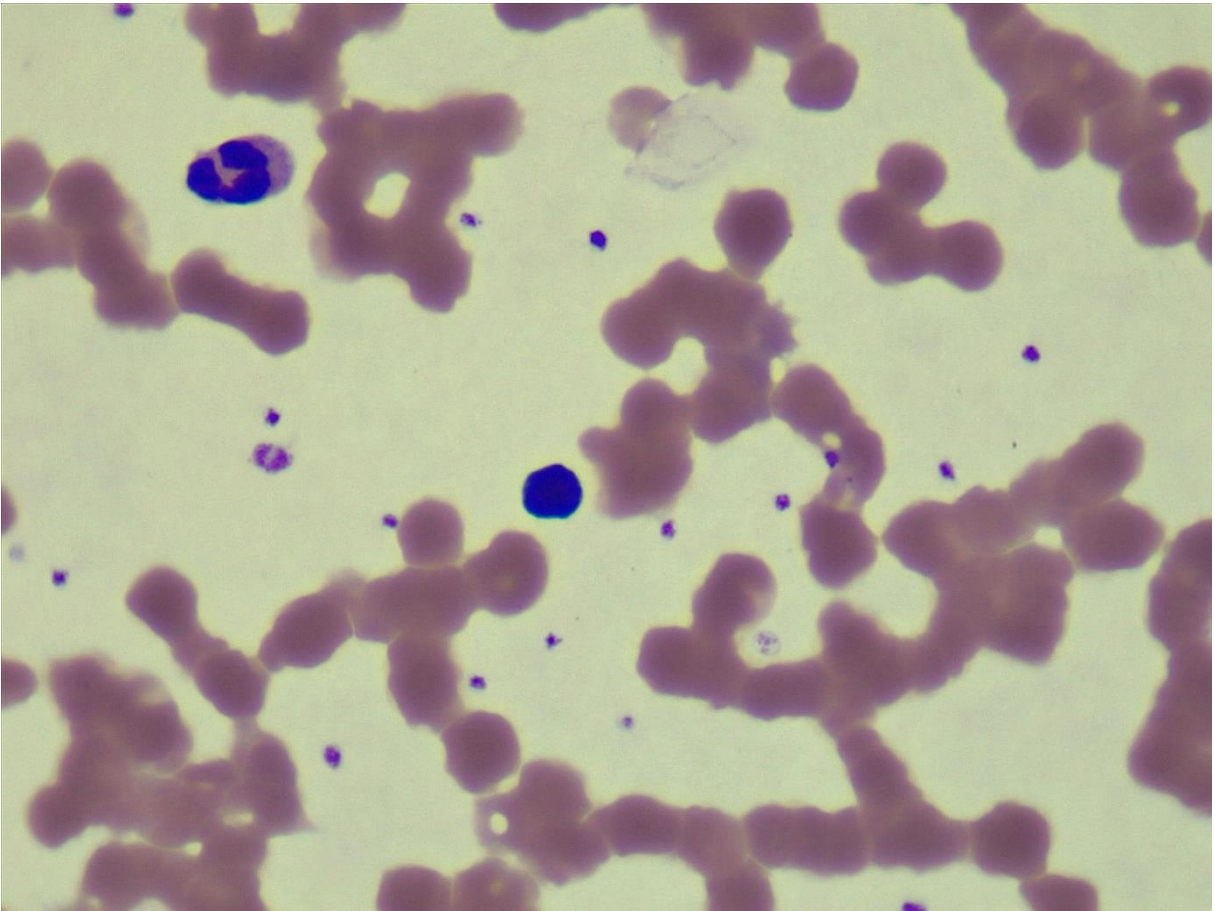
Individuo 3	Imagen 15
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



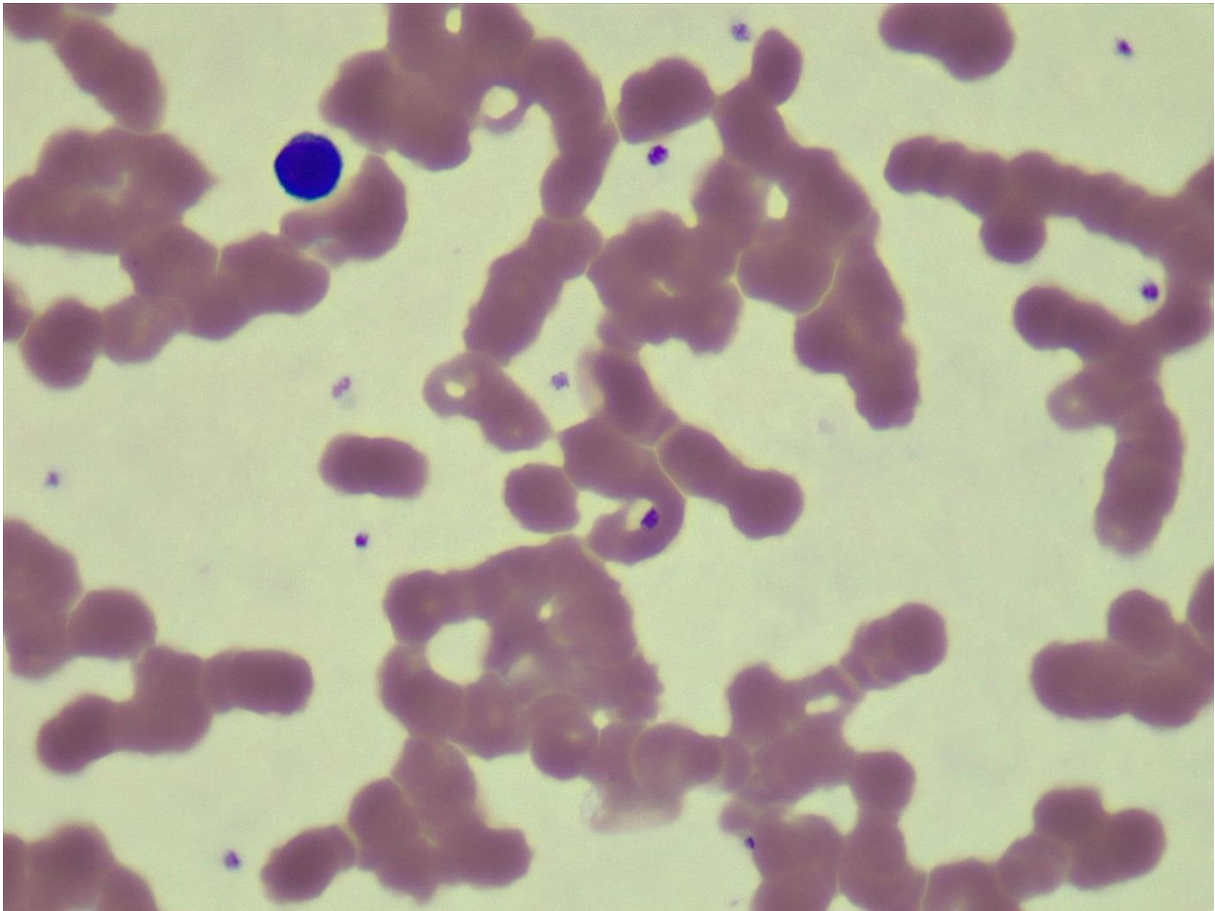
Individuo 3	Imagen 16
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



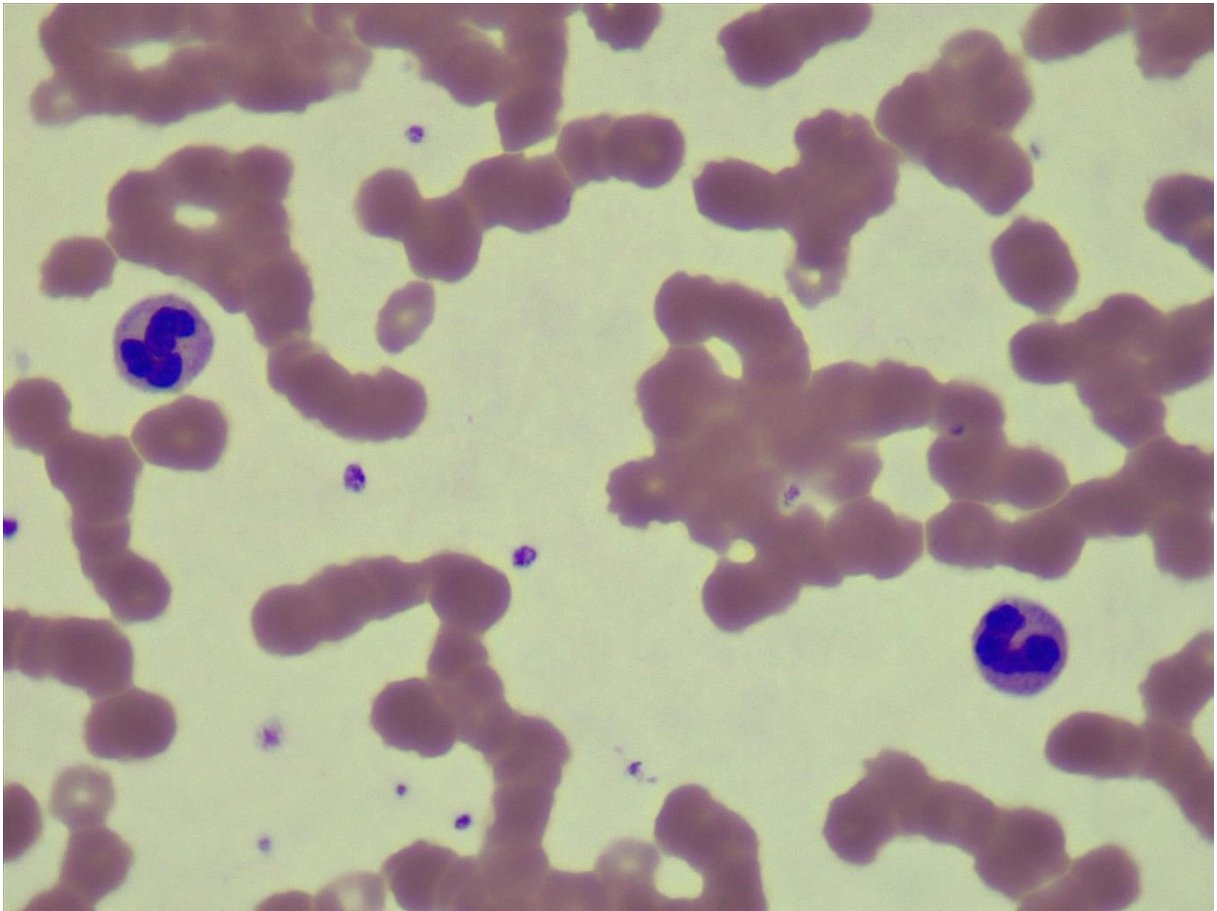
Individuo 3	Imagen 17
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



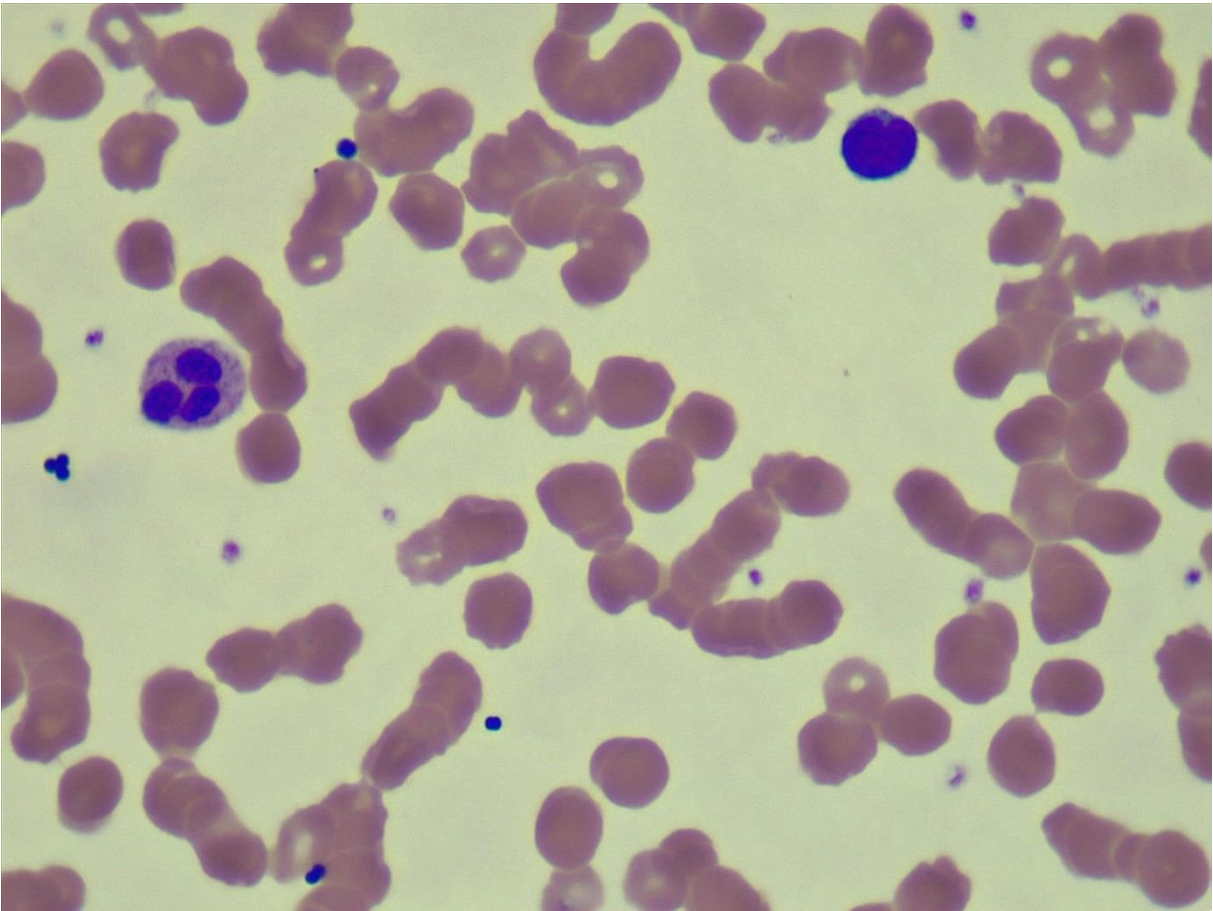
Individuo 3	Imagen 18
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



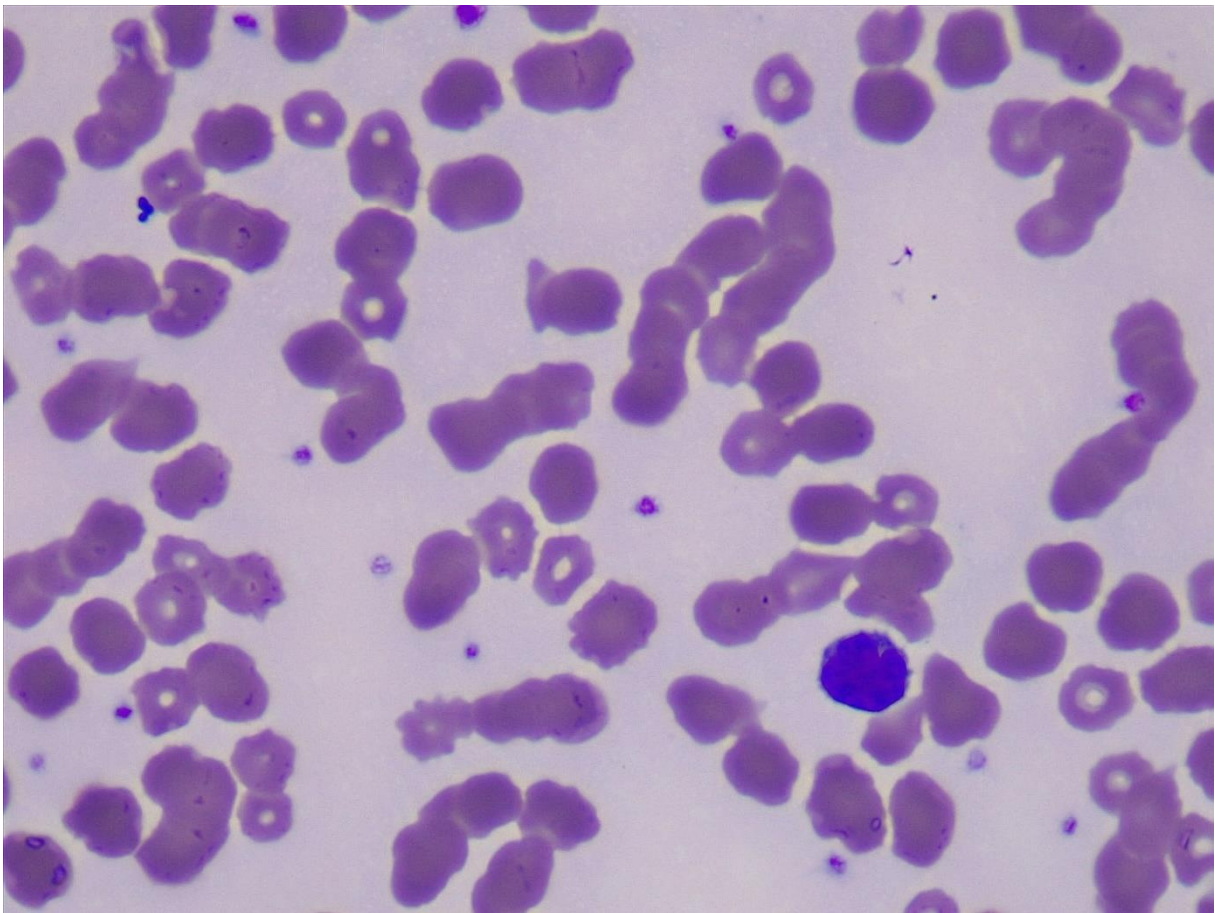
Individuo 3	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	1



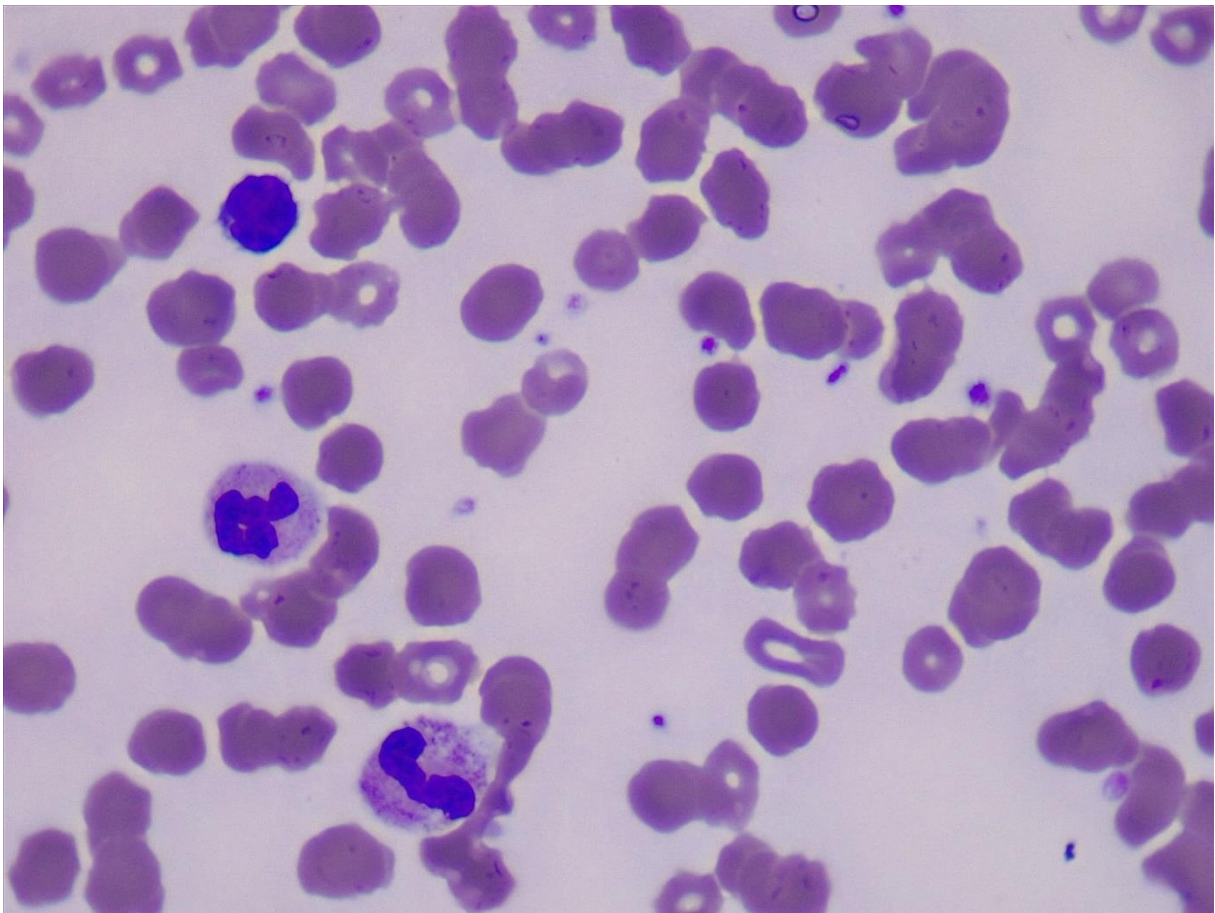
Individuo 3	Imagen 20
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



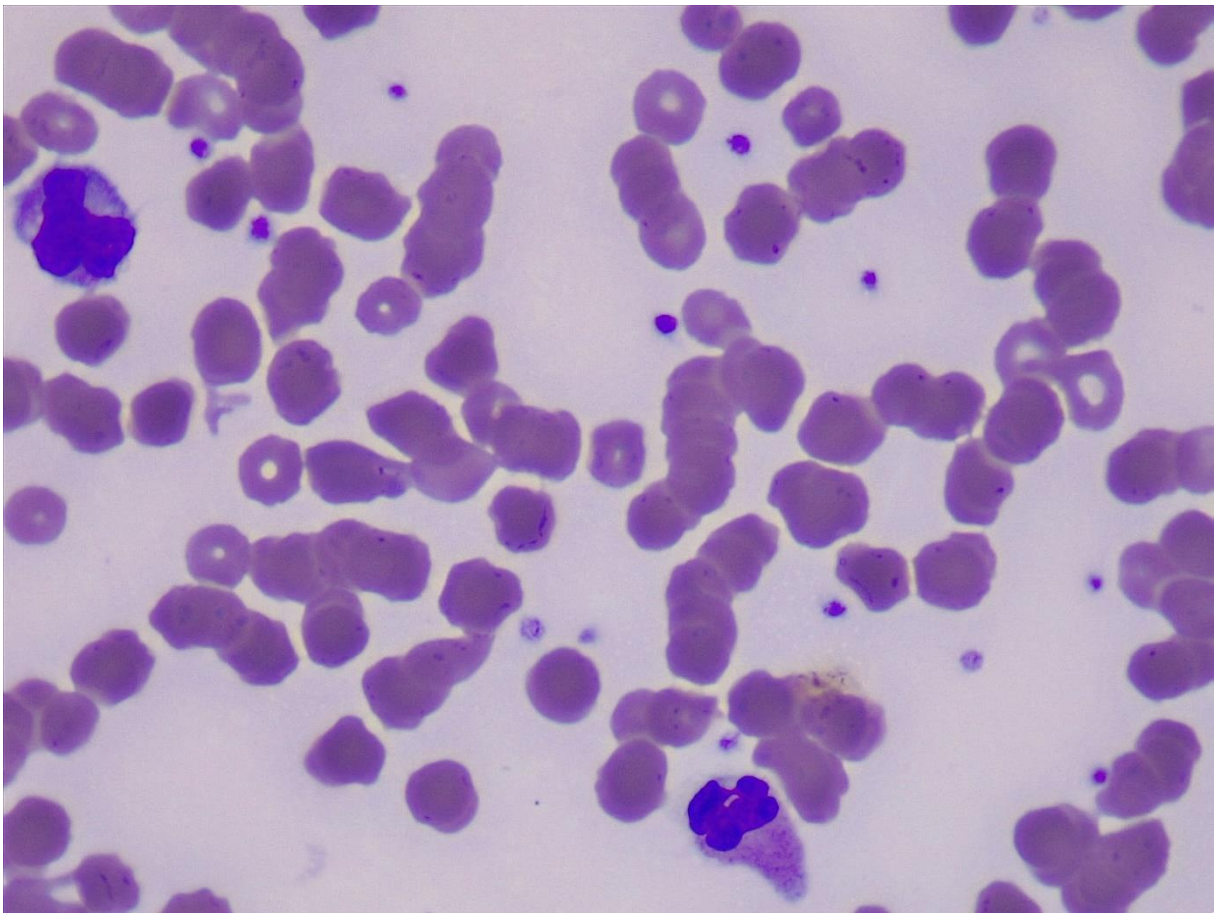
Individuo 4	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



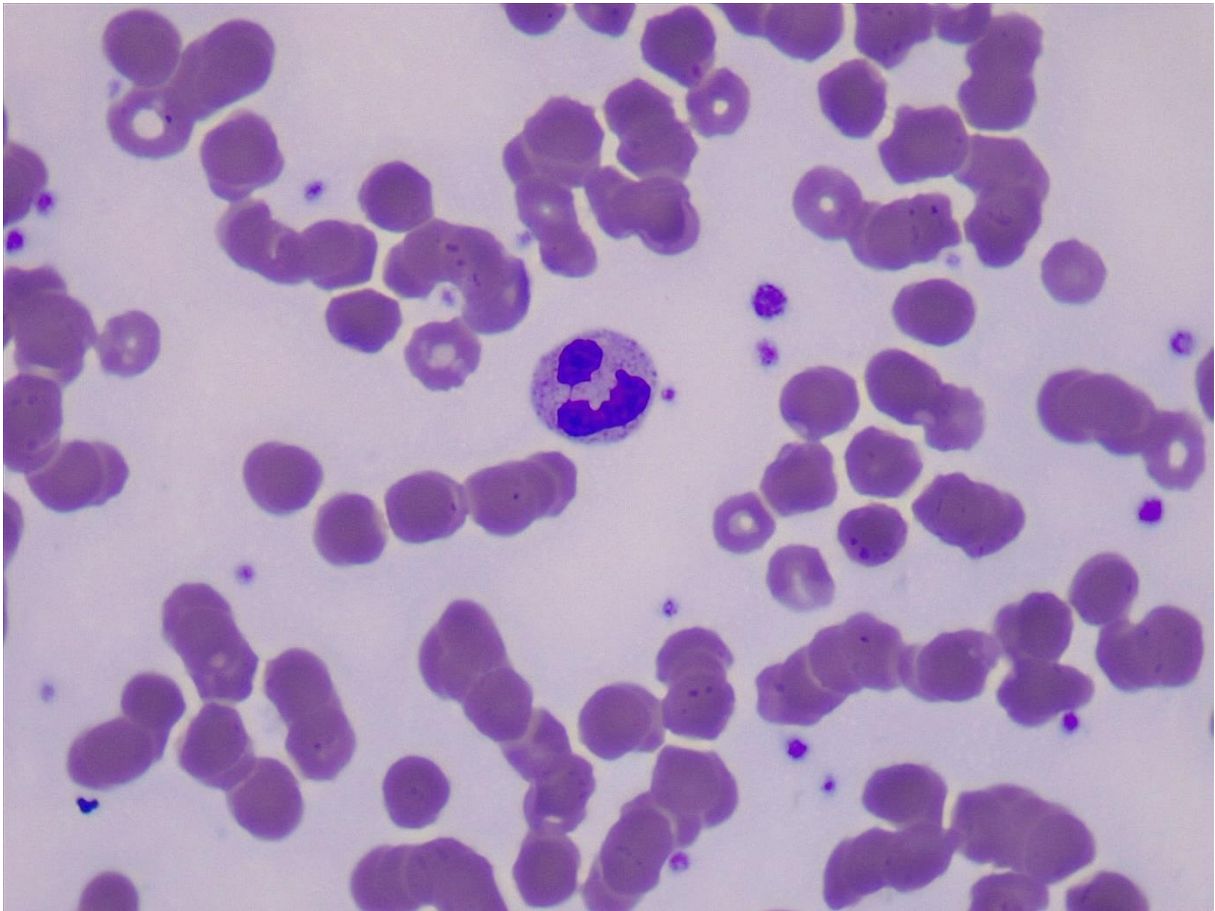
Individuo 4	Imagen 2
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



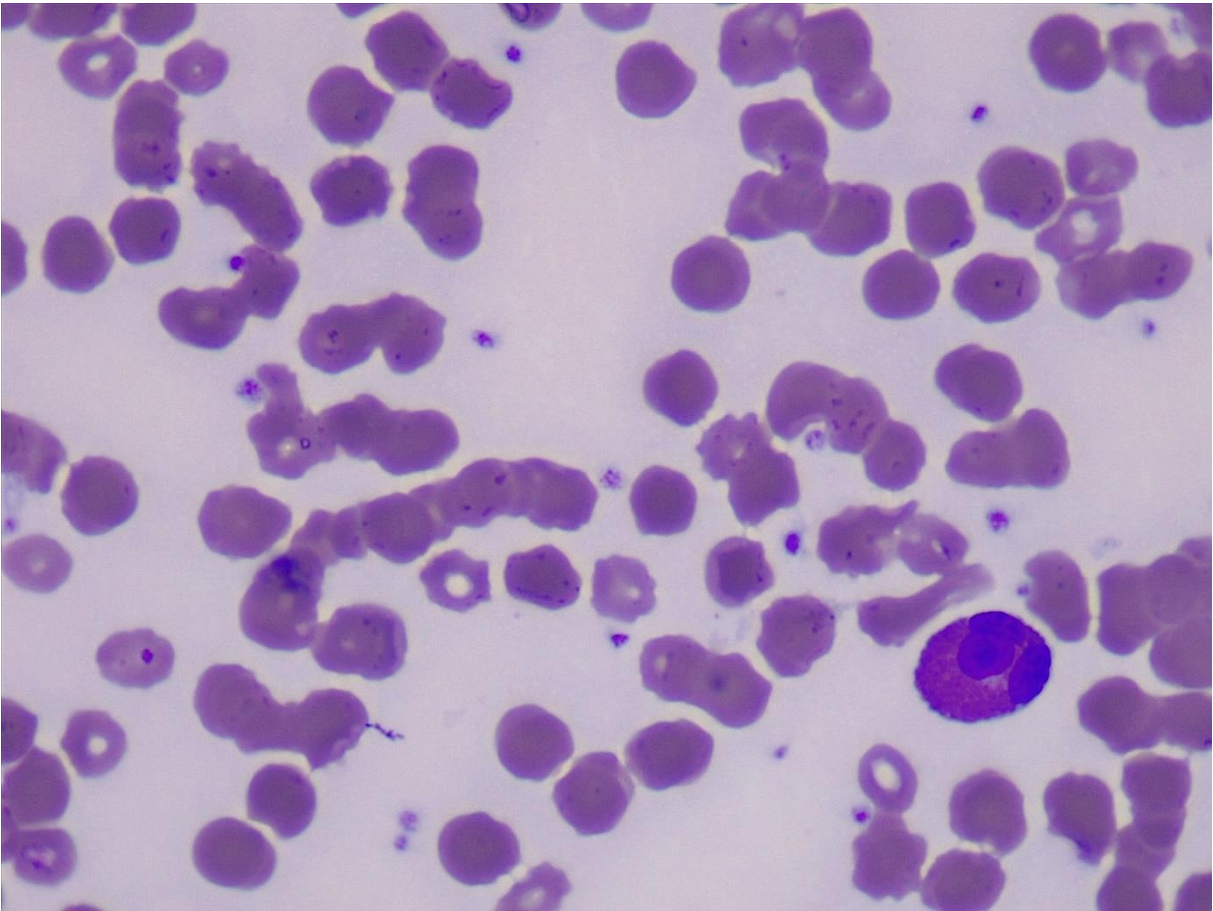
Individuo 4	Imagen 3
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



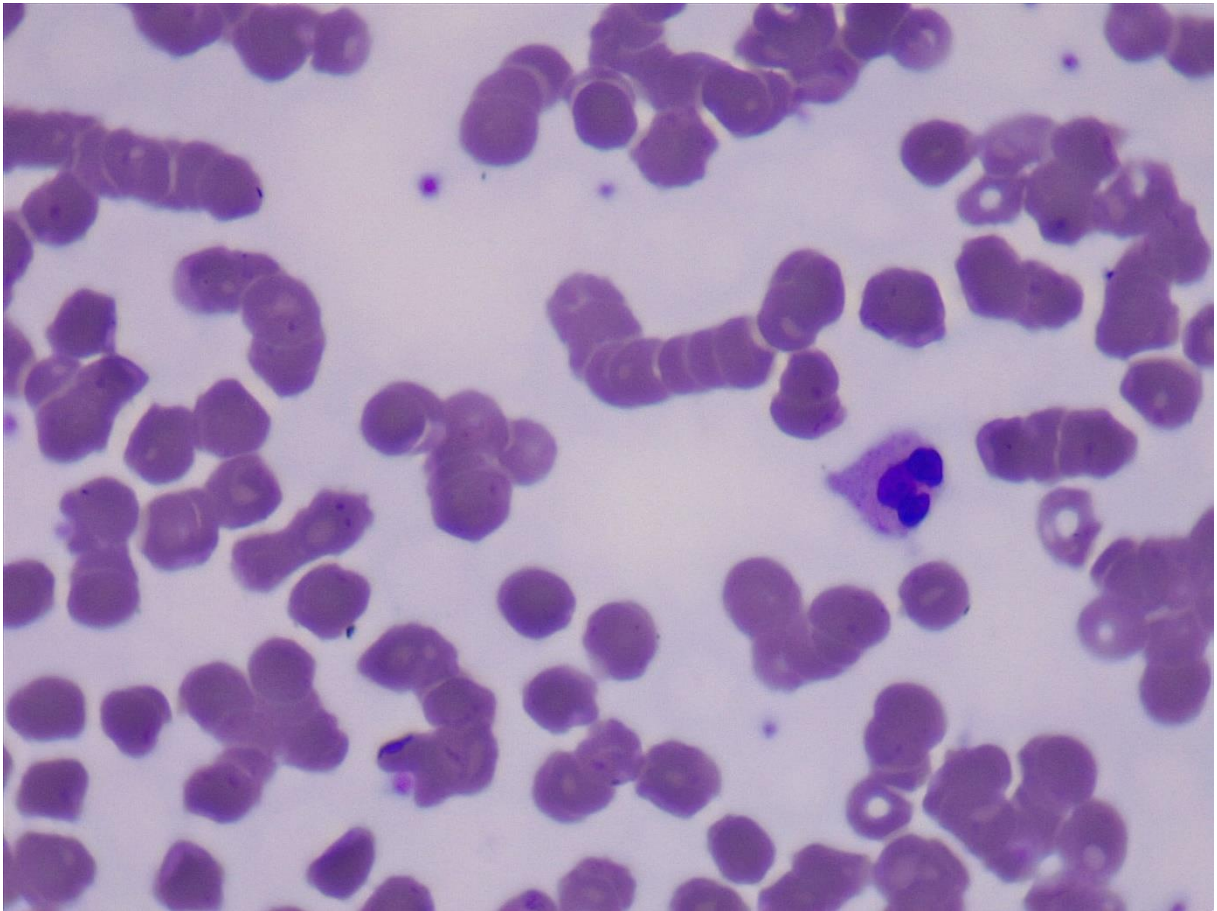
Individuo 4	Imagen 4
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



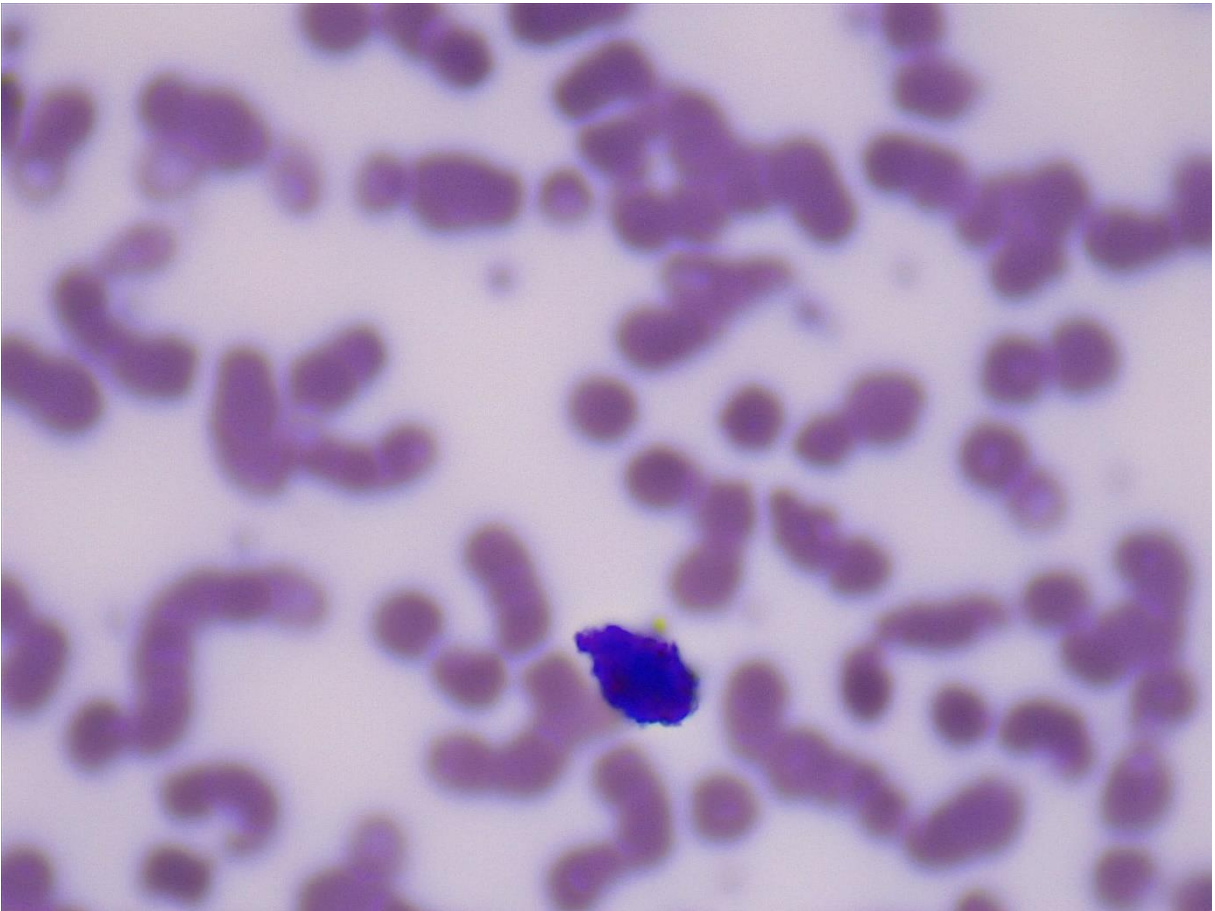
Individuo 4	Imagen 5
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	1



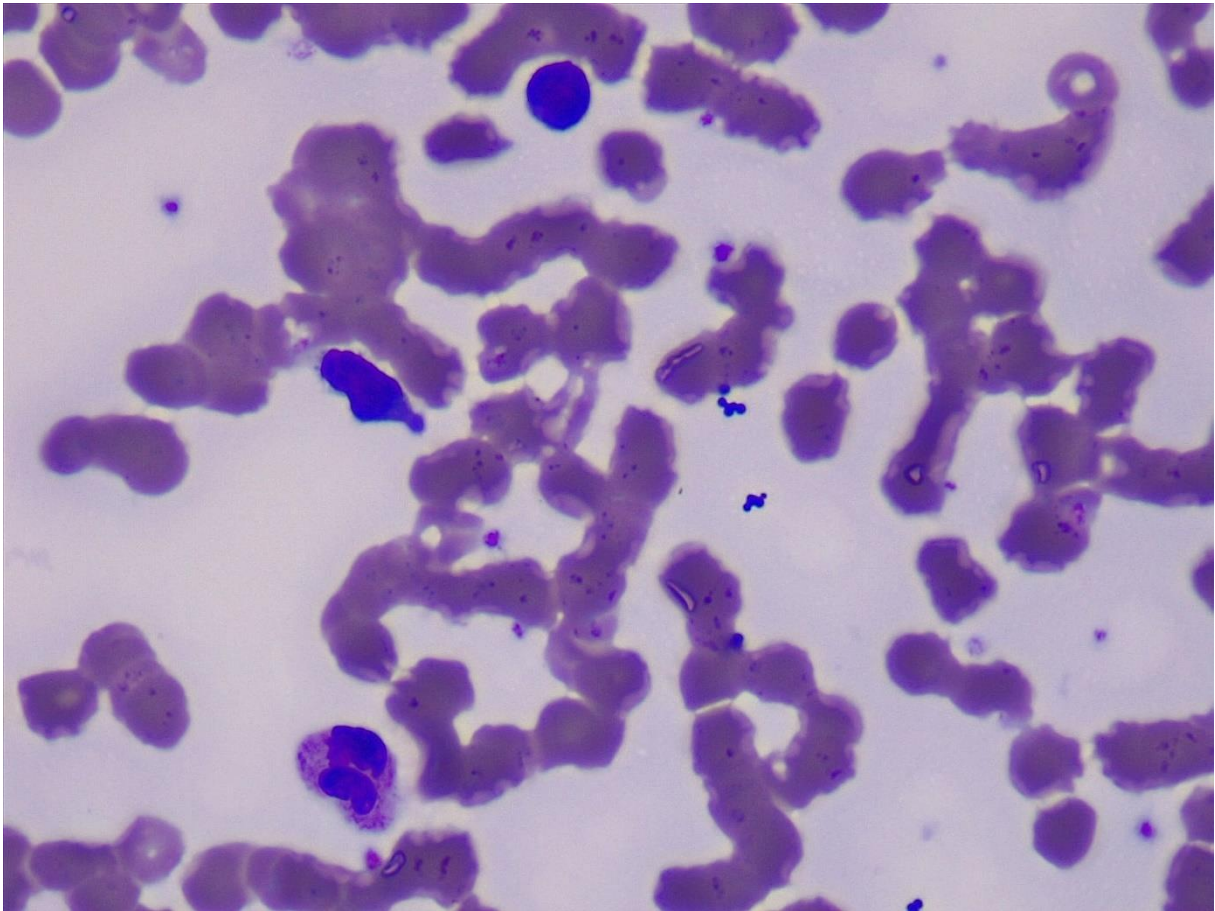
Individuo 4	Imagen 6
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



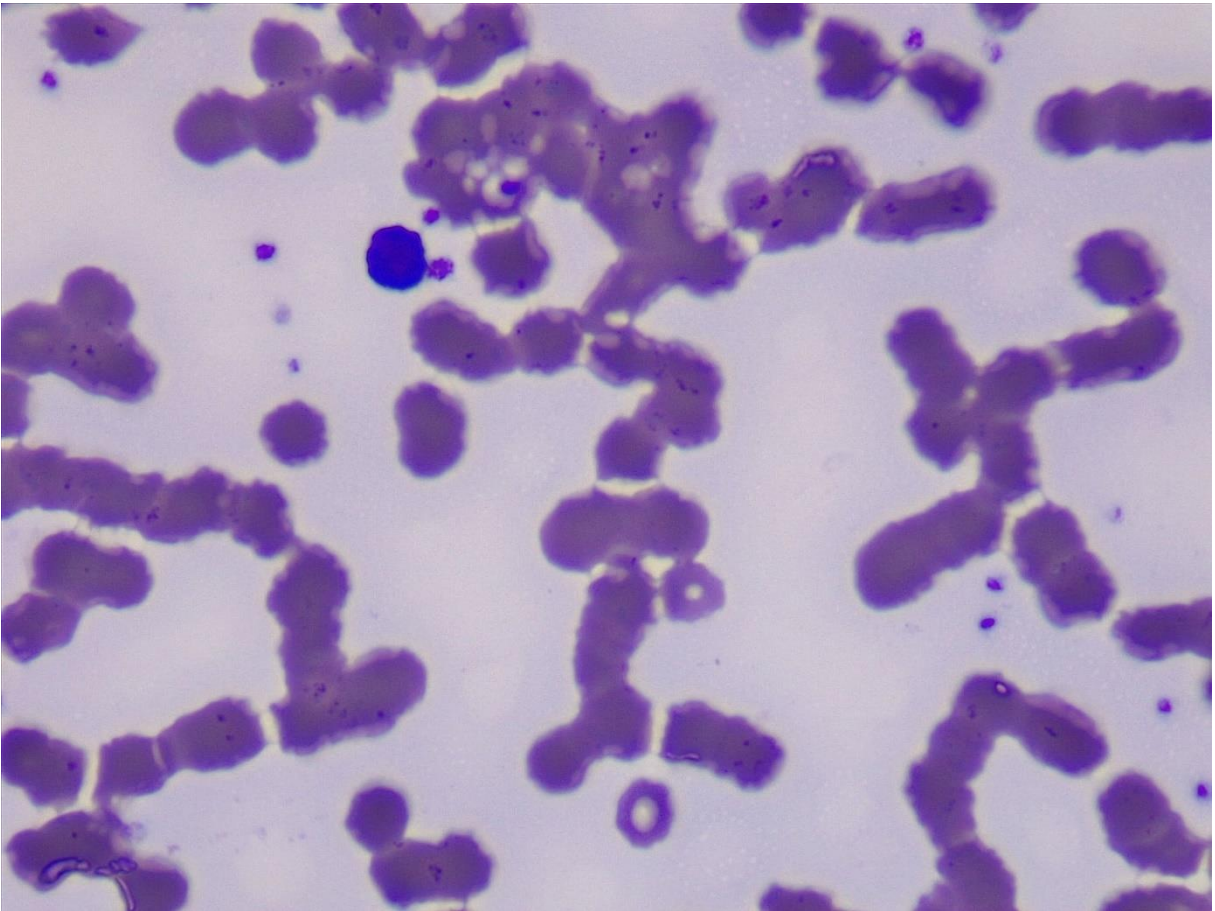
Individuo 4	Imagen 7
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



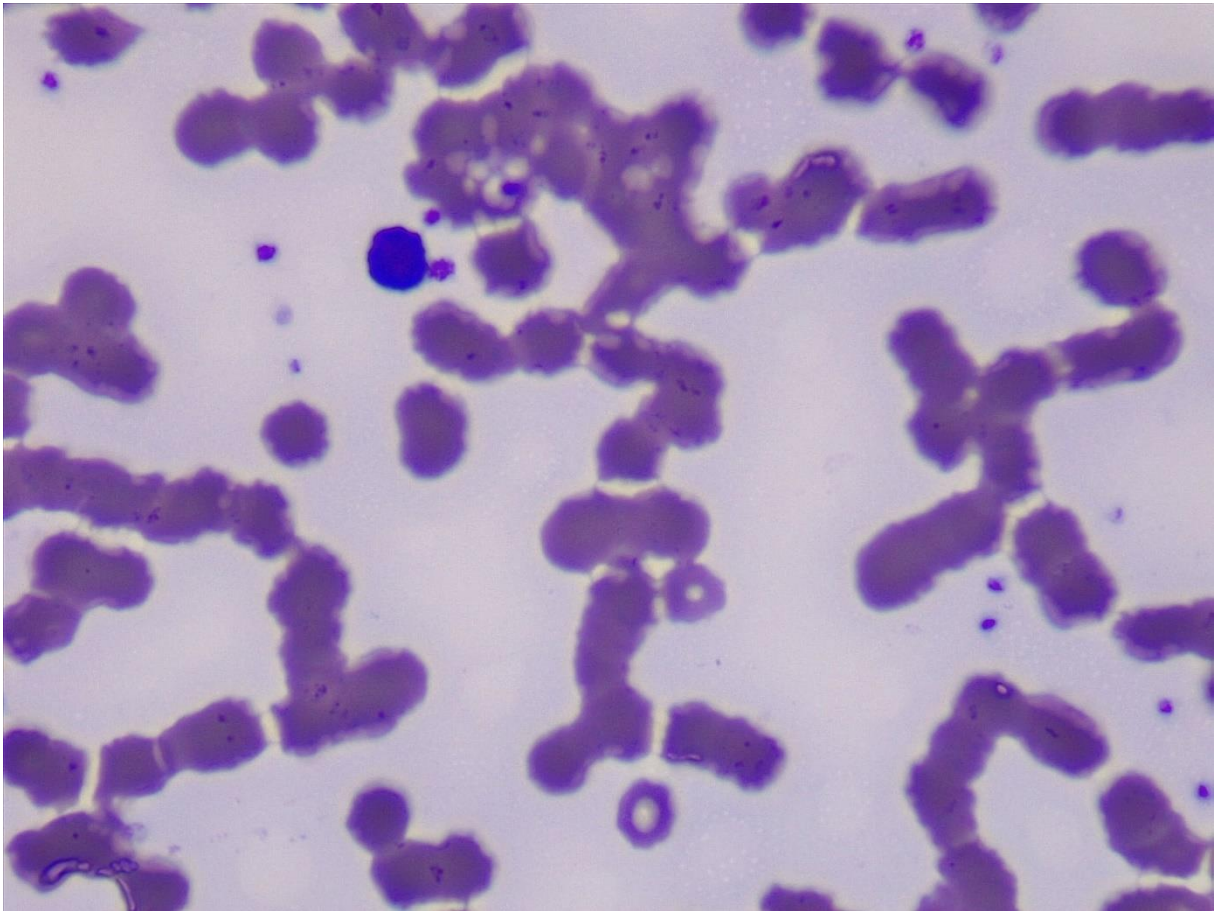
Individuo 4	Imagen 8
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



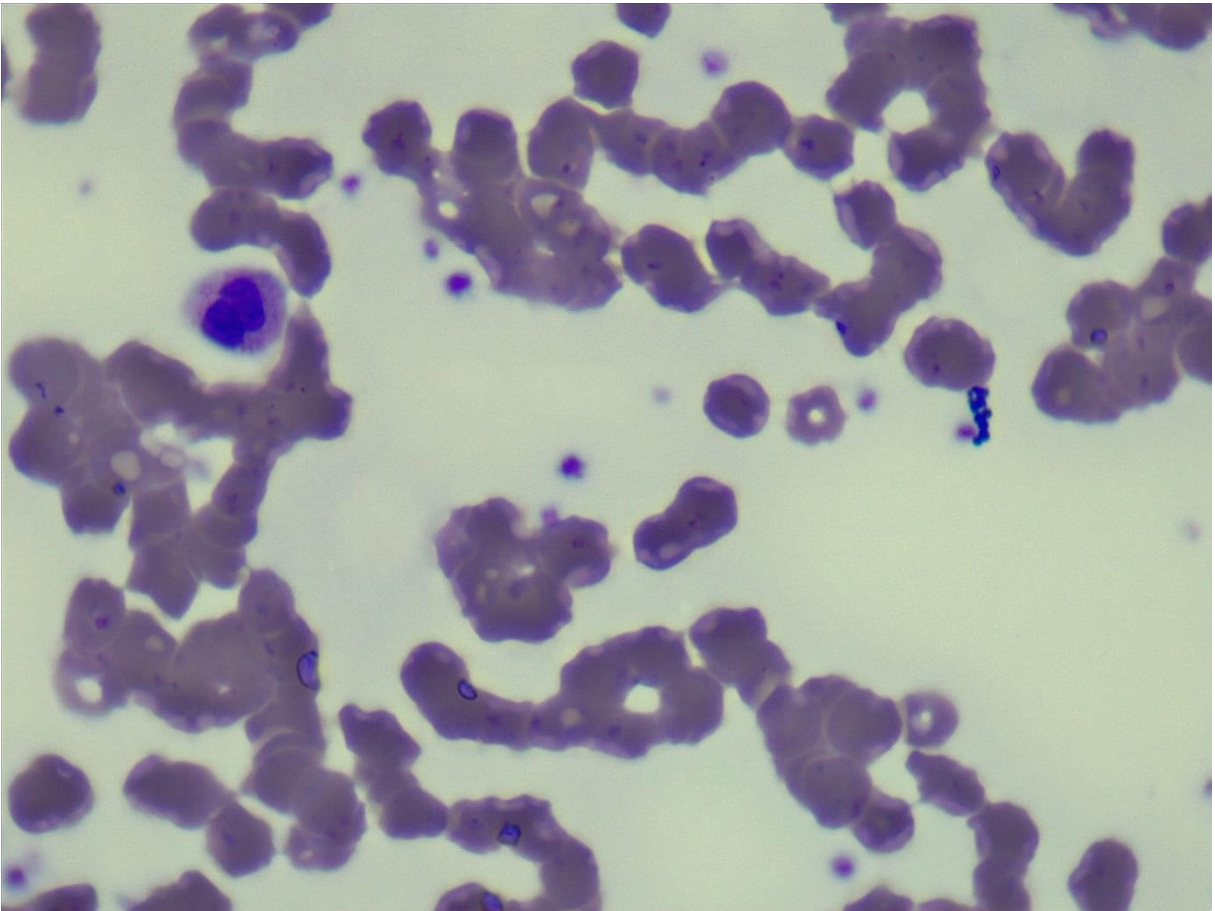
Individuo 4	Imagen 9
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



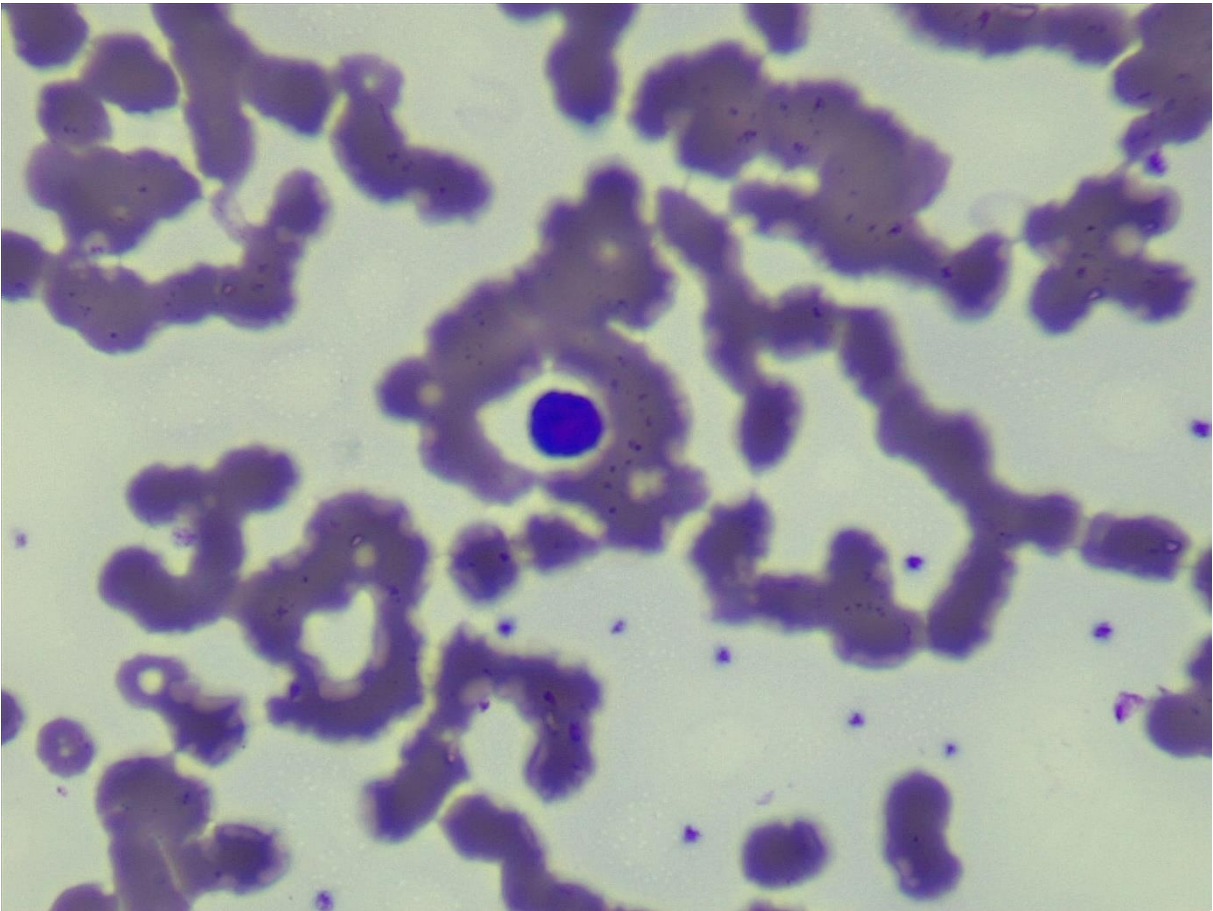
Individuo 4	Imagen 10
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



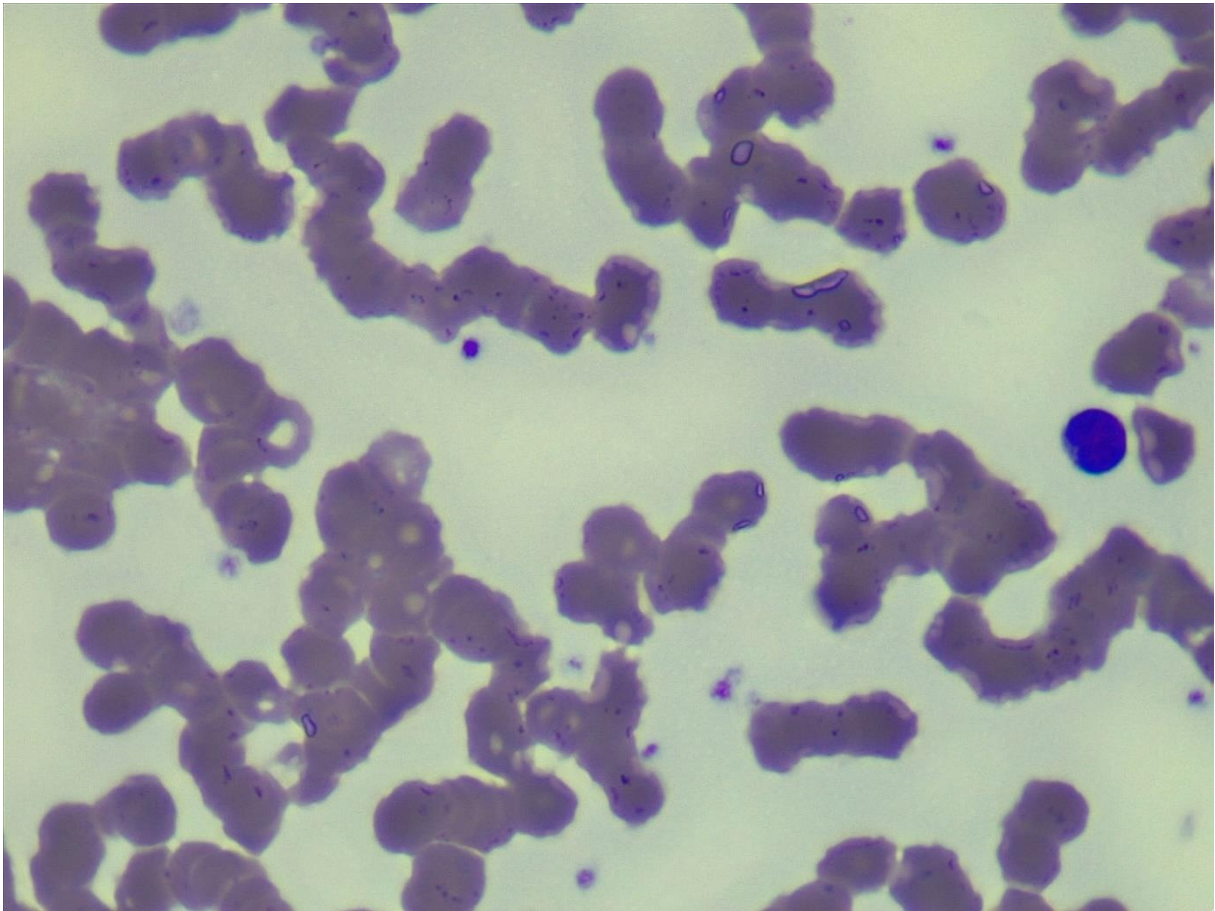
Individuo 4	Imagen 11
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



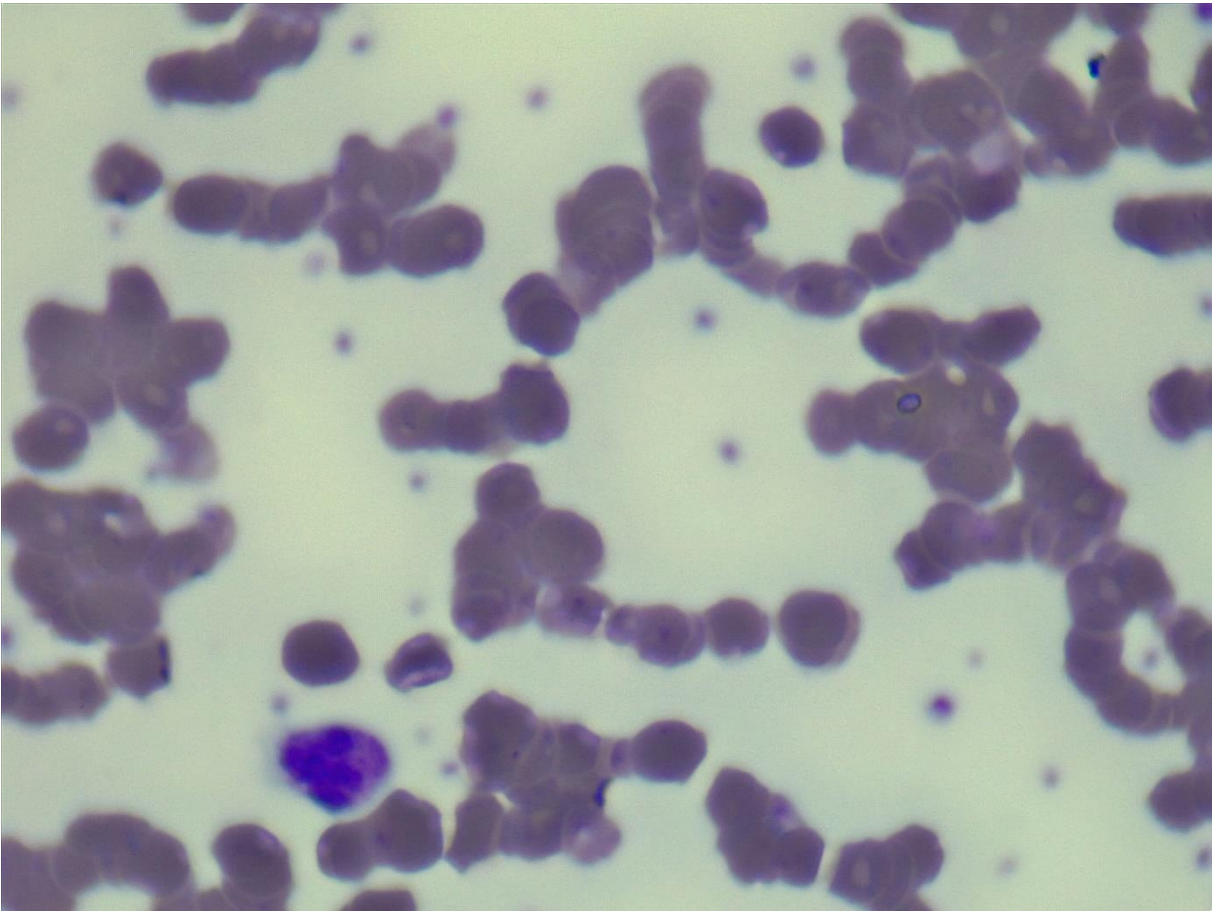
Individuo 4	Imagen 12
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



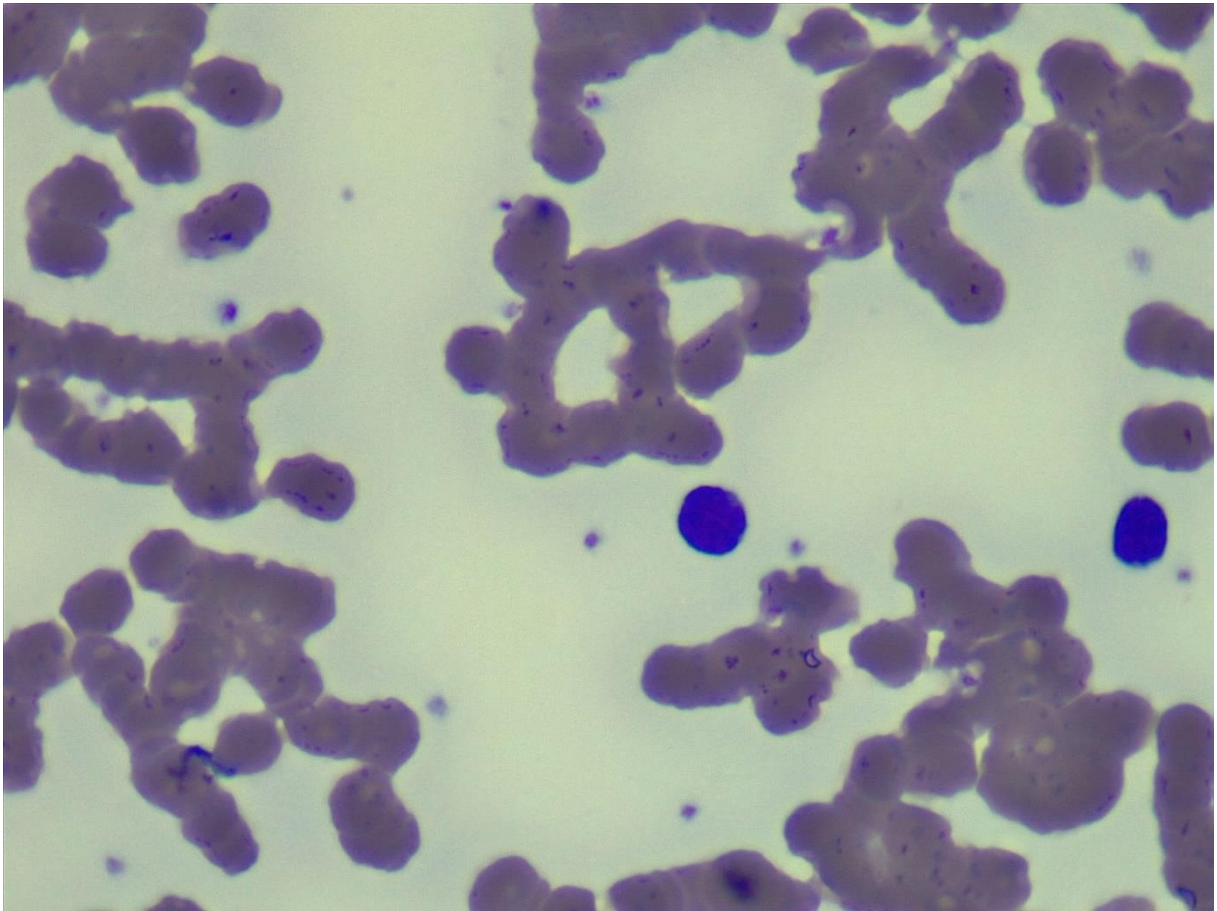
Individuo 4	Imagen 13
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



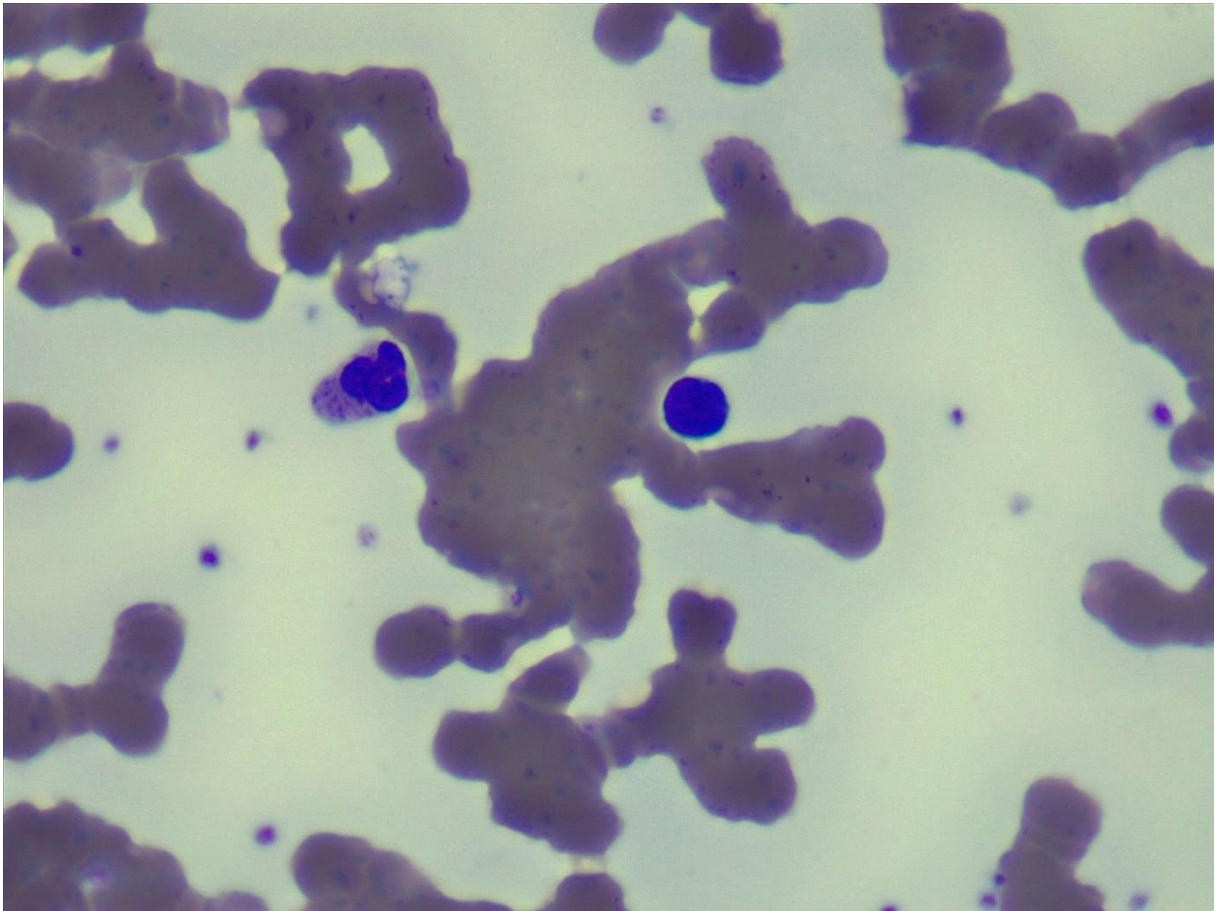
Individuo 4	Imagen 14
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



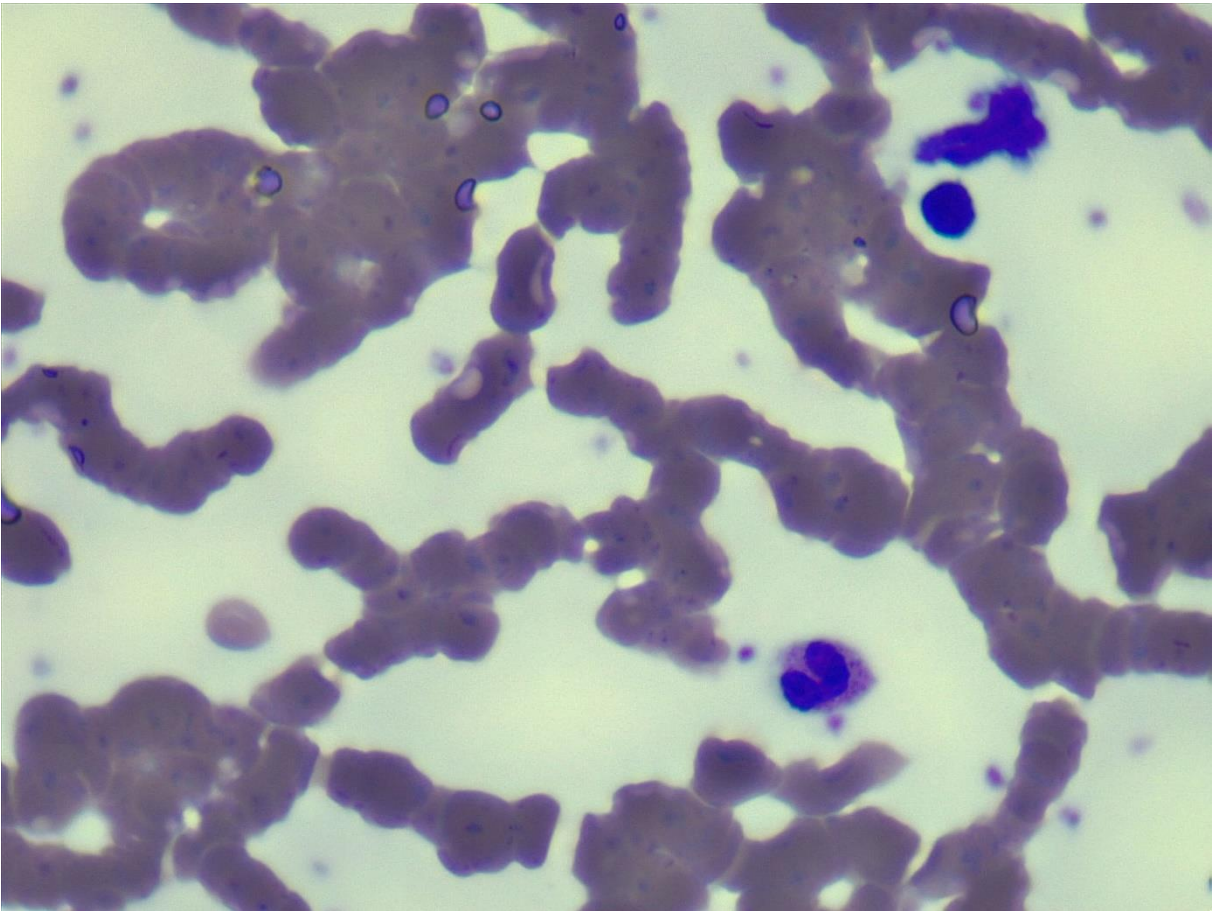
Individuo 4	Imagen 15
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



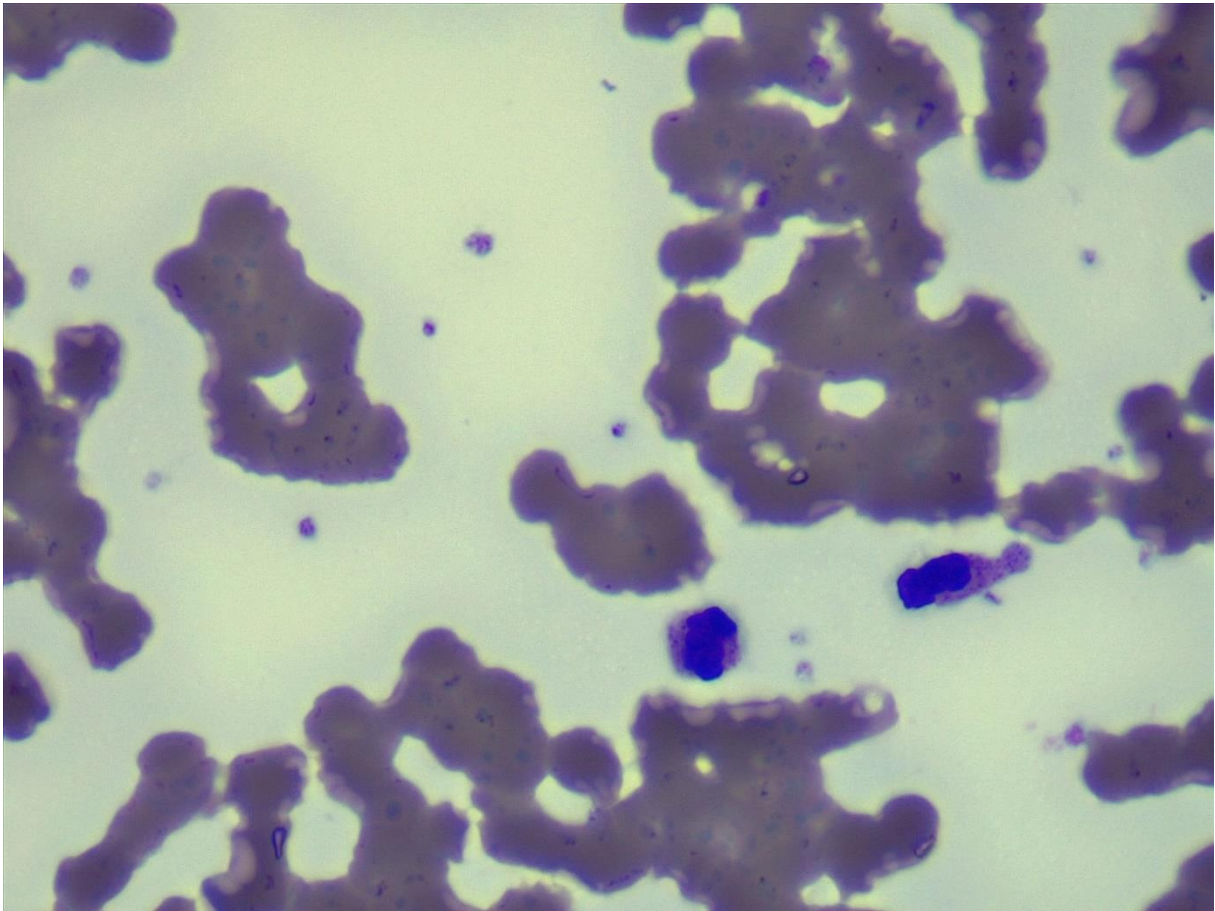
Individuo 4	Imagen 16
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



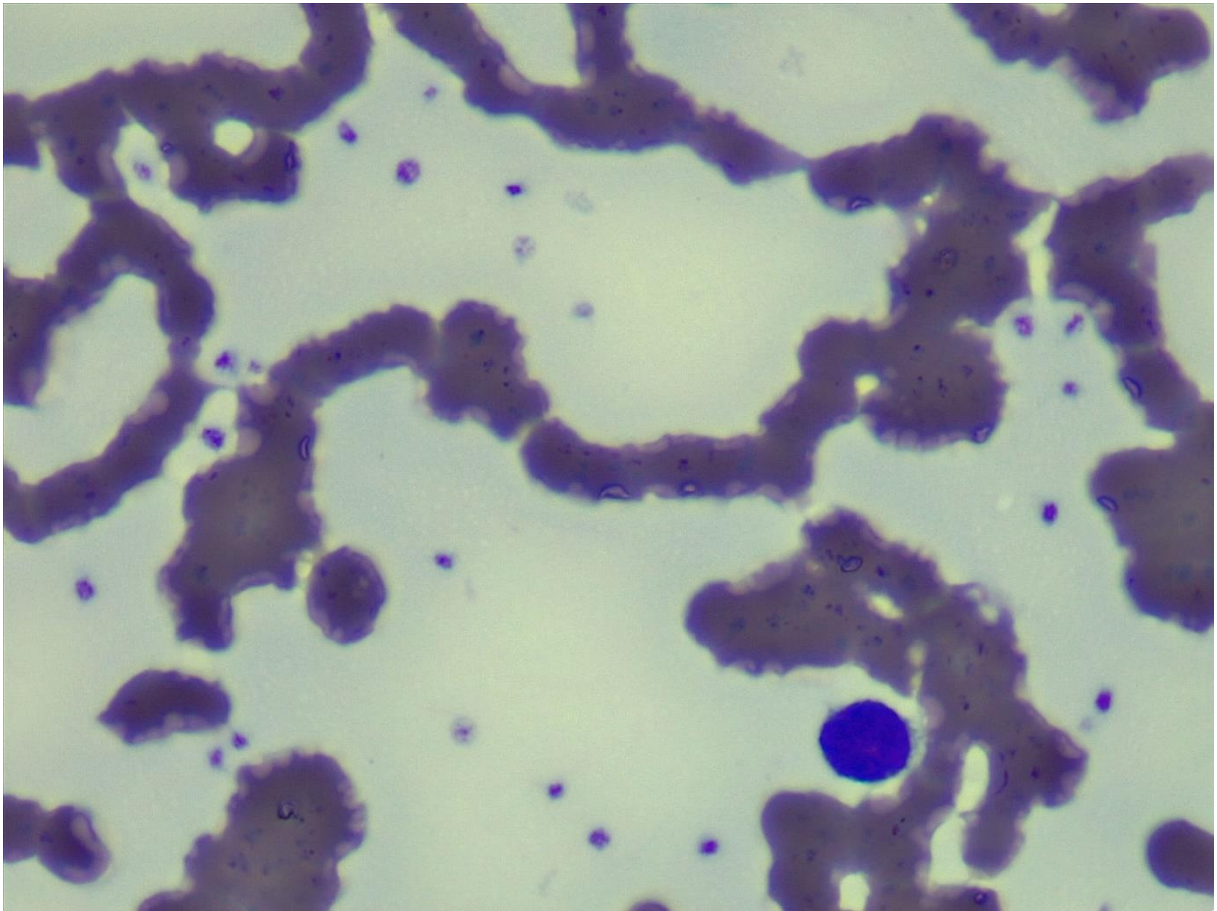
Individuo 4	Imagen 17
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



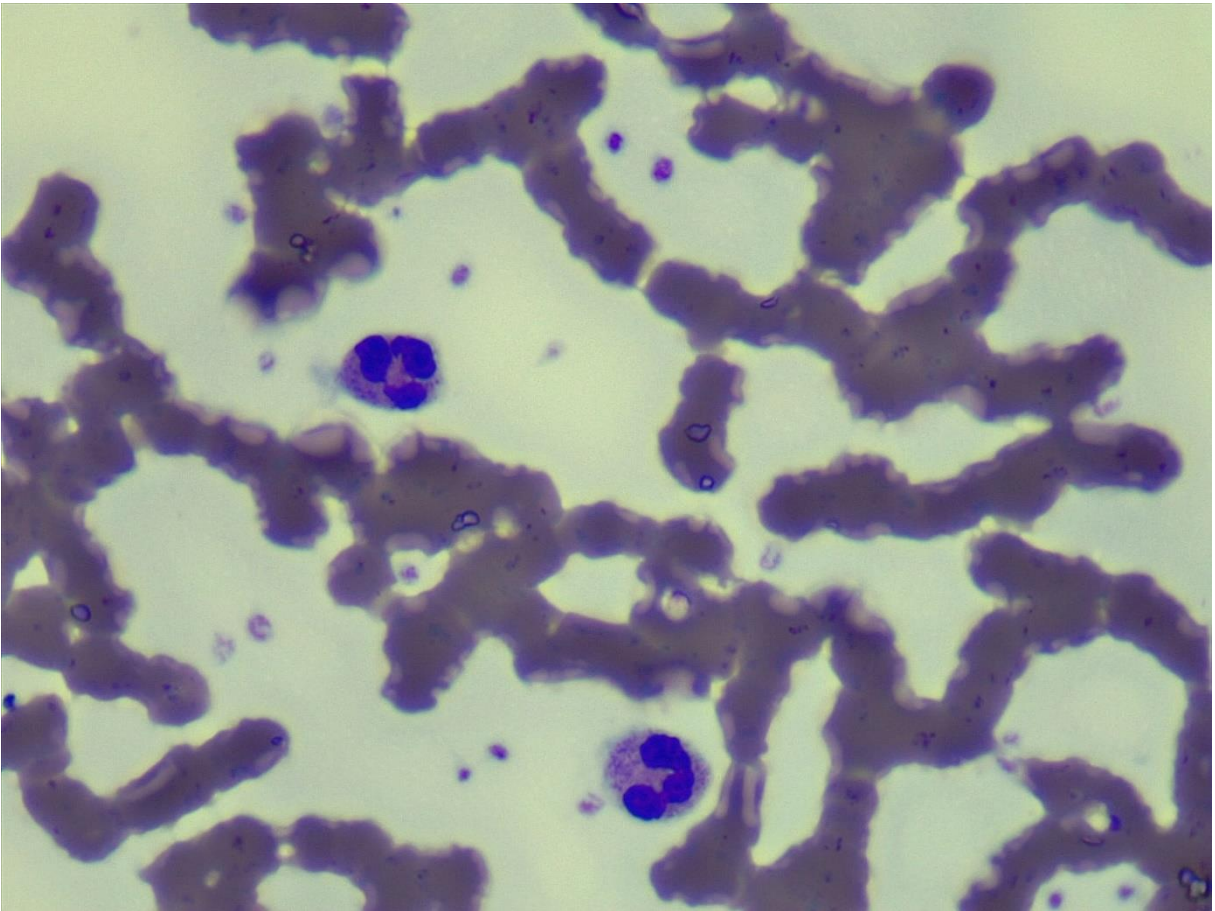
Individuo 4	Imagen 18
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



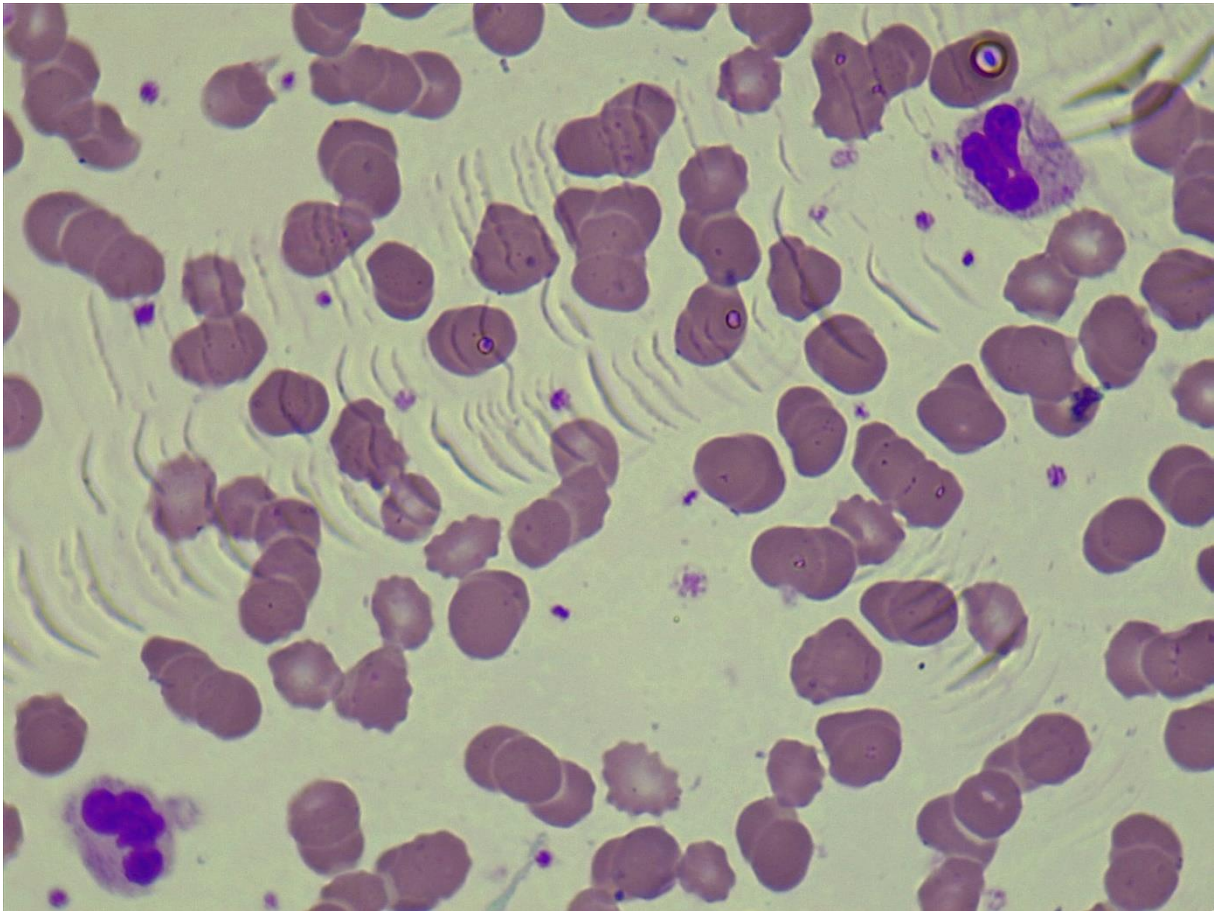
Individuo 4	Imagen 19
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



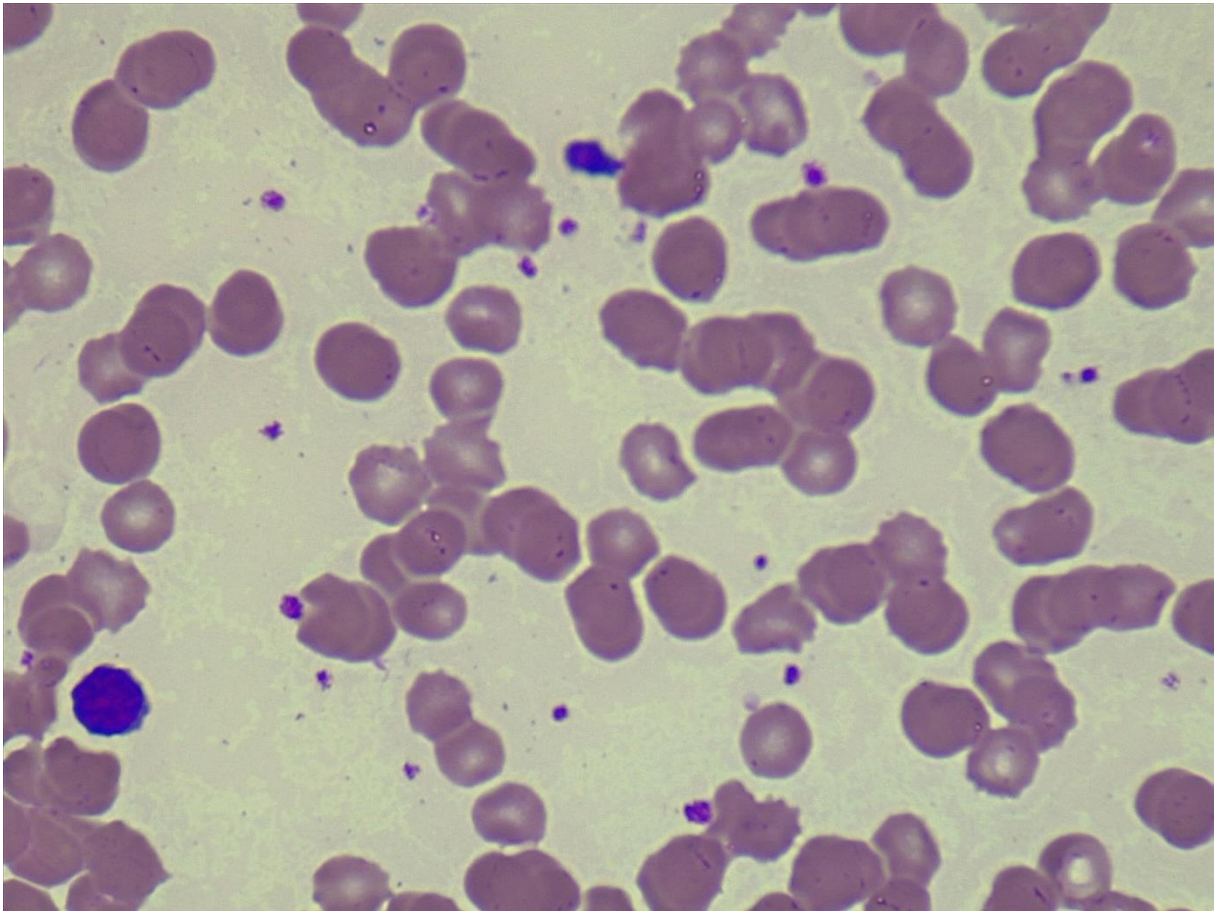
Individuo 4	Imagen 20
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



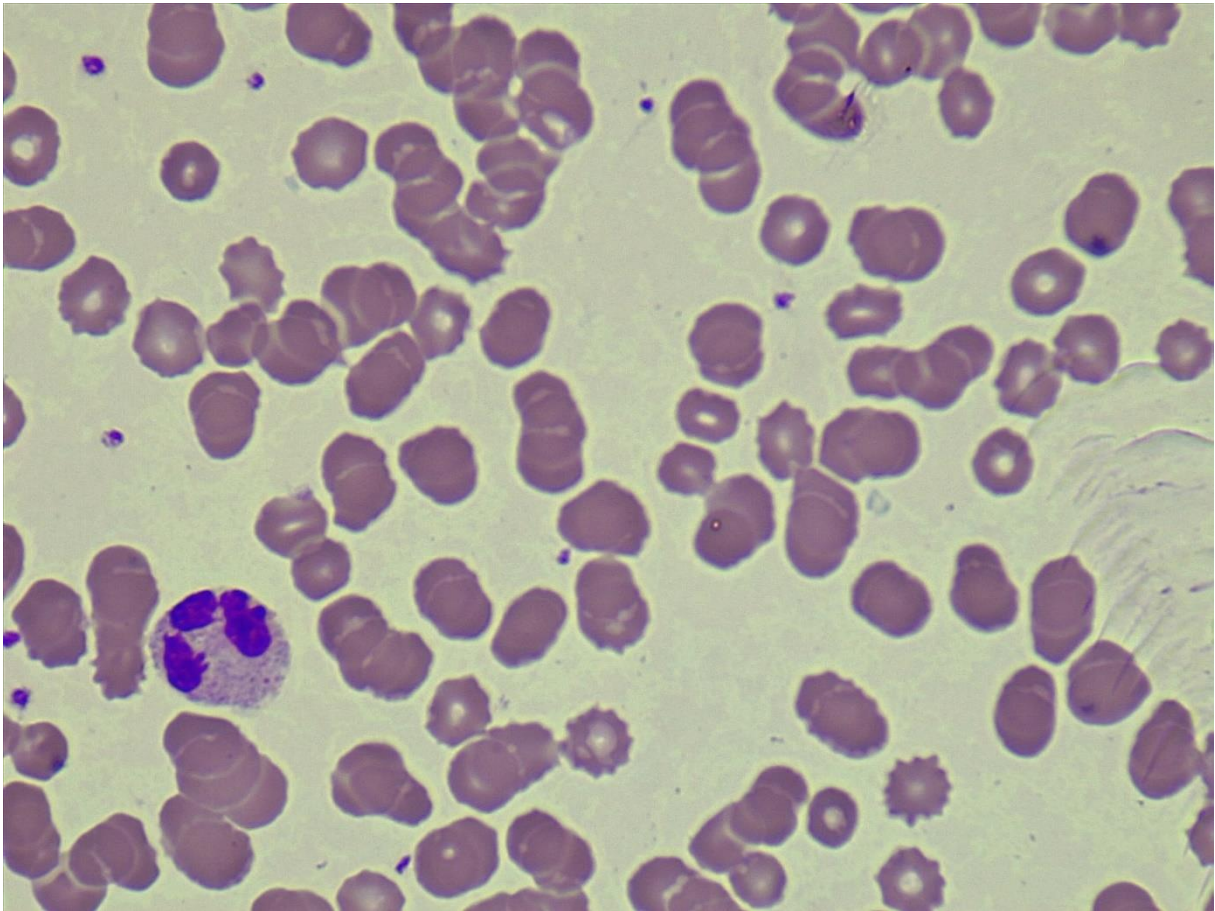
Individuo 5	Imagen 1
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



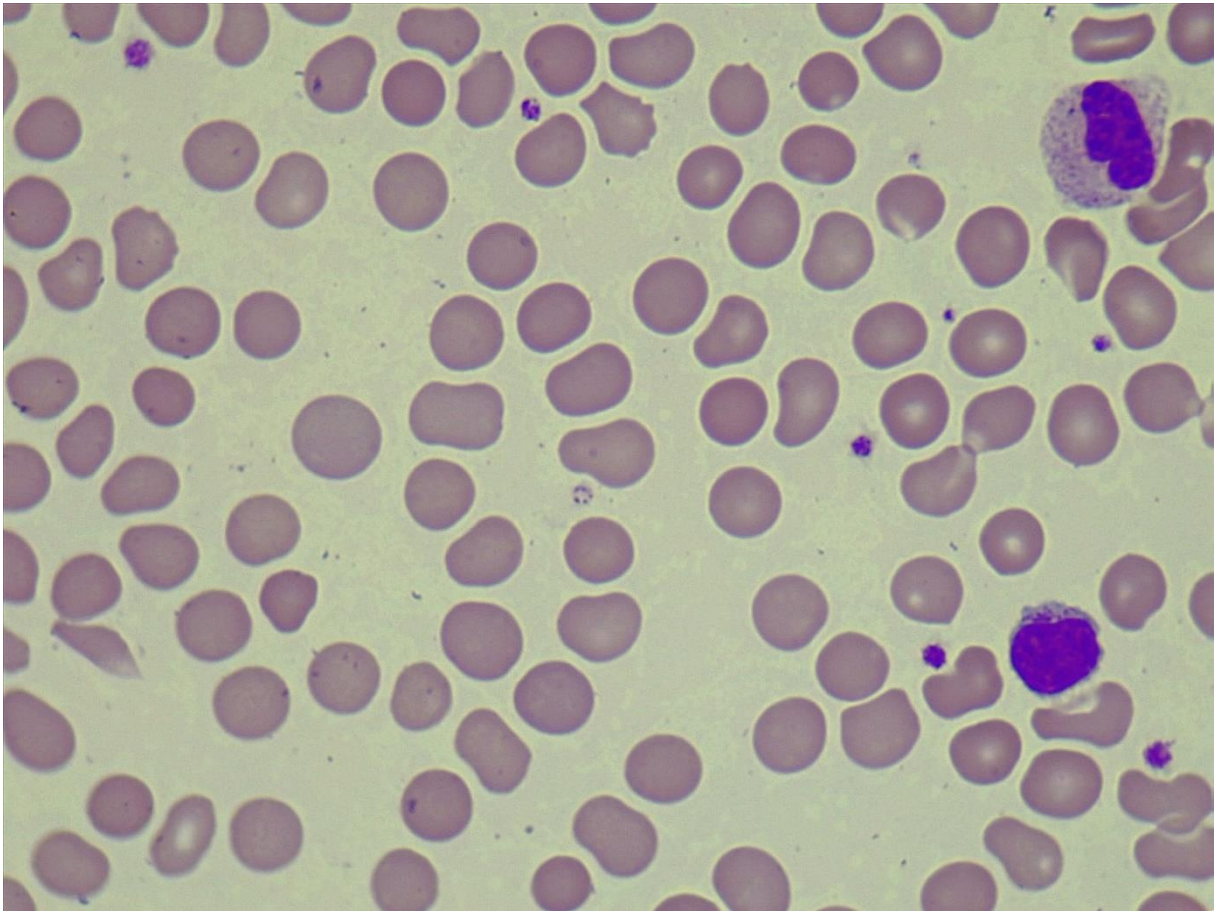
Individuo 5	Imagen 2
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



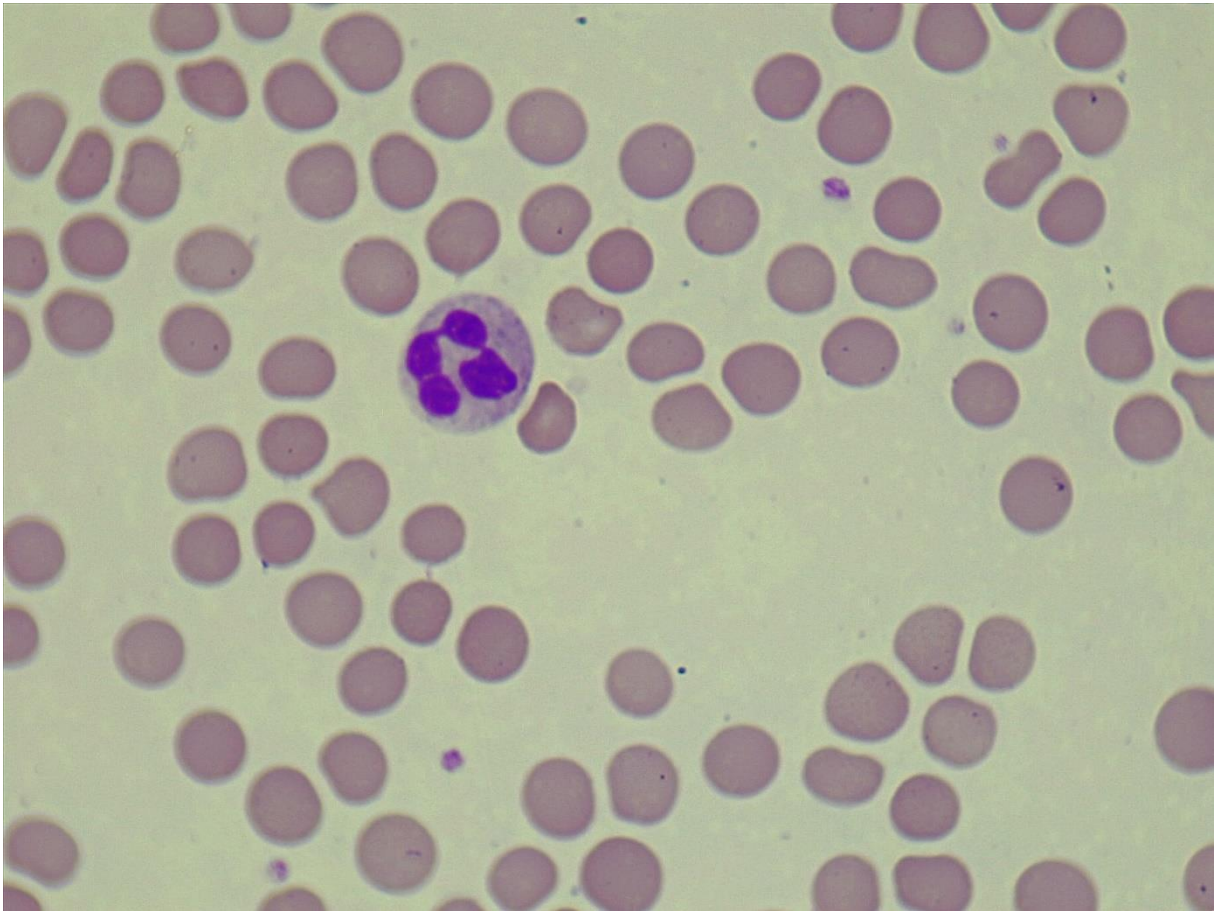
Individuo 5	Imagen 3
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



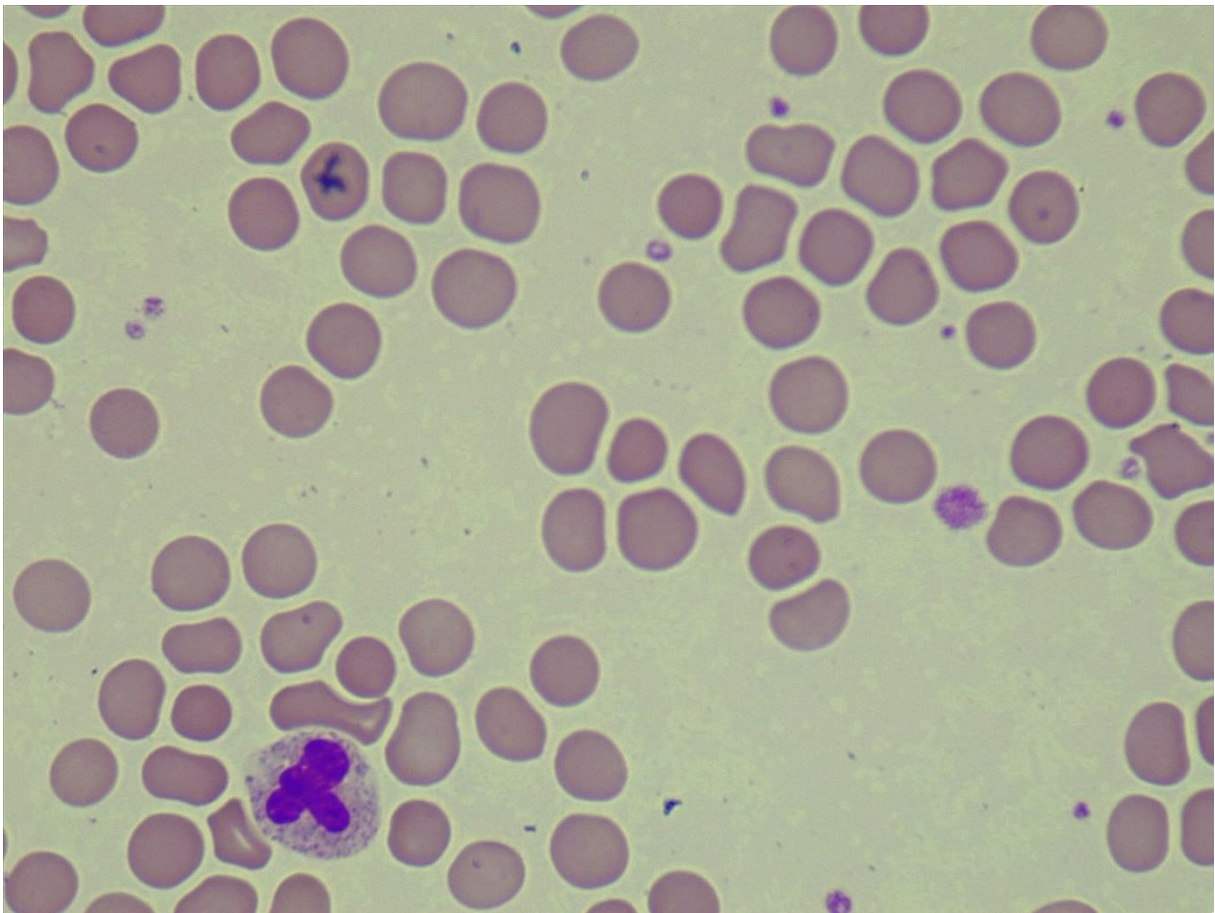
Individuo 5	Imagen 4
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



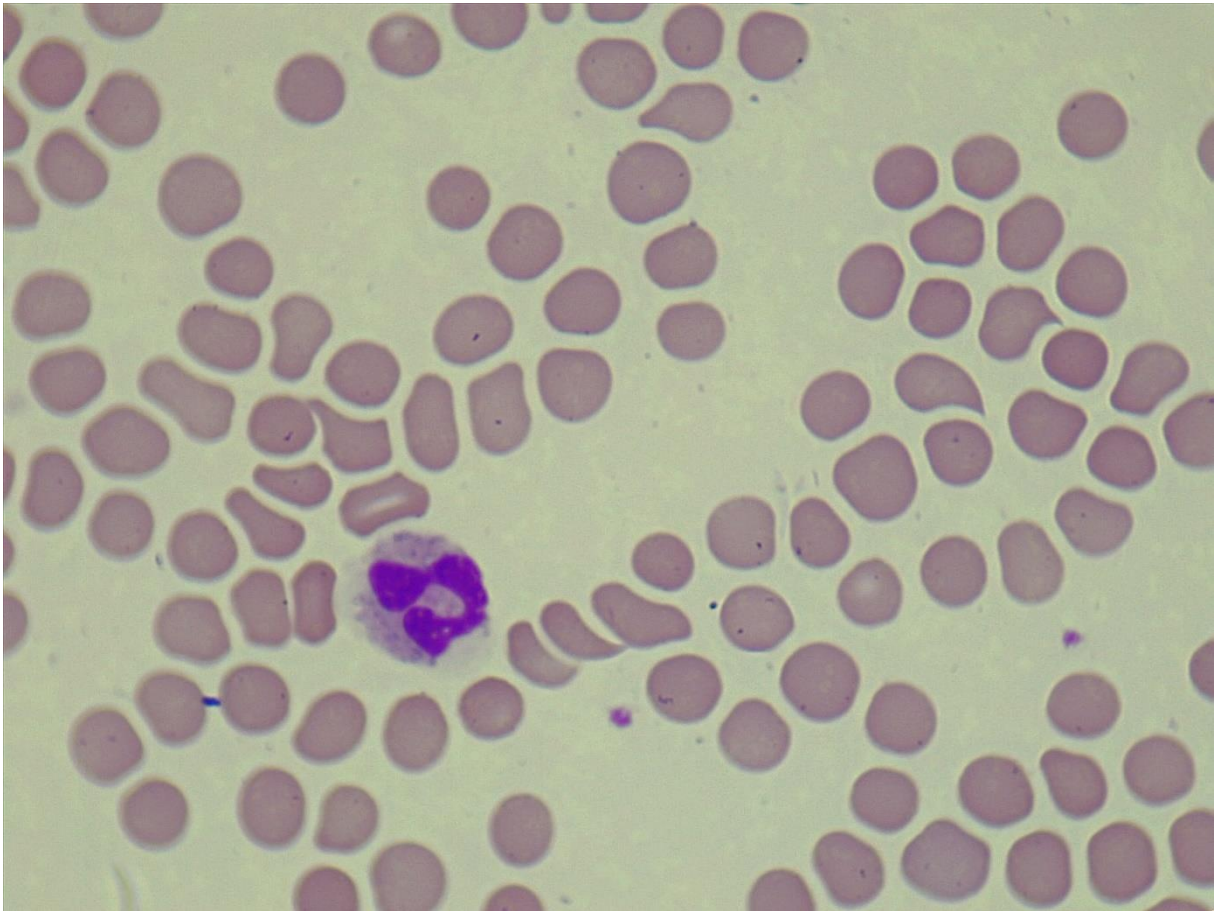
Individuo 5	Imagen 5
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



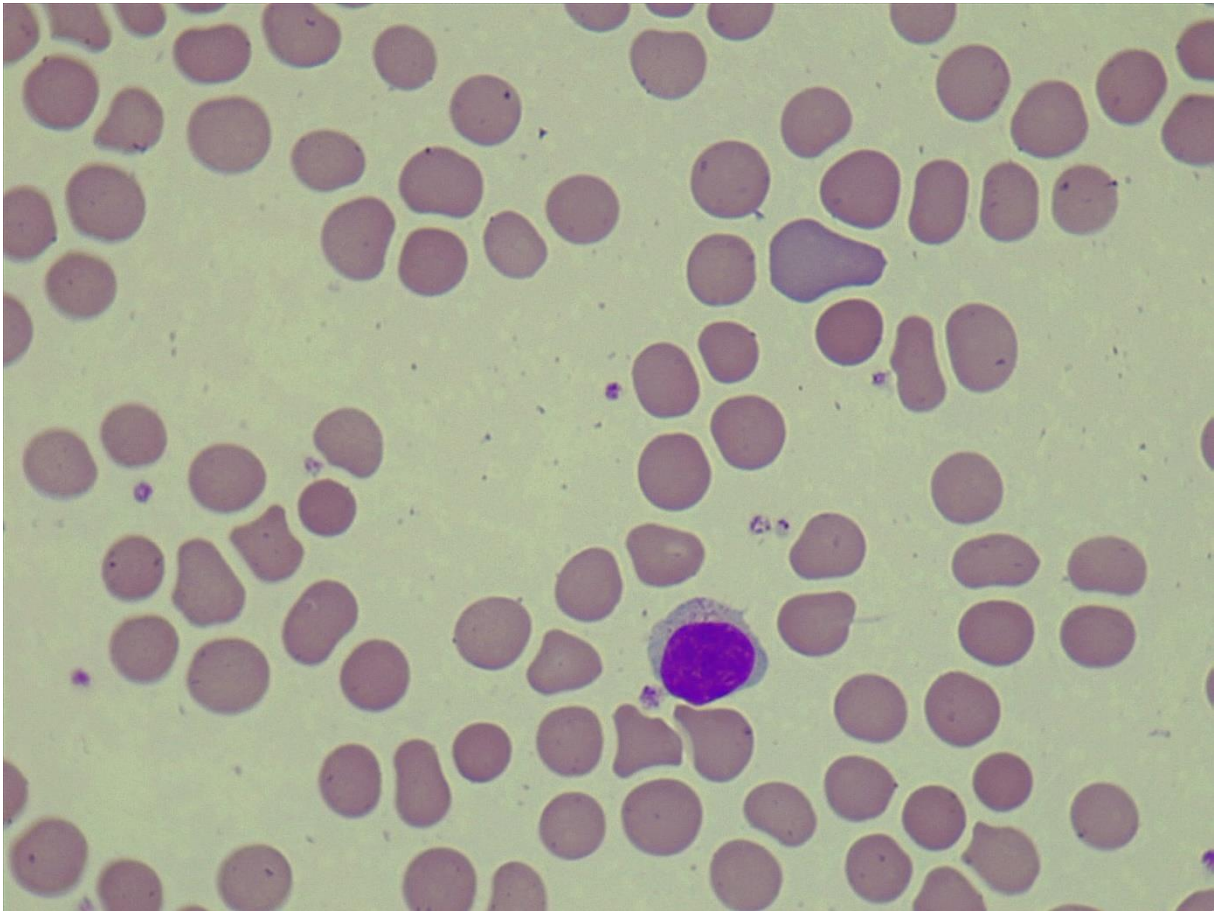
Individuo 5	Imagen 6
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



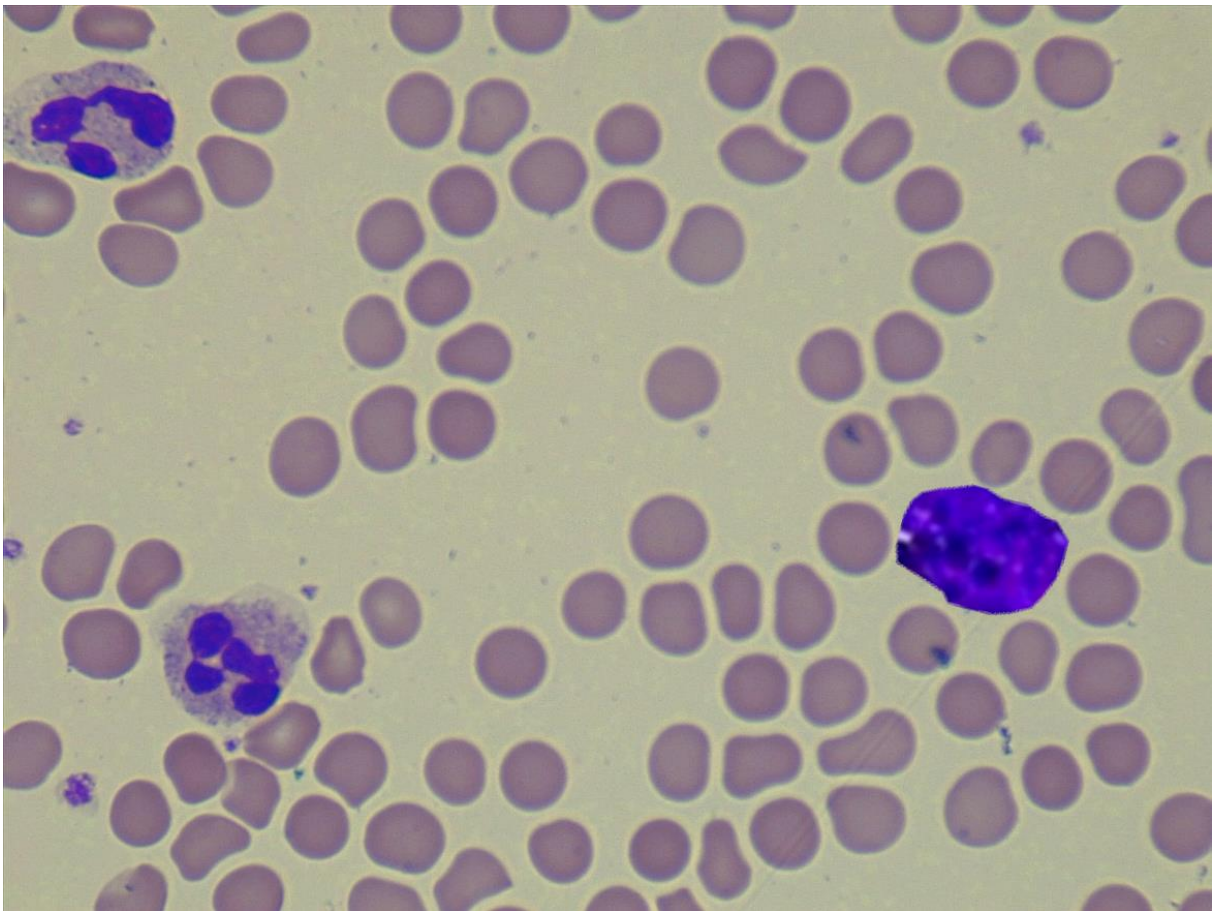
Individuo 5	Imagen 7
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



Individuo 5	Imagen 8
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



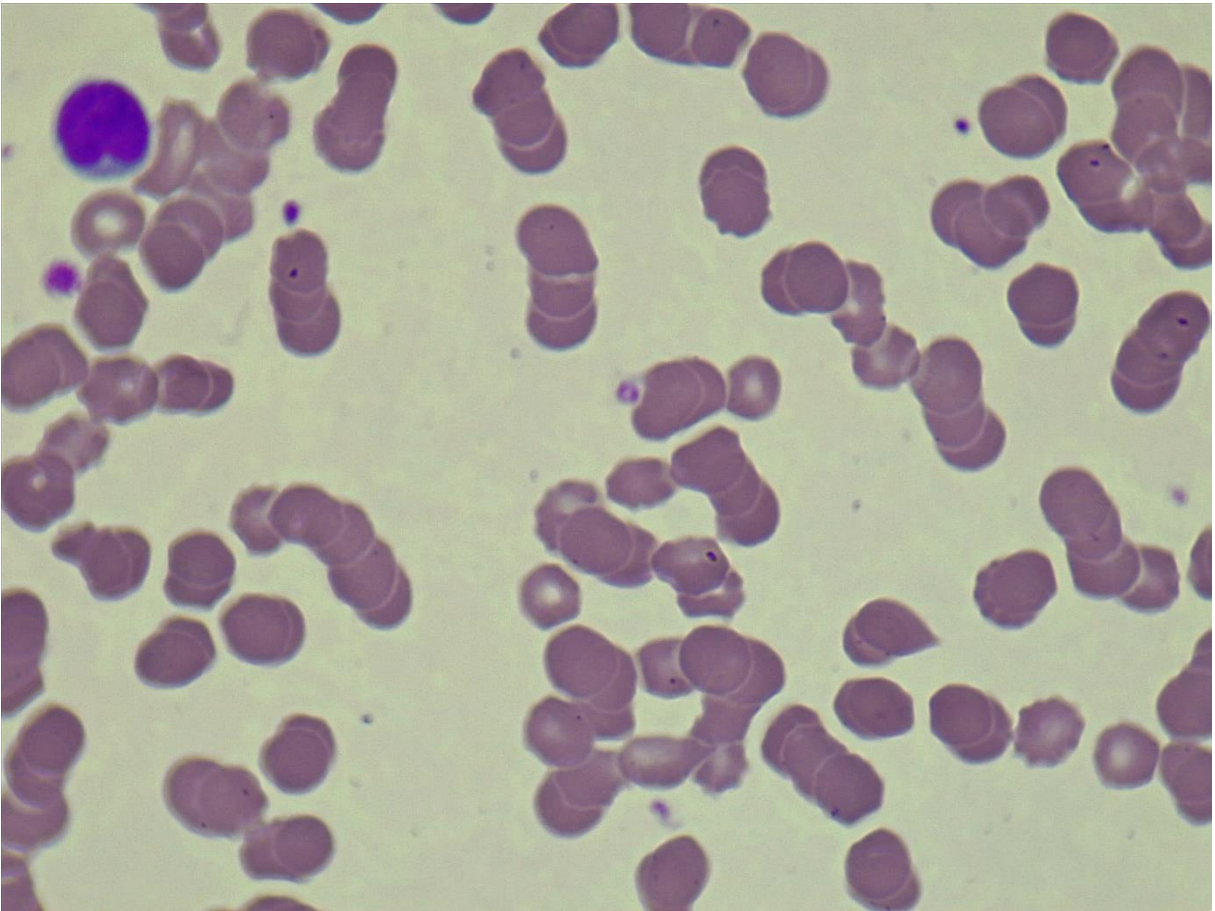
Individuo 5	Imagen 9
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	1
Monocito	0
Eosinófilo	0



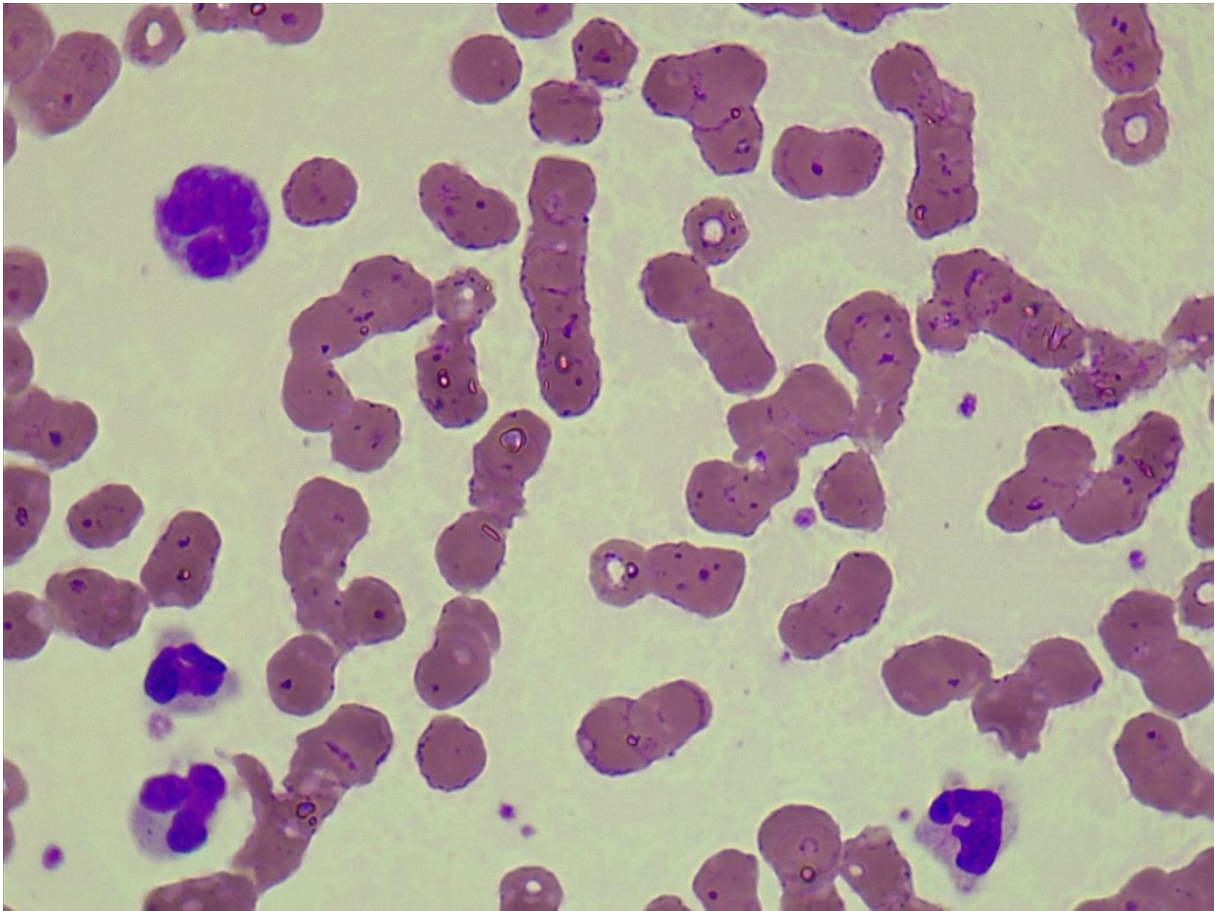
Individuo 5	Imagen 10
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



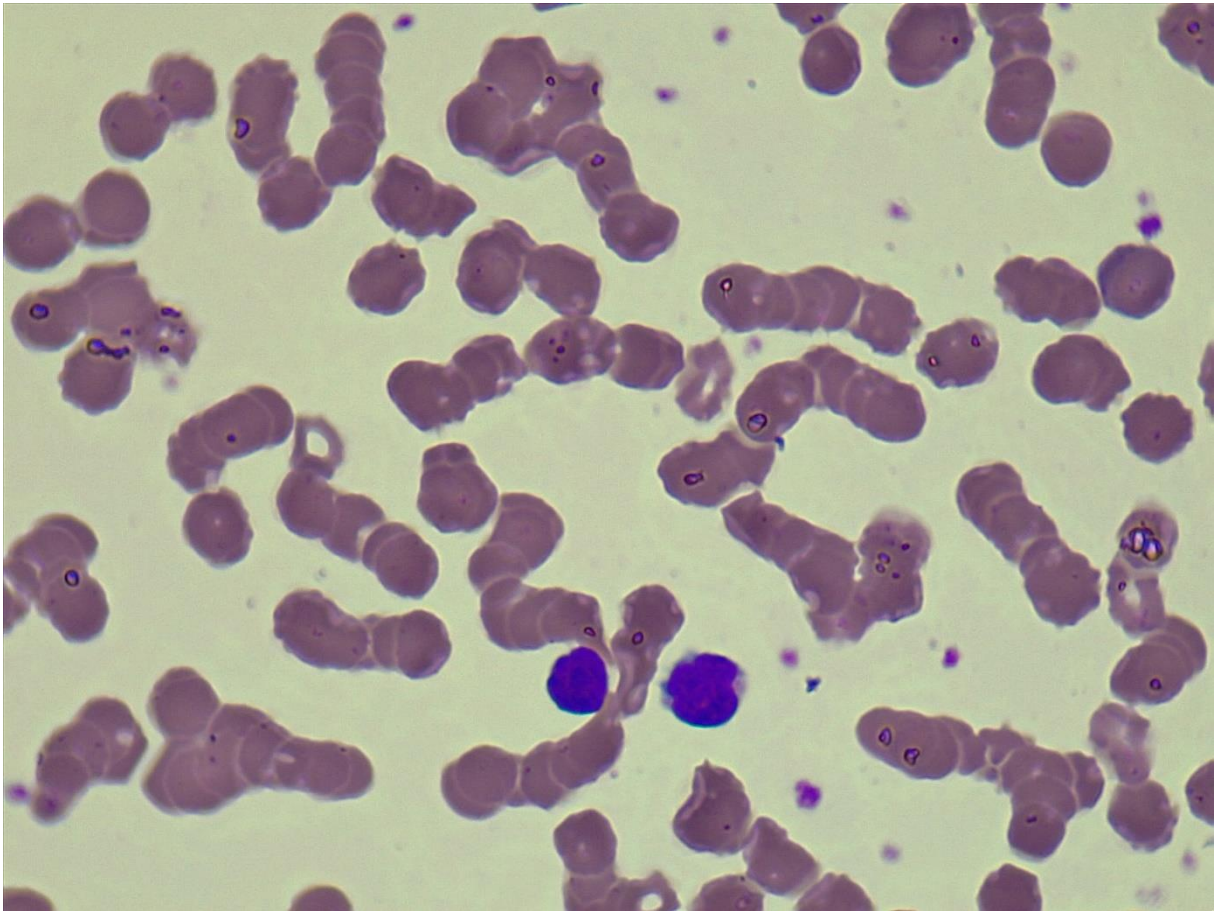
Individuo 5	Imagen 11
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



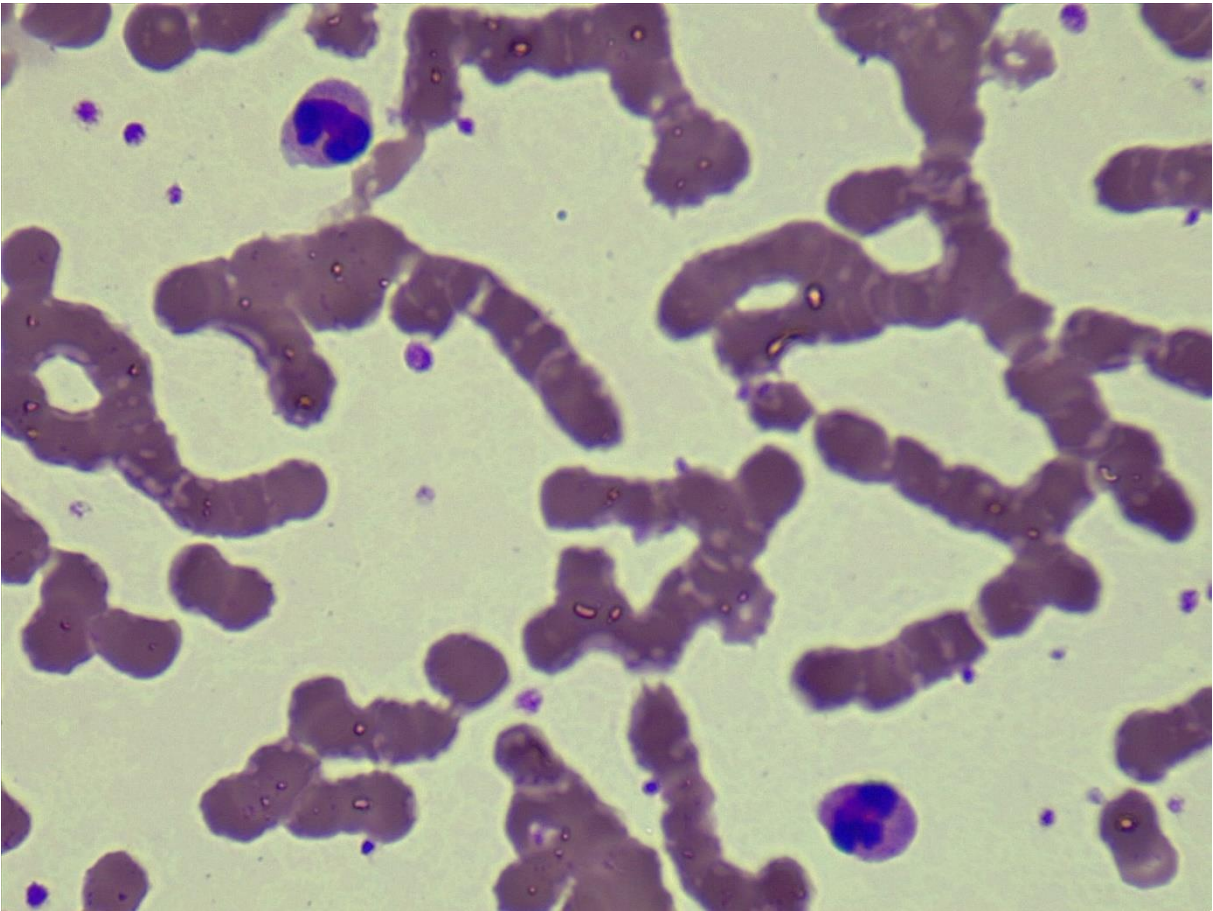
Individuo 5	Imagen 12
Célula	Cantidad
Neutrófilo	3
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



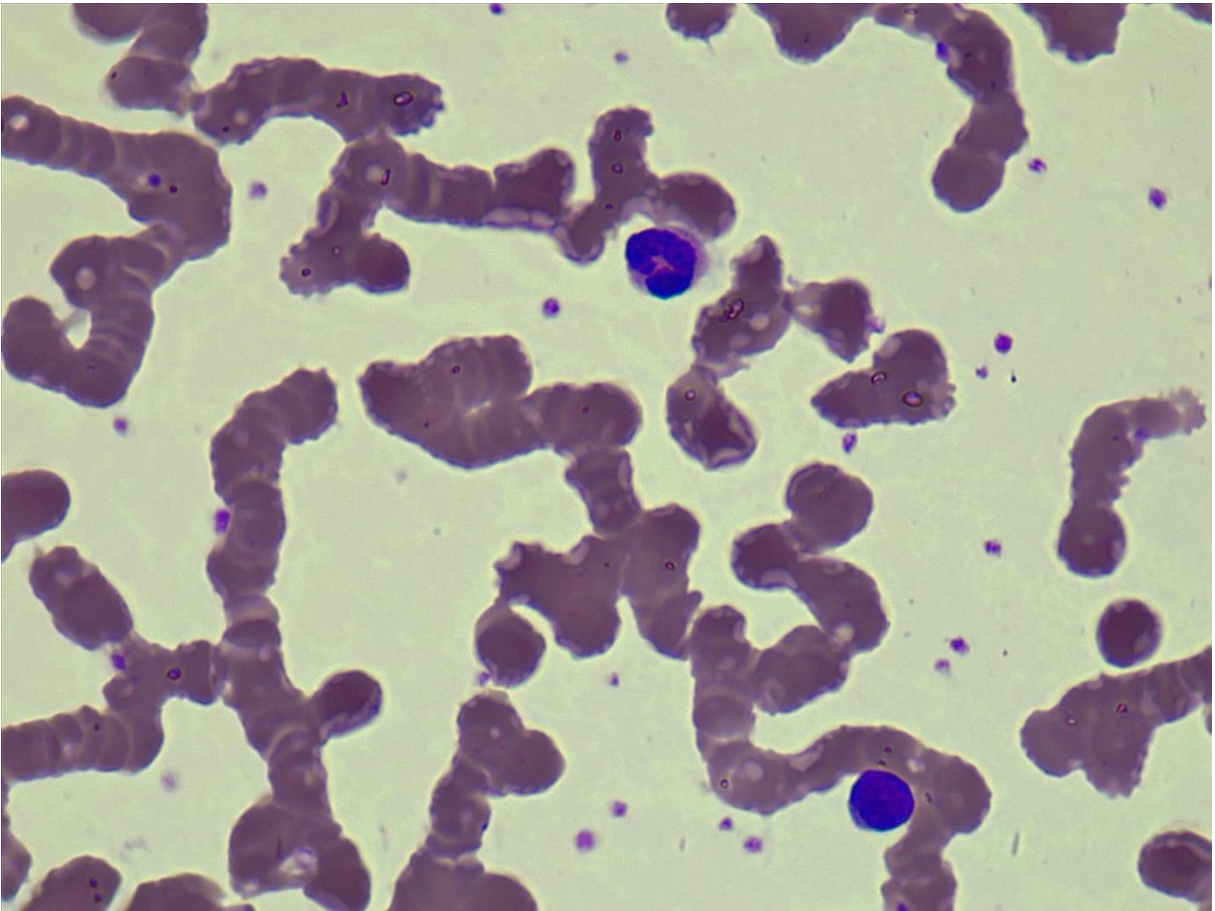
Individuo 5	Imagen 13
Célula	Cantidad
Neutrófilo	0
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



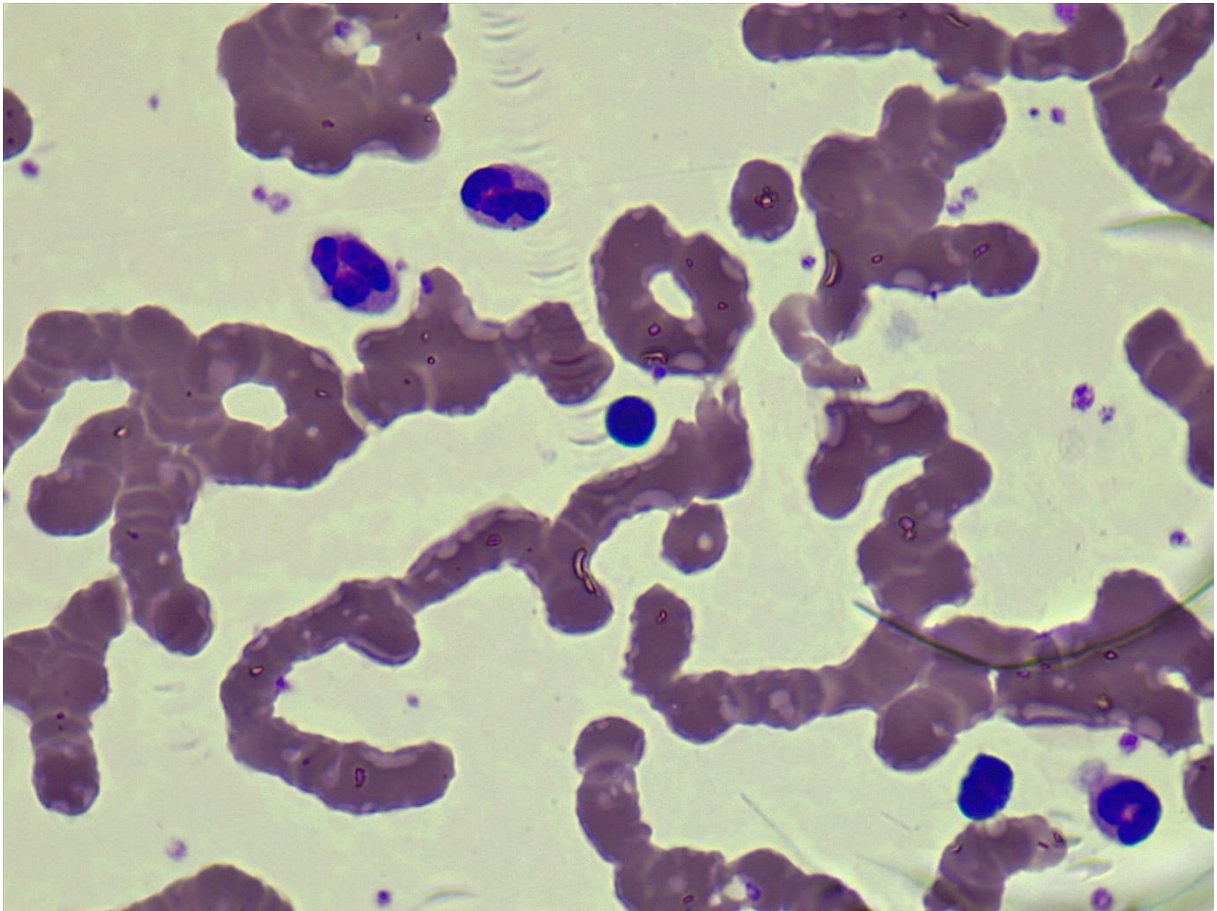
Individuo 5	Imagen 14
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



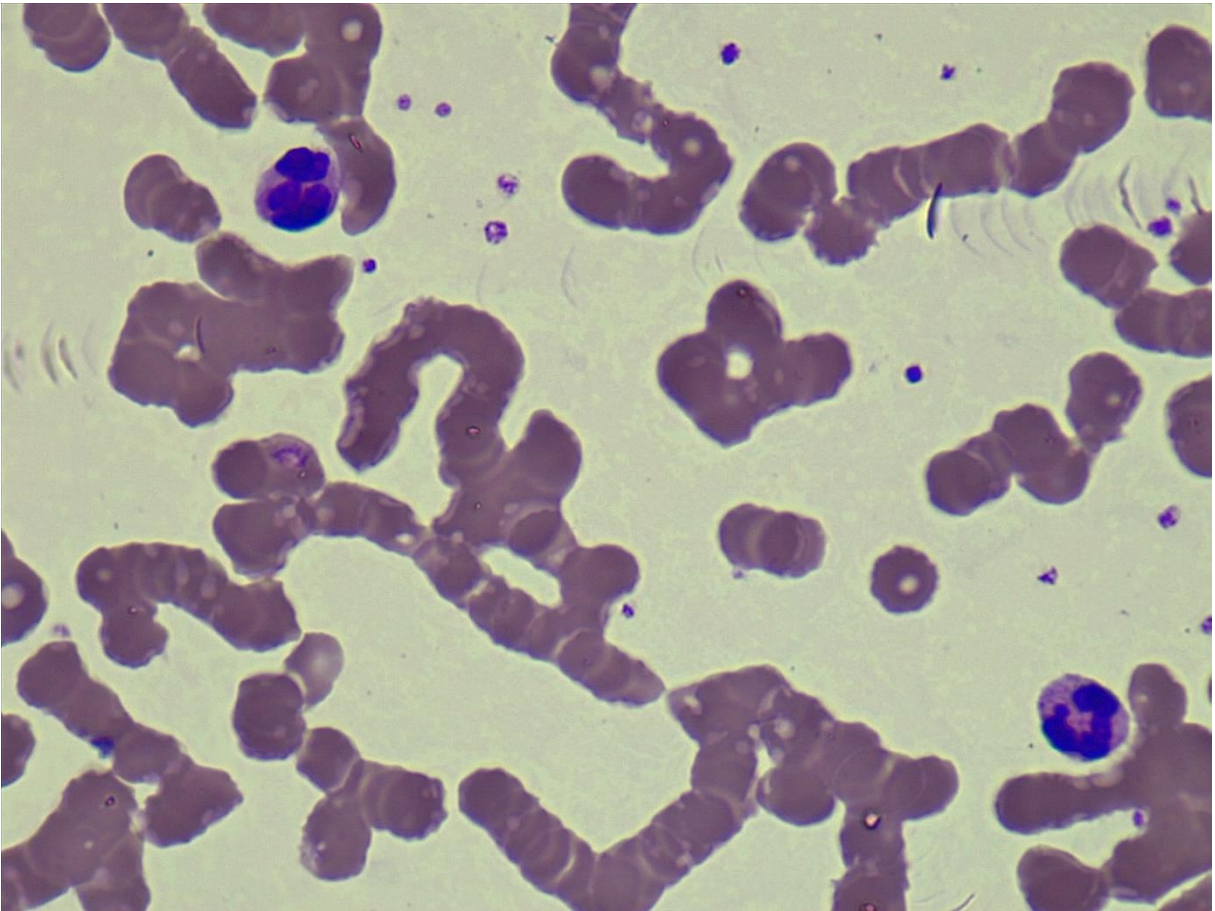
Individuo 5	Imagen 15
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



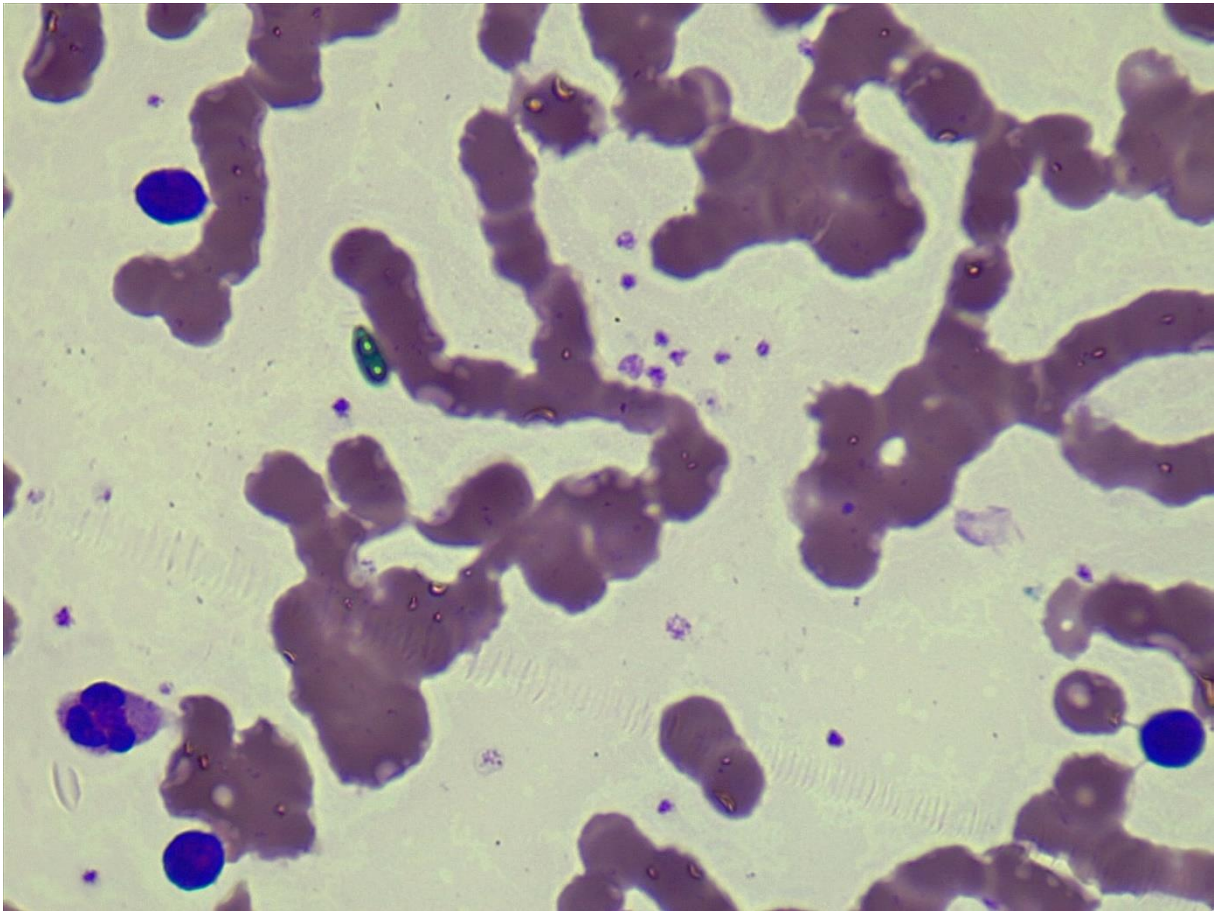
Individuo 5	Imagen 16
Célula	Cantidad
Neutrófilo	3
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



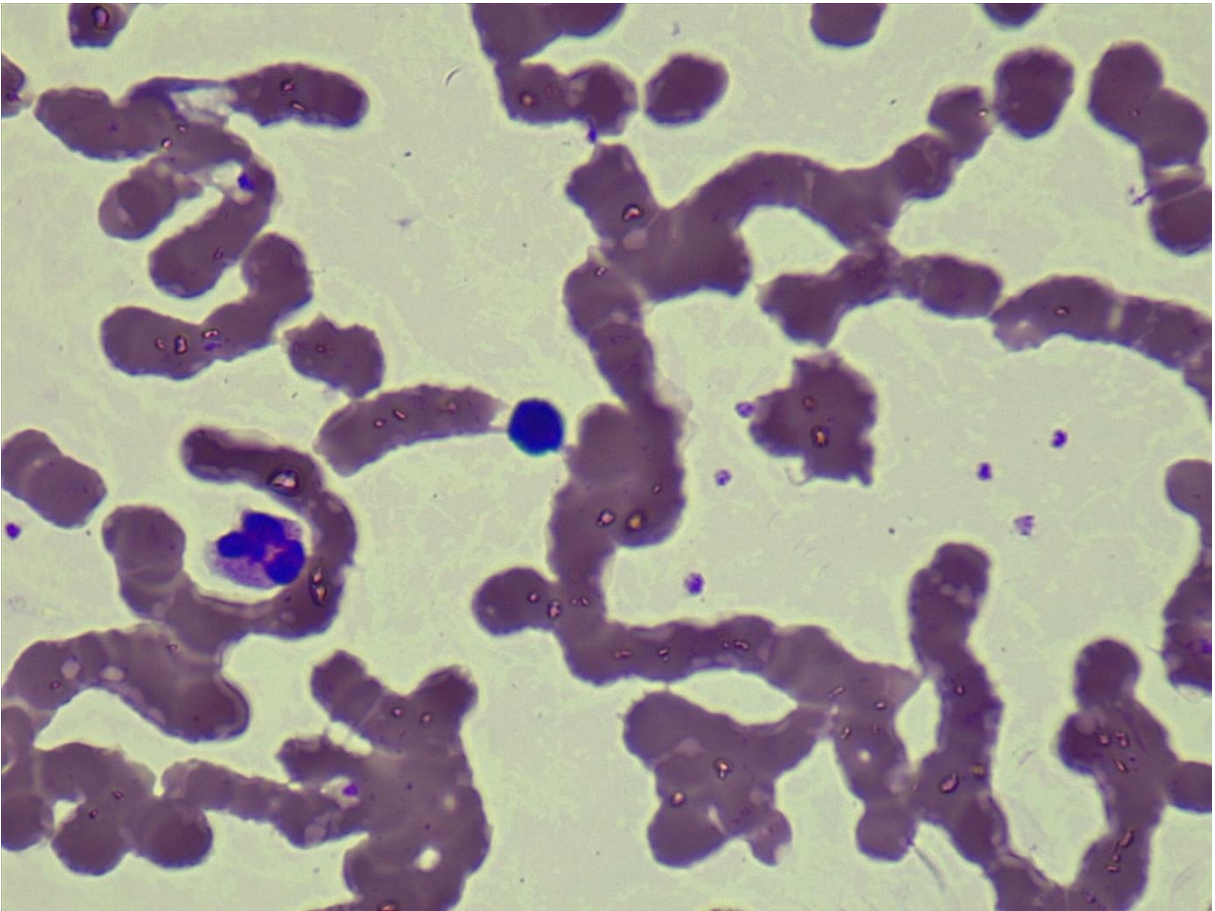
Individuo 5	Imagen 17
Célula	Cantidad
Neutrófilo	2
Linfocito	0
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



Individuo 5	Imagen 18
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	3
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



Individuo 5	Imagen 19
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	1
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0



Individuo 5	Imagen 20
Célula	Cantidad
Neutrófilo	1
Linfocito	2
Basófilo	0
Monocito	0
Eosinófilo	0

