

Clasificación automática de formas patológicas de eritrocitos humanos

Automatic classification of pathological shapes in human erythrocytes

Marcela Mejía F.¹, Marco A. Alzate M.²

¹ Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingeniería, Angela.mejia@unimilitar.edu.co

² Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ingeniería, malzate@udistrital.edu.co

Received: 27/05/2015. Modified: 31/08/2015. Accepted: 16/10/2015

Resumen

Contexto: La clasificación de variaciones morfológicas de eritrocitos suele hacerse mediante la observación directa desde el microscopio por parte de un experto, con base en criterios cualitativos, lo cual conduce a diagnósticos subjetivos. Las propuestas para automatizar este proceso suelen clasificar los eritrocitos en normales o anormales, sin especificar el tipo de anomalía que indique la presencia de alguna enfermedad. Desarrollamos una herramienta para apoyo diagnóstico que determina distintas formas patológicas de eritrocitos mediante características medidas desde la imagen microscópica.

Método: Detectamos los eritrocitos aislados usando procesos de segmentación por color y medimos algunas características discriminantes en cada célula detectada, incluyendo una medida novedosa de palidez central. Estas características se usan como entrada a una red neuronal que etiqueta la célula de acuerdo con siete tipos de anomalía.

Resultados: El sistema resultante alcanza una alta tasa de aciertos (97,3%) en comparación con los resultados de clasificación binaria encontrados en la literatura. La medida de palidez central es altamente discriminante, pues permite distinguir perfectamente los esferocitos de los normocitos, cuando otras características morfológicas son muy semejantes entre ellos.

Conclusiones: Nuestra contribución incluye la clasificación de múltiples clases de eritrocitos y la propuesta de una medida de palidez central altamente discriminante. Se verificó la utilidad de combinar técnicas de pre-procesamiento para extracción de características con redes neuronales para clasificación en el espacio de características. Para el trabajo futuro sería deseable disponer de un mayor número de imágenes con muestras estadísticamente significativas de otros tipos de eritrocitos para verificar las bondades de la metodología propuesta para un mayor número de tipos de células. Así mismo, con un mayor número de muestras clasificadas se podrían estudiar otras técnicas de clasificación de patrones para evaluar, comparar y seleccionar la más adecuada.

Palabras clave: glóbulos rojos, frotis de sangre periférica, procesamiento de imágenes médicas.

Open access



Citación: Mejía, M. y Alzate, M. A. (2016). Clasificación automática de formas patológicas de eritrocitos humanos. En: Ingeniería, Vol. 21, No. 1, pp. 31–48

© los autores; titular de derechos de reproducción Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

En línea DOI: <http://dx.doi.org/10.14483/udistrital.jour.reveng.2016.1.a03>

Abstract

Context: Classification of erythrocyte morphological changes is usually done by an expert through direct observation from the microscope based on qualitative criteria, leading to subjective diagnosis. Proposals to automate this process usually classified erythrocytes in normal or abnormal, without specifying the type of abnormality that indicates the presence of some disease. We develop a tool for diagnostic support that determines different pathological forms of erythrocytes using characteristics measured from the microscopic image.

Method: We detect isolated erythrocytes using a segmentation processes based on color. Then we measure some differentiating features in each cell, including a new measure of central pallor. These features are presented to a neural network that labels the cell according to seven types of abnormality.

Results: The resulting system achieves a high success rate (97.3%) compared to binary classifications found in the literature. The measure of central pallor is highly discriminant because it allows a perfect distinction between normocytes and spherocytes, when other morphological characteristics are very similar between them.

Conclusions: Our contribution includes the classification of multiple types of erythrocytes and the proposal of a highly discriminating measure of the central pallor. We verified the usefulness of combining pre-processing techniques for extracting features and neural networks for classification in feature space. For future work, it would be desirable to have a greater number of images with statistically significant samples of other types of erythrocytes to verify the goodness of the proposed methodology to classify more cell types. Also, with a greater number of classified samples, different pattern classification techniques could be studied in order to evaluate, compare and select the most appropriate technique.

Keywords: medical image processing, peripheral blood smear, red blood cells.

1. Introducción

El frotis de sangre periférica es un examen para el diagnóstico hematológico que conduce a imágenes microscópicas, en las que se encuentran tres tipos de células en un individuo normal: leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Los eritrocitos representan alrededor del 45% del volumen de la sangre y la variación en su forma, tamaño y textura puede estar asociada a la presencia de diversas enfermedades [1]. Bajo el microscopio, los eritrocitos normales (normocitos) se pueden observar como estructuras altamente circulares cuyo diámetro oscila entre 7 y 9 μm , con una palidez central que refleja su forma de disco bicóncavo. Cualquier variación en estas características debe considerarse anormal, pues podría indicar la existencia de algún tipo de patología, que puede ir desde úlcera péptica y deficiencias patológicas y renales, hasta diferentes tipos de cáncer, entre muchas otras [2]. Por esta razón, los expertos basan el diagnóstico hematológico en distintos aspectos morfológicos de los eritrocitos [3].

Normalmente, la clasificación de las variaciones morfológicas de los eritrocitos se hace de manera rutinaria mediante la evaluación del experto a través de la observación directa desde el microscopio, con base en criterios puramente cualitativos, lo cual implica altos grados de dificultad y subjetividad y, en consecuencia, variaciones en el diagnóstico [3][4][5]. Por esta razón, cobra gran importancia el desarrollo de herramientas de software para clasificación automática de eritrocitos que agilicen el proceso y hagan más objetivos los diagnósticos del experto, pues podrían convertirse en una ayuda diagnóstica que disminuya las dificultades mencionadas. La motivación y la justificación para el presente trabajo se enmarcan dentro de esta sentida necesidad de herramientas automatizadas de clasificación de variaciones morfológicas de eritrocitos para ayuda diagnóstica.

Se han propuesto diferentes algoritmos para la separación de los leucocitos y los eritrocitos, así como su respectiva clasificación en normales o anormales, dependiendo de algunas características morfológicas de las células, incluyendo el análisis del núcleo para el caso de los leucocitos. En [6] se presenta un sistema automático para la clasificación de eritrocitos de acuerdo con su estado de infección con el parásito de la malaria, llegando a identificar el estado

de evolución del parásito en los glóbulos rojos infectados. El sistema utiliza la técnica de Otsu para segmentar los eritrocitos a partir de las imágenes preprocesadas. Posteriormente usa un clasificador binario basado en una máquina de soporte vectorial (SVM por *Support Vector Machine*) para identificar los eritrocitos infectados de acuerdo con las características de color y forma. El clasificador binario alcanzó una sensibilidad del 96.26% y una especificidad del 99.09%. Finalmente, un multclasificador SVM determina el estado de evolución del parásito en las células infectadas, logrando una precisión del 96.42%. En [7] se propone la clasificación de los eritrocitos en normales o anormales utilizando una red neuronal híbrida que utiliza la información visual extraída de las imágenes del frotis de sangre. Para la clasificación utilizan las propiedades características de forma y textura de los eritrocitos. La red neuronal propuesta clasificó como anormales los glóbulos rojos con una precisión del 88,25%. En [8] se muestra un sistema para automatizar el proceso de detección e identificación de los glóbulos rojos. El método propuesto clasifica los glóbulos rojos como normales o anormales con una precisión del 83%. Para esto, los eritrocitos se extraen de la imagen utilizando el método de umbral global sobre el canal verde de la imagen, posteriormente se aplica un filtro morfológico y, finalmente, basados en propiedades geométricas, se clasifican los eritrocitos utilizando una red neuronal artificial. En [9] se clasifican los eritrocitos en tres clases: (1) normales, (2) elongados y (3) otras deformaciones. Los autores usan una función de conjuntos de nivel para la segmentación de cada imagen, el método de los dos vecinos más cercanos para la clasificación supervisada y la distancia euclidiana para determinar la semejanza de los objetos, alcanzando una efectividad del 95,08%. En [5] utilizan unas métricas obtenidas mediante un programa estándar de procesamiento de imágenes microscópicas celulares (NIH Scion Image) para ajustar los parámetros de un discriminador lineal de siete tipos de eritrocitos; sorprendentemente alcanzan hasta un 70% de aciertos con este método simple. En [10] se presenta una revisión muy detallada de las diferentes propuestas reportadas en la literatura sobre los métodos de segmentación, extracción de características y clasificación de glóbulos blancos o leucocitos.

En este trabajo proponemos el análisis de imágenes microscópicas de frotis de sangre periférica humana para identificar características morfológicas de los eritrocitos contenidos en la imagen, de manera que se puedan clasificar dentro de alguna de las anomalías más comunes. Dado que dichas anomalías están relacionadas con la presencia de diversas enfermedades, obtuvimos una herramienta de clasificación que ofrece al médico elementos de juicio y criterios objetivos para reducir la naturaleza subjetiva del diagnóstico. Como plataforma de computación científica para el desarrollo de la herramienta, usamos Matlab® [11]. De acuerdo con la justificación y la motivación que se mencionaron antes, la importancia de este trabajo radica precisamente en la combinación de herramientas de procesamiento de imágenes y técnicas de inteligencia computacional, para determinar métricas discriminantes y usarlas en la clasificación de algunos tipos de células que pueden ser indicadoras de diferentes enfermedades.

2. Clases de eritrocitos

El eritrocito o glóbulo rojo es una célula altamente especializada del cuerpo humano, cuya función principal es el transporte de oxígeno a todas las células del cuerpo y la remoción del dióxido de carbono producto de la oxidación celular. El eritrocito normal, o normocito, es un disco ovalado y bicóncavo que carece de núcleo y de la mayoría de organelos, tiene un diámetro entre 7 y 9 μm con una región pálida central de no más de 3 μm de diámetro, y tiene una apariencia rojo-naranja bajo el tinte de Wright [2][3]. Esta forma básica se ve alterada bajo

algunas condiciones patológicas particulares, como se muestra en la figura 1. La detección de tales alteraciones morfológicas es de gran importancia en aplicaciones clínicas, pues pueden indicar presencia de patologías que incluyen trastornos hereditarios, deficiencias hepáticas o renales, diferentes tipos de anemias y hasta distintas formas de cáncer, por ejemplo [1][2].

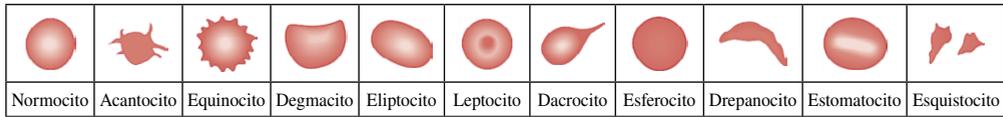


Figura 1. Tipos de Eritrocitos [12].

El acantocito, por ejemplo, presenta proyecciones gruesas espaciadas de manera irregular, mientras el equinocito presenta proyecciones más pequeñas y espaciadas regularmente. En el degmacito se pierde una porción semicircular del borde de la célula. El eliptocito es un óvalo más alargado, por lo que también se conoce como ovalocito o célula cigarro. El leptocito (o codocito) tiene un área central de tinte intenso rodeada por un anillo pálido y, posteriormente, por otro anillo intenso en el borde de la célula, de donde surgen los nombres sugestivos de sombrero mejicano o célula de tiro al blanco. El dacrocito tiene una elongación puntada, por lo que se conoce también como célula lágrima. El esferocito es excesivamente redondo y carece de la región pálida central. El drepanocito (o célula hoz) tiene forma de cuarto-creciente. El estomatocito tiene una palidez central ovalada o rectangular (en forma de boca) debido a la pérdida de concavidad en uno de sus lados. El esquistocito tiene una forma irregular fragmentada y dentada con dos puntos extremos y sin la región central pálida. También pueden existir aglomeraciones de eritrocitos indistinguibles y rollos (*rouleaux* –grupos de eritrocitos superpuestos, como pilas de monedas) [1] [2]. Cada una de estas modificaciones en la morfología del eritrocito es indicación de diferentes tipos de patologías y, por esta razón, su detección es de gran importancia clínica [12].

En una imagen de frotis de sangre periférica también hay leucocitos y trombocitos además de eritrocitos. Los leucocitos (neutrófilos, linfocitos T ó B, monocitos macrófagos, eosinófilos y basófilos) son células nucleadas que varían entre 8 y 14 μm de diámetro y son mucho menos comunes en la sangre (cerca de un leucocito por cada 600 eritrocitos). Por otro lado, los trombocitos o plaquetas son fragmentos de citoplasma de 2 a 3 μm de diámetro, con cerca de un trombocito por cada 20 eritrocitos [2] [3]. En este trabajo solo contemplamos los eritrocitos y sus diferentes alteraciones.

2. Tratamiento de las imágenes

Pasamos las imágenes disponibles por un proceso de segmentación, en el que se detectan eritrocitos aislados, y por un proceso de extracción de características, en el que se toman medidas discriminantes. A continuación describimos estos dos procesos.

2.1. Segmentación

Para esta investigación dispusimos de 23 imágenes en las que se pueden distinguir 351 eritrocitos aislados, 265 de los cuales fueron clasificados por expertos hematólogos (los 86 restantes fueron clasificados dubitativamente y no se usaron en el proceso de entrenamiento). Entre las 265 células clasificadas hay tres tipos que no ocurren (acantocitos, degmacitos y

drepanocitos) y tres tipos que ocurren una sola vez (un leptocito, un reticulocito y un estomatocito). Por esta razón solo usamos 262 células, como muestra la tabla 1.

La mayoría de rollos y aglutinaciones se pueden eliminar mediante el criterio del tamaño. Sin embargo, cuando los rollos están compuestos por dos eritrocitos superpuestos, pueden tener tamaños semejantes a un eritrocito grande, razón por lo cual en la tabla 1 se incluyó el rollo como otro tipo de eritrocito para detectar esta condición.

Tabla 1. Número de cada tipo de células clasificadas en las imágenes disponibles

Dacrocitos	Eliptocitos	Equinocitos	Esferocitos	Esquistocitos	Normocitos	Rollos
7	36	42	37	20	100	20

Las imágenes, que fueron facilitadas por el doctor Javier Rodríguez [13], se obtuvieron mediante frotis de sangre periférica con coloración de Wright y fotografía microscópica de 2700x3600 píxeles. La figura 2 muestra dos ejemplos de cada tipo de célula en la base de datos.

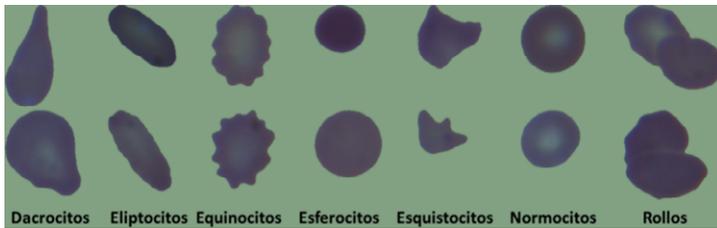


Figura 2. Algunos tipos de eritrocitos en nuestra base de datos.

Para detectar los eritrocitos en la imagen intensificamos el contraste mediante el ajuste del histograma de los niveles de luminancia y, después, hicimos un filtrado tipo mediana para reducir el ruido sin afectar los bordes de los objetos de interés. Para no alterar el color de cada pixel, descompusimos la imagen RGB en sus componentes YIQ, donde Y se refiere a la luminancia de la imagen (una forma de intensidad de gris) mientras I y Q se refieren a la crominancia, con componentes en fase (I) y en cuadratura de fase (Q) [14]. El ajuste del histograma mediante ecualización y filtrado mediana se hizo en la capa Y para obtener una versión ajustada, Y', en la que se mantiene intacta la crominancia IQ. Así pudimos retornar de Y'IQ a R'G'B', obteniendo una versión ecualizada y filtrada de la imagen completa en la que se conserva el color original de cada pixel.

El siguiente paso es la segmentación para distinguir entre las células y el fondo de la imagen. Escogimos el método de Otsu[14] ya que este logra minimizar la varianza dentro de las regiones correspondientes a “célula” y dentro de las regiones correspondientes a “fondo”, al tiempo que maximiza la varianza entre estos dos tipos de regiones. Sin embargo, para aprovechar mejor la información de color, aplicamos el método de Otsu a cada uno de los canales R, G y B, encontrando los niveles de comparación óptimos en cada canal. Posteriormente, integramos nuevamente los tres canales ya segmentados obteniendo una nueva imagen RGB. Los colores blanco y negro corresponden a regiones en la que los tres colores coinciden, las regiones rojas, verdes y azules corresponden a regiones en las que un solo color se activa, y las regiones amarillas, magenta y cian son aquellas en las que dos colores se activan. Sobre la

imagen integrada aplicamos otro filtro mediana antes de hacer la binarización de la imagen, la cual condujo a una primera aproximación a las regiones de célula y de fondo. Para aislar las células individuales, rellenamos los huecos en las regiones conectadas y aplicamos algoritmos morfológicos de apertura y cierre. Así, se separaron las células de objetos vecinos que podrían afectar sus propiedades morfológicas (en especial de trombocitos superpuestos, lo cuales podrían afectar significativamente la clasificación de cada célula). Al calcular el área y el perímetro de las regiones así detectadas, pudimos determinar cuáles de ellas podrían corresponder a eritrocitos y, de esta manera, logramos eliminar la mayoría de trombocitos, leucocitos y formas inmaduras de eritrocitos, así como aglomeraciones o rollos de células.

La figura 3 muestra el resultado de los procesos anteriores en una imagen típica en la que se detectaron 22 eritrocitos aislados. En la parte superior izquierda se observa la imagen original; en la parte superior derecha aparece el resultado del proceso de filtrado y ecualización que, como se puede apreciar, enfatiza significativamente el borde de las células y su estructura interna sin afectar la información de color. En la parte inferior izquierda se observa la salida del proceso de segmentación sobre cada banda R, G y B, después de integrar las tres segmentaciones. En la parte inferior derecha se aprecia el resultado final de la segmentación, en el que las máscaras de las 22 células aisladas que se detectaron se superponen en la imagen original. Los elementos que tocan el borde han sido eliminados por considerarse incompletos.

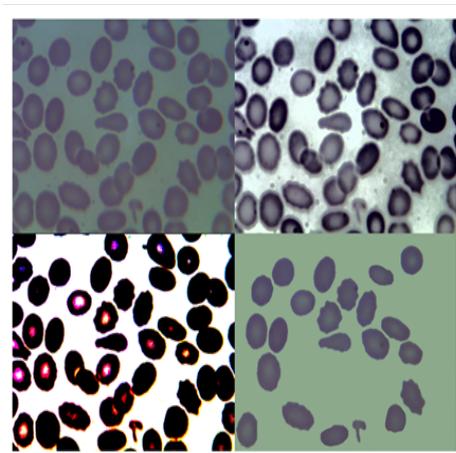


Figura 3. (a) Imagen original con 22 eritrocitos aislados (b) Filtrado, (c) ecualización y (d) segmentación.

2.2 Extracción de características

Después de haber detectado los eritrocitos aislados y completos en la imagen, se extraen algunas características que podrían usarse como discriminantes para la clasificación de los distintos tipos de eritrocito presentes en la imagen. En particular consideramos siete medidas que, en principio, ayudarían a discriminar entre las diferentes anomalías de los eritrocitos. Las primeras cinco medidas son el perímetro, el área, la excentricidad, la solidez y la circularidad, las cuales se refieren a la forma de la célula. Las siguientes dos medidas, que se refieren a la textura de la célula, son la palidez central y la dimensión *box-counting* de la superficie de la célula. Se tuvieron en cuenta otras medidas como la media y la varianza de los niveles de gris,

no obstante, de acuerdo con el procedimiento de análisis descrito en la sección 4.1, resultaron irrelevantes para el proceso de clasificación. A continuación describimos las medidas seleccionadas.

El perímetro es el número de píxeles en el borde de la célula, mientras que el área incluye también los píxeles dentro de ella [14]. Estos dos números, por sí mismos, hablan del tamaño de la célula, mientras que las relaciones entre ellos hablan de la forma de la célula. El criterio del tamaño es muy útil para distinguir los eritrocitos de los linfocitos y los trombocitos, así como para detectar la mayoría de rollos y aglutinaciones. Sin embargo, como mencionamos antes, cuando los rollos están compuestos por dos eritrocitos superpuestos pueden tener tamaños semejantes a un eritrocito grande, por lo cual incluimos el eritrocito tipo rollo para detectar esta condición. Una vez detectados los eritrocitos, se puede identificar el tipo particular al que pertenece cada uno, de acuerdo con las medidas descritas a continuación.

La excentricidad se obtiene construyendo una elipse que tenga los mismos segundos momentos de la célula y calculando la razón entre la distancia inter-focal de la elipse y la longitud de su eje mayor, como muestra la figura 4 [14]. La excentricidad de un círculo es cero y la excentricidad de un segmento de línea recta es uno, de manera que entre mayor sea la elongación de la célula, mayor será su excentricidad.

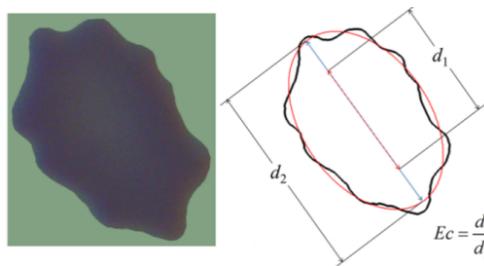


Figura 4. Cálculo de la excentricidad.

La solidez es la razón entre el área de la célula y el área de su casco convexo, donde el casco convexo de una célula es el polígono convexo de área mínima que la contiene [14]. Cuando la solidez toma el valor uno es porque la célula es convexa, mientras que si la solidez toma un valor cercano a cero se trata de una célula compuesta por una curva en el plano. La figura 5 muestra el concepto de solidez y su cálculo.

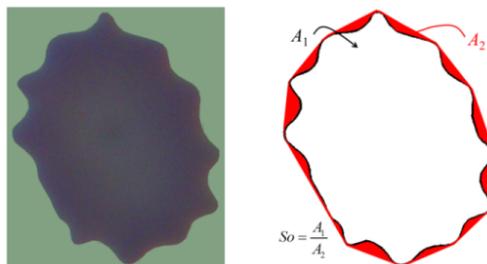


Figura 5. Cálculo de la solidez.

La circularidad es la relación entre el área de la célula y el cuadrado de su perímetro normalizada con respecto a $1/4\pi$, de manera que la circularidad de un círculo es 1 [14]. La figura 6 muestra la comparación entre dos células y los correspondientes círculos que tienen el mismo centroide y la misma área. El normocito de la izquierda tiene un perímetro pequeño en comparación con su área y por eso su circularidad es alta. El equinocito de la derecha, en cambio, tiene un perímetro grande en comparación con su área, por lo que su circularidad es baja. Aunque pareciera que la solidez y la circularidad son altamente redundantes para la clasificación de eritrocitos, nótese que una figura cuadrada tiene solidez igual a 1, pero una circularidad de solo $\pi/4$, de manera que sí hay algunos atributos representados de manera diferente en cada medida.

Para caracterizar la textura usamos la dimensión *box counting* de la superficie de la célula [15] y una medida de la palidez central. Para calcular la dimensión *box counting* consideramos la imagen como una superficie en un espacio euclidiano tri-dimensional, donde el nivel de gris corresponde a la tercera dimensión euclidiana. Esto es, si el nivel de gris del pixel con coordenadas (x,y) es z , se dice que la superficie se encuentra a una altura z en el punto (x,y) , como muestra la figura 7. Al dividir el espacio tridimensional (x,y,z) en bloques no sobrelapados de tamaño $s_x \times s_y \times s_z$, con $s_x = \varepsilon X$, $s_y = \varepsilon Y$ y $s_z = \varepsilon Z$, para algún $0 < \varepsilon < 1/2$, contamos el número de bloques que son atravesados por la superficie, $N(\varepsilon)$. La dimensión *box counting* se estima mediante la pendiente de la recta que se obtiene al hacer un ajuste lineal de mínimos cuadrados para la curva de $\log(N(\varepsilon))$ en función de $\log(1/\varepsilon)$ [15]. Una superficie suave siempre arrojará una dimensión 2, pero la variabilidad debida a la textura conduce a dimensiones superiores a 2.

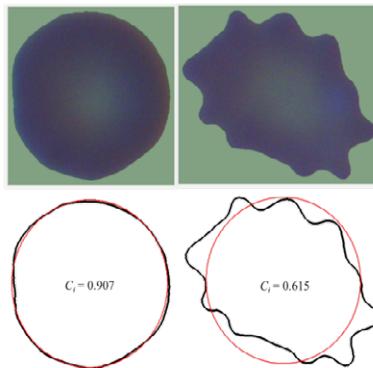


Figura 6. Significado de la circularidad.

La última característica medida tiene que ver con la palidez central y se refiere a la relación entre el promedio del tono de gris de la zona clara del centro y el promedio del tono de gris en el borde de la célula. Primero calculamos el promedio del nivel de gris de la célula entera (nivel cero). Luego, mediante un proceso de erosión, eliminamos los bordes de la célula y calculamos nuevamente el promedio del nivel de gris en la figura resultante (nivel uno). Así seguimos calculando el promedio sobre versiones más y más erosionadas de la célula (niveles superiores), con lo cual se va concentrando la medida en el centro del eritrocito, donde podría estar la palidez, como muestra la figura 8. La curva del nivel promedio de gris en función de la escala representa los cambios que se producen en el valor promedio del tono de gris de la célula a medida que se restringe el área de observación a regiones centrales cada vez más pequeñas. La medida de palidez se obtiene mediante la pendiente promedio de la curva correspondiente de nivel promedio de gris *versus* nivel de erosión.

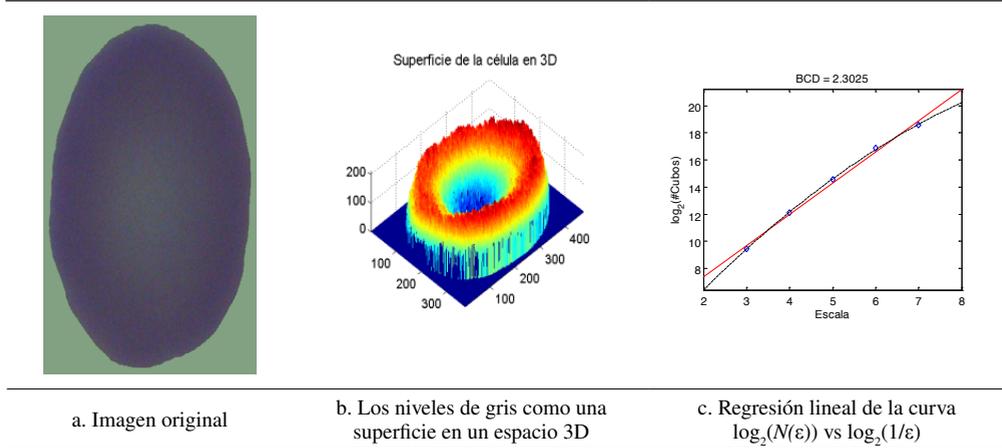


Figura 7. Cálculo de la dimensión *box-counting* 3D.

Esta medida de la palidez central es una de las características más discriminantes, pues permite distinguir perfectamente los esferocitos de los normocitos, cuando las otras características morfológicas son muy semejantes entre ellos. De hecho, la palidez permitiría identificar con facilidad otras células como los leptocitos, pues ellos muestran una variación característica en la pendiente de la curva, como muestra la figura 9. En efecto, la zona más clara es un anillo alrededor del centro de la célula, lo cual se refleja como un máximo en la curva de intensidad promedio. Sin embargo, como se mencionó, no disponemos de un número adecuado de leptocitos en la base de datos para aprovechar esta capacidad discriminante de la medida de la palidez central.

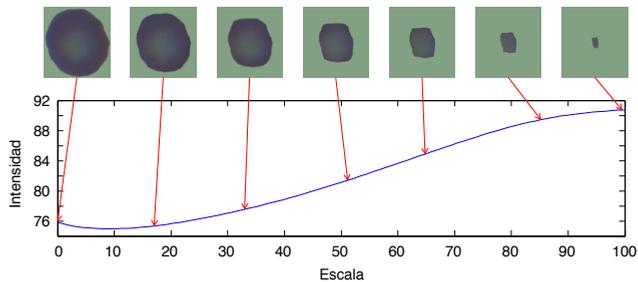


Figura 8. Cálculo de la palidez central.

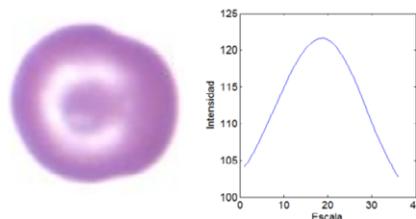


Figura 9. Uso de la palidez para detección de leptocitos.

4. Clasificación de los eritrocitos

A continuación verificamos la utilidad de las características seleccionadas para discriminar entre diferentes tipos de células y, posteriormente, describimos el clasificador neuronal que se utilizó para determinar el tipo de cada célula.

4.1. Capacidad discriminante de las características medidas

Las siete medidas seleccionadas se escogieron *a priori* observando cómo, en principio, cada una de ellas tiene algo que decir sobre las células. La figura 10 muestra, por ejemplo, cómo los rolos están entre las células con mayor área, los esferocitos están entre las células con mayor circularidad, los eliptocitos están entre las células con mayor excentricidad y los normocitos están entre las células con mayor palidez central.

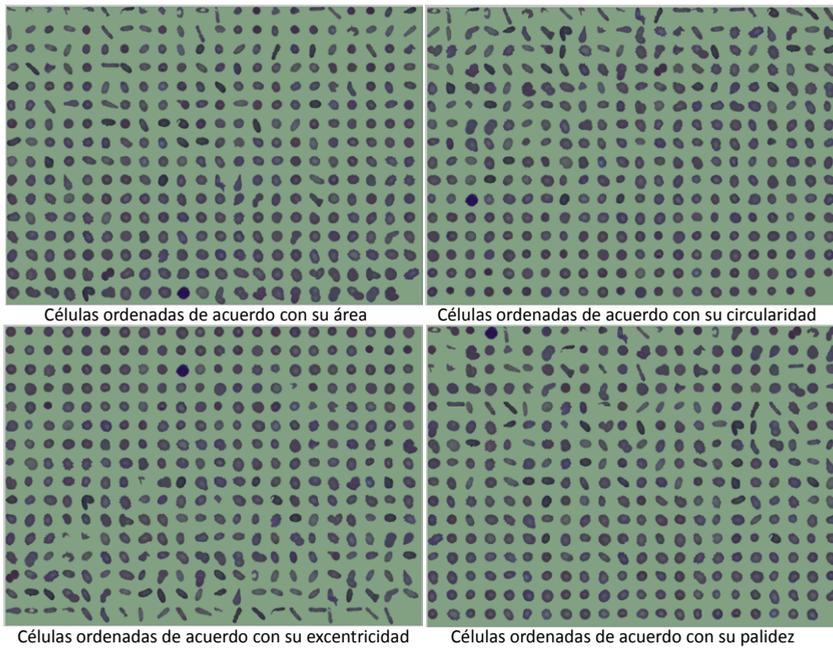


Figura 10. Células ordenadas de acuerdo con cuatro características.

De manera semejante, la figura 11 y la figura 12 muestran algunas células separadas según su palidez y su dimensión *box-counting* en el rango dinámico de cada medida. La figura 11 muestra que la medida de palidez central (la pendiente creciente) forma un espectro continuo que captura con exactitud la convexidad de los esferocitos en el extremo izquierdo y la concavidad de los normocitos en el extremo derecho. La figura 12 muestra cómo las células de baja dimensión *box-counting* corresponden a esferocitos, que son uniformes en su textura, mientras que las de alta dimensión son esquistocitos con una rugosidad aleatoria en su superficie. Las dimensiones intermedias corresponden a células rugosas pero con estructuras claramente definidas, como la presencia de la palidez central que se acaba de mencionar, debida a la biconcavidad de los eritrocitos sanos.

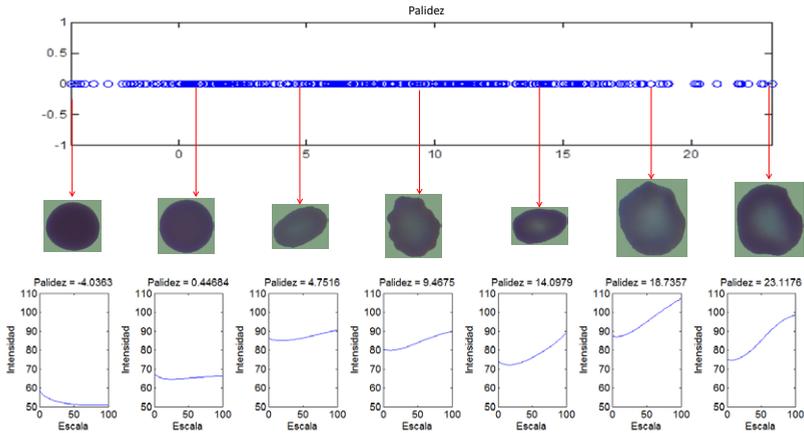


Figura 11. Tipos de células que ocupan el rango de mediciones de palidez.

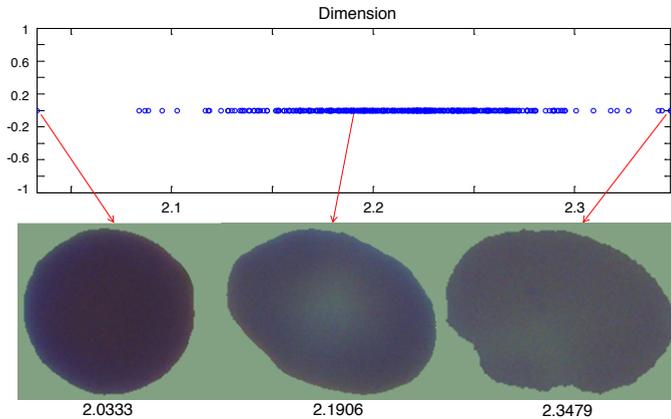


Figura 12. Tipos de células que ocupan el rango de mediciones de la dimensión *box counting*.

En la figura 13 se observa el rango de seis de las características extraídas de las imágenes, separadas para cuatro tipos de eritrocitos (normocitos, esferocitos, equinocitos y eliptocitos), con estimaciones funcionales de la distribución de densidad de probabilidad (*pdf*). Basta observar los intervalos de dominio de cada *pdf* para notar cómo la circularidad es suficiente para distinguir a los esferocitos de los eliptocitos e inclusive, de los equinocitos, aunque la solidez hace un mejor trabajo distinguiendo entre esferocitos y equinocitos. A pesar de que ninguna de estas medidas permitiría distinguir esferocitos de normocitos, la palidez resulta una característica claramente discriminadora entre estos dos tipos de células. La excentricidad, a su vez, permite distinguir a los eliptocitos entre los demás tipos de células. Las otras características no resultan tan discriminantes por sí mismas, aunque es notorio que, por ejemplo, el área tiende a ser menor en los eliptocitos que en otras células mientras el perímetro tiende a ser mayor en los equinocitos. Es este tipo de información la que captaremos mediante una red neuronal para la clasificación de las distintas formas en los eritrocitos, como explicaremos a continuación.

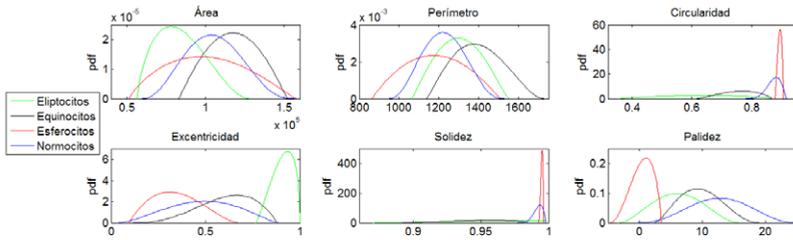


Figura 13. Funciones estimadas de densidad de probabilidad (*pdf*) para las características seleccionadas.

4.2. Proceso de clasificación

Los siete parámetros extraídos de las imágenes mediante técnicas de procesamiento de imágenes se convierten en las características seleccionadas para clasificar las células en uno de los siete tipos presentes en la base de datos, para lo cual escogimos usar una red neuronal.

Las siete características de entrada y los siete tipos de células por detectar corresponden al número de neuronas en la capa de entrada y en la capa de salida, respectivamente. Como los datos no son linealmente separables en el espacio de las características de entrada, añadimos una capa intermedia cuyo tamaño se diseñó cuidadosamente para que la red tenga suficiente capacidad de aprendizaje para el problema en cuestión, pero no demasiada capacidad de aprendizaje para que se sobreentrene con la información de entrada [16]. A fin de lograr este diseño, dividimos aleatoriamente las 262 células clasificadas por un hematólogo experto en 180 datos de entrenamiento, 41 datos de validación y 41 datos de prueba. Los datos de entrenamiento se usan para calcular los gradientes y ajustar los pesos de las sinapsis; los datos de validación se monitorean durante el entrenamiento para minimizar el sobre-ajuste; los datos de prueba se usan para verificar los resultados de la red ya entrenada con datos que no hayan sido vistos durante el entrenamiento. La figura 14 muestra el desempeño con los datos de prueba para redes con diferentes complejidades estructurales entrenadas como experimentos piloto para determinar la complejidad estructural adecuada de la red. Se puede apreciar que, con menos

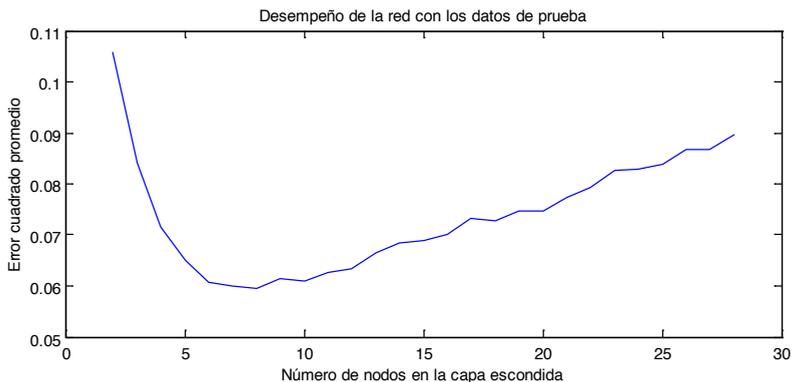


Figura 14. Error cuadrado promedio en los datos de prueba como función de la complejidad estructural de la red.

de siete neuronas en la capa oculta, la red no es capaz de aprender satisfactoriamente la tarea de clasificación; pero con más de siete neuronas en la capa oculta, la red tiene capacidad de sobre-ajustarse a los datos de entrenamiento, al punto que se le dificulta generalizar la información aprendida cuando se le presentan datos que no hubiese visto antes. En consecuencia, la estructura óptima para este problema es la de una red (7, 7, 7): siete neuronas en la capa de entrada, siete en la capa oculta y siete en la capa de salida.

La estructura (7, 7, 7) requiere un conjunto de 112 pesos sinápticos por seleccionar, los cuales se encuentran mediante el algoritmo clásico de *Back Propagation Learning* [17]. Cada división aleatoria de las muestras de entrenamiento, validación y prueba y cada inicialización aleatoria de los pesos sinápticos conducen a una red diferente. Al entrenar así un gran número de redes, escogimos la red que obtuvo mejores resultados de clasificación con los datos de prueba.

Para terminar esta sección, la figura 15 muestra un resumen general del proceso llevado a cabo en la herramienta de software para la clasificación automática de eritrocitos. Incluye los pasos para la segmentación de la imagen, las medidas observadas en cada célula y la estructura de la red neuronal.

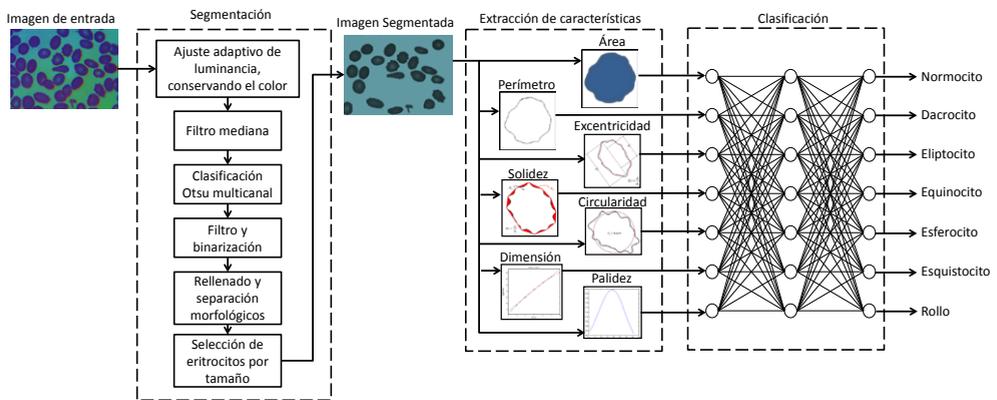


Figura 15. Esquema general de la herramienta desarrollada.

4.3. Análisis de resultados

Los resultados de clasificación con la red seleccionada se muestran en la tabla 2. Las filas representan los tipos de células clasificadas por el experto hematólogo y las columnas representan las clasificaciones hechas por la red neuronal. Por ejemplo, la primera fila indica que, de los siete dacrocitos presentes en la base de datos, cinco se clasificaron correctamente, uno fue confundido con un equinocito y otro fue confundido con un normocito. Por eso las matrices como las de la tabla 2 se conocen como “matrices de confusión” [18]. La última columna indica el número total de cada tipo de célula en la base de datos y la última fila indica el número total de cada tipo de célula clasificada por la red neuronal.

Sumando los elementos de la diagonal se observa un total de 255 aciertos entre las 262 células, para una tasa del 97,3%. Esta es una alta tasa de aciertos en comparación con los resultados de clasificación binaria encontrados en la literatura y reportados en la sección 1. Sin embargo, como el número de muestras varía mucho de un tipo de célula a otro (hay cien normocitos y solo siete dacrocitos, por ejemplo), esta tasa de aciertos no es una medida definitiva

del desempeño del clasificador. Así, otro clasificador que acertara en todas las células distintas a los dacrocitos pero no pudiera identificar un solo dacrocito, alcanzaría la misma tasa del 97,3% de aciertos. Por eso en la tabla 2 también reportamos los aciertos y errores obtenidos con cada tipo de célula, de manera que podemos calcular la fracción de células de cada tipo que clasificó correctamente. Por ejemplo, el clasificador identificó correctamente cinco de los siete dacrocitos, para una sensibilidad de 71,4%. Igualmente, clasificó correctamente el 100% de los eliptocitos, el 97,6% de los equinocitos, el 97,3% de los esferocitos, el 95% de los esquistocitos, el 99% de los normocitos y el 95% de los rollos. Estas sensibilidades indican que no hay ninguna tendencia de confusión entre pares de tipos de células, de manera que la red realmente aprendió las características de cada una de ellas, no solo de las mayoritarias.

Sin embargo, es interesante notar que de los siete errores cometidos por el clasificador automático, cuatro se deben a haber clasificado equivocadamente como equinocitos, algunas células que no lo eran (un dacrocito, un esquistocito, un normocito y un rullo). Este tipo de fenómenos se captura mejor en las matrices de confusión individuales para cada tipo de célula, pues en ellas se considera a la red neuronal como un clasificador binario y se muestran el número correspondiente de verdaderos positivos, falsos negativos, falsos positivos y verdaderos negativos para cada tipo de célula (Tabla 3) [18]. De esta manera podemos calcular la sensibilidad (qué fracción de las muestras positivas clasificó como positivas), la especificidad (qué fracción de las muestras negativas clasificó como negativas), la precisión (qué fracción de las muestras que clasificó como positivas eran realmente positivas), la predecibilidad de negativos (qué fracción de las muestras que clasificó como negativas eran realmente negativas) y la exactitud (qué fracción de muestras clasificó correctamente, ya sea como positivas o negativas). Estas estadísticas también se aprecian en la tabla 3 y, como se puede observar, ratifican el buen desempeño del clasificador propuesto, pues no solo las estadísticas generales sino las individuales para cada tipo de célula son altas en comparación con los resultados de trabajos anteriores.

Tabla 2. Resultados del Clasificador con el conjunto completo de 262 células en la base de datos

		Clasificación automática							
		Dacrocito	Eliptocito	Equinocito	Esferocito	Esquistocito	Normocito		
Clasificación por el experto	Dacrocito	5	0	1	0	0	1	0	7
	Eliptocito	0	36	0	0	0	0	0	36
	Equinocito	1	0	41	0	0	0	0	42
	Esferocito	0	0	0	36	0	1	0	37
	Esquistocito	0	0	1	0	19	0	0	20
	Normocito	0	0	1	0	0	99	0	100
	Rullo	0	0	1	0	0	0	19	20
		6	36	45	36	19	101	19	262

Tabla 3. Verdaderos positivos, falsos negativos, falsos positivos y verdaderos negativos para cada tipo de célula

		Clasificación automática		Precisión = 83,3% Sensibilidad = 71,4% Especificidad = 99,6% Exactitud = 98,9% P.Negativos = 99,2%	
		Dacrocito	Otro		
Clasificación por el experto	Dacrocito	Vp=5	Fn=2		
	Otro	Fp=1	Vn=254		
		Clasificación automática			Precisión = 100% Sensibilidad = 100% Especificidad = 100% Exactitud = 100% P.Negativos = 100%
		Eliptocito	Otro		
Clasificación por el experto	Eliptocito	Vp=36	Fn=0		
	Otro	Fp=0	Vn=226		
		Clasificación automática		Precisión = 91,1% Sensibilidad = 97,6% Especificidad = 98,2% Exactitud = 98,1% P.Negativos = 99,5%	
		Equinocito	Otro		
Clasificación por el experto	Equinocito	Vp=41	Fn=1		
	Otro	Fp=4	Vn=216		
		Clasificación automática			Precisión = 100% Sensibilidad = 97,3% Especificidad = 100% Exactitud = 99,6% P.Negativos = 99,6%
		Esferocito	Otro		
Clasificación por el experto	Esferocito	Vp=36	Fn=1		
	Otro	Fp=0	Vn=225		
		Clasificación automática		Precisión = 100% Sensibilidad = 95% Especificidad = 100% Exactitud = 99,6% P.Negativos = 99,6%	
		Esquistocito	Otro		
Clasificación por el experto	Esquistocito	Vp=19	Fn=1		
	Otro	Fp=0	Vn=242		
		Clasificación automática			Precisión = 98% Sensibilidad = 99% Especificidad = 98,8% Exactitud = 98,9% P.Negativos = 99,4%
		Normocito	Otro		
Clasificación por el experto	Normocito	Vp=99	Fn=1		
	Otro	Fp=2	Vn=160		
		Clasificación automática		Precisión = 100% Sensibilidad = 95% Especificidad = 100% Exactitud = 99,6% P.Negativos = 99,6%	
		Rollo	Otro		
Clasificación por el experto	Rollo	Vp=19	Fn=1		
	Otro	Fp=0	Vn=242		

5. Conclusiones

En este artículo presentamos una herramienta de software para clasificación de formas patológicas de glóbulos rojos en muestra microscópicas de frotis de sangre periférica. La herramienta descrita hace uso de técnicas de procesamiento de imágenes y de clasificación mediante red neuronal. La clasificación automática coincide en más del 97% con la realizada por hematólogos expertos, lo cual supera los resultados encontrados en la literatura, aún para

simples clasificadores binarios que distinguen entre eritrocitos normales y anormales. Estos resultados sugieren la posibilidad de usar la herramienta en aplicaciones de apoyo diagnóstico.

Después de un proceso de ecualización y filtrado de la imagen que conserva el color de cada pixel, adelantamos un proceso de segmentación multicanal complementada con procesos morfológicos para identificar las células aisladas. Posteriormente medimos siete características en cada célula, la cuales resultaron discriminantes para distinguir diferentes anomalías de los eritrocitos: perímetro, área, excentricidad, solidez, circularidad, palidez central y dimensión *box-counting*. Para la clasificación usamos una red neuronal adecuadamente dimensionada para el problema de aprendizaje, la cual arrojó los resultados mencionados.

Las contribuciones de este artículo incluyen la clasificación en múltiples tipos de células, lo cual contrasta con las clasificaciones binarias que se encuentran en la mayoría de la literatura, y la introducción de la medida de palidez central, que resultó definitiva para la detección correcta de normocitos.

Estas contribuciones permiten concluir la utilidad de las técnicas de procesamiento digital de imágenes en el desarrollo de herramientas para ayuda diagnóstica, en particular para el caso de la detección de variaciones morfológicas de eritrocitos, de gran importancia clínica en la identificación de diferentes patologías. La combinación de técnicas de pre-procesamiento para extracción de características simples pero altamente discriminantes (como la palidez central) con técnicas de inteligencia artificial para clasificar los tipos de células en el espacio vectorial de las características extraídas, arroja resultados promisorios para la elaboración de ayudas diagnósticas, como se evidenció en este artículo.

Existen diferentes rutas para el trabajo futuro en esta línea de investigación. En primer lugar, sería deseable disponer de un mayor número de imágenes en las que se encuentren muestras de cada uno de los tipos de eritrocitos, en cantidades suficientes para obtener resultados estadísticamente significativos. En efecto, con las imágenes disponibles no fue posible trabajar en la detección de acantocitos, degmácitos, leptocitos, drepanocitos y estomatocitos. La hipótesis a verificar sería que la metodología propuesta conduciría a resultados de clasificación igualmente confiables, pero con un mayor número de tipos de células clasificadas. De otro lado, midiendo otras características sobre estos otros tipos de células con una base de datos más representativa, podría llegarse a encontrar nuevos parámetros simples y discriminantes que hagan más objetivos los procesos de diagnóstico, como hicimos aquí con la palidez central.

En segundo lugar, al detectar únicamente las células aisladas se pierde una gran cantidad de muestras de células superpuestas que podrían usarse para aumentar la significancia estadística de los resultados. Otro frente interesante de trabajo es, entonces, utilizar procedimientos de alto nivel para aislar las células superpuestas (segmentación) simultáneamente con técnicas de clasificación avanzadas como ajuste de formas estándar (transformada generalizada de Hough), contornos activos (algoritmos de serpientes) o modelos probabilísticos.

Por último, con un mayor número de muestras clasificadas y con más características discriminantes, sería de interés estudiar otras técnicas de clasificación basadas en inteligencia computacional o en otros métodos estadísticos para evaluar, comparar y seleccionar la más adecuada para este tipo de propósitos.

6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Militar Nueva Granada a través del proyecto de investigación ING1532. Agradecemos al grupo de investigación “Insight” por la contribución en el desarrollo de este proyecto, en particular al líder del grupo, el Doctor Javier Rodríguez, y al personal científico y administrativo del Hospital Militar Central y del Centro de Investigaciones de la Clínica del Country. Finalmente, agradecemos a los revisores anónimos, pues sus sugerencias se volvieron importantes contribuciones a la versión original del artículo. Marcela Mejía participó como investigadora del grupo TIGUM de la Universidad Militar y Marco Alzate participó como investigador de los grupo IDEAS y GITUD de la Universidad Distrital.

Referencias

- [1] C. Naranjo, “Atlas de hematología células sanguíneas”. Segunda edición. Manizalez: Centro de publicaciones Universidad Católica de Manizales, 2008.
- [2] J. Carr y B. Rodak, *Atlas de hematología Clínica*. Tercera edición, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2010.
- [3] G. Campuzano, “Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos”. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 14, Número 7, 2008, pp. 311-357.
- [4] N. Hamasaki and M. Yamamoto, “Red Blood Cell Function and Blood Storage”. *Vox Sanguinis*, Volume 79, 2000, pp. 191-197.
- [5] M. C. Albertini, L. Teodori, E. Piatti, M. P. Piacentini, A. Accorsi and M. B. L. Rocchi, “Automated Analysis of Morphometric Parameters for Accurate Definition of Erythrocyte Cell Shape”. *Cytometry Part A*, Volume 52A, Number 1, 2003. pp. 12–18
- [6] S. Savkare and S. Narote, “Automatic System for Classification of Erythrocytes Infected with Malaria and Identification of Parasite’s Life Stage”. *Procedia Technology*, Volume 6, 2012, pp. 405-410.
- [7] L. Howard and C. Yi-Ping, “Cell morphology based classification for red cells in blood smear images”. *Pattern Recognition Letters*, Volume 49, 2014, pp. 155-161.
- [8] R. Tomari, W. Nurshazwani, W. Zakaria, M. Mahadi Abdul Jamil, F. Mohd Nor, N. Farhan and N. Fuad, “Computer Aided System for Red Blood Cell Classification in Blood Smear Image”. *Procedia Computer Science*, Volume 42, 2014, pp. 206-213.
- [9] E. Domínguez, S. García, P. Marrero Fernández y K. Fernández Arias, “Clasificación automatizada de eritrocitos en imágenes de muestras de sangre periféricas”. *IX Congreso Internacional de Informática en la Salud*, La Habana, Cuba, marzo de 2013.
- [10] Mohammed EA, Mohamed MMA, Far BH y Naugler C, “Peripheral blood smear image analysis: A comprehensive review”. *Journal of Pathology Informatics*, Volume 5, Number 9, 2014.
- [11] MATLAB Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States. (<https://www.mathworks.com>)
- [12] D. Harmening, editor. “Clinical hematology and fundamentals of hemostasis”, F.A. Davis Co., Philadelphia, PA, 2009.
- [13] M. Mejía, M. Alzate y J. Rodríguez, “Clasificación automática de glóbulos rojos en frotis de sangre periférica”. Sometido a revisión en mayo de 2015.
- [14] R. González and R. Woods, *Digital Image Processing*. 3rd edition, Prentice Hall, 2008

- [15] Jian Lia, Qian Dub and Caixin Suna, "An improved box-counting method for image fractal dimension estimation". *Pattern Recognition*, Volume 42, Number 11, 2009, pp. 2460-2469
- [16] C. Bishop, *Pattern Recognition and Machine Learning*. Springer, 2006.
- [17] S. Haykin, *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*. Segunda Edición, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.
- [18] Tom Fawcett, "An introduction to ROC analysis". *Pattern Recognition Letters*, Volume 27, 2006, pp. 861–874.

Marcela Mejia Fajardo

Ingeniera Electrónica de la Universidad Santo Tomas, Bogotá, Colombia. Magíster en Teleinformática de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia. Doctora en Ingeniería de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Doctora en Telemática de la Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.

Se desempeñó como Jefe de comunicaciones de la Corporación de Ahorro y Vivienda CONCASA. Actualmente se desempeña como profesora Asociada en el área de Redes en la Universidad Militar Nueva Granada de Bogotá, Colombia. Pertenece al grupo de investigación TIGUM. Sus áreas de interés son las redes inalámbricas Ad Hoc y procesamiento de imágenes

e-mail: angela.mejia@unimilitar.edu.co

Marco Alzate Monroy

Ingeniero Electrónico de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia. Magíster en Ingeniería Eléctrica de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Doctor en Ingeniería de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Ha sido investigador del Instituto Tecnológico de Electrónica y Comunicaciones (ITEC – Telecom), asistente de investigación en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Computadores de la Universidad de Maryland y científico investigador en el Laboratorio de Sistemas de Información de la Universidad del Sur de la Florida. Actualmente es profesor titular de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Distrital. Pertenece a los grupos de investigación GITUD e IDEAS de la Universidad Distrital. Es miembro senior de IEEE y de sus sociedades de comunicaciones y de procesamiento de señales. Sus áreas de interés son el procesamiento de señales, el control de sistemas dinámicos, la teoría de la información y la teoría de sistemas complejos, tanto en sus aspectos teóricos como en su aplicación al modelado de redes modernas de comunicaciones.

e-mail: malzate@udistrital.edu.co