



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TREBALL FI DE GRAU

Grau en Enginyeria Biomèdica

**CONTRIBUCIÓ AL DIAGNÒSTIC DE MALALTIES GREUS
MITJANÇANT EL RECONeixEMENT AUTOMÀTIC
D'ESQUISTÒCITS A LA SANG PERIFÈRICA**



Memòria i Annexos

Autor: Alvaro López Cabello
Director: Jose Julian Rodellar Benede
Co-Director: Andrea Milena Acevedo Lipes
Convocatòria: Juny 2021

Resum

Els esquistòcits són cèl·lules vermelles fragmentades formades pel dany mecànic en la membrana quan els eritròcits, que es mouen ràpidament, impacten amb els brins de fibrina durant la coagulació. El reconeixement d'esquistòcits és de gran importància pel diagnòstic de les anèmies hemolítiques microangiopàtiques (MAHA) ja que representen la principal alteració en la sang perifèrica dels pacients que pateixen d'aquestes greus malalties. No obstant, la diversitat de formes provoca variabilitat en les interpretacions dels observadors.

L'objectiu principal del treball, és la creació d'un model d'aprenentatge profund basat en xarxes neuronals convolucionals (CNN) per la classificació automàtica binària d'esquistòcits i eritròcits més altres possibles anomalies secundàries, i el posterior recompte d'esquistòcits pel diagnòstic del trastorn. El model pot contribuir a reduir el biaix dels facultatius.

Es generen 15 models mitjançant la variació de cinc paràmetres: mida dels lots d'entrenament i validació, número de filtres, tècnica de regularització, algoritme d'optimització i número d'iteracions. En aquell amb major rendiment es canvia el llindar de classificació i l'exactitud assoleix el 95.43%. Tot seguit, es testeja el model amb els 11 frotis sanguinis disponibles, cada un d'un pacient, i es duu a terme el recompte d'esquistòcits per a la identificació del trastorn en base a un llindar estandarditzat igual o superior a l'1%.

La finalitat futura és la contribució en el laboratori clínic i l'optimització de la gestió gràcies a l'algoritme de reconeixement i recompte automàtic d'esquistòcits.

Paraules clau: xarxes neuronals convolucionals, deep learning, esquistòcits, anèmia hemolítica microangiopàtica, sang perifèrica

Resumen

Los esquistocitos son células rojas fragmentadas formadas por el daño mecánico en la membrana cuando los eritrocitos, que se mueven rápidamente, impactan con las hebras de fibrina durante la coagulación. El reconocimiento de esquistocitos es de gran importancia para el diagnóstico de las anemias hemolíticas microangiopáticas (MAHA) puesto que representan la principal alteración morfológica en la sangre periférica en los pacientes que sufren de estas graves enfermedades. Sin embargo, la diversidad de formas provoca variabilidad en las interpretaciones de los observadores.

El objetivo principal del trabajo es la creación de un modelo de aprendizaje profundo basado en redes neuronales convolucionales (CNN) para la clasificación automática binaria de esquistocitos y eritrocitos más otras posibles anomalías secundarias, y el posterior recuento de esquistocitos para el diagnóstico del trastorno. El modelo puede contribuir a reducir el sesgo de los facultatius.

Se generan 15 modelos mediante la variación de cinco parámetros: medida de lotes de entrenamiento y validación, número de filtros, técnica de regularización, algoritmo de optimización y número de épocas. En aquél con mayor rendimiento se cambia el umbral de clasificación y la exactitud alcanza el 95.43%. Seguidamente, se testea el modelo con los 11 frotis sanguíneos disponibles, uno por paciente, y se lleva a cabo el recuento de esquistocitos para la identificación del trastorno en base a un umbral estandarizado igual o superior al 1%.

La finalidad futura es la contribución en el laboratorio clínico y la optimización de la gestión gracias al algoritmo de reconocimiento y recuento automático de esquistocitos.

Palabras clave: redes neuronales convolucionales, deep learning, esquistocitos, anemia hemolítica microangiopática, sangre periférica

Abstract

Schistocytes are fragmented red cells formed by mechanical damage to the membrane when rapidly moving erythrocytes impact with fibrin strands during coagulation. The recognition of schistocytes is of great importance for the diagnosis of microangiopathic hemolytic anemia (MAHA) when they represent the main morphological alteration in the peripheral blood. However, the diversity of shapes causes variability in the interpretations of the observers.

The main objective of the work is the creation of a deep learning model based on convolutional neural networks (CNN) for automated binary classification of schistocytes and erythrocytes plus other possible secondary abnormalities, and the subsequent schistocyte count for the diagnosis of the disorder. The model may contribute to reduce the bias of the clinical pathologists.

A number of 15 models are generated by varying five parameters: training and validation batches size, number of filters, regularization technique, optimization algorithm and number of epochs. In the one with the highest performance, the classification threshold is changed and the accuracy reaches 95.43%. The model is then tested with the 11 available blood smears, one per patient, and the schistocyte count is carried out for the identification of the disorder based on a standardized threshold equal to or higher than 1%.

The future purpose is the contribution in the clinical laboratory and the management optimization thanks to the automatic schistocyte recognition and counting algorithm.

Keywords: convolutional neural networks, deep learning, schistocytes, microangiopathic hemolytic anemia, peripheral blood



Agraïments

M'agradaria donar les gràcies, en primer lloc, al Dr. Jose Rodellar Benede per encaminar en un principi el treball, oferir-me els recursos imprescindibles per a la seva realització i, sobretot, per la oportunitat. En segon lloc, dono les gràcies a la Dra. Andrea Acevedo Lipes pel coneixement ofert en els algoritmes per la creació d'una xarxa neuronal convolucional i per la seva guia i preocupació durant el treball.

També agraeixo als integrants restants del Grup de Recerca d'Hematologia de l'Hospital Clínic per posar-me les imatges a disposició, sobretot al Dr. Angel Molina per la segmentació de les imatges, la Dra. Anna Merino per la revisió de les bases biològiques i Laura Boldú per l'explicació d'un dels articles del Grup.

Per últim als meus amics per simplement estar i quedar-se i, sobretot, a la meva família per educar-me, comprendre'm i donar-me suport. Mai estaré tan agraït. Gràcies. *Gracias.*



Glossari

ANN: Xarxa Neuronal Artificial

CNN: Xarxa Neuronal Convolucional

Deep learning: aprenentatge profund

DIC: Coagulació intravascular disseminada

Esquistòcit: fragment de glòbul vermell

Hb: Hemoglobina

HUS: Síndrome hemolítica urèmica

Machine learning: aprenentatge automàtic

MAHA: Anèmia Hemolítica Microangiopàtica

Overfitting: sobre ajust d'un algoritme durant el seu entrenament

ReLU: Unitat Lineal Rectificada, una funció d'activació

TMA: Anèmia Microangiopàtica Trombòtica

TTP: Porpra trombocitopènica trombòtica

Underfitting: insuficient entrenament d'un algoritme



Índex

RESUM	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRAÏMENTS	V
GLOSSARI	VII
ÍNDIX DE FIGURES	XIII
ÍNDIX DE TAULES	XVII
1. PREFACI	1
1.1. Origen del treball	1
1.2. Motivació	1
1.3. Requeriments previs	1
2. INTRODUCCIÓ	3
2.1. Objectius del treball	3
2.2. Abast del treball	4
3. BASES BIOLÒGIQUES	5
3.1. Sistema vascular	5
3.1.1. Vasos sanguinis	5
3.2. La sang	6
3.3. Hematopoesi	7
3.3.1. Eritropoesi	9
3.4. Cèl·lules sanguínies	11
3.4.1. Eritròcits	11
3.4.2. Leucòcits	13
3.4.3. Plaquetes	15
3.5. Preparació d'un frotis sanguini	15
3.6. Alteracions i malalties eritrocitàries	17
3.6.1. Esquistòcits	18
4. FONAMENTS D'APRENTATGE AUTOMÀTIC I APRENTATGE PROFUND BASATS EN XARXES NEURONALS	23

4.1.	Xarxes neuronals.....	24
4.1.1.	Concepte de referència.....	24
4.1.2.	Arquitectura	25
4.1.3.	Funcions d'activació.....	26
4.1.4.	Gradient descent i backpropagation	30
4.2.	Xarxes neuronals convolucionals	32
4.2.1.	Concepte de referència.....	32
4.2.2.	Convolució.....	33
4.2.3.	Subsampling: Pooling.....	35
4.2.4.	Overfitting i underfitting.....	35
4.2.5.	Regularització.....	36
4.2.6.	Classificació	38
5.	ANÀLISI DEL CONJUNT DE DADES _____	39
5.1.	Presentació de les dades	39
5.2.	Organització de les dades.....	40
5.3.	Balanceig de les dades.....	41
6.	CREACIÓ DE LA XARXA NEURONAL CONVOLUCIONAL DES DE ZERO _____	45
6.1.	Construint la xarxa	45
6.2.	Entrenament i avaluació.....	48
6.3.	Ajustant els paràmetres.....	50
6.3.1.	Assaig 1: mida del lot	51
6.3.2.	Assaig 2: número de filtres	53
6.3.3.	Assaig 3: regularització L2.....	55
6.3.4.	Assaig 4: optimitzador	56
6.3.5.	Assaig 5: epochs.....	59
6.4.	Resultats.....	60
7.	RECOMPTE D'ESQUISTÒCITS PER FROTIS _____	67
7.1.	Avaluació de la CNN en els frotis.....	68
7.2.	Recompte d'esquistòcits	72
8.	ANÀLISI DE L'IMPACTE AMBIENTAL _____	75
9.	CONCLUSIONS _____	77
	PRESSUPOST I/O ANÀLISI ECONÒMICA _____	79
	Material i software	79

Mà d'obra.....	79
Pressupost final.....	81
BIBLIOGRAFIA _____	83
ANNEX A: RECOMPTE D'ESQUISTÒCITS AMB LLINDAR DE 0.29 _____	89





Índex de Figures

Figura 3.1. Diagrama del sistema vascular [6].	6
Figura 3.2. Arbre hematopoètic del desenvolupament de les principals línies sanguínies [10].	9
Figura 3.3. Esquema de l'eritropoesi [8].	11
Figura 3.4. Representació esquemàtica de l'hemoglobina (Hb) [8].	12
Figura 3.5. Eritròcits o glòbuls vermells [17].	13
Figura 3.6. Leucòcits o glòbuls blancs: neutròfil, eosinòfil, basòfil, limfòcit i monòcit. Imatges de la base de dades de l'Hospital Clínic.	14
Figura 3.7. Plaqueta o trombòcit. Imatge de la base de dades de l'Hospital Clínic.	15
Figura 3.8. Dibuix esquemàtic d'una extensió sanguínia realitzada en un portaobjectes d'esquerra a dreta [24].	16
Figura 3.9. Microfotografia d'una zona d'un frotis sanguini. Imatge de la base de dades de l'Hospital Clínic.	17
Figura 3.10. Classificació i representació d'alteracions eritrocitàries [25].	18
Figura 3.11. (a) i (b): microfotografies amb esquistòcits indicats amb fletxes. Imatges de la base de dades de l'Hospital Clínic.	19
Figura 3.12. Diagrama de flux pel recompte d'esquistòcits segons les directrius de l'ICSH (redactat originalment per B. J. Bain) [30].	21
Figura 4.1. Relació entre intel·ligència artificial, machine learning, xarxes neuronals i deep learning.	24
Figura 4.2. Esquerra: neurona biològica [44]. Dreta: neurona artificial [45].	25
Figura 4.3. Arquitectura d'una xarxa neuronal.	26

Figura 4.4. Funció d'activació lineal o identitat. _____	26
Figura 4.5. Funció d'activació llindar. _____	27
Figura 4.6. Funció d'activació sigmoide. _____	28
Figura 4.7. Funció d'activació tangent hiperbòlica. _____	28
Figura 4.8. Funcions d'activació ReLU i la seva derivada Leaky ReLU. _____	29
Figura 4.9. Funció d'activació softmax. _____	30
Figura 4.10. Representació de l'objectiu del descens de gradient [49]. _____	31
Figura 4.11. Representació dels efectes del learning rate. A l'esquerra, quan és massa petit. A la dreta, quan és massa gran. _____	31
Figura 4.12. Arquitectura d'una xarxa neuronal convolucional (CNN) [66]. A mesura que succeeixen les capes, major és el nombre de mapes de característiques (profunditat) però menor la seva mida (altura x amplada). _____	32
Figura 4.13. Convolució 2D entre una matriu d'entrada $X_{3 \times 3}$ amb $p = (1 \times 1)$, donant lloc a la matriu X_{padded} i un filtre $W_{3 \times 3}$, amb $s = (2 \times 2)$. El resultat és la matriu $Y_{2 \times 2}$ [46]. _____	34
Figura 4.14. Max Pooling i Average Pooling. _____	35
Figura 4.15. Representació d'unferffing i overfitting en una regressió [54]. _____	36
Figura 4.16. Regularització per drop-out [46]. _____	37
Figura 5.1. Escalat d'una imatge d'esquístòcit. _____	40
Figura 5.2. Distribució d'imatges abans i després de l'augment de dades. _____	41
Figura 5.3. Imatges d'esquístòcits. (a) Imatge original. (b), (c), (d) Imatges transformades. _____	42
Figura 5.4. Organització i distribució d'imatges per directori. _____	43

Figura 6.1. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 1.	50
Figura 6.2. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 2.	52
Figura 6.3. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 3.	52
Figura 6.4. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 4.	52
Figura 6.5. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 5.	54
Figura 6.6. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 6.	54
Figura 6.7. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 7.	55
Figura 6.8. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 8.	55
Figura 6.9. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 9.	56
Figura 6.10. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 10.	57
Figura 6.11. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 11.	57
Figura 6.12. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 12.	57
Figura 6.13. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 13.	59
Figura 6.14. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 14.	59
Figura 6.15. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 15.	60
Figura 6.16. Matriu de confusió.	61
Figura 6.17. Matrius de confusió del model M4. La matriu de l'esquerra presenta els valors en quantitat d'imatges i la matriu de la dreta en proporcions.	62
Figura 6.18. Corba ROC del model M4.	63

Figura 6.19. Matrius de confusió del model M4 amb llindar = 0.29. _____	64
Figura 6.20. Imatges de no esquistòcits classificades com esquistòcits. _____	65
Figura 6.21. Imatges d'esquistòcits classificades com no esquistòcits. _____	65
Figura 7.1. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 1. Dreta: frotis 2. _____	69
Figura 7.2. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 3. Dreta: frotis 4. _____	69
Figura 7.3. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 5. Dreta: frotis 6. _____	70
Figura 7.4. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 7. Dreta: frotis 8. _____	70
Figura 7.5. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 9. Dreta: frotis 10. _____	70
Figura 7.6. Matrius de confusió del frotis 11. _____	71
Figura 0.1. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 1. Dreta: frotis 2. _____	89
Figura 0.2. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 3. Dreta: frotis 4. _____	89
Figura 0.3. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 5. Dreta: frotis 6. _____	90
Figura 0.4. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 7. Dreta: frotis 8. _____	90
Figura 0.5. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 9. Dreta: frotis 10. _____	90
Figura 0.6. Matriu de confusió amb llindar 0.29 del frotis 11. _____	91

Índex de Taules

Taula 5.1. Agrupació del conjunt d'imatges per frotis. _____	39
Taula 6.1. Exactitud i pèrdua de test del model 1 amb els seus paràmetres. _____	50
Taula 6.2. Models amb modificació de paràmetres. _____	51
Taula 6.3. Models de l'assaig 1. _____	53
Taula 6.4. Models de l'assaig 2. _____	54
Taula 6.5. Models de l'assaig 3. _____	56
Taula 6.6. Models de l'assaig 4. _____	58
Taula 6.7. Models de l'assaig 5. _____	60
Taula 6.8. Mètriques del model M4 per diferents llindars. _____	64
Taula 7.1. Imatges d'esquistòcits i no esquistòcits per frotis. _____	67
Taula 7.2. Mètriques de cada frotis a partir del model M4. _____	71
Taula 7.3. Recompte d'esquistòcits per frotis. _____	73
Taula 0.1.a. Costos de material i software. _____	79
Taula 0.2.b. Costos d'enginyeria. _____	80
Taula 0.3.c. Costos de medicina. _____	80
Taula 0.4.d. Pressupost final. _____	81
Taula 0.1.e. Mètriques de cada frotis M4 llindar 0.29. _____	91
Taula 0.2.f. Recompte d'esquistòcits per frotis llindar 0.29. _____	92





1. Prefaci

1.1. Origen del treball

El treball neix de la necessitat d'utilitzar un mètode de classificació automàtica d'imatges de cèl·lules sanguínies, eficient i ràpid i que no depengui del biaix de l'observador clínic.

Els esquistòcits, fragments de glòbuls vermells, són una alteració amb interès mèdic per la principal patologia associada: l'anèmia hemolítica microangiopàtica (MAHA). La seva detecció és molt important perquè permet guiar el diagnòstic i donar tractament ràpid i adequat al pacient. Uns algorismes en auge que permeten fer la distinció entre esquistòcits i altres eritròcits són les xarxes neuronals convolucional (CNN), que són la font del projecte.

1.2. Motivació

La motivació de l'elecció d'aquest treball prové d'haver cursat l'assignatura "Processament d'Imatges Biomèdiques". Em va despertar un interès en aquest àmbit sense jo donar-me compte del tot fins que va ser el processament d'imatges al que primer vaig recórrer al pensar en el Treball de Fi d'estudis (TFG). La majoria d'imatges amb les que treballava eren radiològiques i el món del cervell tant enrevessat però organitzat em va començar a cridar l'atenció.

Quan el professor José Rodellar em va proposar un treball com el present no vaig dubtar. M'oferien els recursos i treballaria amb imatges que processaria amb xarxes neuronals convolucional. No entenia aquest concepte bastant difícil de pronunciar, però al cercar informació i veure que s'inspiraven en el funcionament del cervell, no podia demanar res més.

1.3. Requeriments previs

Els coneixements de programació i fisiologia adquirits durant el grau han sigut de gran ajuda pel desenvolupament del treball. En la mateixa línia, també ha contribuït la matèria d'aprenentatge bioestadístic cursada alhora que el TFG. A més, degut al desconeixement de les xarxes neuronals artificials i convolucional, s'ha realitzat un seguiment del bloc de reconeixement de patrons del "Master's degree in Interdisciplinary & Innovative Engineering" de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Per treballar amb els algorismes en un temps satisfactori s'ha requerit la connexió remota a un servidor de la UPC amb accés a una GPU (Unitat de Processament Gràfic) amb la instal·lació de la Deepbox.

El treball s'ha realitzat en un ordinador portàtil amb la instal·lació necessària de:

- Llenguatge de programació Python 3.6.9.
- Plataforma de distribució de Python Anaconda.
- Aplicació web de codi obert Jupyter Notebook.
- Llibreria de codi obert TensorFlow amb especial importància l'API (Interfície de programació d'aplicacions) d'alt nivell Keras per l'entrenament de les xarxes neuronals convolucionals.
- Altres llibreries com NumPy, matplotlib i pandas.
- Processador de text Microsoft Word.
- Plataforma Google Meet.

2. Introducció

Els eritròcits són les cèl·lules sanguínies més nombroses a la sang. La seva funció principal és el transport d'oxigen dels pulmons cap als teixits del cos i el retorn de diòxid de carboni en sentit invers. Com altres funcions, aquesta és de gran importància i sempre existeix el risc de ser entorpida.

Unes de les alteracions morfològiques dels glòbuls vermells són els esquistòcits, fragments d'eritròcits amb variabilitat en la forma. La seva detecció en la sang perifèrica i posterior recompte són imprescindibles pel diagnòstic d'anèmia hemolítica microangiopàtica (MAHA), un trastorn on els esquistòcits representen la principal alteració morfològica dels hematies i on apareix la formació de trombes plaquetaris. També es detecten en el síndrome HELLP, que es pot presentar a dones embarassades durant el tercer trimestre de la gestació, lo que motiva a una actuació clínica ràpida per salvar la vida de la mare i del nadó. Les malalties associades a la presència d'esquistòcits a la sang son una urgència mèdica.

A dia d'avui el diagnòstic de MAHA es fa a partir del recompte d'esquistòcits al microscopi per part del personal clínic. A causa de les diferències de formes que els esquistòcits presenten, hi ha discrepàncies entre els observadors. Per això es requereix d'una eina que eviti les variacions i permeti classificar esquistòcits d'altres cèl·lules sanguínies. El model computacional per dur-ho a terme són les xarxes neuronals convolucional (CNN), uns tipus de xarxes neuronals que s'inspiren en el funcionament del còrtex visual del cervell pel reconeixement d'objectes, animals, vegetals, etc.

Les CNN formen el *deep learning* o aprenentatge profund, i són capaces d'aprendre les característiques de les mostres d'entrada per realitzar una separació de classes.

2.1. Objectius del treball

L'objectiu principal del treball és el desenvolupament d'una CNN per la classificació automàtica d'imatges d'esquistòcits i d'eritròcits on també poden estar agregades altres alteracions morfològiques. Una vegada creada la xarxa neuronal es porta a lloc el recompte d'esquistòcits pel diagnòstic de MAHA en cada pacient.

Específicament, els objectius al llarg del treball són:

- Entendre les bases biològiques que es ramifiquen per conèixer els esquistòcits i comprendre la importància en el seu reconeixement.
- Entendre els conceptes involucrats en les xarxes neuronals artificials i convolucional i el procés que duen a terme.

- Analitzar les dades d'entrada i la seva organització per la correcta creació d'una CNN.
- Cerca del millor model mitjançant l'ajust dels hiperparàmetres i paràmetres.
- Entendre el desequilibri entre classes i les mètriques útils per mesurar el rendiment del classificador.
- Recompte d'esquistòcits pels 11 frotis o pacients i justificar el diagnòstic de MAHA.

2.2. Abast del treball

És vital la correcta classificació entre esquistòcits i eritròcits més altres alteracions (a partir d'ara esquistòcits i no esquistòcits). Gràcies al mètode automàtic proposat es deixa enrere el biaix de l'observador però la variabilitat en la forma segueix sent un problema per l'entrenament de la xarxa neuronal, tenint en compte, a més, les poques imatges a l'abast.

No obstant, l'algoritme pretén ajudar als facultatius en el diagnòstic d'hora del trastorn i actuar en conseqüència amb un tractament, mentre el personal compara els seus resultats amb els de la màquina. A mesura que es comprovi el bon funcionament de l'algoritme, els facultatius estalvien temps i deixen pas a la classificació automàtica. Tot i així, existeix la limitació que el rendiment no assolirà el 100%, per tant, sempre hi haurà un error que en un futur podria reduir-se.

LA CNN realitza una classificació binària però a l'hora de fer el recompte d'esquistòcits, ha de ser aquesta l'alteració principal pel diagnòstic del trastorn. No s'han classificat altres anomalies degut a la suposició d'haver obtingut els 11 frotis sanguinis havent ja descartat les alternatives de MAHA.

3. Bases biològiques

3.1. Sistema vascular

El sistema vascular està constituït pels vasos sanguinis, que transporten la sang per l'organisme, i pel sistema limfàtic, que transporta la limfa. S'encarrega de mantenir l'homeòstasi cel·lular, és a dir, manté la funció cel·lular, porta oxigen, nutrients com les vitamines o els minerals, i hormones a les cèl·lules, i recull diòxid de carboni i altres productes de rebuig [1]. També és el responsable de la resposta immunitària, gràcies a la producció dels limfòcits i a la neteja dels teixits, i del transport de grasses cap a la sang [2].

3.1.1. Vasos sanguinis

Els vasos sanguinis formen una xarxa ordenada de cilindres que passen per gairebé tots els òrgans del cos humà. Hi ha 5 tipus: artèries, arterioles, capil·lars, venes i vènules. La majoria de vasos estan formats per 3 capes o túniques:

- **Túnica íntima:** és la més interna, generalment la més fina, i la única en contacte directe amb la sang. Està composta per cèl·lules endotelials, formant així el teixit endotelial, a part del col·lagen i l'elastina. Aquestes característiques la fan de gran importància en els aspectes relacionats amb l'homeòstasi.
- **Túnica mitja:** és la capa intermèdia. Tot i que conté col·lagen i fibres d'elastina, hi predominen les cèl·lules del múscul llic. Gràcies a elles permet que el vas es contregui o es dilati segons les seves necessitats.
- **Túnica adventícia:** és la més externa, i la més complexa, orientada cap a una funció de protecció. Està composta majoritàriament per teixit conjuntiu fibroelàstic. Per la capa hi passen fibres nervioses, cèl·lules del sistema immune, entre altres, que eviten lesions provinents de l'entorn. Els vasos més grans, com l'aorta, també presenten vasa vasorum, una xarxa de vasos sanguinis que aporten nutrients i oxigen [1], [3].

El cor és l'òrgan que bombeja la sang cap als vasos sanguinis i, que després, li és retornada. La sang oxigenada que retorna dels pulmons i passa per l'aurícula esquerra arriba al ventricle esquerra. Des d'aquesta cavitat, la sang és impulsada cap a les **artèries**, començant per l'artèria aorta. Les artèries més properes al cor són elàstiques, ja que han de suportar la pressió exercida per la sang bombejada pel cor. Aquestes es comuniquen amb les artèries musculars, de diàmetre més petit, que distribueixen la sang cap a tots els òrgans i teixits. Es van ramificant en vasos més petits, les **arterioles**, les quals regulen el flux i la pressió sanguínia per no provocar danys als **capil·lars**.

Els capil·lars són el punt d'inflexió de la circulació sanguínia perquè connecten el sistema arterial amb el sistema venós. Estan formats per una única capa de cèl·lules endotelials i el seu diàmetre tant petit els hi permet dur a terme l'intercanvi de nutrients, aigua i soluts entre els teixits i la sang. En els pulmons entreguen el diòxid de carboni i recullen l'oxigen. En canvi, en els teixits arriben els nutrients i l'oxigen, i recullen el diòxid de carboni i altres productes de rebuig, desoxigenant la sang.

Després del bescanvi corresponent, els capil·lars s'uneixen per formar les **venúcles**, i aquestes les **venes**. Tenen una paret més fina que les artèries perquè la pressió sanguínia es menor. Tot i així, les venes dels membres inferiors presenten vàlvules que eviten el reflux de la sang, i totes elles més les restants la retornen al cor a través de la vena cava superior i la vena cava inferior [1], [4], [5].

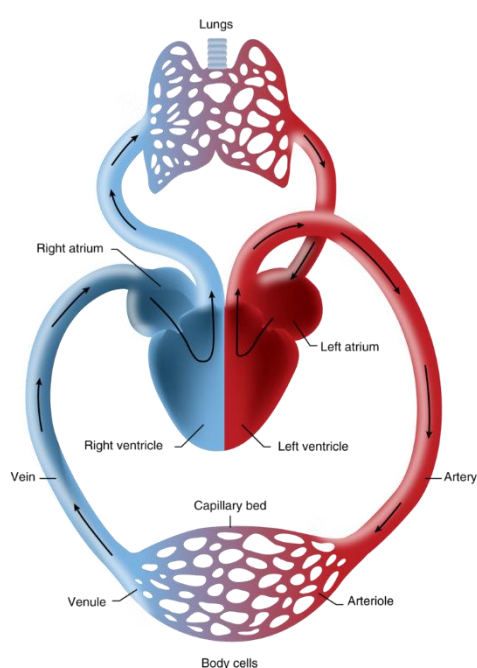


Figura 3.1. Diagrama del sistema vascular [6].

3.2. La sang

La sang és un fluid especialitzat del cos, incompressible i viscoelàstic. És conduïda pels vasos sanguinis i representa aproximadament entre el 7 i el 8 per cent del pes corporal. Les funcions de la sang són àmplies, entre les que es troben el transport d'oxigen i nutrients cap als teixits i els pulmons, el transport de productes de rebuig cap als ronyons i el fetge, la formació de coàguls sanguinis i la regulació de la temperatura [7].

La sang està formada per quatre components bàsics que es poden classificar en dos grups:

- **Plasma:** és el component líquid i representa el 55% de la sang. És una mescla d'aigua (92%), proteïnes plasmàtiques (7%) i altres soluts (1%) com sucre o sals. La funció principal del plasma és el transport de les cèl·lules sanguínies junt amb nutrients i altres productes [2]. Les proteïnes més abundants són:
 - o Les albúmines (60%): són les majors responsables de la pressió osmòtica del plasma i transporten àcids grassos i hormones.
 - o Globulines (35%): són importants perquè algunes d'elles són anticossos, imprescindibles per la resposta immunitària, i altres transporten àcids grassos i vitamines.
 - o Fibrinogen: és el precursor de la fibrina i responsable important de la coagulació de la sang.
- **Cèl·lules sanguínies:** són la part sòlida i representen el 45% de la sang. Els seus components són les cèl·lules vermelles o eritròcits (RBC), les cèl·lules blanques o leucòcits (WBC) i les plaquetes. A l'apartat 3.4. s'hi explicaran en més detall, en específic els eritròcits, objectes d'aquest treball.

3.3. Hematopoesi

L'hematopoesi és el procés biològic (formació, desenvolupament i maduració) que dona lloc a les cèl·lules sanguínies. Tant a l'edat embrionària com a l'edat adulta les cèl·lules es van regenerant per reposar el sistema sanguini. Degut a que la vida mitja d'aquestes cèl·lules és relativament curta, la producció diària s'aproxima als $2,5 \times 10^9$ eritròcits per kg de pes corporal, el mateix per les plaquetes i 1×10^9 leucòcits per kg [8].

Tot i que normalment es diu que l'origen de la seva producció és la **medul·la òssia (MO)**, hi ha altres òrgans involucrats durant el desenvolupament embrionari. Durant les dues primeres setmanes de gestació, el sac vitel·lí és el responsable, juntament amb cèl·lules mare que formen illots sanguinis. Entre el segon i el setè mes, són el fetge i en menor grau la melsa, els ganglis limfàtics i el tim i, fins el naixement la principal encarregada és la medul·la òssia. A partir de llavors es converteix en la única font de producció en condicions normals. El fetge i la melsa poden recuperar la seva funció hematopoètica en condicions patològiques, procés anomenat hematopoesi extra medul·lar [8].

Una **cèl·lula mare hematopoètica (HSC)** és aquella que donarà lloc a tots els eritròcits, leucòcits i plaquetes. Les HSC són cèl·lules mare multipotents. Són cèl·lules amb la capacitat d'auto-renovació, és a dir, de passar per moltes divisions cel·lulars i diferenciar-se en cèl·lules sanguínies madures, mantenint l'estat indiferenciat. S'identifiquen gràcies a la presència de marcadors de superfície, com les proteïnes CD34 i CD90, i per la carència de marcadors específics de llinatge.

Les HSC generen dos tipus de cèl·lules progenitores pluripotents:

- **Progenitor limfoide comú (PLC)** o unitat formadora de colònies limfoides (CFU-L) [9]. Forma la línia cel·lular limfoide, que es diferencia en precursors compromesos que són cèl·lules mare. Cada línia acaba diferenciant-se per obtenir cèl·lules madures: limfòcits B, limfòcits T, cèl·lules natural killer, i cèl·lules ILC [10].
- **Progenitor mieloide comú (PMC)** o unitat formadora de colònies granulocítiques, eritrocítiques, monocítiques i megacariocítiques (CFU-GMM) [9]. Forma la línia cel·lular mieloide, que es diferencia en unitats formadores de colònies (CFU) que són precursors compromesos i cèl·lules mare. Aquests es diferencien en precursors hematopoètics i acaben madurant en eritròcits, plaquetes, neutròfils, monòcits, eosinòfils, basòfils, mastòcits, megacariòcits [8], [10].

Durant la proliferació i maduració de les cèl·lules hi actuen els **factors estimulants de colònies (CFS)** o factors de creixements hematopoètics, glicoproteïnes que estimulen aquest procés. Els CFS són produïts pels macròfags, limfòcits T estimulats, cèl·lules endotelials, fibroblasts i en altres llocs que després són transportats a la MO, com l'**eritropoetina (EPO)**, secretada pel ronyó i, en menor mesura, pel fetge [8].

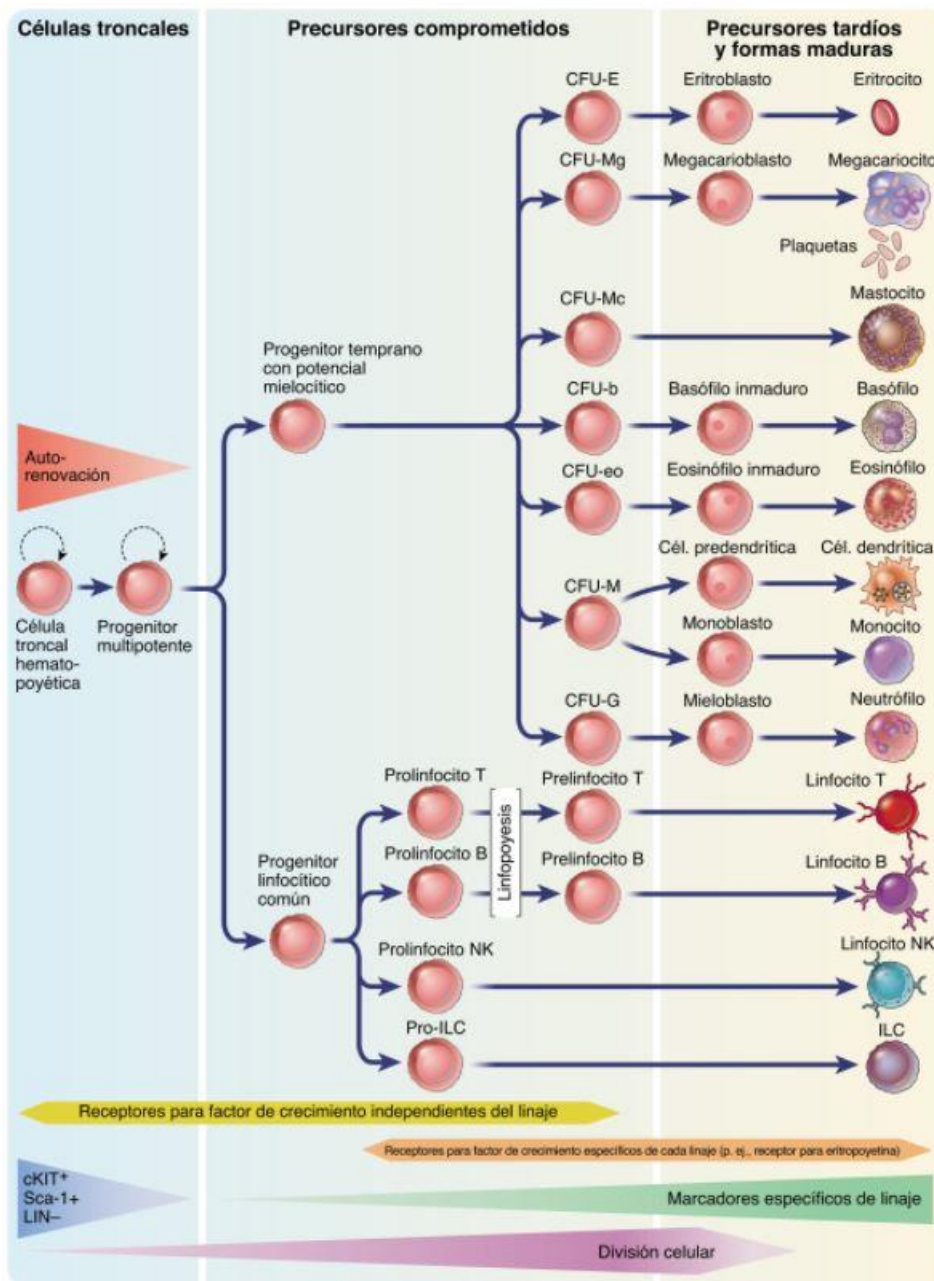


Figura 3.2. Arbre hematopoètic del desenvolupament de les principals línies sanguínies [10].

3.3.1. Eritropoesi

L'eritropoesi és el procés de formació ordenat dels eritròcits que, en un adult en condicions normals es realitza íntegrament a la MO. A partir d'una cèl·lula mare pluripotent es generen cèl·lules progenitores morfològicament indiferenciades i, després, cèl·lules precursors ja diferenciades que donen lloc als eritròcits. L'objectiu és mantenir un número adequat i constant de cèl·lules vermelles perquè aquestes puguin fer la seva funció.

La primera cèl·lula progenitora compromesa cap a la línia eritroide que deriva de la cèl·lula mare pluripotent és la **BFU-E** (de l'anglès *burst forming unit-erythroid*), capaç de formar colònies grans amb més de 200 eritroblasts en un medi de cultiu. D'ella apareix una cèl·lula progenitora tardana anomenada **CFU-E** (de l'anglès *colony forming unit-erythroid*), capaç de formar una o dues colònies amb un total de 8 a 200 eritroblasts en un medi de cultiu [9].

La maduració de la CFU-E dona lloc al **proeritroblast**, la primera cèl·lula de la línia vermella morfològicament diferenciada. És 10 vegades més gran que un eritròcit, conté un nucli que ocupa la major part del volum citoplasmàtic, citoplasma basòfil i sense grànuls, i nuclèols mal definits. La transformació restant per obtenir els eritròcits passa per 45 divisions successives on les cèl·lules van madurant a eritroblasts, cèl·lules precursoras eritroides nucleades, fins perdre el nucli.

El proeritroblast madura per generar **eritroblasts basòfils**, més petits, amb citoplasma basòfil i, on la cromatina comença a agregar-se i condensar-se. Aquestes cèl·lules es diferencien en **eritroblasts policromatòfils** amb la cromatina més condensada. Això provoca un augment de la producció d'hemoglobina (Hb), hemoproteïna que conté l'oxigen per entregar als teixits i el diòxid de carboni per portar als pulmons. Aquests eritroblasts es diferencien en **eritroblasts ortocromàtics** o normoblasts que són les últimes cèl·lules de la sèrie amb nucli. Els normoblasts expulsen el nucli per extrusió, el qual és fagocitat pels macròfags, i donen lloc als **reticulòcits**. Tot i que són cèl·lules anucleades, contenen ribosomes i mitocondries els quals tenen la capacitat de sintetitzar els components de l'Hb (globina i hemo, respectivament). Els reticulòcits passen a la sang perifèrica (SP) i perden els receptors pels ribosomes i les mitocondries degut al contacte amb uns macròfags esplènics al tim. Finalment, es transformen en les pròximes 24-48 hores en **eritròcits** madurs [8], [11].

L'Hb està formada per quatre subunitats, cada una amb una cadena de globina -normalment parelles de α_2 i β_2 - i un grup hemo. En el centre dels quatre grups hemo s'hi troba el **ferro**, el qual és imprescindible pel transport dels gasos, ja que és un dels responsables de la síntesi d'Hb [12]. El ferro és transportat pel plasma cap als eritroblasts policromatòfils o les altres cèl·lules que sintetitzen Hb mitjançant la transferrina (una proteïna transportadora). La membrana de les cèl·lules presenta un receptor de la transferrina, el ferro entra a les mitocondries i es sintetitza el grup hemo. Això provoca la transcripció de l'àcid ribonucleic missatger (ARNm) del nucli als ribosomes, els quals comencen la síntesi de les cadenes de globina [8].

És a l'eritropoesi on la glicoproteïna EPO fa la seva funció: estimular la formació d'eritròcits. El seu punt àlgid és en la cèl·lula CFU-E, ja que de totes les intervinents en el procés, és la que presenta més receptors d'aquest factor de creixement. Per aquest motiu, té especial importància en la proliferació i diferenciació de CFU-E en proeritroblasts.

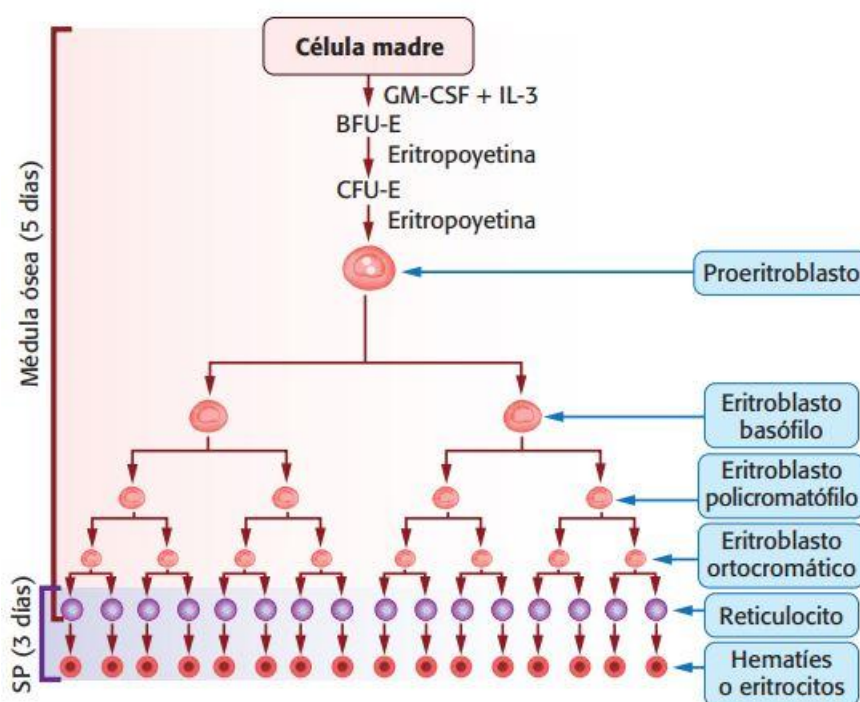


Figura 3.3. Esquema de l'eritropoesi [8].

3.4. Cèl·lules sanguínies

Les cèl·lules sanguínies són aquelles formades gràcies a l'hematopoesi. Els tres tipus principals són els eritròcits, els leucòcits i les plaquetes.

3.4.1. Eritròcits

Els **eritròcits, glòbuls vermells o hematies (RBC)** són les cèl·lules més nombroses en la sang ($4\text{-}5 \times 10^{12}/l$), representant el 99% [2]. Són discos bicòncaus amb un diàmetre aproximat de $7,5 \mu m$, $2 \mu m$ de gruix a la part perifèrica, $1 \mu m$ a la part central degut a l'absència de nucli i un volum mitjà de $90 fl$ [8].

Els components de la membrana i la manca de nucli permeten a l'eritròcit deformar-se al pas pels vasos sanguinis més petits. Però aquesta característica és una arma de doble tall, ja que al fer-ho, la membrana de les cèl·lules queda danyada i esgota les reserves energètiques. Per aquest motiu, la seva vida mitjana és aproximadament de 120 dies en el torrent sanguini. Quan envelleixen, la membrana es torna rígida i, finalment, són eliminats pels macròfags [7].

La membrana dels eritròcits està formada per tres components principals:

- **Lípids:** representen el 40% de la membrana. Els fosfolípids formen una bicapa lipídica, exposant les parts hidròfiles a l'interior i exterior de la cèl·lula, i les parts hidròfobes a l'interior de la bicapa. D'aquesta manera s'evita l'hemòlisi (desintegració de l'eritròcit per l'excés d'aigua al seu interior) i la seva eliminació per part dels macròfags. El colesterol, incorporat entre la bicapa ajuda a la flexibilitat del glòbul. Si la seva proporció augmenta respecte els fosfolípids, la membrana es torna més rígida.
- **Proteïnes:** representen el 50%. Comprenen les proteïnes integrals i les perifèriques. Les primeres es poden trobar dins la bicapa lipídica i tenen funcions de transport i adhesió. Les segones estan involucrades en la morfologia de l'eritròcit.
- **Carbohidrats:** representen el 10%. La majoria es troba en les glucoproteïnes i en els glucolípidis, que actuen com determinants antigènics.

La funció principal dels eritròcits és el transport d'oxigen des dels pulmons a la resta del cos i el retorn del diòxid de carboni en sentit invers per ser exhalat. Aquesta funció la duu a terme específicament dins dels glòbuls vermells l'**hemoglobina**, com s'ha dit anteriorment. L'Hb és la que dona el color vermell als eritròcits i, a causa del seu alt percentatge a la sang, també a aquesta.

Per la sortida de l'oxigen dels pulmons, l'O₂ s'ha de fixar a l'Hb. La primera molècula que s'uneix ho fa dèbilment a la desoxihemoglobina (Hb sense oxigenar), però aquest enllaç provoca un canvi conformacional de l'Hb i la molècula s'expandeix, millorant així l'associació de la resta de molècules per les altres subunitats [12], [8]. A mesura que augmenta la concentració d'O₂ o la pressió parcial d'oxigen (pO₂), major és la proporció d'oxihemoglobina (Hb oxigenada). Quan la sang arriba als teixits, l'O₂ s'allibera i es forma la desoxihemoglobina.

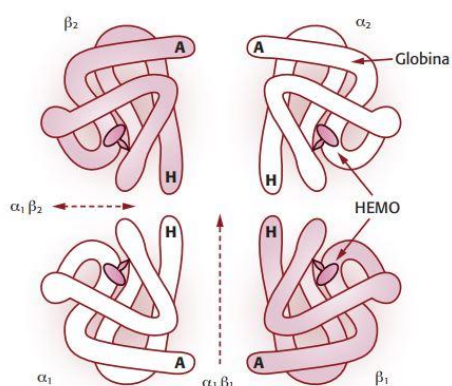


Figura 3.4. Representació esquemàtica de l'hemoglobina (Hb) [8].

Amb el transport d'O₂ i CO₂, els glòbuls vermells regulen el pH sanguini. L'intercanvi de gasos generaria un augment de l'acidesa de la sang, però el pH es manté gràcies a la capacitat amortidora de l'Hb.

L'obtenció d'energia és imprescindible perquè, no només els eritròcits, sinó totes les cèl·lules, puguin sobreviure. Si el nostre cos no en produeix, ens veurem cansats i en situacions molt pitjors. Els glòbuls vermells no poden sintetitzar lípids ni proteïnes perquè no presenten els orgànuls del nucli que farien la funció en altres cèl·lules. La solució és la degradació de la glucosa de forma anaeròbica (sense oxigen) per diferents vies gràcies als enzims, cofactors i l'aigua, entre altres. D'aquesta manera obtenen les molècules d'adenosina trifosfat (ATP), que és l'equivalent de l'energia, i són capaços de mantenir el transport d'ions i oferir les substàncies necessàries pel compliment de la funció de l'hemoglobina [8].



Figura 3.5. Eritròcits o glòbuls vermells [17].

3.4.2. Leucòcits

Els **leucòcits o glòbuls blancs (WBC)** són cèl·lules que es poden trobar tant a la sang com al teixit limfàtic. Són menys nombroses que els eritròcits ($4\text{-}11 \times 10^9/\text{l}$), conformant el 1% del volum sanguini total en un adult en condicions normals [8]. La seva vida pot ser d'hores, mesos o inclús anys, depenent del tipus de glòbul blanc. Els leucòcits formen part del sistema immunitari i el seu principal objectiu és la protecció del cos contra agents infecciosos.

Hi ha diferents tipus de glòbuls blancs que es podrien classificar en dos grups: **granulòcits** i **no granulòcits**. La diferència rau en la presència de grànuls després d'una tinció sota el microscopi. El primer grup en presentarà abundants grànuls i, el segon, tot i que pel seu nom sembli que no en presentin, sí tindran però en quantitat molt inferior [13].

Els grànuls que presenten els granulòcits són de dos tipus: primaris o azuròfils i secundaris o específics. Els primaris són lisosomes necessaris per l'eliminació dels microorganismes. Els secundaris intervenen en l'activació de la fagocitosis. Els tres tipus de leucòcits granulòcits són els següents [7], [14], [15]:

- **Neutròfils (55 – 70%):** són els més abundants i els que actuen primer davant d'una infecció. S'adhereixen a la superfície endotelial dels teixits i ajuden a destruir i digerir bacteries i fongs.

- **Eosinòfils** (2 – 5%): s'encarreguen de respondre a les infeccions provocades pels paràsits i atacar les cèl·lules cancerígenes. També s'activen en les respostes al·lèrgiques.
- **Basòfils** (< 1%): són els menys abundants, tot i que la seva producció augmenta quan apareix una reacció al·lèrgica. Secreten histamina, entre altres substàncies, per controlar la resposta immunitària.

Els leucòcits agranulòcits són mononuclears, no contenen grànuls secundaris, però sí en poden tenir d'azuròfils. En aquest grup de leucòcits es troben:

- **Limfòcits** (20 – 35%): s'inclouen tres principals tipus responsables del sistema immunitari. Els **limfòcits B** produeixen anticossos -proteïnes que s'enllacen amb els antígens dels agents estranys-, en la resposta immune humoral. Els **limfòcits T** participen en el reconeixement i eliminació de les cèl·lules causants de les infeccions. Les **cèl·lules Natural Killer (NK)** són cèl·lules citotòxiques encarregades de matar cèl·lules tumorals, virals o infectades. També les **cèl·lules limfoides innates (ILCs)** formen part de la sèrie limfoide, preferentment es troben en les mucoses participant en la resposta immune [7], [14], [15].
- **Monòcits** (2 – 8%): ajuden a descompondre les bacteries i a combatre les infeccions cròniques. Els monòcits es poden diferenciar en macròfags i cèl·lules dendrítiques. Els **macròfags** passen del torrent sanguini als teixits per destruir material estrany i netejar els cossos restants després de la resposta dels neutròfils. Les **cèl·lules dendrítiques** fagociten patògens properes a l'entorn extern de l'organisme [16].

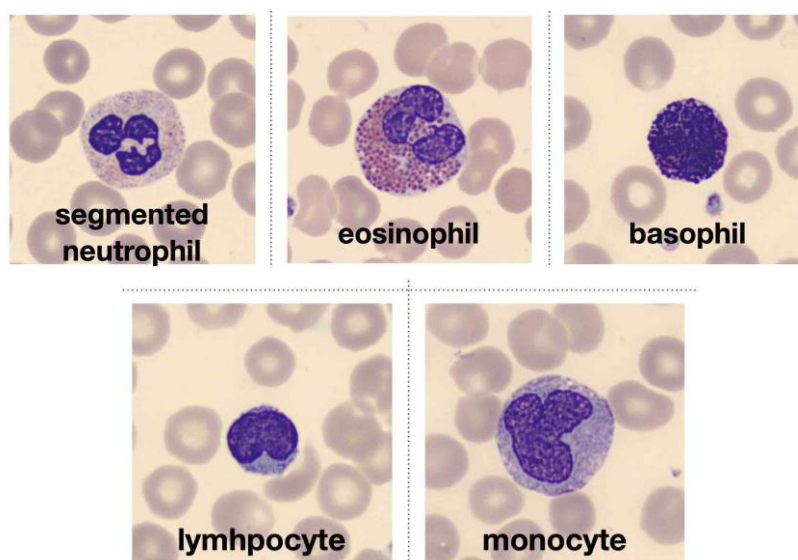


Figura 3.6. Leucòcits o glòbuls blancs: neutròfil, eosinòfil, basòfil, limfòcit i monòcit. Imatges de la base de dades de l'Hospital Clínic.

3.4.3. Plaquetes

Les **plaquetes o trombòcits** no són cèl·lules com a tal com ho són els eritròcits i els leucòcits. Realment, les plaquetes són fragments del citoplasma dels megacariòcits (cèl·lules gegants), i estan envoltades per una membrana citoplasmàtica. Cada megacariòcit allibera entre 2000 i 3000 plaquetes durant la seva vida útil i la resta de la cèl·lula és digerit pels macròfags [13]. Aquest procés està controlat per una hormona secretada pels ronyons i el fetge anomenada trombopoietina (TPO).

Les plaquetes tenen forma de disc amb un diàmetre de 2 a 4 μm . Els valors normals de plaquetes a la sang són de $150\text{-}400 \times 10^9/\text{l}$, i la seva vida útil es troba entre 8 i 10 dies [8].

La funció principal és la producció de coàguls sanguinis per aturar el sagnat i cicatritzar la ferida. El vas sanguini danyat envia senyals a les plaquetes perquè hi vagin al lloc. Una vegada allà, s'adhereixen unes amb les altres i amb el revestiment del vas, produint així la coagulació. Mentre, envien senyals químiques per atraure més plaquetes, que s'afegeixen en un procés anomenat agregació. El resultat és un coàgul de fibrina que tapa la ferida. Després, la fibrina formarà part de la bastida (*scaffold* en anglès) sobre el que es repararà el teixit [7], [18].

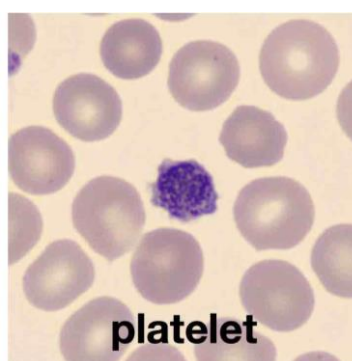


Figura 3.7. Plaqueta o trombòcit. Imatge de la base de dades de l'Hospital Clínic.

3.5. Preparació d'un frotis sanguini

Per avaluar les cèl·lules sanguínies i el percentatge de cada una d'elles a la sang i observar la seva morfologia es realitza un **frotis sanguini**. Aquesta tècnica ajuda en la detecció i el diagnòstic de malalties i trastorns, i en els efectes de la resposta terapèutica en els casos que s'estiguin seguint [19]. Malgrat els avenços en l'automatització de l'hematologia, el frotis sanguini segueix sent "l'estàndard d'or" (*the gold standard* en anglès) en el diagnòstic hematològic [20].

Per a la realització del frotis de la sang perifèrica s'obté una mostra de sang, ja sigui a través d'una punció a la punta del dit o mitjançant una venopunció (extracció d'una vena) [21]. La sang recollida

s'emmagatzema en un tub amb anticoagulants EDTA (àcid tetraacètic d'etilè diamina), ja que són els que millor conserven la morfologia de les cèl·lules, tenint en compte la correcta proporció sang – anticoagulant determinada pel tub. La mostra ha d'arribar al laboratori i analitzar-se durant les pròximes 2 hores a l'extracció per evitar la degeneració de les cèl·lules. Sinó, pot refrigerar-se a 4°C, sempre i quan es realitzi el frotis durant les pròximes 24 hores [22].

El mètode més utilitzat per fer l'extensió és el mètode de falca. Es col·loca una gota de sang sobre un portaobjectes aproximadament a 1 cm d'un dels extrems. Un altre portaobjectes amb la vora polida forma un angle de 30 - 45° respecte l'altre, retrocedeix per tocar la gota i fer que la sang s'expandeixi a l'ample i, finalment, el portaobjectes escampador avança, formant una pel·lícula fina de sang. Després es deixa assecar a l'aire. Passat el temps, el frotis es fixa amb metanol absolut o alcohol etílic i es tenyeixen les cèl·lules amb algun dels mètodes disponibles, normalment amb una mescla d'eosina (component àcid) i blau de metilè (component bàsic). Després de diluir amb aigua taponada, esbandir amb aigua corrent i netejar la cara inferior del portaobjectes, s'observa la mostra al microscopi [19], [23].

Normalment s'observa la part central del frotis, on el percentatge de cèl·lules més representa la sang de l'organisme, però tot depèn dels interessos dels professionals. Per exemple, si un pacient presentés símptomes d'immunodeficiència podria examinar-se la zona més gruixuda com s'observa a la Figura 3.8. En canvi, per identificar un augment o una disminució d'algun tipus de cèl·lula polimorfonuclear (leucòcits granulòcits) s'examinaria la cua del frotis.

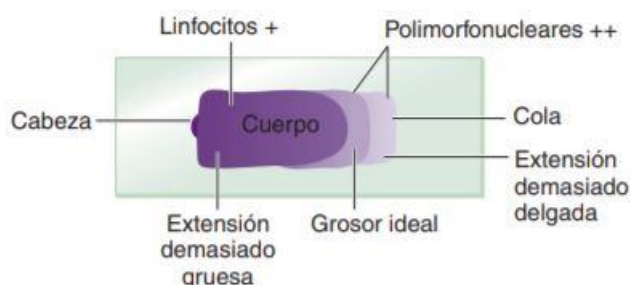


Figura 3.8. Dibuix esquemàtic d'una extensió sanguínia realitzada en un portaobjectes d'esquerra a dreta [24].

A part d'enfocar-se en la morfologia de les cèl·lules, també es fa un recompte d'elles, on l'avaluació manual (per exemple en la càmera de Neubauer) s'està substituint cada vegada més pels recomptes automatitzats, més precisos. En aquestes tècniques s'analitza l'hematòcrit (HCT) que, segons [23] "és la relació existent entre el volum d'eritròcits i el volum total de sang, expressat en percentatge". Un descens de l'HCT és un diagnòstic d'anèmia, mentre que un augment ho és de policitemia, no tant comú.

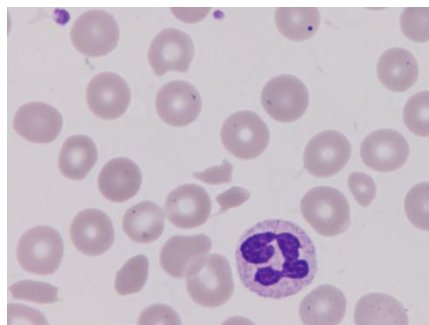
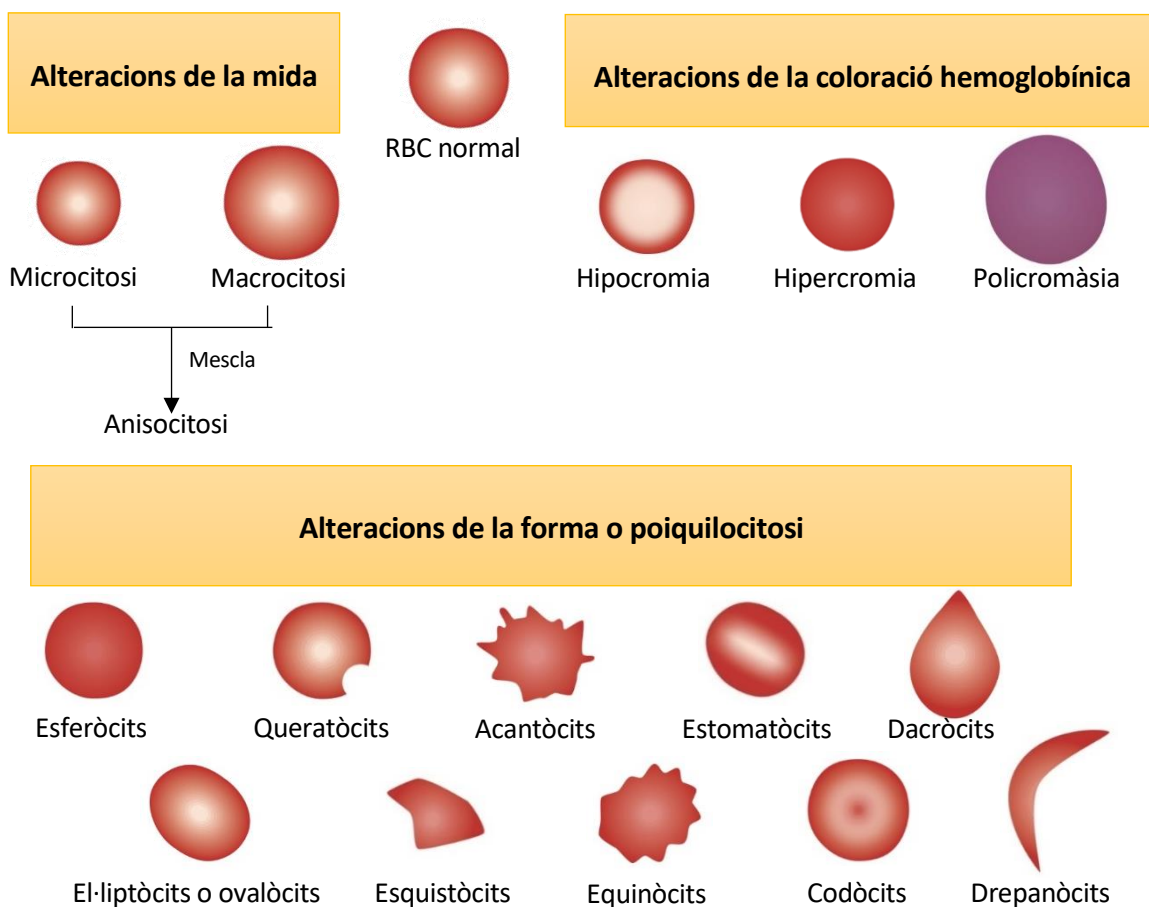


Figura 3.9. Microfotografia d'una zona d'un frotis sanguini. Imatge de la base de dades de l'Hospital Clínic.

3.6. Alteracions i malalties eritrocitàries

Anteriorment s'ha descrit la morfologia d'un eritròcit normal, però quan s'excedeixen els límits, ja sigui en mida, forma, color, distribució o presència d'altres cossos, el pacient pot patir un trastorn, malaltia o patologia eritrocitària.

A la Figura 3.10 es representen algunes alteracions eritrocitàries.



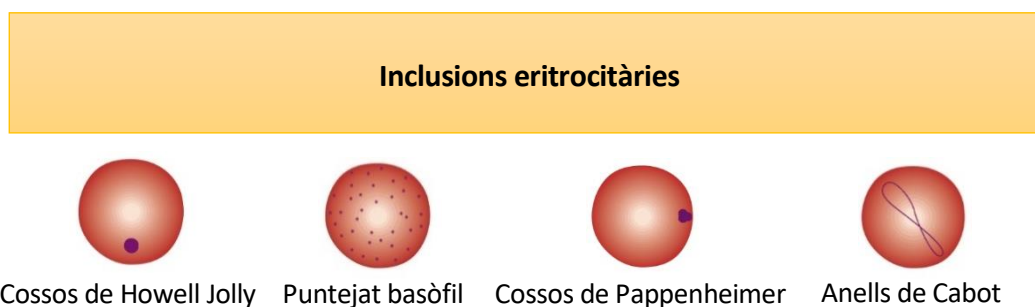


Figura 3.10. Classificació i representació d'alteracions eritrocitàries [25].

El trastorn sanguini més comú present a moltes de les alteracions és l'**anèmia**. Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'anèmia afecta al voltant de 1620 milions de persones en tot el món [26]. Pacients amb insuficiència renal, infeccions i malalties cròniques com l'artritis reumatoide, entre d'altres, estan en major risc d'anèmia.

Hi ha diferents tipus d'anèmies que es classifiquen per criteris etiopatogènics (origen del trastorn) o per la morfologia [8]. Tres exemples són [27]:

- Anèmia ferropènica: el tipus més comú. Té lloc quan hi ha deficiència de ferro, deguda a la pèrdua de sang (motiu pel qual les dones embarassades tenen un elevat risc) o a la mala absorció del metall.
- Anèmia falciforme: la morfologia dels eritròcits es veu alterada per una mutació en una de les cadenes de l'Hb, provocant l'obstrucció de la circulació dels vasos sanguinis.
- Anèmia hemolítica: els glòbuls vermells es descomponen en el torrent sanguini i la medulla òssia no és capaç de generar-ne més per substituir-los. Les causes poden ser mecàniques, com fallades en les vàlvules cardíques o trastorns autoimmunes.

Existeixen més trastorns relacionats amb els eritròcits, com la talassèmia i la mielofibrosis, però com l'objectiu del treball és la classificació entre esquistòcits i altres glòbuls vermells, es detallaran els aspectes relacionats amb aquesta alteració morfològica.

3.6.1. Esquistòcits

Els **esquistòcits** són fragments de glòbuls vermells o hematies dels quals s'han després fragments citoplasmàtics. En adults sans normalment no excedeixen el 0.2% de cèl·lules vermelles, tot i que en nounats prematurs poden arribar al 5.5% [28]. Són petits (2-3 μm) [29], però la **variabilitat** de la seva forma donava lloc a diagnòstics erronis i a la no uniformitat dels criteris utilitzats per cada laboratori.

Per això, el Grup de Treball d'Esquistòcits del Consell Internacional d'Estandarització d'Hematologia (ICSH) va definir unes característiques morfològiques en casos positius: "cèl·lules de casc, cèl·lules petites, triangulars irregulars o en forma de mitja lluna, projeccions punxegudes i falta de pal·lidesa central" [30].

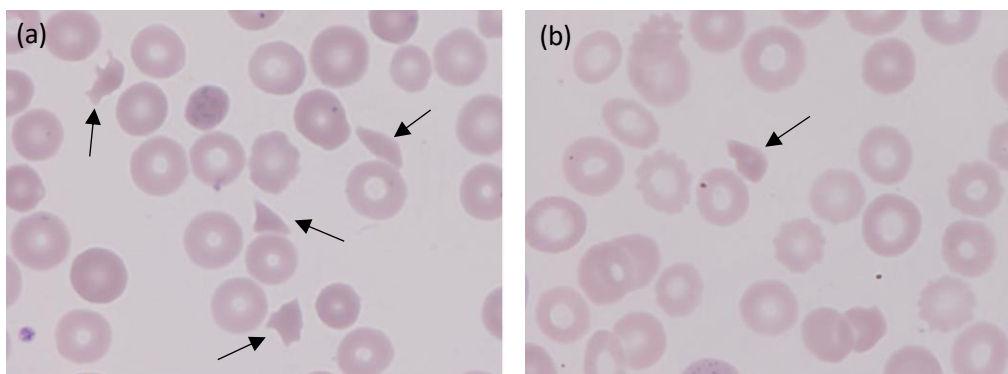


Figura 3.11. (a) i (b): microfotografies amb esquistòcits indicats amb fletxes. Imatges de la base de dades de l'Hospital Clínic.

La formació dels esquistòcits es deu al dany mecànic de la membrana dels eritròcits. En el procés de coagulació, alguns glòbuls vermells es mouen ràpidament cap al vas sanguini danyat i xoquen amb els brins de fibrina que formen els coàguls. Durant la interacció, aquests eritròcits es mouen entre les xarxes de fibrina que, amb l'ajuda del flux sanguini, els trenquen i formen els esquistòcits [20], [31].

La seva detecció és important pel diagnòstic d'**anèmia hemolítica microangiopàtica (MAHA)**, la qual pot ocórrer aïlladament, per exemple a causa de fallides en les vàlvules cardíaques, o com s'observa normalment, amb trombocitopènia (MAHAT), definint l'**anèmia microangiopàtica trombòtica (TMA)** [32].

Les causes de MAHA i les síndromes que inclou són:

- **Porpra trombocitopènica trombòtica (TTP):** està relacionada amb una deficiència en l'enzim plasmàtic ADAMTS13, una desintegrina i proteasa que escindeix el factor von Willebrand (VWF) per evitar l'acumulació de cèl·lules endotelials. Aquesta deficiència inferior a un 10% de lo normal és adquirida a través d'anticossos de la proteasa, però en casos menors s'hereta una mutació autosòmica recessiva (dues còpies mutades del mateix gen) del gen ADAMTS13. Quan ocorre, el VWF no s'escindeix, s'acumulen les cèl·lules i es formen trombes plaquetaris. El reconeixement de TTP ha de ser ràpid. Normalment es tracta amb un recanvi plasmàtic d'ADAMTS13 deficient fins la disminució de l'activitat de la malaltia. Tot i així, inclús amb tractament, la taxa de mortalitat és del 10% - 20% [33], [34].

- **Síndrome hemolítica urèmica (HUS):** les xarxes de fibrina damnifiquen les plaquetes i els eritròcits, causant MAHA i provocant dany renal agut, sobretot durant la infantesa. En la majoria de casos el HUS hi té lloc després d'una infecció intestinal aguda per la toxina Shiga (Stx) produïda per bacteris com l'*Escherichia coli* (*E. Coli*), que passa dels intestins al torrent sanguini, a causa del consum de productes en mal estat, poc processats o per l'exposició a aigua contaminada [33], [35], [36].
El SUH es tracta amb atenció mèdica, inclosa l'hemodiàlisi aproximadament en el 50% dels casos.
- **Coagulació intravascular disseminada (DIC):** provoca una excessiva i anormal coagulació sanguínia (trombina i fibrina), causada per una infecció d'alguna malaltia, dany tissular greu o factors de coagulació de càncer o complicacions de l'embaràs. El DIC pot evolucionar lentament o ràpidament, en aquest últim cas arribant al sagnat dels òrgans.
Després del diagnòstic, es tracta la causa de la DIC i es controla la coagulació i el sagnat, però tot dependrà de l'evolució de la condició [33], [37].
- **Síndrome HELLP** (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count* en anglès): és una complicació de l'embaràs (tercer trimestre o inclús després del part) que afecta la sang i el fetge, considerada una variant de la preeclàmpsia. Al igual que aquesta, es caracteritza per pressió arterial alta i el mal funcionament d'alguns òrgans com el fetge o els ronyons.
El síndrome HELLP és difícil de diagnosticar per la presència de símptomes semblants en altres complicacions. Tot i així es requereix un tractament precoç mitjançant medicaments o transfusions de sang perquè sense aquest, un 25% presenta problemes greus [38].

Els esquistòcits són presents en pacients amb anèmia megaloblàstica per dèficit de vitamina B12 o àcid fòlic [29] o amb eritroleucèmia on hi ha una proliferació d'elements eritropoètics i granulòcits. També poden aparèixer per cremades greus on prenen la forma de disc o poden ser microsferòcits [28].

Pel diagnòstic de la TMA es fa un **recompte dels esquistòcits** a la sang perifèrica. Abans de realitzar-lo, s'ha de confirmar que l'esquistocitosi (formació d'esquistòcits) és la principal anomalia morfològica en el frotis, i no una entre d'altres que suggereixi un diagnòstic diferent. Amb aquesta premissa i a partir de la literatura, l'ICSH va definir un llinar $\geq 1\%$ del percentatge d'esquistòcits com a indicador citomorfològic robust per al diagnòstic de TMA en adults. Per l'avaluació, el grup de treball recomana haver comptat almenys 1000 glòbuls vermells. La Figura 3.12 presenta el diagrama de flux recomanat pel recompte d'esquistòcits en el diagnòstic de TMA.

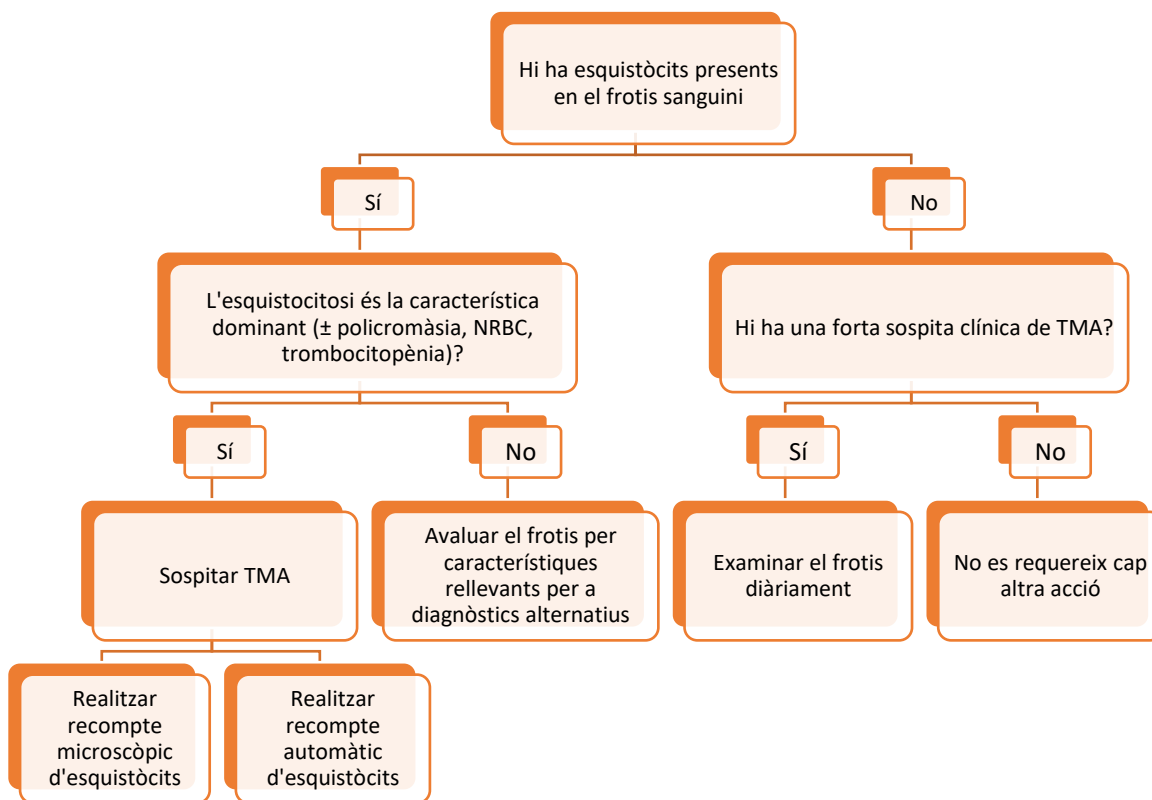


Figura 3.12. Diagrama de flux pel recompte d'esquistòcits segons les directrius de l'ICSH (redactat originalment per B. J. Bain) [30].

Tot i les recomanacions estandarditzades de l'ISCH, s'han presentat altres estudis, com el de [39] on el biaix de l'observador es redueix però continuen havent diferències en el recompte entre els dos morfòlegs per microscòpia. I consideren augmentar el llindar per distingir la TMA d'altres anomalies amb un nombre d'esquistòcits superior a l'1%.



4. Fonaments d'aprenentatge automàtic i aprenentatge profund basats en xarxes neuronals

La intel·ligència artificial (IA) es troba cada vegada més amb un pes important en el nostre dia a dia. Tot i que el seu origen es remunta a finals del segle XIX, el terme el va aflorar l'informàtic John McCarthy al 1955. Des de llavors, la seva definició guarda diverses interpretacions, però amb la posada en comú d'alguns punts de vista es podria dir que té l'objectiu de crear màquines i algoritmes que imitin el comportament humà. Una tasca complicada si continuen havent caixes negres que comprenen la intel·ligència i les neurones que l'envolten.

No obstant això, el coneixement creix exponencialment ara que ens trobem en l'era de la informació. Al 1997, una màquina anomenada Deep Blue desenvolupada per IBM va superar el rendiment humà al derrotar el campió mundial d'escacs Garri Kaspárov. Va ser una fita de la IA i del *machine learning* [40]. El **machine learning o aprenentatge automàtic** és una branca dins de la IA, i la diferència rau en que la disciplina dona a les màquines la **capacitat d'aprendre**. Per exemple, una cosa és programar una màquina perquè digui que totes les flors que se li presenten són lliris i, una altra ben diferent, és programar una màquina perquè aprengui a separar, no només lliris, sinó altres flors.

Per crear un model d'aprenentatge automàtic es necessiten unes dades d'entrada a l'algoritme, per exemple, imatges, que es transformaran en uns resultats mitjançant un procés en el que el model aprèn les característiques rellevants. Per portar-lo a lloc, ha de tenir disponibles unes entrades amb sortides conegudes que podrien ser imatges etiquetades amb el nom de la flor. I, per avaluar que el model està realment aprenent es fan servir unes mètriques, com podrien ser l'exactitud o la precisió [41].

Hi ha diferents tècniques dins del machine learning àmpliament utilitzades, com els algoritmes de regressió, arbres de decisió o classificació, però les que han guanyat protagonisme en els últims anys són les **xarxes neuronals**. Aquest tipus de models s'entrenen i aprenen de forma jerarquitzada a través de capes. Quantes més capes, més profund serà el model i més característiques s'extrauran. Aquest tipus d'aprenentatge s'anomena **deep learning o aprenentatge profund**, un camp dins del machine learning. Són algoritmes que s'inspiren en el funcionament del nostre cervell sense arribar a ser models d'ells i, per tant, són més complexos que els algoritmes de l'aprenentatge automàtic.

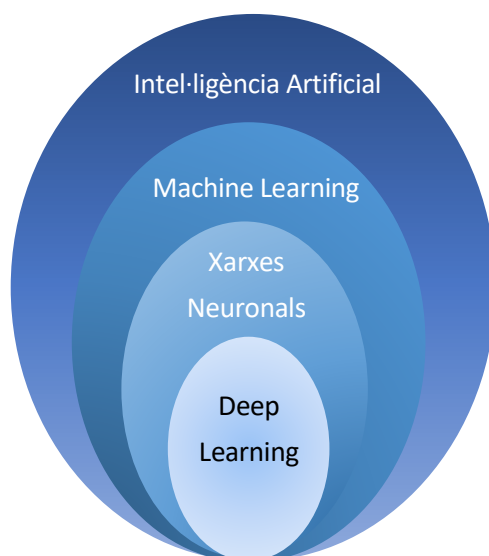


Figura 4.1. Relació entre intel·ligència artificial, machine learning, xarxes neuronals i deep learning.

4.1. Xarxes neuronals

4.1.1. Concepte de referència

Les **xarxes neuronals artificials (ANN** de l'anglès *Artificial Neural Network*) s'inspiren i intenten imitar el comportament de les neurones biològiques. La **neurona** és el principal component del sistema nerviós. Les 85 mil milions que l'encèfal conté aproximadament, es connecten entre sí de manera organitzada transmetent la informació a través de les sinapsis, els buits entre neurones. Les dendrites recullen la informació i el soma (cos cel·lular) processa el senyal. Quan s'excedeix un cert llindar, la neurona s'excita i el soma genera senyals químiques i un impuls elèctric que l'axó condueix cap a la següent neurona [42].

Al 1943, McCulloch i Pitts van crear un model de neurona artificial basada en el mecanisme biològic [43]. Però no va ser fins el 1958 quan Rosenblatt, amb les idees dels autors, va crear la primera xarxa neuronal, un algoritme simple anomenat **perceptró**. Aquest sistema estava format per unes entrades, com les dendrites, una funció d'activació que decideix quan activar l'impuls, com el soma i una sortida com l'axó, que enviaria el senyal a les següents neurones.

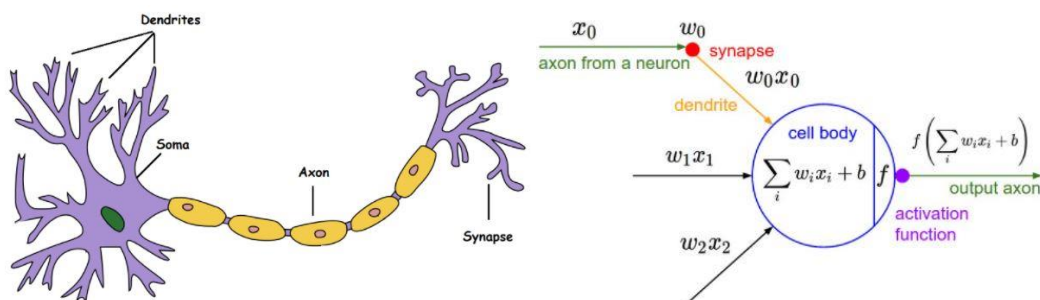


Figura 4.2. Esquerra: neurona biològica [44]. Dreta: neurona artificial [45].

4.1.2. Arquitectura

Les xarxes neuronals estan compostes per neurones o nodes, cada un amb un **pes o paràmetre** w_i que li assigna la importància a aquell node. Els nodes d'entrada x_i es multipliquen pels pesos i es fa la suma ponderada dels productes més el biaix b o error. El resultat passa per una funció d'activació i si supera el llindar establert, la informació es propagarà o, en el cas del perceptró, es predirà si la mostra pertany a una classe o una altra [46].

El perceptró té la limitació que només és capaç de resoldre problemes de dues classes linealment separables. Per això va evolucionar a perceptró multicapa (MLP o *multilayer perceptron* en anglès) on la xarxa neuronal està formada per tres tipus de capes:

1. **Capa d'entrada (input layer):** formada per totes les neurones o dades d'entrada que s'utilitzaran per entrenar la xarxa. Cada node es connecta amb tots els de la següent capa.
2. **Capa oculta (hidden layer):** poden estar integrades una o més capes ocultes, depenent de què tant sofisticat es desitja el model. Les neurones de la primera capa oculta són la sortida de la capa d'entrada després d'haver fet el sumatori dels productes. El resultat passarà a la capa de sortida si hi ha una sola o es repetirà el procés per les restants, sempre completament connectades unes amb les altres, inclosa la capa d'entrada i la capa de sortida.

Les primeres capes ocultes reconeixen aspectes més senzills com poden ser punts o línies, els quals s'aniran acoblant capa per capa per reconèixer, en les següents, característiques més específiques. Quantes més capes, més selectiva i precisa és la xarxa neuronal però major cost computacional comporta.

El número d'unitats de cada capa es pot variar com un hiperparàmetre per trobar el millor model.

3. **Capa de sortida (output layer):** és la última capa de la xarxa que fa la predicció de les mostres d'entrada. Per exemple, si després de l'entrenament de la xarxa, una imatge del dígit 7 la classifica com a tal o com un altre número. La capa presentarà tantes neurones com classes úniques es puguin predir.

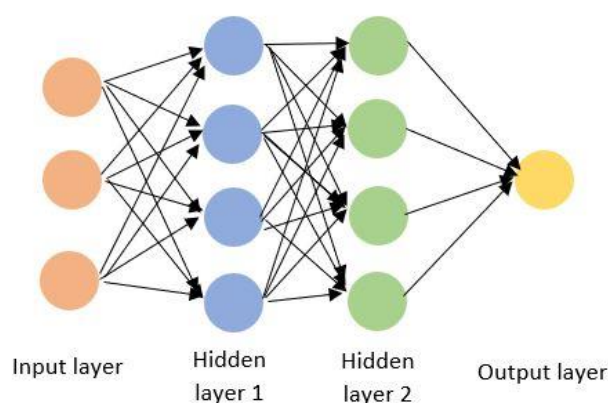


Figura 4.3. Arquitectura d'una xarxa neuronal.

4.1.3. Funcions d'activació

Una **funció d'activació** representa el potencial d'acció. Transforma les dades d'entrada de la neurona combinades amb els pesos en una sortida. Cada capa de la xarxa neuronal té una funció d'activació.

La informació transmesa pot no ser modificada si la funció d'activació és la **funció lineal o identitat**. En aquesta, l'entrada és igual a la sortida. Són útils quan hi ha dependència de variables linealment com a les regressions lineals, però no serveixen quan el model presenta funcions corbes o d'altres formes no lineals, com normalment passa al crear xarxes neuronals.

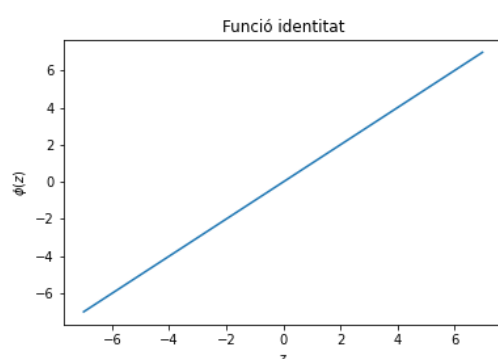


Figura 4.4. Funció d'activació lineal o identitat.

Les **funcions no lineals** més utilitzades són [46], [47]:

Funció llindar: molt utilitzada per la classificació binària de variables qualitatives o categòriques. Funciona quan les dues classes són linealment separables. Si la sortida d'una determinada mostra z és

major o igual que un llindar θ , la xarxa classificarà l'objecte en la classe 1. En qualsevol altre cas, serà de la classe -1. Es defineix de la següent manera:

$$\hat{y} = \phi(z) = \begin{cases} 1 & \text{if } z \geq \theta \\ -1 & \text{if } z < \theta \end{cases} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

on $\hat{y} = \phi(z)$ és l'etiqueta de la classe predita.

La funció de decisió té una alternativa amb la mateixa dinàmica quan el llindar és 0: si la sortida de la mostra z és menor que zero serà classe 0, però si és major o igual que zero serà classe 1.

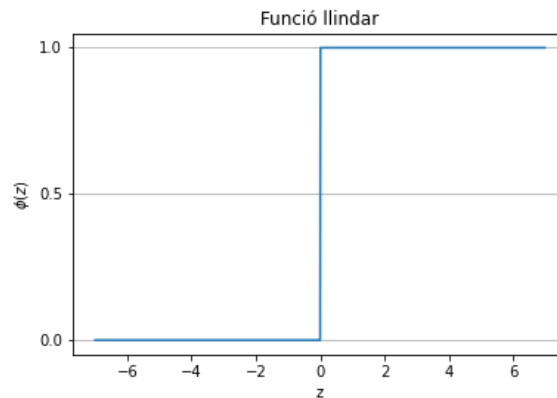


Figura 4.5. Funció d'activació llindar.

Funció sigmoide o funció logística: utilitzada també per la regressió i classificació binària. Es defineix com:

$$\phi(z) = \frac{1}{1 + e^{-z}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

La sortida està compresa entre 0 i 1. Els valors d'entrada negatius tendiran a 0 i els positius a 1. El valor d'entrada 0 queda centrat, per tant, la sortida serà de 0.5. Tot i que s'ha fet servir molt, en els últims anys està en desús perquè la funció està descentrada, afectant a l'entrenament de la xarxa neuronal i, per consegüent, influint en el problema de desaparició de gradient. És a dir, per valors d'entrada extrems, la funció no canvia gairebé res i, per tant, el gradient és tant petit que l'algoritme genera un error i la xarxa deixa d'aprendre amb la retropropagació (veure *Apartat 4.1.4.*).

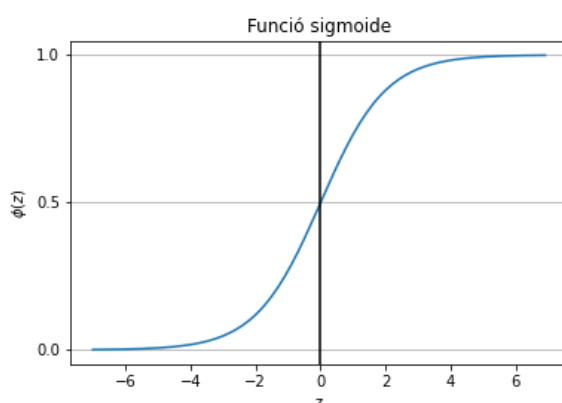


Figura 4.6. Funció d'activació sigmoide.

Funció tangent hiperbòlica: semblant a la funció sigmoide. En aquest cas els valors de sortida es troben entre -1 i 1.

$$\phi(z) = \frac{2}{1 + e^{-2z}} - 1 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Aquesta funció sí està centrada i el pendent de la derivada és més pronunciada. El rang és més ampli i dona a la xarxa la capacitat d'aprendre més ràpid. Tot i així, la desaparició de gradient segueix present.

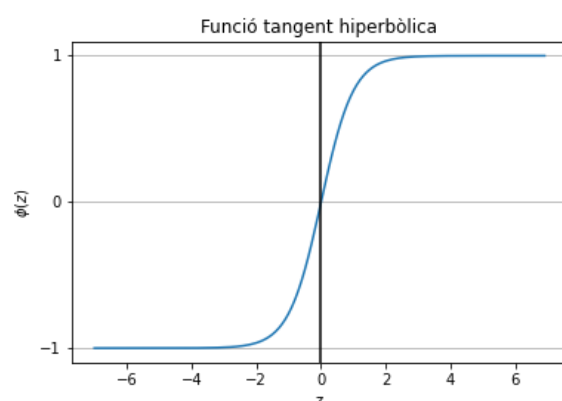


Figura 4.7. Funció d'activació tangent hiperbòlica.

Funció ReLU (Rectified Linear Unit): és la funció d'activació més utilitzada en xarxes neuronals convolucionals (CNN) pel ràpid aprenentatge de la xarxa. Es defineix com:

$$\phi(z) = \max(0, z) \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Si els valors d'entrada són positius, el resultat es manté, però amb valors negatius, la sortida és 0, evitant la seva activació i reduint la càrrega computacional. La desaparició de gradient es soluciona ja que la derivada dels valors positius és 1, però com la derivada dels negatius és 0 sorgeix un nou problema: la "mort" de les neurones. En aquests casos, la xarxa no realitza la retropropagació i deixa d'aprendre ja que els pesos no s'actualitzen, de manera que les neurones no podran activar-se en cap moment. Amb una taxa d'aprenentatge baixa, aquest fet no succeeix gaire, però per evitar-ho existeixen derivacions de la funció ReLU, com la Leaky ReLU.

Un dels objectius d'aplicar la funció rectificadora (ReLU) és augmentar la no linealitat quan les dades són imatges. Les imatges naturals solen presentar característiques no lineals com la transició entre píxels, però al fer la convolució, es pot imposar linealitat que gràcies a la funció ReLU la trenquem. A més, al mantenir-se l'entrada per valors positius, la sortida no es veu tant modificada com a les funcions anteriors.

Funció Leaky ReLU: la diferència amb la funció ReLU és que aquesta derivació presenta un petit pendent pels valors negatius, evitant que la derivada sigui 0 i, conseqüentment, evitant la "mort" de les neurones.

$$\phi(z) = \max(0.01z, z) \tag{Eq. 4.5}$$

Té el desavantatge que no proporciona prediccions consistents per valors d'entrada negatius. Per això existeixen altres derivacions de la funció ReLU com la ReLU paramètrica o la ReLU aleatòria [48].

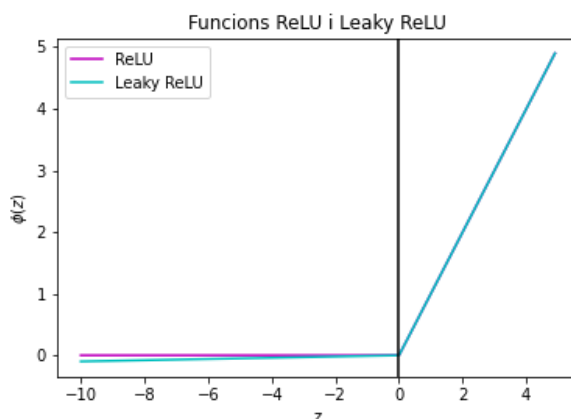


Figura 4.8. Funcions d'activació ReLU i la seva derivada Leaky ReLU.

Funció softmax: és la funció que normalment es fa servir en la capa de sortida per la classificació de les dades en els casos de classes múltiples.

$$[\phi(z)]_i = \frac{e^{z_i}}{\sum_{j=1}^t e^{z_j}} = P(y = i|z) \quad (\text{Eq. 4.6})$$

on z és un vector $z = (z_1, z_2, \dots, z_t)$

Donat el vector z de la capa de sortida, la funció softmax retorna la probabilitat de cada classe i prediu aquella amb major probabilitat. Per exemple, hi ha una imatge d'entrada i 3 classes. La probabilitat de que l'objecte de la imatge es classifiqui com a ordinador és d'un 0.5 (classe 1), que sigui un mòbil és d'un 0.2 (classe 2), i que sigui una televisió és d'un 0.3 (classe 3). La funció associarà l'objecte a un ordinador i el predirà com a classe 1.

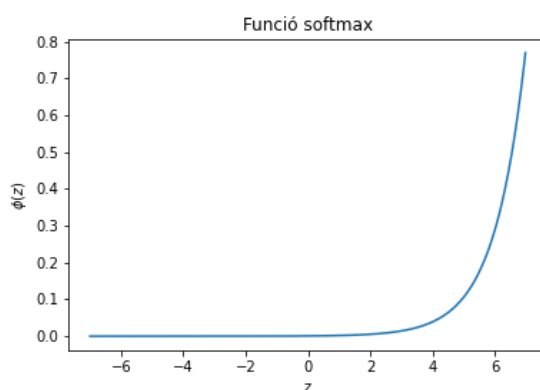


Figura 4.9. Funció d'activació softmax.

4.1.4. Gradient descent i backpropagation

L'objectiu d'una xarxa neuronal és aprendre quines són les característiques més rellevants de les entrades de cada capa per obtenir una predicció de la mostra inicial. Per això s'ha de trobar els pesos i biaixos que millor s'ajustin. En una primera iteració, és a dir, quan les dades d'entrada es passen una sola vegada per la xarxa, és difícil que totes les prediccions coincideixin amb les classes verdaderes. El valor que penalitza una predicció incorrecta és la pèrdua. I per saber si s'està aconseguint el correcte ajust dels paràmetres es defineix una **funció de cost o pèrdua (loss function)**. Si la funció de cost és gran, la predicció està lluny de la classe verdadera, i viceversa. Per tant, l'objectiu de l'entrenament és **minimitzar la funció de cost** a través dels pesos i els biaixos. Per portar-lo a lloc es fa servir l'algoritme conegut com **descens de gradient (gradient descent)** [47], [49].

El descens de gradient té la finalitat d'anar actualitzant els pesos i trobar on la funció de cost assoleix el seu mínim global. Els pesos que multipliquen les entrades a les capes són escollits aleatòriament. Per tant, si es suposa que la funció de cost és tan senzilla com la que es mostra a la Figura 4.10., el pes imaginat com un punt o bola es situarà aleatòriament al gràfic.

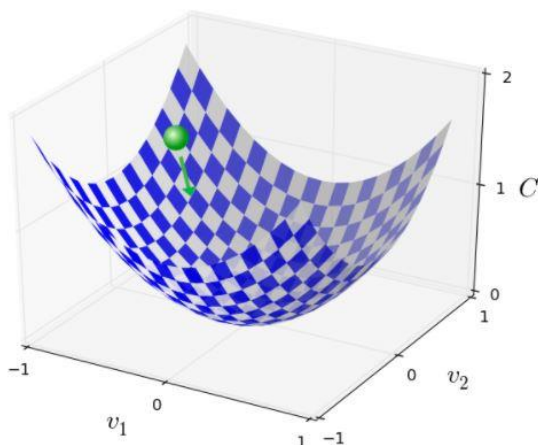


Figura 4.10. Representació de l'objectiu del descens de gradient [49].

El gradient de la funció de cost es defineix com un vector de derivades parcials de la funció de cost respecte cada un dels pesos. El resultat d'aplicar aquesta operació en el punt aleatori del gràfic és un vector de direccions (pendent) cap a on la pèrdua augmenta. La solució és que el punt es mogui en direcció contrària perquè s'apropi al mínim global. Finalment, el gradient es multiplica per la **taxa d'aprenentatge (learning rate o η)**, un hiperparàmetre entre 0 i 1.

L'elecció del learning rate és de gran importància per un model de xarxa neuronal. Si és molt petit, els passos que farà el punt en l'actualització d'aquell pes seran tant petits que el descens del gradient trobarà un mínim local i no el global i l'algorisme es detindrà, caient en *underfitting*. En canvi, si el learning rate s'aproxima a 1, els passos seran tant grans que la funció de cost mai es minimitzarà (*overfitting*). La Figura 4.11. representa els efectes del learning rate.

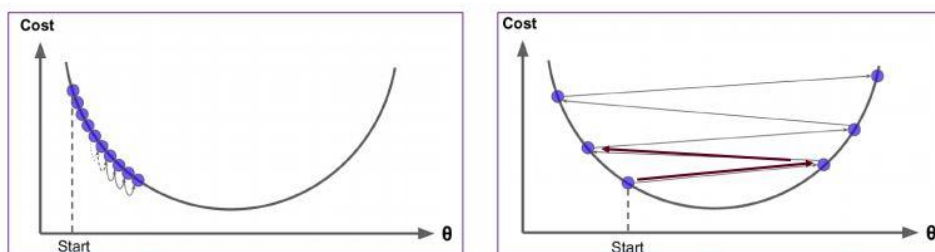


Figura 4.11. Representació dels efectes del learning rate. A l'esquerra, quan és massa petit. A la dreta, quan és massa gran.

Calcular una derivada parcial de la funció de cost respecte un pes en una xarxa neuronal és complicat per totes les connexions existents. Per això, per calcular el vector gradient s'utilitza una tècnica anomenada **backpropagation o retropropagació**, formalment introduïda per Rumelhart, Hinton i Williams [50]. A l'obtenir un error en la predicció, hi haurà neurones que hauran afectat amb més pes

al resultat incorrecte. Els pesos de les primeres capes es propaguen cap a les següents i s'acumula l'error, de manera que un pes elevat en una específica neurona de l'última capa oculta significarà que gran quantitat de l'error es troba connectat a aquesta neurona. Gràcies a l'algoritme backpropagation la xarxa neuronal és analitzada començant per la sortida i anant enrere, identificant l'error del pes de cada neurona en la predicció final mitjançant la retropropagació d'errors. Així, es calcula el vector gradient de cada paràmetre amb l'objectiu de minimitzar l'error o pèrdua [49].

4.2. Xarxes neuronals convolucionals

Existeixen diferents tipus de xarxes neuronals utilitzades pel reconeixement de veu, seguretat automàtica, finances, anàlisi empresarial, etc. En l'àmbit mèdic i el camp de visió per computadora, les **xarxes neuronals convolucionals (CNN** de l'anglès *Convolutional Neural Network*) són el centre d'atenció. Treballen amb imatges ja siguin radiològiques o de cèl·lules sanguínies, entre d'altres.

4.2.1. Concepte de referència

Les CNN s'inspiren en el funcionament del **còrtex visual** del cervell humà per a la identificació dels objectes. Aquesta àrea visual està dividida en regions o capes organitzades jeràrquicament. La primera regió, anomenada escorça visual primària o V1, rep la informació visual directe després de passar pel tàlem. Les neurones que la conformen són sensibles a característiques bàsiques dels objectes com orientacions, vores o punts. Quan es passa a la següent regió les característiques a veure són més complexes, com contorns o textures. Així successivament, els trets que s'extreuen de les capes anteriors es combinen per formar trets més complexos i específics fins identificar quin és l'objecte que es visualitza. Aquesta transformació és la que implementa una CNN [46].

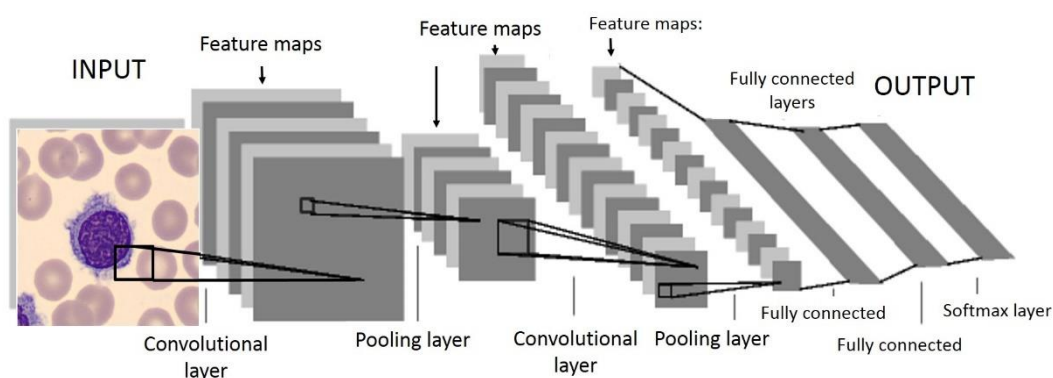


Figura 4.12. Arquitectura d'una xarxa neuronal convolucional (CNN) [51]. A mesura que succeeixen les capes, major és el nombre de mapes de característiques (profunditat) però menor la seva mida (altura x amplada).

Seguint el mateix procés, les CNN estan compostes per capes convolucional i capes de submostreig (*subsampling*) o *pooling* agrupades en blocs convolucional i, al final, una o més capes completament connectades.

Els paràmetres o descriptors d'entrada a la xarxa són píxels (neurones) de la imatge. Si una imatge té una mida de 28 x 28 píxels, hi hauria 784 neurones d'entrada. Si s'afegeix que la imatge és a color (RGB), cada neurona es multiplica pels 3 canals (vermell, verd i blau) i els paràmetres totals d'entrada per una imatge serien $784 \times 3 = 2352$ neurones.

Els píxels tenen valors entre 0 i 255 segons l'escala de color, més fosc o més clar, respectivament. Per entrenar la xarxa amb valors més senzills, es normalitzen entre 0 i 1 mitjançant la divisió de cada número per 255, el més gran possible [52].

4.2.2. Convolució

El número de paràmetres podria semblar un problema si totes les capes de la xarxa estiguessin completament connectades, com a les ANN, però gràcies a la **convolució** el número de pesos disminueix en gran mesura i la xarxa és capaç d'extreure característiques rellevants de les imatges.

La convolució és el producte escalar de dos matrius X i W on X és la imatge d'entrada i W un **filtre o kernel**. El filtre és l'encarregat d'extreure els patrons més significatius de la imatge. Depenent del que utilitzi la xarxa, les característiques de sortida seran unes o altres. En la convolució s'agafa un grup de píxels de la imatge d'igual mida que el filtre i es fa el producte escalar de cada número. El resultat és un únic valor que formarà part del **mapa de característiques** (imatge de sortida de la convolució). Després, el filtre es desplaça i realitza de nou el producte escalar amb algunes neurones de valors diferents. Així, el kernel recorre totes les neurones de la imatge en un procés iteratiu. El mapa de característiques obtingut és una matriu de neurones definida com la sortida de la capa d'entrada i l'entrada de la següent capa [46].

Una imatge RGB té 3 plans i cada filtre de la capa de convolució es connecta a una porció quadrada de la imatge, en els tres plans

Hi ha 4 hiperparàmetres a tenir en compte per la convolució:

Mida del filtre: si és 2x2, 3x3, 5x5 píxels, etc. Com més gran sigui la seva mida, més espai ocuparà la convolució. Es desitja una mida petita per reduir el nombre de pesos de la xarxa a entrenar. A més, els píxels veïns seran més rellevants els uns amb els altres, que amb píxels llunyans.

Número de filtres: número de filtres utilitzats en una capa convolucional. Cada filtre buscarà patrons diferents. Si s'apliquen 32 filtres a una imatge, s'obtidran 32 mapes de característiques. Com més profund, més cost computacional.

Stride (s): és el pas entre el producte escalar i el següent. És a dir, si $\text{stride} = 1$ (normalment) i el filtre es mou horitzontalment, passarà columna per columna de píxels de la imatge. Si $\text{stride} = 2$, el filtre saltarà a la segona columna i no a la següent.

Padding (p): és l'addició de files i columnes al voltant de la imatge amb valor zero (addició de zeros). El valor p defineix el número de zeros a cada costat. La mida de la imatge de sortida depèn de l'elecció del padding:

- Full mode: la sortida és més gran que l'entrada, establint $p = m - 1$, on m és la mida del filtre.
- Same mode: la sortida i l'entrada tenen la mateixa mida. És el més utilitzat en xarxes neuronals.
- Valid mode: no s'aplica padding ($p = 0$).

Afegir zeros és de gran utilitat quan hi ha informació rellevant a les cantonades o vores de la imatge, ja que dona més èmfasis a aquells píxels que amb $p = 0$.

Es pot calcular la mida de la sortida, tant l'amplada com l'alçada, a partir dels hiperparàmetres en cas que sigui necessària:

$$o = \frac{n + 2p - m}{s} + 1$$

on n = mida del vector d'entrada; m = mida del filtre; p = padding; s = stride; o = mida del vector de sortida.

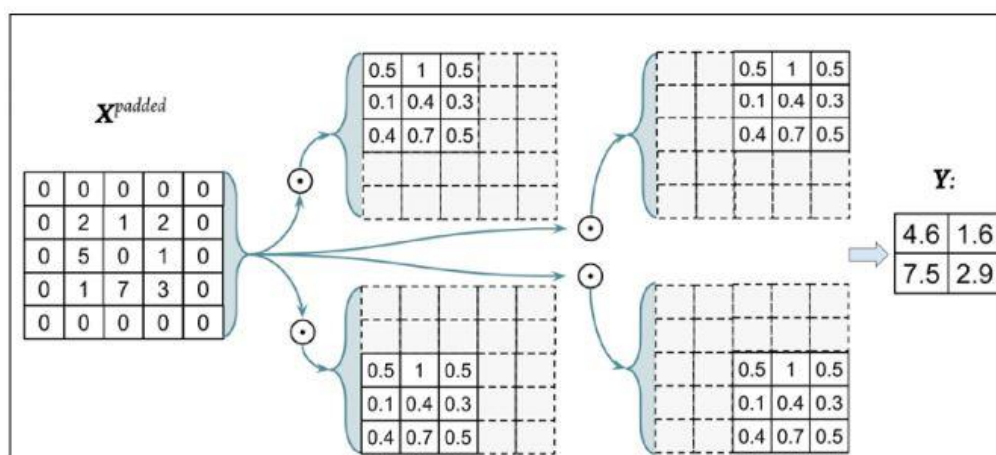


Figura 4.13. Convolució 2D entre una matriu d'entrada $X_{3 \times 3}$ amb $p = (1 \times 1)$, donant lloc a la matriu X_{padded} i un filtre $W_{3 \times 3}$, amb $s = (2 \times 2)$. El resultat és la matriu $Y_{2 \times 2}$ [46].

4.2.3. Subsampling: Pooling

El resultat de la convolució són moltes neurones que tenen un efecte negatiu en el cost computacional i el processament. Per exemple, tornant a l'exemple del nombre de paràmetres (sense afegir el color a la imatge), es tenen 784 neurones. A cada una s'apliquen 32 filtres, donant lloc a 32 mapes de característiques amb 25.088 neurones en total. Si a aquests descriptors se'ls aplica una altra convolució, el número s'enlairaria. Per evitar-ho existeix el procés de **subsampling** que és aplicat en forma d'**agrupació o pooling**. Aquesta tècnica redueix la mida de les imatges filtrades, però mantenint les característiques que el filtre va destacar [46], [53].

S'utilitza la capa d'agrupació com si fos un filtre definit per $P_{n1 \times n2}$, on el subíndex és la mida de veïnatge (els píxels adjacents de cada dimensió on es farà l'operació). El càlcul es fa pels 32 mapes amb una de la opcions:

- Max Pooling: la capa d'agrupació es desplaça per la imatge i en el bloc present (de mida de la capa) agafarà com a resposta el valor del píxel més gran.
- Average Pooling: és el mateix procés, però no té en compte el valor més gran, sinó la mitja dels píxels que estigui analitzant.

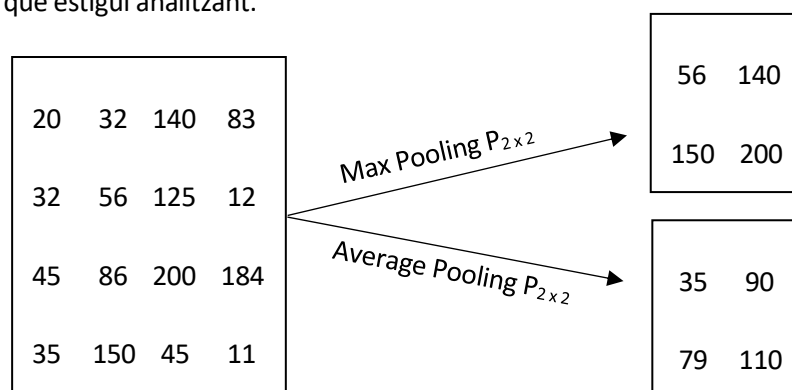


Figura 4.14. Max Pooling i Average Pooling.

4.2.4. Overfitting i underfitting

Els algoritmes han d'assolir un estat en el que, donades suficients dades d'entrenament, siguin capaç de predir els resultats correctes de mostres noves i, per tant, generalitzar els conceptes a classificar.

En el machine learning i el deep learning, l'overfitting o sobre ajust i l'underfitting o subajust són dos efectes comuns que poden ocórrer quan els models no donen bons resultats [54].

L'underfitting té lloc quan no s'ha entrenat el model amb suficients mostres. Per exemple, imaginem-ne que entrenem el model amb 5 imatges de llibres i ara volem classificar un nou llibre. Al tenir només 5 mostres i haver tantes diferències entre llibres, l'algoritme no classificarà la nova mostra com a llibre.

L'overfitting té lloc quan s'ha sobreentrenat el model amb un determinat tipus de mostres tant semblant que, a l'hora de classificar el mateix concepte però visualment diferent, l'algoritme fallarà. El model estarà memoritzant i no entrenant. Per exemple, ara s'ha entrenat el model amb un elevat número de llibres però tots amb la imatge d'un llibre obert. Si es volgués classificar la imatge del lloc, el model fallaria perquè no l'hem generalitzat des de totes les vistes d'un llibre.

Per tant, s'ha de buscar l'equilibri per no produir cap dels efectes. Per reconèixer si anem ben encaminats, un procés imprescindible és dividir el conjunt de dades en dos grups: un d'entrenament i un de validació, deixant a part les dades de test que el model no haurà vist durant l'entrenament, amb les quals s'avalua en mostres noves. Normalment s'agafa el 80% de les dades per entrenament i el 20% per validar-lo i comprovar que no fallaria gaire en el test.

Per evitar produir cap dels efectes, les imatges d'entrada haurien de ser variades i de quantitat similar entre classes. Incrementar el número d'iteracions i combinar-les amb diferents taxes d'aprenentatge i altres paràmetres, tenint em compte el cost computacional de cada opció. I també, fer servir les tècniques de regularització [54].



Figura 4.15. Representació d'unferffing i overfitting en una regressió [55].

4.2.5. Regularització

Les tècniques de regularització controlen el comportament del model durant l'entrenament. Les tres que s'han utilitzat en els experiments són les següents:

Dropout: consisteix en la **desactivació aleatòria de neurones** en les capes ocultes (blocs convolucionals) i en la capa d'entrada. Com a conseqüència es trenquen les connexions i no flueix informació entre elles. El nombre de neurones que es desactiven a l'atzar pot ser diferent o igual entre capes, amb una probabilitat p . Segons Srivastava et al. (2014), les millors opcions pel paràmetre p són de 0.5 per les capes ocultes i prop de 1.0 per la capa d'entrada [56].

Les neurones multipliquen per una variable binària per saber si s'abandona (probabilitat p) o si es manté activa (probabilitat $1 - p$), passant d'una xarxa neuronal a una diluïda (thinned network) [57]. Al inactivar algunes neurones, els pesos s'ajusten i la xarxa no pot dependre de les neurones actives

ocultes perquè durant l'entrenament es poden desactivar. Per això els patrons que s'aprenen són generals i s'evita l'overfitting.

Finalment, a la predicció totes les neurones tornen a ser actives, però s'han de reescalar les que eren actives durant l'entrenament per mantenir l'escala en la predicció.

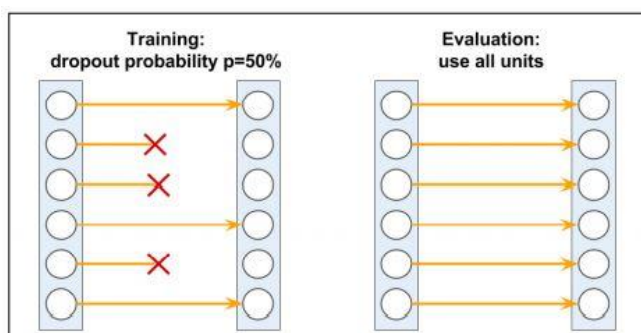


Figura 4.16. Regularització per drop-out [46].

Regularització L2 o Ridge: l'objectiu és reduir els valors dels paràmetres d'entrada gràcies a una penalització en la funció de cost. Li afegeix la suma del quadrat dels paràmetres. No obstant això, el resultat seria tant elevat que els paràmetres s'aproximarien a 0 quan es minimitza la funció amb al descens del gradient. Per això s'afegeix un paràmetre de penalització petit que multiplica el sumatori. Si es vol augmentar o reduir l'efecte de la regularització L2, només caldria variar aquest terme [49].

Ridge serveix quan poden haver característiques d'entrada correlacionades entre sí. La disminució dels paràmetres minimitza la correlació i el model generalitza millor [58].

Augment de les dades (Data augmentation): l'augment d'imatges és una tècnica molt útil quan no hi ha suficients imatges d'entrada (dades limitades) perquè el model aprengui, o quan hi ha suficients imatges per algunes classes, però no per les altres, caient en una predicció errònia. La idea és aplicar transformacions a les imatges original amb la possibilitat del canvi de valor dels píxels, però sempre mantenint les característiques clau. Les transformacions no són una rèplica exacta de la imatge, per tant, el model no memoritza, sinó que aprèn [59], [60]. Alguns exemples d'aquestes modificacions són:

- Girar la imatge vertical o horitzontalment
- Rotar-la en diferent angles.
- Escalat cap a l'exterior o cap a l'interior.
- Translació: la imatge es mou en una o ambdues direccions dels eixos.
- Afegir soroll gaussià: s'afegeixen píxels aleatoris en les freqüències que distorsionen les característiques d'alta freqüència, no útils per l'entrenament de la xarxa i responsables d'una part d'overfitting.

- Ajustar la brillantor o el contrast.

4.2.6. Classificació

Després dels blocs convolucional i les capes de regularització queda fer la classificació. Les neurones de l'última capa de pooling s'aplanen, és a dir, es transformen els mapes de característiques amb la seva altura i ample en un vector com una capa del MLP. Les neurones d'aquesta capa estan completament connectades amb els mapes de la capa anterior i amb la capa de sortida, si no hi ha altres pel mig [58].

La capa de sortida conté, com a les ANN, tantes neurones com classes a classificar. A la capa completament connectada se li aplica una funció d'activació que decidirà quina és la classe predita. Normalment es fa servir la funció softmax per classes múltiples que retorna les probabilitats de pertànyer a cada una, però en els casos pràctics del treball s'ha utilitzat la funció sigmoide perquè es tractava una classificació binària.

5. Anàlisi del conjunt de dades

5.1. Presentació de les dades

El conjunt de dades disponible conté imatges originals de camp provinents d'11 frotis sanguinis, cada un d'un pacient. Cada frotis conté un nombre variable d'imatges de camp on es visualitza una zona del frotis, és a dir, un conjunt de cèl·lules sanguínies. La Taula 5.1 mostra quantes hi ha en cada frotis.

Taula 5.1. Agrupació del conjunt d'imatges per frotis.

Frotis	Número d'imatges de camp
Frotis 1: 162524799	103
Frotis 2: 172134479	53
Frotis 3: 172701481	24
Frotis 4: 172924803	61
Frotis 5: 172929489	45
Frotis 6: 172939049	62
Frotis 7: 172939618	79
Frotis 8: 172961561	30
Frotis 9: 173384507	33
Frotis 10: 173385597	62
Frotis 11: 182986014	42

La mida de totes les imatges és de 2400 x 1800 píxels i els facultatius clínics les van capturar amb el mateix objectiu del microscopi.

A més, per aconseguir l'objectiu referent a la classificació automàtica d'esquistòcits i altres eritròcits, va ser necessari la segmentació de les cèl·lules individuals de cada frotis, obviant els leucòcits i les plaquetes, les quals van ser facilitades pels mateixos facultatius. El directori "RBC_recortados" conté

dues carpetes: “ESQUISTOS” y “NORM”. La primera amb 1737 imatges, tots els esquistòcits dels frotis, i la segona amb 10119, tots els eritròcits i altres possibles alteracions morfològiques.

Les imatges, tot i poder ser identificables per frotis, es van barrejar per dur a terme l’entrenament i l’avaluació del model de classificació. No té importància que unes cèl·lules pertanyin a un pacient o un altre per reconèixer si aquella és un esquistòcit o no.

5.2. Organització de les dades

Les imatges segmentades tenen una mida de 440 x 440 píxels. Suposa un problema de temps i cost computacional introduir-les directament com entrada al model de classificació. Per això, s’escalen a la meitat (220 x 220 píxels) sense fer cap modificació més que aquesta.

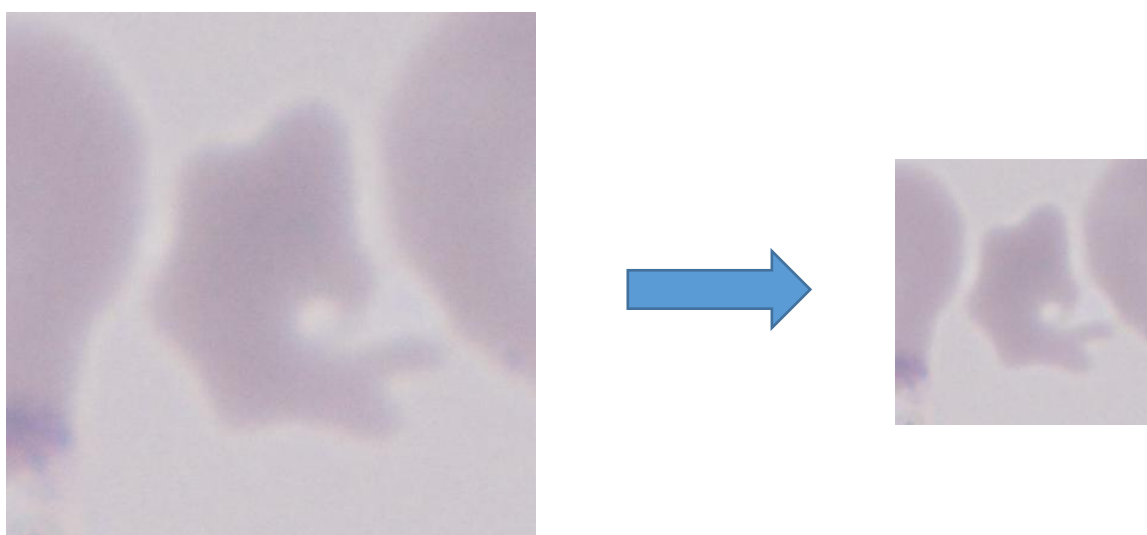


Figura 5.1. Escalat d’una imatge d’esquistòcit.

Per entrenar la CNN amb les imatges i avaluar els resultats, el conjunt de dades es divideix en tres sets:

- **Conjunt d’entrenament (*training*):** són les imatges amb les que la xarxa aprèn a classificar. És l’encarregat d’ajustar els paràmetres o pesos per reduir l’error a la sortida. Normalment, és el conjunt més gran (amb més dades). Així com el cervell, per la xarxa no és el mateix veure 10 esquistòcits que 1000 quan les cèl·lules tenen variabilitat de forma.
- **Conjunt de validació (*validation*):** ajusta els hiperparàmetres i estima per cada iteració com la xarxa va aprenent.
- **Conjunt de test (*testing*):** avalua el rendiment del model de xarxa en imatges noves i prediu la seva classe.

Es crea el directori “dataset_resized” amb els tres subdirectoris per la divisió de les dades: “train”, “validation” i “test”. En cada un d’ells es creen dues carpetes amb les etiquetes de classe, anomenades “0_no_esquistocitos” i “1_esquistocitos”. Les primeres contindran imatges d’hematies, sans o amb altres possibles alteracions i les segones d’esquistòcits.

5.3. Balanceig de les dades

Les dades estan desequilibrades. És a dir, el número d’imatges de cada classe (esquistòcits i no esquistòcits) no és el mateix. La diferència en la quantitat de classes (1737 i 10119, respectivament) és comprensible, sabent el tant per cent que els eritròcits ocupen a la sang, tot i havent alteracions. Però si es desenvolupés el model amb totes les imatges, aquest no generalitzaria i perjudicaria la classe minoritària. L’exactitud (veure Eq. 6.5.) de l’entrenament del model seria tant bona que l’error seria mínim i no faria falta entrenar més. Per tant, es fa un balanceig de dades. A causa de la gran diferència s’opta per un balanceig híbrid. Aquesta tècnica redueix el número d’imatges de la classe majoritària i augmenta els de la classe minoritària.

Es desitja 6000 imatges per l’entrenament, 400 per la validació i 1400 pel test, cada conjunt dividit en parts iguals (3900) per cada classe. Les imatges de no esquistòcits hi són disponibles, però de l’altre grup falten $3900 - 1737 = 2163$ imatges.

Les imatges d’esquistòcits que formen part dels conjunts de validació i test no s’augmenten perquè significaria una validació i avaluació de l’algoritme en una imatge diferida de la realitat. Per això, després de reduir les imatges de no esquistòcits, elles més les imatges d’esquistòcits originals es distribueixen als directoris corresponents. La Figura 5.2. mostra la quantitat d’imatges actual i desitjable per cada conjunt.

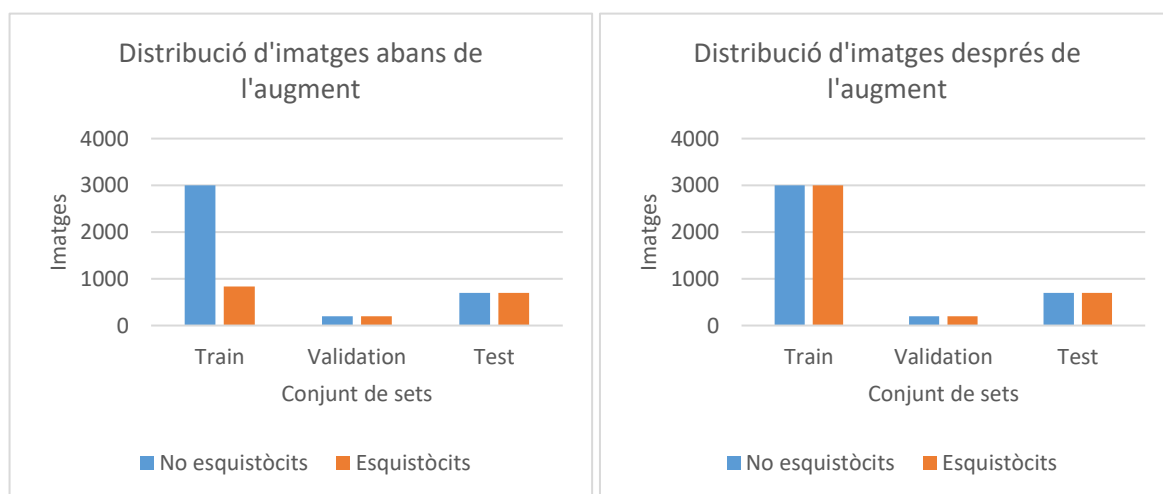


Figura 5.2. Distribució d’imatges abans i després de l’augment de dades.

El data augmentation o augment de dades es realitza amb les imatges d'esquistòcits ja posades en el conjunt d'entrenament. Es fa servir la comanda "ImageDataGenerator" de Keras que genera vàries transformacions a les imatges. En aquest cas, una rotació de 60 graus, un gir (*flip*) vertical i un desplaçament horitzontal del 20% d'ample.

```
datagen = ImageDataGenerator(rotation_range=60, vertical_flip=True, width_shift_range=0.2)
```

El resultat són 2163 imatges d'esquistòcits augmentades pel directori d'entrenament. La Figura 5.3. mostra un exemple d'augment de dades en una imatge d'esquistòcits.

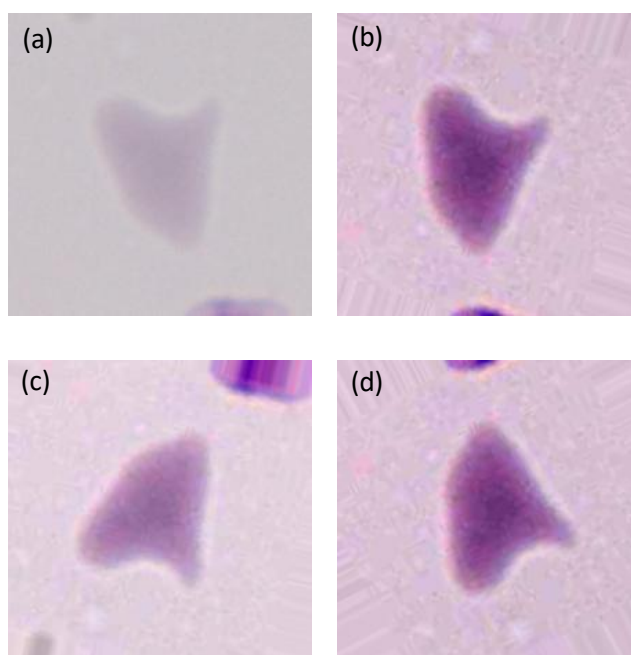


Figura 5.3. Imatges d'esquistòcits. (a) Imatge original. (b), (c), (d) Imatges transformades.

Finalment, la Figura 5.4 resum el conjunt de dades organitzades i equilibrades amb les que construir el millor model de CNN per la classificació d'esquistòcits i no esquistòcits.

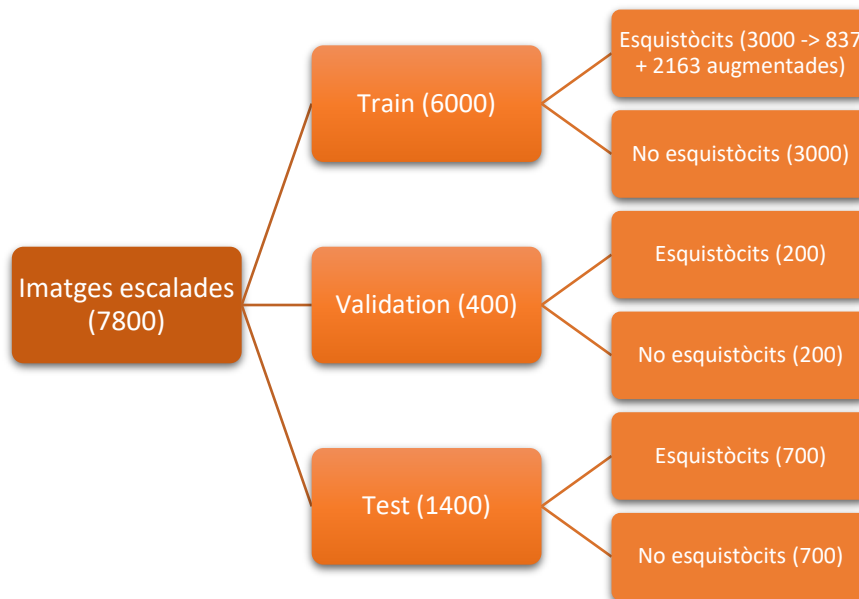


Figura 5.4. Organització i distribució d'imatges per directori.

El codi creat tant per organitzar i balancejar les dades, com per la creació del model i el posterior recompte que es presentaran en els següents apartats s'ha carregat a la plataforma GitHub, d'accés obert. La direcció URL que porta al repositori és la següent: <https://github.com/AlvaroLC24/cnn-tfg>



6. Creació de la xarxa neuronal convolucional des de zero

El treball té per objectiu la creació d'una xarxa neuronal convolucional per la classificació d'esquistòcits i no esquistòcits en pacients amb possible anèmia microangiopàtica trombòtica. Aquest apartat es centre en la cerca del millor model per la classificació de les cèl·lules.

El procés a dur a terme per construir una CNN des de zero és el següent:

1. Càrrega de les llibreries i els directoris amb les imatges.
2. Construcció de l'estructura de la xarxa.
3. Compilació del model.
4. Normalització i creació dels generadors.
5. Entrenament del model.
6. Avaluació del model.

6.1. Construint la xarxa

Primerament s'importen les llibreries a utilitzar:

```
from tensorflow.keras.models import Sequential
from tensorflow.keras.models import Model
from tensorflow.keras.layers import Conv2D, MaxPooling, Dense, Dropout, Activation, Flatten
from tensorflow.keras.preprocessing import image
from tensorflow.keras.preprocessing.image import ImageDataGenerator
from tensorflow.keras.callbacks import TensorBoard, ModelCheckpoint
from tensorflow.keras import backend

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import tensorflow as tf
import os
```

Després de cridar els directoris creats anteriorment per l'organització i balanceig de les dades, es construeix l'estructura del model gràcies als mòduls de Keras. L'arquitectura parteix de DysplasiaNet, model creat per Andrea Acevedo i els seus companys [61] pel reconeixement automàtic de neutròfils displàstics hipogranulats en pacients amb sospita de síndromes mielodislàstiques (MDS). Van arribar a una exactitud del 94.85%.

```

# Modelo
from keras import models
from keras import layers, regularizers
model = models.Sequential([

    # block 1
    layers.Conv2D(filters=16, kernel_size=(3,3), data_format='channels_last', name='conv_1', activation='relu',
                  input_shape=(img_width,img_height,3)),
    layers.MaxPool2D(pool_size=(2,2), name='pool_1'),

    # block 2
    layers.Conv2D(filters=16, kernel_size=(3,3), data_format='channels_last', name='conv_2', activation='relu'),
    layers.MaxPool2D(pool_size=(2,2), name='pool_2'),

    # block 3
    layers.Conv2D(filters=16, kernel_size=(3,3), data_format='channels_last', name='conv_3', activation='relu'),
    layers.MaxPool2D(pool_size=(2,2), name='pool_3'),

    # block 4
    layers.Conv2D(filters=16, kernel_size=(3,3), data_format='channels_last', name='conv_4', activation='relu'),
    layers.MaxPool2D(pool_size=(2,2), name='pool_4'),

    layers.Flatten(),
    layers.Dropout(0.5),
    layers.Dense(units=16, name='fc_1', activation='relu'),
    layers.Dense(units=1, name='output', activation='sigmoid')
])

model.summary()

```

Les imatges d'entrada tenen la mida escalada de 220 x 220 píxels per 3 canals. L'estructura és un model seqüencial on cada capa s'acoba a l'anterior i cada una té un tensor (matriu 3D o vector) d'entrada i un de sortida. Consta de 4 blocs, cada un format per una capa convolucional i una capa de MaxPooling. Les primeres capes tenen 16 filtres de 3 x 3 cadascun i apliquen la funció d'activació ReLU, i les segones redueixen la mida dels mapes de característiques obtinguts a la meitat. Després de l'última capa de submostreig, s'aplanen tots els mapes i es passa una capa amb la regularització Dropout. El 50% dels píxels es desactivaran aleatòriament durant l'entrenament. Finalment s'afegeix una capa completament connectada de 16 neurones per realitzar la classificació binària (una unitat) amb la funció sigmoide. El resultat final serà un valor entre 0 i 1 que indicarà si la imatge és un esquistòcits (1) o un altre tipus d'eritròcit (0).

El següent codi mostra com les dimensions dels mapes de característiques van variant a mesura que les imatges passen per cada capa.

```

Model: "sequential"
Layer (type)                Output Shape                Param #
-----
conv_1 (Conv2D)              (None, 218, 218, 16)      448
pool_1 (MaxPooling2D)        (None, 109, 109, 16)      0
conv_2 (Conv2D)              (None, 107, 107, 16)      2320
pool_2 (MaxPooling2D)        (None, 53, 53, 16)        0
conv_3 (Conv2D)              (None, 51, 51, 16)        2320
pool_3 (MaxPooling2D)        (None, 25, 25, 16)        0
conv_4 (Conv2D)              (None, 23, 23, 16)        2320
pool_4 (MaxPooling2D)        (None, 11, 11, 16)        0
flatten (Flatten)            (None, 1936)               0
dropout (Dropout)            (None, 1936)               0
fc_1 (Dense)                 (None, 16)                 30992
output (Dense)                (None, 1)                   17
-----
Total params: 38,417
Trainable params: 38,417
Non-trainable params: 0
    
```

Per defecte i si no es posa el contrari, el padding dels filtres és 0. Per això, la sortida de les capes convolucionals redueix en 2 els píxels de l'amplada i l'altura. Per exemple:

$$\text{amplada output}_{conv_1} = \text{mida entrada} - (\text{mida filtre} - 1) \tag{Eq. 6.1}$$

$$\text{amplada output}_{conv_1} = 220 - (3 - 1) = 218 \text{ píxels}$$

Com el filtre del MaxPooling és de (2 x 2), l'amplada i l'altura es divideixen per 2 i s'arrodoneix. I finalment, per la capa aplanada, es multipliquen les dades d'entrada:

$$\text{output}_{Flatten} = \text{amplada} * \text{altura} * \text{profunditat} \tag{Eq. 6.2}$$

$$\text{output}_{Flatten} = 11 * 11 * 16 = 1936 \text{ neurones}$$

En les capes convolucionals, la capa completament connectada i la capa de sortida, la xarxa aprèn els paràmetres de les imatges. Les capa de pooling només redueixen la mida de la sortida de la capa anterior, per tant no aprenen cap paràmetre. D'igual manera, la capa "Flatten" només aplanava les neurones i el drop-out regula quines activar. Per entendre el funcionament, els paràmetres de les dues primeres capes convolucionals es calculen de la següent manera:

$$\text{Param}_{conv_1} = ((\text{mida filtre} * \text{profunditat}) + \text{biaix}) * \text{num. filtres} \tag{Eq. 6.3}$$

$$\text{Param}_{conv_1} = ((3 * 3 * 3) + 1) * 16 = 448 \text{ paràmetres}$$

$$Param_{conv_2} = ((3 * 3 * 16) + 1) * 16 = 2320 \text{ paràmetres}$$

I els paràmetres de la capa completament connectada:

$$Param_{fc_1} = (\text{output}_{capa anterior} * \text{unitats}_{actuals}) + \text{biaix per unitat} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

$$Param_{fc_1} = (1936 * 16) + 16 = 30992 \text{ paràmetres}$$

El total de paràmetres que la CNN és capaç d'aprendre i entrenar és la suma de tots els paràmetres, que per aquesta estructura són 38417 paràmetres.

A continuació es compila el model, és a dir, es tradueix l'estructura creada en un llenguatge apte per ser executat amb la CNN construïda.

```
# Compilación del modelo
model.compile(optimizer = tf.keras.optimizers.Adam(),
              loss = tf.keras.losses.BinaryCrossentropy(),
              metrics = ['accuracy'])
```

La compilació conté tres paràmetres:

- **Optimitzador:** és l'encarregat d'actualitzar els paràmetres de la xarxa a mesura que aquesta s'entrena mitjançant el backpropagation. L'optimitzador Adam, amb un learning rate per defecte de 0.001, incorpora el descens del gradient estocàstic. Estima el primer i segon moment dels gradients de cada pes [62].
- **Funció de cost o pèrdua:** mesura la diferència entre la classe verdadera i la predicció. S'utilitzarà per tots els casos la funció "BinaryCrossentropy" que calcula l'entropia entre les dues etiquetes per classificacions binàries.
- **Mètrica:** a part de la pèrdua, es calcula l'exactitud (*accuracy*) per entrenament i validació durant cada iteració i també pel test. L'*accuracy* és la freqüència amb la que la predicció és igual a l'etiqueta verdadera. És a dir, és el nombre de classes correctes dividit pel nombre total.

6.2. Entrenament i avaluació

Abans d'entrenar el model es normalitzen totes les imatges entre 0 i 1 dividint per 255 (valor màxim que poden prendre els píxels). Després es creen dos generadors que recorren els directoris d'entrenament i validació amb etiquetes binàries i un lot o *batch* especificat. El valor de lot fa referència al número de vegades que s'actualitzaran els pesos internament en cada iteració.

```

batch_size_train = 50
batch_size_val = 20

# Se reescalan todas las imágenes
train_datagen = ImageDataGenerator(rescale = 1.0/255.)
test_datagen = ImageDataGenerator(rescale = 1.0/255.)

# Imágenes de training de flujo en lotes (batches) de 100 usando el generador train_datagen
train_generator = train_datagen.flow_from_directory(train_dir_2,
                                                    batch_size = batch_size_train,
                                                    class_mode='binary',
                                                    target_size=(img_height, img_width))

# Imágenes de validación de flujo en lotes (batches) de 100 usando el generador test_datagen
validation_generator = test_datagen.flow_from_directory(validation_dir,
                                                       batch_size=batch_size_val,
                                                       class_mode='binary',
                                                       target_size=(img_height, img_width))

```

A continuació s'entrena el model per 30 iteracions o èpoques (*epochs*). Les imatges passaran per la xarxa 30 vegades, ajustant-se en cada cicle els paràmetres. En cada una es calcularà la pèrdua i l'exactitud tant per l'entrenament com per la validació. El número de passos de cada epoch serà igual a les mostres totals de cada un dels directoris dividit per la mida del lot.

```

# Entrenamiento del modelo
history = model.fit(
    train_generator,
    steps_per_epoch = muestras_train // batch_size_train,
    epochs = 30,
    validation_data = validation_generator,
    validation_steps = muestras_validation // batch_size_val,
    shuffle = False,
    verbose = 1)

```

Després s'avaluarà el model amb les imatges de test no mostrades encara a la xarxa.

```

# Evaluación del modelo para obtener la accuracy con el conjunto de test
batch_size = 1

test_generator = test_datagen.flow_from_directory(test_dir,
                                                  batch_size=batch_size,
                                                  class_mode='binary',
                                                  target_size=(img_height, img_width),
                                                  shuffle=False)

evaluation = model.evaluate(test_generator,
                            steps=muestras_test,
                            verbose=1)

```

Els resultats graficats al llarg de l'entrenament i la validació es mostren a la Figura 6.1. I la seva avaluació a la Taula 6.1.

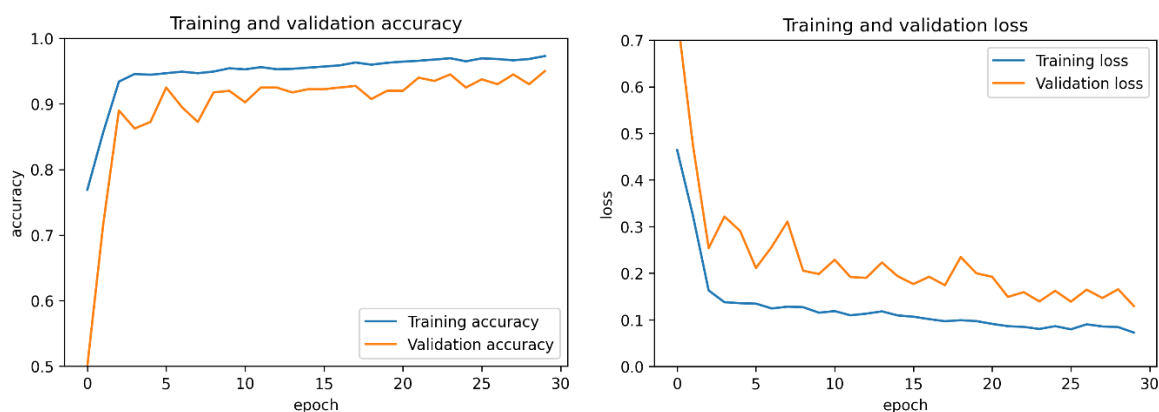


Figura 6.1. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 1.

Taula 6.1. Exactitud i pèrdua de test del model 1 amb els seus paràmetres.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Loss	Train	Val.				
M1	0.9350	0.1735	100	100	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out

En la primera prova, ja s'assoleix un 93.50% d'exactitud, un valor elevat tractant-se d'una CNN senzilla i construïda des de zero. Al llarg de les iteracions, tant l'entrenament com la validació van augmentant l'exactitud. Al començament hi ha un gran augment degut a la falta d'aprenentatge per part de la xarxa. Els paràmetres inicials són aleatoris i a mesura que passa el temps es van reajustant per reduir la pèrdua, com s'observa a la segona gràfica. La corba de l'entrenament, tot i el pendent bruscat al principi, comença amb millors mètriques i s'estableix en un augment progressiu pel motiu explicat, però la de validació oscil·la una mica, més la de la pèrdua, perquè és la que comprova si els hiperparàmetres s'ajusten bé amb unes poques imatges.

Les corbes d'entrenament i validació pels dos gràfics segueixen la mateixa línia de millora i estan properes una de l'altra, indicatiu de l'absència d'overfitting.

6.3. Ajustant els paràmetres

A partir de la xarxa neuronal convolucional creada, els paràmetres es van variant per tal de trobar un millor model que superi l'exactitud trobada. Tot i així, un 93.50% amb una CNN creada des de zero està molt bé i pot ser difícil d'excedir, com es veurà a continuació.

La Taula 6.2 avança quines seran les modificacions que inclourà cada model:

Taula 6.2. Models amb modificació de paràmetres.

Model	Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Train	Val.				
M1	100	100	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M2	100	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M3	100	32	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M4	50	20	30	16	Adam (0.001)	Drop-out
M5	50	20	30	32	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M6	50	20	30	16,32,64,64	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M7	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out L2 (0.0001)
M8	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out L2 (0.1)
M9	50	20	30	16	Adam (lr=0.01)	Drop-out
M10	50	20	30	16	Adam (lr=0.0001)	Drop-out
M11	50	20	30	16	RMSProp	Drop-out
M12	50	20	30	16	SGD (lr=0.01, momentum=0.9, decay=0.001)	Drop-out
M13	50	20	50	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M14	50	20	60	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M15	50	20	100	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out

Es generen 15 models separats en 5 assajos. Començant pel primer, es seleccionarà el millor i es mantindran tots els paràmetres excepte un i així successivament. Es variarà:

- La mida dels lots
- El número de filtres per capa convolucional
- La tècnica de regularització (a part del drop-out)
- L'optimitzador i el learning rate
- El número d'epochs que dura l'entrenament

6.3.1. Assaig 1: mida del lot

La mida dels lots, com ja s'ha dit, actualitza tantes vegades com les indicades, els paràmetres en cada iteració. Per tant, com més elevat sigui el valor del batch_size, més actualitzacions hi haurà.

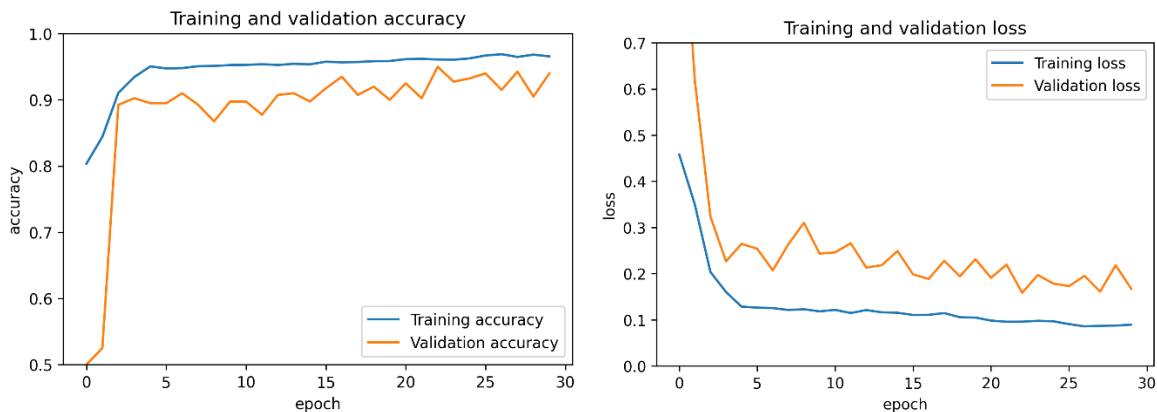


Figura 6.2. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 2.

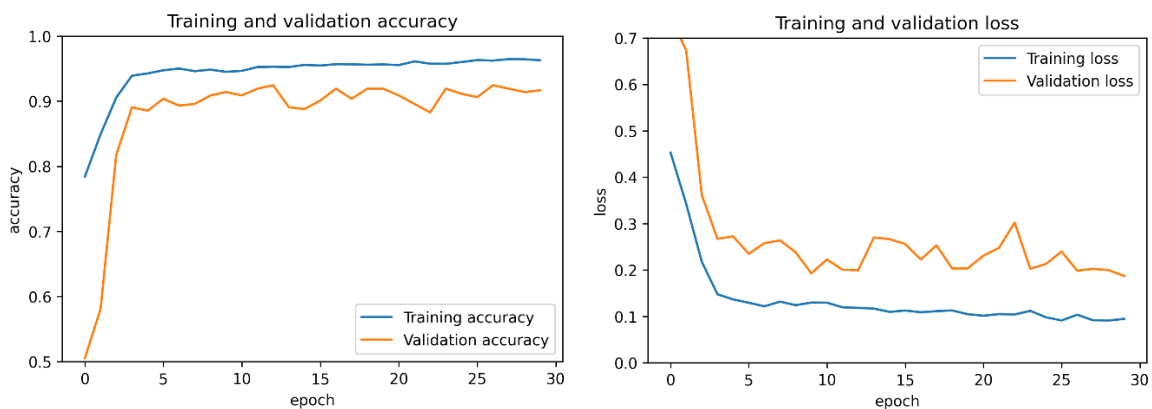


Figura 6.3. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 3.

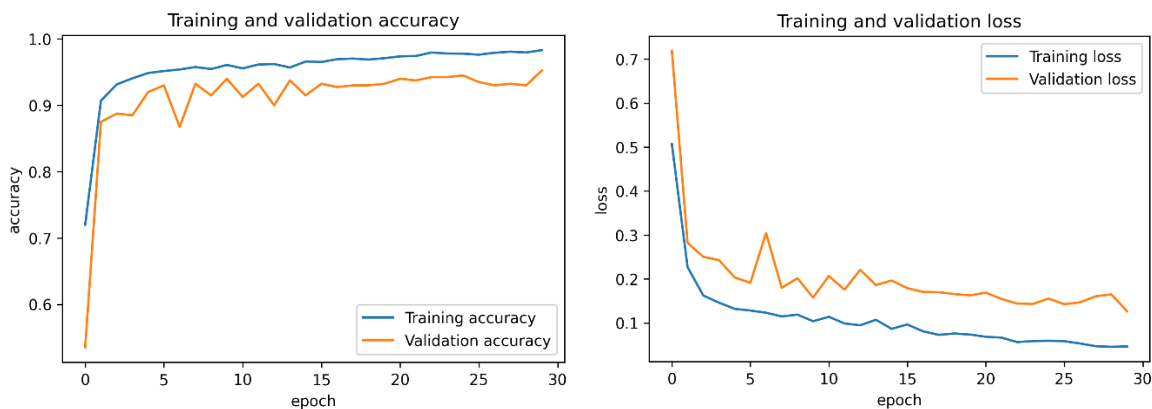


Figura 6.4. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 4.

Si s'eliminessin les oscil·lacions de les corbes de validació i s'aplanessin s'observaria una corba paral·lela a la d'entrenament. Significa que la xarxa està aprenent els paràmetres i no els està memoritzant.

Els gràfics de la Figura 6.2. són els que mostren més oscil·lacions. La causa pot ser la diferència en la mida dels lots entre entrenament i validació. Mentre que pel training la xarxa actualitza en cada iteració 100 vegades els paràmetres, la validació només ho fa 20 i no concorda amb els millors pesos.

A les corbes de validació de la Figura 6.3 s'hi observa el manteniment a partir aproximadament de la iteració 10, tot i que l'entrenament augmenti alguna centèsima. En aquesta iteració, podria haver deixat d'entrenar la xarxa ja que el model no millora.

Per altra banda, quan la mida del lot és de 50 per entrenament i 20 per validació, s'observen millors resultats. Al començament hi ha unes oscil·lacions, com les petites que s'hi veuen durant l'entrenament. Però a partir de llavors va augmentant un cert grau tant l'exactitud com la pèrdua.

Taula 6.3. Models de l'assaig 1.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Loss	Train	Val.				
M1	0.9350	0.1735	100	100	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M2	0.9150	0.2291	100	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M3	0.9279	0.1895	100	32	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M4	0.9493	0.1624	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out

El model 4 presenta l'accuracy més elevada, del 94.93%. El nombre de pacients i, per tant, el conjunt de dades disponibles no és elevat, tenint en compte datasets com el MNIST que disposa de 70000 imatges totals. Per l'escassetat de mostres, no ha fet falta una mida de lot massa elevada.

6.3.2. Assaig 2: número de filtres

Amb la mida de lot fixe, es varia el número de filtres de cada capa. El model M5 disposa de 32 filtres a cada capa convolucional i el M6 d'un nombre variat: 16 i 32 a la primera i segona capa respectivament i 64 a les dues últimes més a la capa completament connectada.

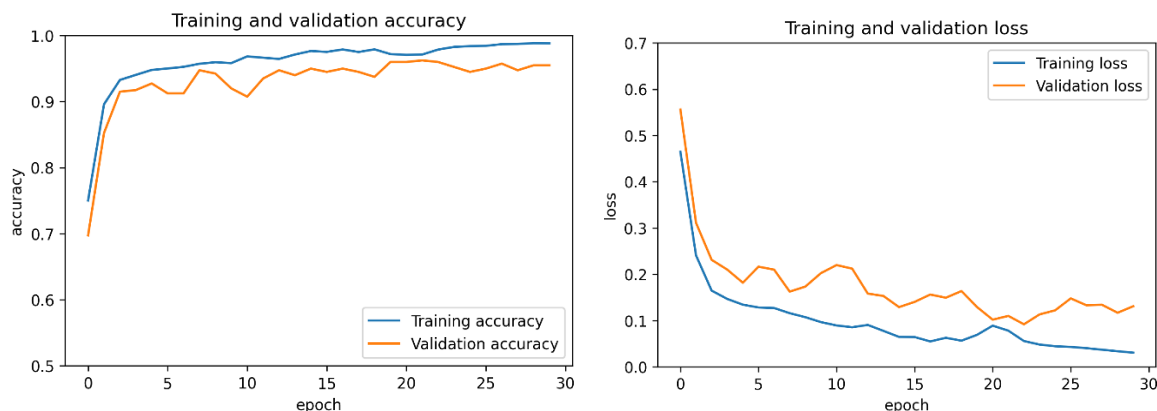


Figura 6.5. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 5.

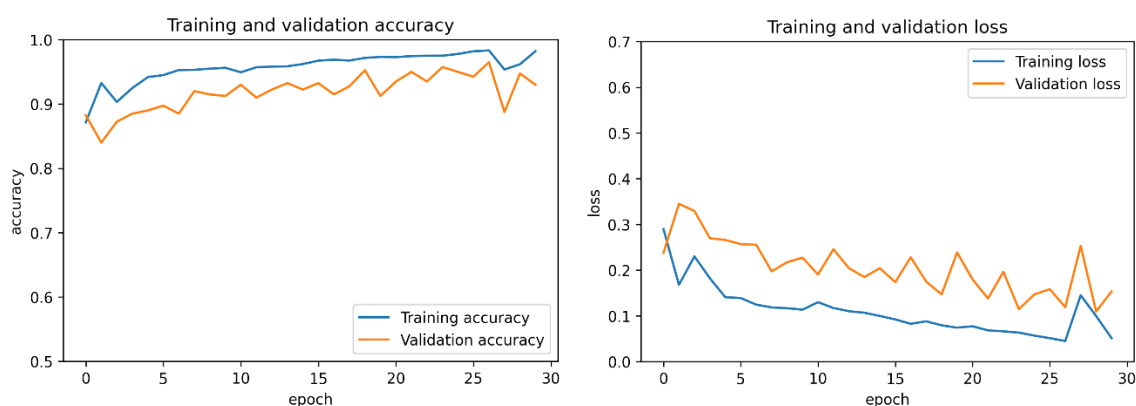


Figura 6.6. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 6.

Taula 6.4. Models de l'assaig 2.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Loss	Train	Val.				
M4	0.9493	0.1624	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M5	0.9450	0.1980	50	20	30	32	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M6	0.9239	0.1831	50	20	30	16,32,64,64	Adam (lr=0.001)	Drop-out

El model M4 s'apropa a l'exactitud de l'M5 però no la supera. A més, tenint en compte que el nombre de paràmetres ha augmentat degut al canvi en el número de filtres, no val la pena continuar amb un model que no sigui el de 16 filtres per capa convolucional. Inclús en el M6 s'aprecia overfitting quan les oscil·lacions no decauen i al final l'entrenament presenta un mínim en l'exactitud. Per a la

classificació entre esquistòcits i no esquistòcits, no mereix la pena una xarxa més complexa respecte els pesos a entrenar. Les característiques a extreure semblen ser suficients amb els 16 filtres del M4.

6.3.3. Assaig 3: regularització L2

La regularització drop-out s'ha afegit en tots els models per la seva necessitat i la certesa en les arquitectures de xarxes neuronals. Tot i que el model M4 no presenta overfitting, la corba podria suavitzar-se amb la regularització L2.

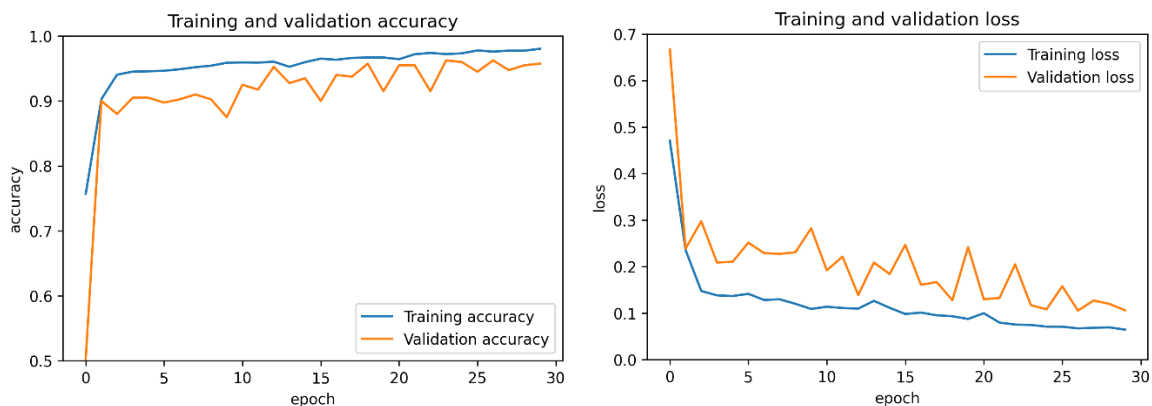


Figura 6.7. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 7.

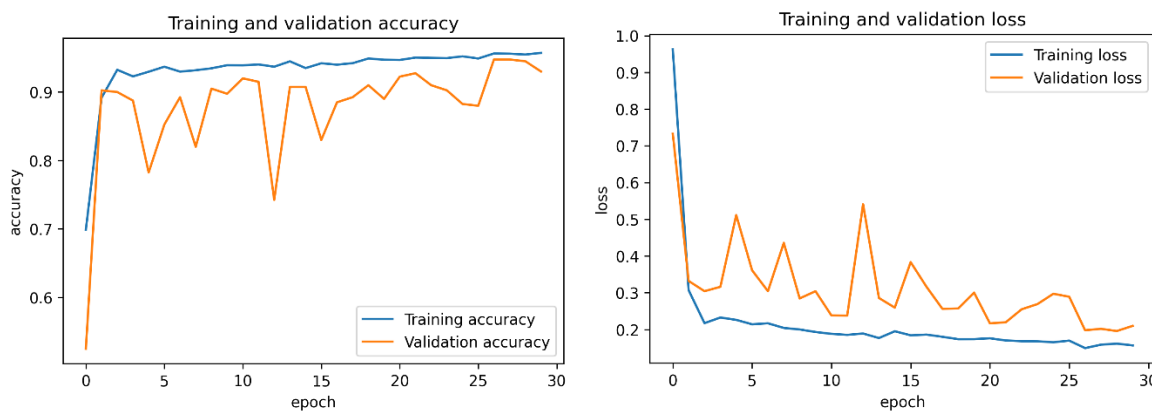


Figura 6.8. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 8.

Taula 6.5. Models de l'assaig 3.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Loss	Train	Val.				
M4	0.9493	0.1624	50	20	30	16	Adam (0.001)	Drop-out
M7	0.9429	0.1629	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out L2 (0.0001)
M8	0.9200	0.2419	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out L2 (0.1)

Dels dos nous models, el que es consideraria millor seria el que agafa un terme de penalització de 0.0001. És a dir, quan el Ridge té una menor presència en l'entrenament de la xarxa. L'objectiu d'aquesta tècnica és reduir la correlació de característiques d'entrada d'una imatge que provoca variància en els coeficients. Per aconseguir-ho disminueix el valor dels paràmetres.

L'efecte ha sigut negatiu perquè al fer la suma dels quadrats dels paràmetres, els pesos grans queden penalitzats, donant després de l'aplicació, una importància semblant entre pesos. Al tractar-se cèl·lules sanguínies on el color dels píxels és semblant al llarg del frotis, la xarxa podria identificar un píxel del plasma com si es tractés d'un eritròcit o esquistòcit.

6.3.4. Assaig 4: optimitzador

En els següents models es canvia el learning rate i l'optimitzador a l'hora de compilar el model.

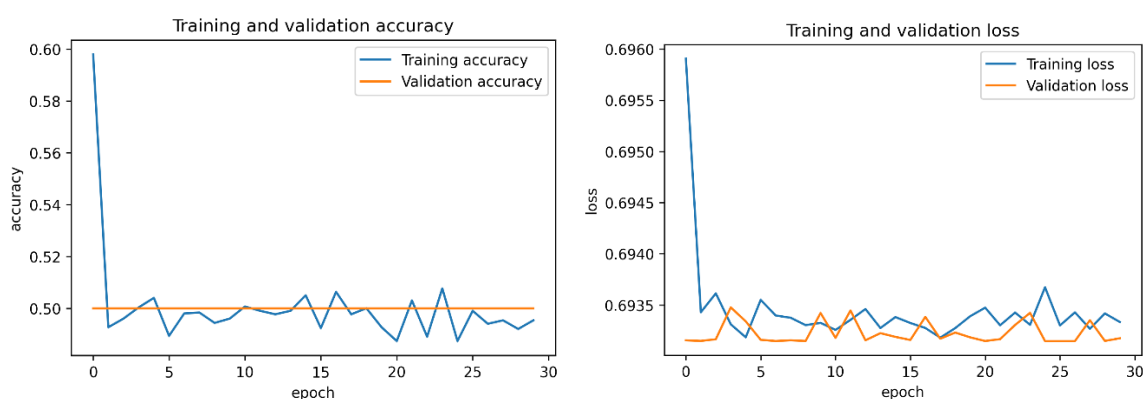


Figura 6.9. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 9.

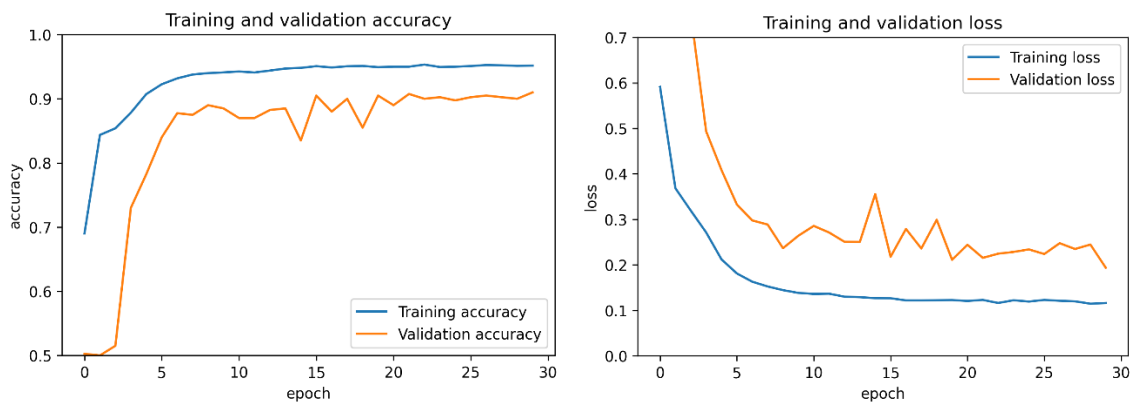


Figura 6.10. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 10.

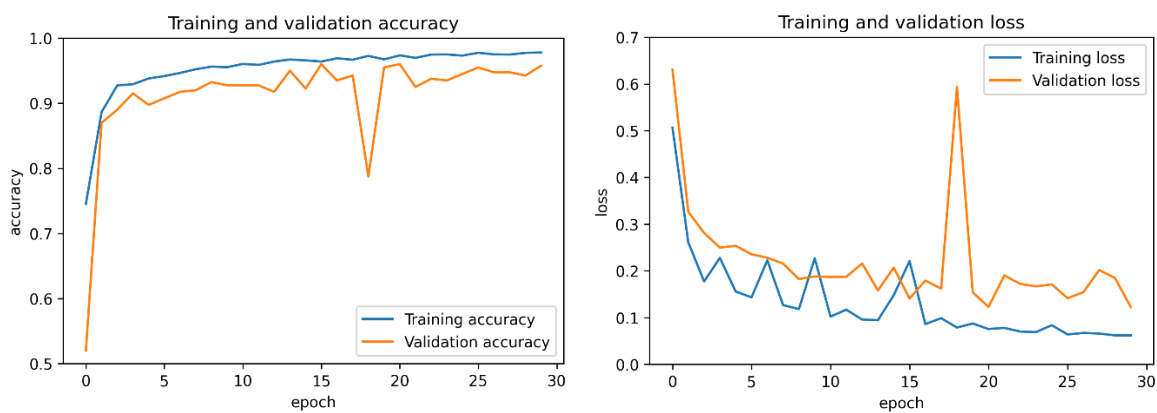


Figura 6.11. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 11.

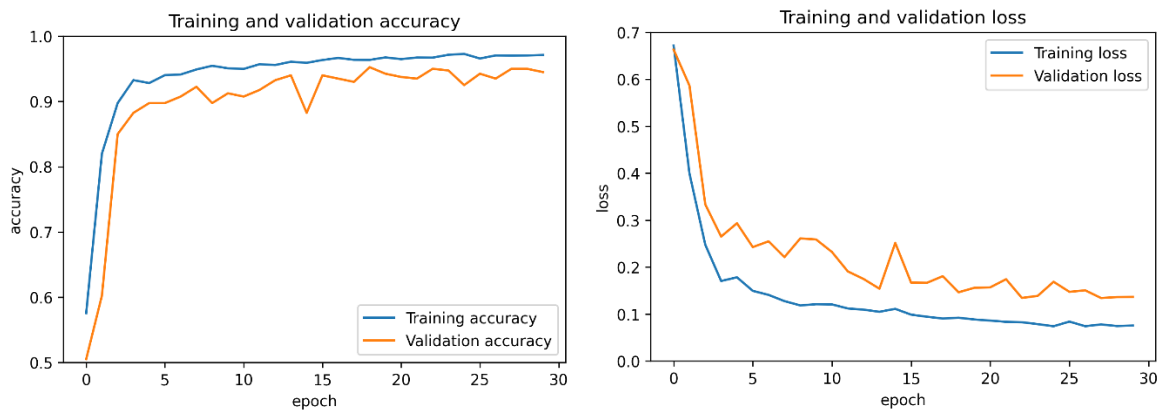


Figura 6.12. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 12.

Taula 6.6. Models de l'assaig 4.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Loss	Train	Val.				
M4	0.9493	0.1624	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M9	0.5000	0.6932	50	20	30	16	Adam (0.01)	Drop-out
M10	0.9171	0.2028	50	20	30	16	Adam (lr=0.0001)	Drop-out
M11	0.9507	0.1492	50	20	30	16	RMSProp (lr=0.001)	Drop-out
M12	0.9357	0.1793	50	20	30	16	SGD (lr=0.01, momentum=0.9, decay=0.001)	Drop-out

El learning rate és un hiperparàmetre molt important. Els resultats dependran de la seva elecció. Com s'observa a la Figura 6.9. tant l'exactitud com la pèrdua de l'entrenament oscil·len indefinidament en un petit rang. És un exemple clar d'overfitting. La taxa d'aprenentatge és tant alta que el model divergeix perquè aprèn el soroll i dades innecessàries en les imatges d'entrenament. Per aquest motiu l'exactitud en la validació és constant igual al 50% i, com a conseqüència, també la del test. És a dir, classifica totes les mostres de testing en una sola classe.

Contràriament, tot i que els valors són millors, quan el learning rate és igual a 0.0001, el model M10 presenta underfitting. Els resultats augmenten positivament fins la iteració 15 aproximadament i, després, les gràfiques es mantenen. Les mètriques es bloquegen i el model no convergeix com succeeix quan el learning rate és igual a 0.001.

Al canviar l'optimitzador, la utilització del gradient del cost canvia a l'hora d'actualitzar els paràmetres o pesos. El valor dels gradients varia entre pesos i al llarg d'entrenament, provocant que l'elecció de la taxa d'aprenentatge no sigui l'adequada. Per evitar-ho apareix l'optimitzador RMSProp (de l'anglès *Root Mean Square Propagation*) que divideix el gradient per l'arrel de la mitjana mòbil del quadrat dels gradients [63]. L'exactitud del conjunt de test supera la del model M4. No obstant, a la Figura 6.11. destaca un pic en les corbes de validació i uns quants a les d'entrenament. Es pot deure a l'overfitting perquè el model agafa valors aleatoris per entrenar la xarxa.

Per altra banda, l'optimitzador SGD (de l'anglès *Stochastic Gradient Descent*) calcula el gradient a partir d'un conjunt de dades seleccionades aleatòriament. Com agafa lots, el gradient no és l'òptim i el terme *momentum* accelera la convergència cap a la direcció correcta. El seu valor s'apropa normalment a 0.9 [50], [64].

També es selecciona un decaïment o *decay* learning rate per disminuint durant les iteracions aquest hiperparàmetre. Això permet canvis grans en els pesos a l'inici de l'entrenament i canvis més petits cap al final.

Tot i així el model M12 no acaba de funcionar pels pics que presenten les gràfiques causant una exactitud inferior al 94%.

Per tot el comentat, es considera oportú continuar l'últim assaig amb el model M4.

6.3.5. Assaig 5: epochs

L'últim assaig consisteix en augmentar el número d'iteracions o epochs per analitzar el comportament de l'entrenament i si es produeix un augment en l'exactitud i una disminució en la pèrdua.

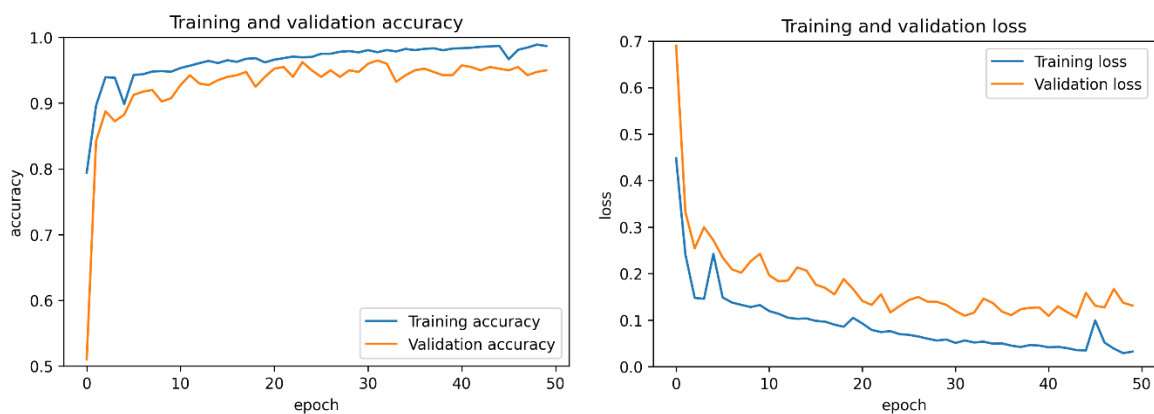


Figura 6.13. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 13.

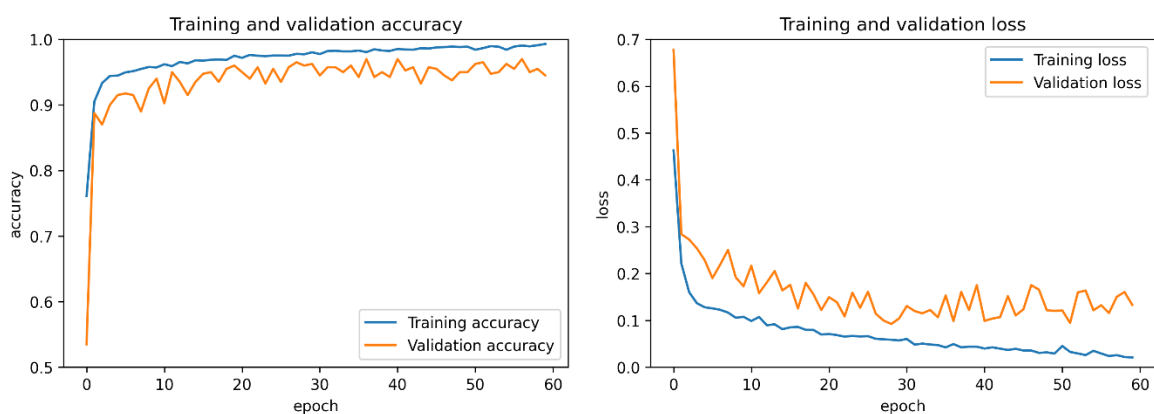


Figura 6.14. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 14.

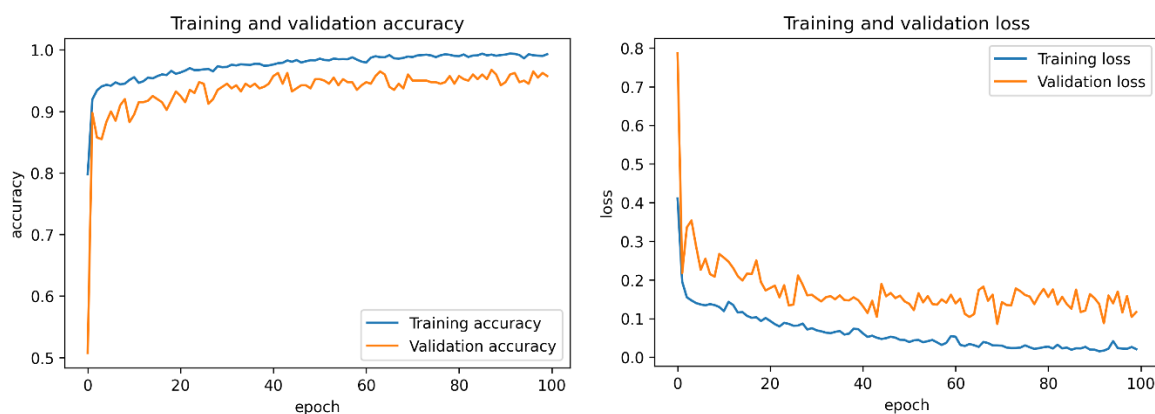


Figura 6.15. Gràfics d'exactitud (esquerra) i pèrdua (dreta) del model 15.

Taula 6.7. Models de l'assaig 5.

Model	Test		Batch_size		Epochs	Núm. Filtres/capa	Optimitzador	Regularització
	Acc.	Losas	Train	Val.				
M4	0.9493	0.1624	50	20	30	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M13	0.9479	0.1662	50	20	50	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M14	0.9429	0.1994	50	20	60	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out
M15	0.9443	0.1996	50	20	100	16	Adam (lr=0.001)	Drop-out

A les tres figures d'aquest assaig s'hi observa un augment positiu tant en l'exactitud com en la pèrdua de l'entrenament. No obstant, en les gràfiques de validació, a partir de les iteracions 30-40, les corbes es mantenen en els mateixos valors. Per aquest motiu, l'exactitud més elevada segueix sent la del model M4, el qual s'entrena durant 30 iteracions. No importa quantes vegades es passin les dades d'entrada per la xarxa neuronal que el rendiment del model no augmentarà.

6.4. Resultats

Els paràmetres del model M4 han resultat ser la millor combinació per un bon rendiment de la xarxa neuronal convolucional.

A continuació es defineix la matriu de confusió i les mètriques per a la seva avaluació:

		Classes predites	
		0 (no esquistòcits)	1 (esquistòcits)
Classes veritables	0 (no esquistòcits)	Veritable Negatiu (VN)	Fals Positiu (FP)
	1 (esquistòcits)	Fals Negatiu (FN)	Veritable Positiu (VP)

■ Imatges bé classificades ■ Imatges mal classificades

Figura 6.16. Matriu de confusió.

La diagonal de color verd correspon a les classes classificades correctament. Un model ideal presentaria el 100% en veritables negatius i positius i el 0% d'errors en els falsos positius i negatius. Gràcies a la matriu de confusió i a la comanda "classification_report" de Python, es poden calcular les mètriques del rendiment del classificador.

Accuracy o exactitud: mètrica utilitzada fins ara que indica quantes mostres totals classifica correctament.

$$\text{Accuracy o exactitud} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

Sensibilitat, recall o True Positive Rate (TPR): identifica quantes mostres classifica bé del total de positius (esquistòcits).

$$\text{Sensibilitat o TPR} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (\text{Eq. 6.6})$$

Especificitat o True Negative Rate (TNR): identifica quantes mostres classifica bé del total de negatius (no esquistòcits).

$$\text{Especificitat o TNR} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (\text{Eq. 6.7})$$

Precisió o Positive Predictive Value (PPV): proporció de veritables positius amb respecte el total de positius predits.

$$\text{Precisió o PPV} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (\text{Eq. 6.8})$$

La **corba ROC** (de l'anglès *Receiver Operating Characteristic*) és una mètrica visual que relaciona la taxa de veritables positius amb la **taxa de falsos positius o FPR (1 – especificitat)** per contestar a quantes

mostres el model prediu incorrectes quan es tracta d'una classe negativa. **L'indicador AUC** és l'àrea sota la corba que interpreta la mesura en la que el model és capaç de separar entre classes.

$$\text{False Positive Rate (FPR)} = \frac{FP}{FP + VN} \quad (\text{Eq. 6.9})$$

La CNN classifica en base a un **llindar**. Si la probabilitat de pertànyer a una classe supera el llindar, la imatge es classificarà com esquistòcits, en cas contrari com a no esquistòcits. El llindar establert és del 0.5. Podria disminuir-se el valor per a què la sensibilitat augmenti, és a dir, que classifiqui més imatges correctes com a esquistòcits, a canvi de disminuir l'especificitat. Accentuar els TPR és recomanable perquè és preferible que una cèl·lula maligna la classifiqui correctament, i no una cèl·lula sana. Si la classificació d'una sola imatge fos el diagnòstic d'una malaltia, un augment en la sensibilitat aconseguiria predir més malalties. Seria catastròfic predir que un pacient malalt estigués sa. Amb la corba ROC es pot trobar el llindar més adequat.

La Figura 6.17. mostra la matriu de confusió sense normalitzar i normalitzada del model M4.

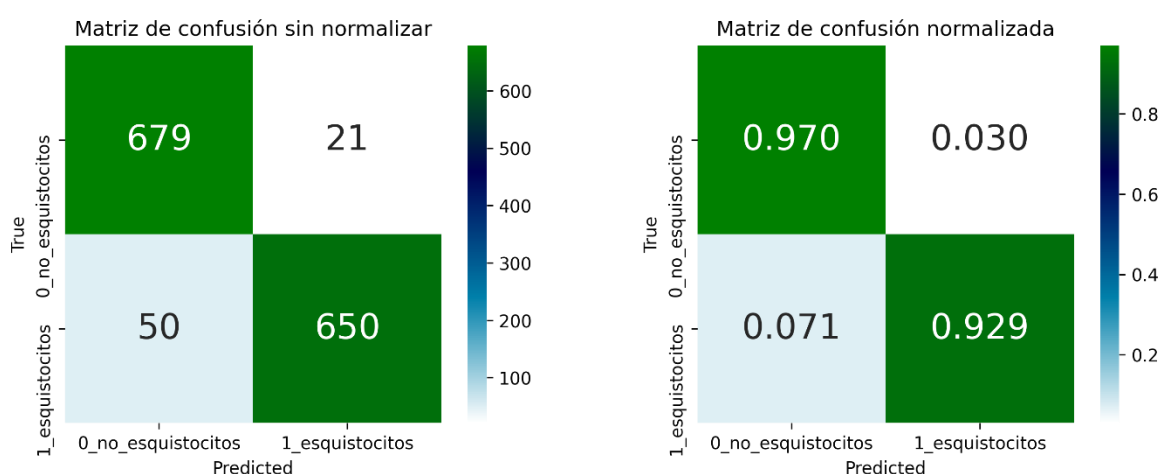


Figura 6.17. Matriu de confusió del model M4. La matriu de l'esquerra presenta els valors en quantitat d'imatges i la matriu de la dreta en proporcions.

El model ha classificat correctament 679 imatges de la classe 0 (no esquistòcits) i 650 de la classe 1 (esquistòcits). Només 71 de 1400 imatges totals utilitzades pel test s'han classificat incorrectament: 21 imatges etiquetades com no esquistòcits s'han predit que són esquistòcits, i 50 imatges d'esquistòcits s'han predit com si no ho fossin.

La diferència entre classes pot ser deguda a la falta d'imatges d'esquistòcits. Les 2167 imatges augmentades d'aquest grup no eren realment imatges originals segmentades de frotis sanguinis, sinó

que eren transformacions d'altres. Alteren les imatges reals per fer un balanceig de classes, però les 1400 imatges noves utilitzades per testejar presenten més diferències morfològiques.

Com a l'exemple anterior, és preferible que una imatge d'un no esquistòcit es classifiqui com esquistòcit que no al revés. Per això, de la corba ROC visualitzada a la Figura 6.18. es busca quin és el millor llindar.

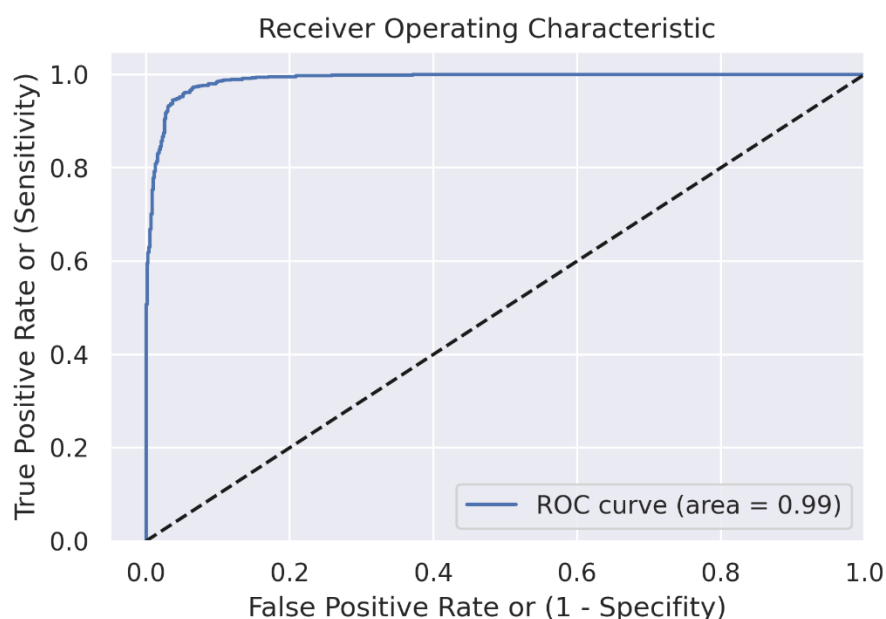


Figura 6.18. Corba ROC del model M4.

Per cada llindar es calcula la taxa de veritables positius i la taxa de falsos positius, obtenint múltiples punts que formen la corba ROC. Tots aquells que estiguin per sobre de la línia diagonal discontinua significarà que la proporció de mostres positives classificades correctament és major que la proporció de mostres negatives classificades incorrectament, com succeeix en la Figura 6.18. excepte en els extrems.

L'àrea sota la corba és gairebé 1, per tant, el model té casi un 100% de probabilitats de saber separar entre les dues classes. El llindar amb més capacitat de separar classes és aquell que més s'apropa al punt (0, 1) de la gràfica.

Gràcies a la funció *argmax*, el millor llindar calculat és ≈ 0.29 . La nova matriu de confusió es presenta a la Figura 6.19.

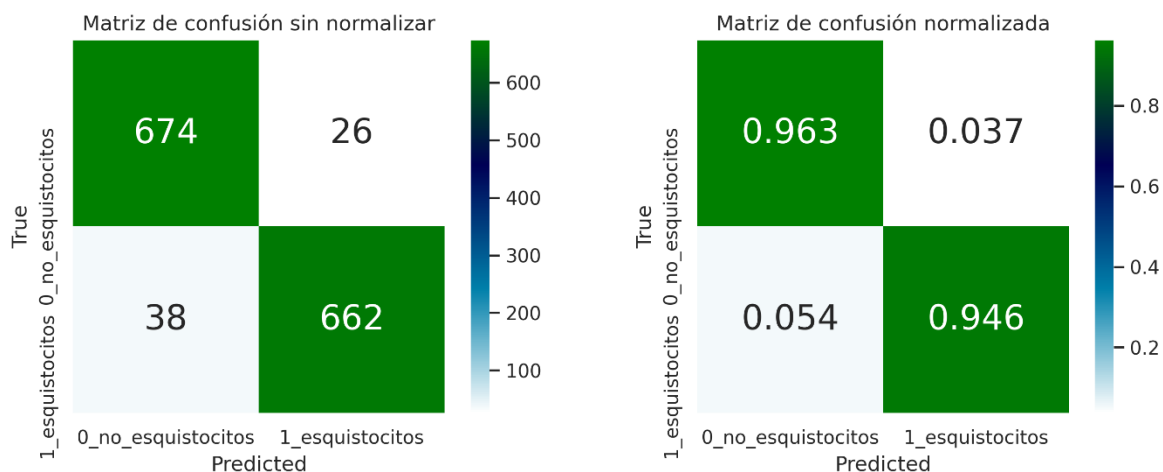


Figura 6.19. Matrius de confusió del model M4 amb llindar = 0.29.

La Taula 6.7. indica els valors de les mètriques descrites pels dos llindars utilitzats.

Taula 6.8. Mètriques del model M4 per diferents llindars.

Model	Llindar	Exactitud	Sensibilitat	Especificitat	Precisió	AUC
M4	0.50	0.9493	0.9286	0.9700	0.9687	0,9898
M4	0.29	0.9543	0.9457	0.9629	0.9622	0.9898

Com era d'esperar, amb un reducció del llindar, la sensibilitat augmenta. Tot i que els VP han baixat del 97% al 96,3%, els VP, que més interessen, han pujat del 92,9% al 94,6%. Gràcies a aquest canvi, l'exactitud total també ha augmentat. Ara el model és més fiable.

A continuació es representen algunes imatges mal classificades. En cada imatge, la t indica l'etiqueta real (*ground truth*) i la p indica la predicció feta per la xarxa:

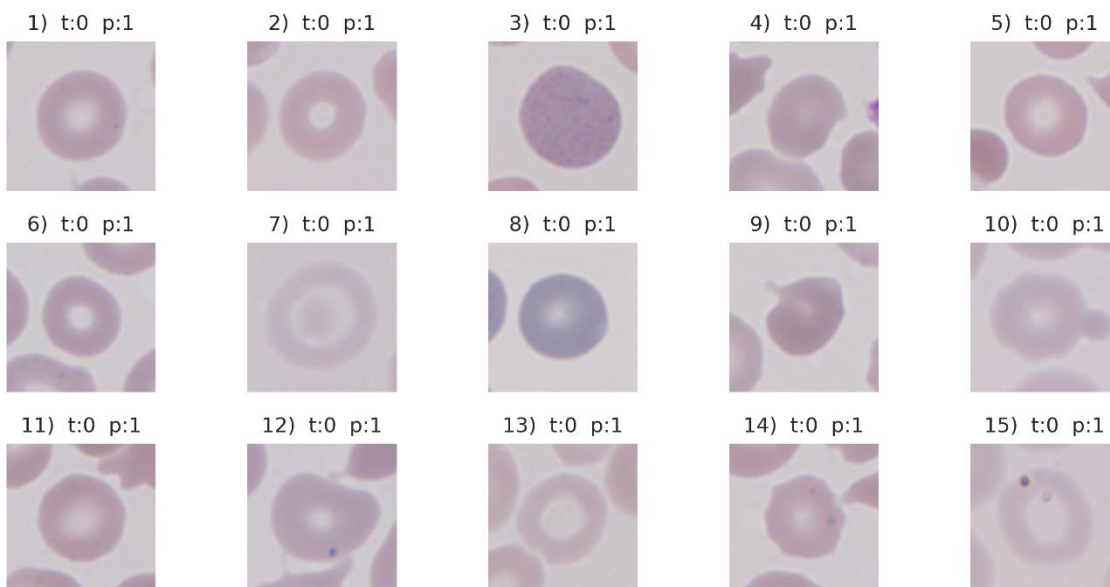


Figura 6.20. Imatges de no esquistòcits classificades com esquistòcits.

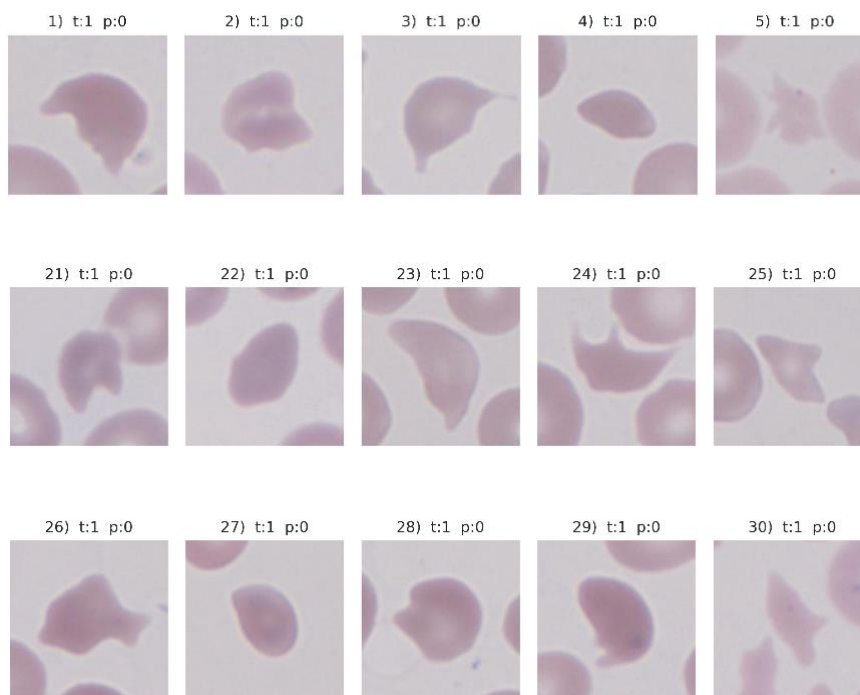


Figura 6.21. Imatges d'esquistòcits classificades com no esquistòcits.

En primer lloc, en algunes imatges hi ha cèl·lules que envolten la que s'analitza que ocupen espai suficient com perquè el model es fixi en les seves característiques i no en les de la cèl·lula central.

La majoria d'imatges totals de la classe 0 utilitzades per entrenar el model, així com per validar i testejar, són hematies sans. La resta són alteracions diferents als esquistòcits. Per això, algunes d'aquestes són mal classificades. Per exemple, en la Figura 6.20., la imatge 3) és una inclusió de puntejat basòfil, la 7) és una cèl·lula diana o codòcit, i la 10) és una cèl·lula llàgrima o dacròcit.

Pel que fa als esquistòcits mal classificats, hi ha alguns que no són tant irregulars com d'altres classificats correctament, per exemple, en la Figura 6.21., els de les imatges 27) i 28). O per la seva forma predu que no són esquistòcits.

7. Recompte d'esquistòcits per frotis

L'anèmia hemolítica microangiopàtica (MAHA) es diagnostica a partir del recompte d'esquistòcits a la sang perifèrica. L'objectiu d'aquest apartat és calcular el percentatge d'esquistòcits per pacient que el model prediu i dictaminar la presència o no del trastorn.

Al contrari que per la cerca del millor model de CNN, ara es juga amb les imatges separades per frotis (per pacient). La Taula 7.1. indica quantes imatges etiquetades de cada classe conté cada un.

Taula 7.1. Imatges d'esquistòcits i no esquistòcits per frotis.

Frotis	Número d'imatges de no esquistòcits	Número d'imatges d'esquistòcits	Número d'imatges totals
Frotis 1: 162524799	1589	140	1729
Frotis 2: 172134479	765	101	866
Frotis 3: 172701481	423	28	451
Frotis 4: 172924803	1091	380	1471
Frotis 5: 172929489	789	281	1070
Frotis 6: 172939049	845	208	1053
Frotis 7: 172939618	1315	209	1524
Frotis 8: 172961561	727	73	800
Frotis 9: 173384507	511	91	602
Frotis 10: 173385597	1109	144	1253
Frotis 11: 182986014	955	82	1037

Es crea un nou directori i 11 subdirectoris, cada un dividit en "ESQUISTOS" i "NORM". Les imatges escalades a 220 x 220 píxels es distribueixen a les carpetes i etiquetes corresponents gràcies als números comuns de cada frotis (primera columna de la Taula 7.1.).

7.1. Avaluació de la CNN en els frotis

El número disponible de frotis és reduït, tot i que es pot considerar elevat tenint en compte la necessitat d'avaluació clínica d'una anomalia poc comú. Per això, els 11 mateixos frotis formen les imatges de test de la CNN ja creada. Algunes imatges s'han fet servir durant l'entrenament, però aquest número aleatori és equivalent per cada frotis. És a dir, podria dir-se que les matrius de confusió i les mètriques que es calculen estan a la mateixa escala. Si s'observessin totes les mostres noves, els resultats, tot i poder ser inferiors, serien equivalents als d'aquest treball. No obstant, el model escollit ha respòs bé amb les 1400 imatges de test i no suposa un problema passar-ne imatges d'entrenament.

No convé fer un augment de dades a les imatges del conjunt de test, per tant, les classes queden desequilibrades: cada frotis té menys esquistòcits que altres eritròcits. El llindar de 0.29 que ha assolit una exactitud general de més del 95%, ha augmentat la sensibilitat del model. Però ara, la sensibilitat augmenta en alguns frotis, però es manté en altres, a causa de la poca quantitat d'esquistòcits. Per tant, no es veu una millora substancial en els frotis amb el llindar de 0.29. Per tant, el recompte d'esquistòcits calculat com el número d'esquistòcits sobre el número total de cèl·lules en el frotis es veu afectat negativament en tots els frotis provocant major diferència entre el recompte real i el recompte predit que amb el llindar de 0.5. És a dir, al reduir el llindar, l'especificitat ha disminuït i hi ha més quantitat de no esquistòcits que el model reconeix com esquistòcits; i com existeix desequilibri entre classes, pesa més la disminució de l'especificitat que l'augment de la sensibilitat. A l'Annex A s'han inclòs les matrius de confusió de cada frotis pel llindar de 0.29.

La sensibilitat o recall i la precisió són mètriques útils per mesurar els resultats relacionats a una sola classe. No obstant, per avaluar el rendiment total i comparar models, es fa servir la *F-score* o *F-measure*, una combinació (mitjana harmònica) d'ambdues mètriques. La generalització de F-score afegeix el paràmetre β que per defecte és 1 (el pes de la precisió i el recall és el mateix). En aquest cas, però, com és preferible minimitzar els falsos negatius, es maximitza el recall i el valor de β es 2.

$F\beta$ -score i el cas específic de F2-score es calculen de la següent manera:

$$F\beta - score = \frac{(1 + \beta^2) * Precisió * Recall}{\beta^2 * Precisió + Recall} \quad (\text{Eq. 7.1})$$

$$F2 - score = \frac{5 * Precisió * Recall}{4 * Precisió + Recall} \quad (\text{Eq. 7.2})$$

Es crea la funció “evaluació” que inclou els passos seguits per trobar la matriu de confusió, les mètriques i el càlcul del recompte d’esquistòcits. Es crida la funció per executar-la segons el frotis, amb tres paràmetres a especificar:

- frotis_dir: directori
- muestras_esq: número d’esquistòcits
- muestras_noesq: número de no esquistòcits

Les figures següents mostren les matrius de confusió per cada frotis. Els valors es presenten en proporcions:

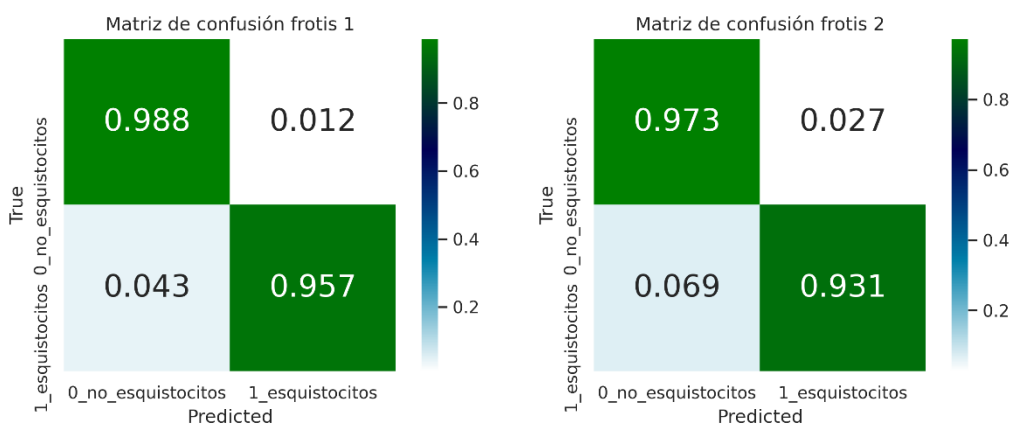


Figura 7.1. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 1. Dreta: frotis 2.

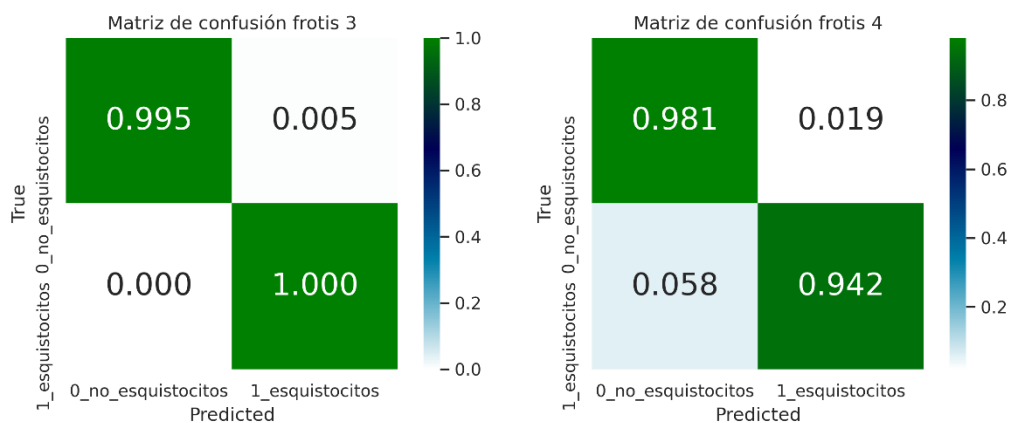


Figura 7.2. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 3. Dreta: frotis 4.

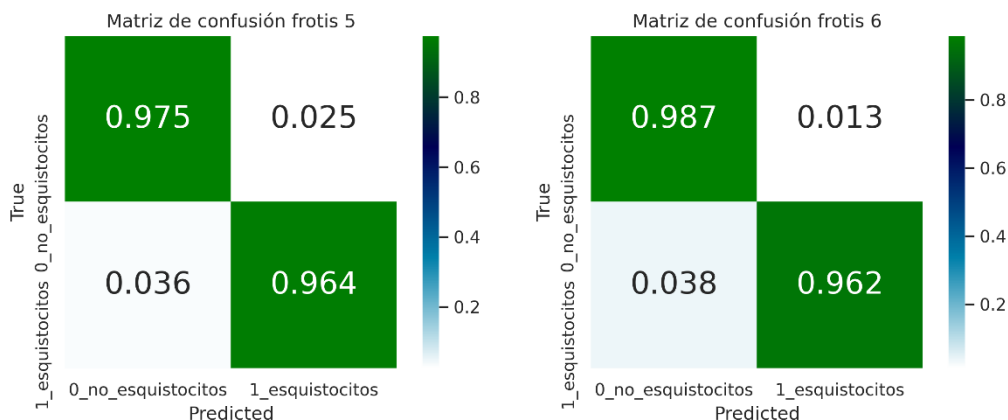


Figura 7.3. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 5. Dreta: frotis 6.

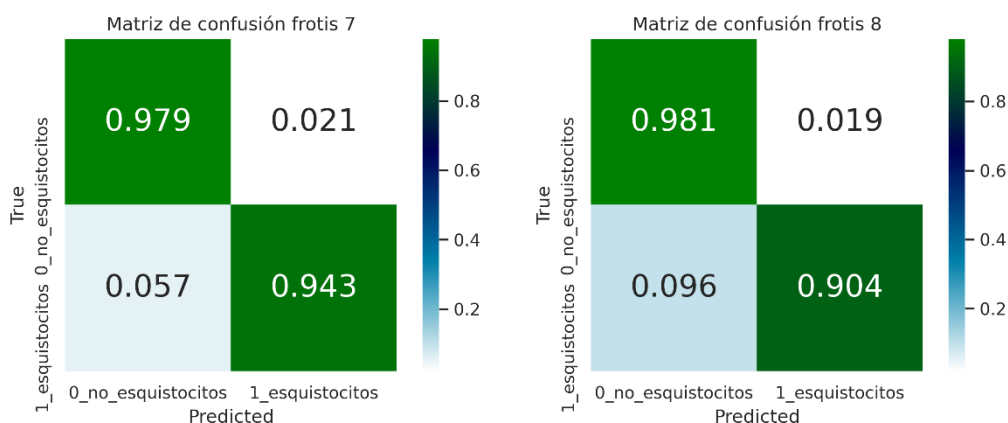


Figura 7.4. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 7. Dreta: frotis 8.

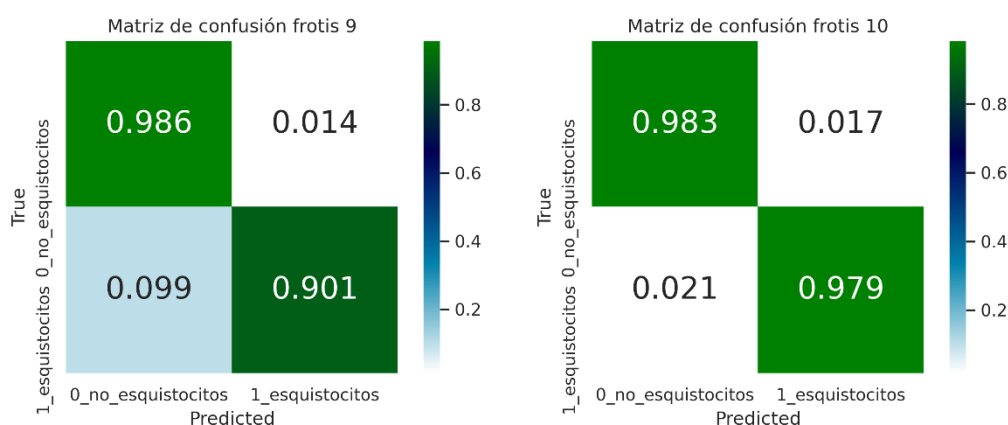


Figura 7.5. Matrius de confusió. Esquerra: frotis 9. Dreta: frotis 10.

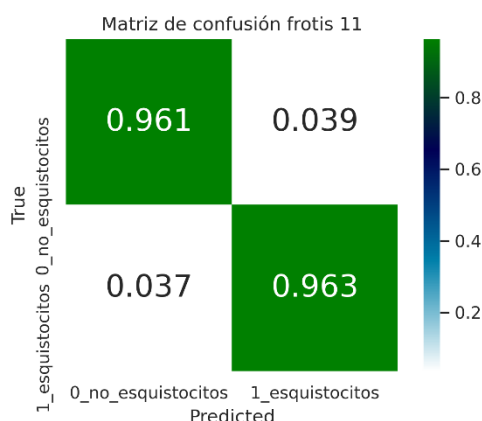


Figura 7.6. Matrius de confusió del frotis 11.

L’avaluació del model M4 en cada un dels frotis dona bons resultats. Tots els VP i els VN superen el 90%, on els màxims es troben pel tercer frotis amb un 100% de sensibilitat (esquistòcits ben classificats) i un 99.53% d’especificitat (no esquistòcits ben classificats).

La Taula 7.2. indica les mètriques per cada frotis sanguini.

Taula 7.2. Mètriques de cada frotis a partir del model M4.

Frotis	Exactitud	Sensibilitat	Especificitat	Precisió	F2-socre	AUC
Frotis 1	0.9855	0.9571	0.9880	0.8758	0.9397	0.9971
Frotis 2	0.9677	0.9307	0.9725	0.8174	0.9056	0.9877
Frotis 3	0.9956	1.000	0.9953	0.9333	0.9859	0.9999
Frotis 4	0.9708	0.9421	0.9808	0.9446	0.9426	0.9945
Frotis 5	0.9720	0.9644	0.9747	0.9313	0.9576	0.9964
Frotis 6	0.9820	0.9615	0.9870	0.9479	0.9588	0.9970
Frotis 7	0.9738	0.9426	0.9787	0.8756	0.9284	0.9939
Frotis 8	0.9738	0.9041	0.9841	0.8250	0.8871	0.9891
Frotis 9	0.9734	0.9011	0.9863	0.9213	0.9051	0.9898
Frotis 10	0.9824	0.9792	0.9829	0.8812	0.9579	0.9974
Frotis 11	0.9614	0.9634	0.9613	0.6810	0.8896	0.9899

En la majoria, el model classifica millor els no esquistòcits que els esquistòcits, com ocorria amb les imatges de testing per la creació de la CNN. Però al disposar d’un nombre petit d’imatges de la classe 1 per cada frotis, inclús aquells que presenten major sensibilitat la disminuirien si aquestes alteracions tinguessin major presència.

La precisió del frotis 11 és la més baixa d’un 68.10% però gràcies al càlcul del F2-score, aquest indica un 88.96%, sent el segon conjunt de test amb pitjor rendiment, seguit del frotis 8. L’exactitud d’aquest no és de les més baixes, motiu pel qual aquesta mètrica no és confiable.

A més, un exemple clar de desbalanceig és el frotis 3 que tot i els elevats valors de sensibilitat i especificitat, aconsegueix un 93.33% de precisió. No obstant, la mesura F2 augmenta en el millor rendiment.

Pel que fa a la corba ROC, les àrees sota la corba estan al voltant del 0.99, imitant el valor obtingut a l'apartat 6.4 i, per tant, una bona separabilitat de classes.

7.2. Recompte d'esquistòcits

Després de verificar el correcte funcionament del model escollit per cada frotis, es fa el recompte d'esquistòcits que predirà un possible diagnòstic de MAHA.

La presència d'esquistòcits a la sang perifèrica quan excedeix els valors normals en adults sans és un signe morfològic de gravetat. Així, el seu recompte esdevé de gran importància clínica.

A la pràctica, un mètode utilitzat és el recompte manual d'esquistòcits per imatges de camp al microscopi o en els sistemes d'anàlisi de sang. Observar un sol esquistòcit per imatge de camp ja significa un diagnòstic clar del trastorn, ja sigui tenint a l'abast 300 o 1000 cèl·lules totals. Segons [65], "gairebé tots els casos de TMA estan associats a MAHA". Per tant, per a la identificació del trastorn en els pacients, es fa servir el lílindar de separació de l'1% recomanat per l'ICSH, sabent que els esquistòcits representen la principal alteració morfològica. Un valor superior indicarà la presència de MAHA, i un valor inferior la seva absència.

L'equació per calcular el recompte d'esquistòcits és la següent:

$$\text{Recompte (\%)} = \frac{\text{total hematies reconeguts com esquistòcits}}{\text{no esquistòcits veritables} + \text{esquistòcits veritables}} * 100 \quad (\text{Eq. 7.3})$$

La Taula 7.3. indica el recompte a partir de les etiquetes veritables (veritat fonamental), el recompte amb el model escollit, diferència entre els dos càlculs i el diagnòstic final.

Taula 7.3. Recompte d'esquistòcits per frotis.

Frotis	Recompte d'esquistòcits (%)		Diferència (amb el model – veritable)	Presència de MAHA
	Veritable	Amb el model		
Frotis 1	8.097	8.849	0.752	SÍ
Frotis 2	11.66	13.28	1.620	SÍ
Frotis 3	6.208	6.652	0.444	SÍ
Frotis 4	25.83	25.76	-0.070	SÍ
Frotis 5	26.26	27.20	0.940	SÍ
Frotis 6	19.75	20.04	0.290	SÍ
Frotis 7	13.71	14.76	1.050	SÍ
Frotis 8	9.125	10.00	0.875	SÍ
Frotis 9	15.12	14.78	-0.340	SÍ
Frotis 10	11.49	12.77	1.280	SÍ
Frotis 11	7.907	11.19	3.283	SÍ

Tots els recomptes aconseguen valors superiors al 6% d'esquistòcits a la sang perifèrica. Els que presentaven una precisió més elevada corresponen amb els frotis amb més esquistòcits respecte del total d'eritròcits ja que les dades estan més balancejades en la mesura possible.

El rendiment de les imatges de test de l'últim frotis era dels pitjors, cosa que es reflecteix en la diferència de recomptes. Tot i així, la diferència general no és elevada, verificant de nou el correcte funcionament del model seleccionat. Dels 11 frotis, només en 2 el model prediu un major nombre d'esquistòcits que els que realment hi ha.

La mitjana aritmètica de la diferència de recomptes (error) és de 0.92. I la desviació estàndard (σ), calculada segon Eq. 7.4, és de 0.97.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Eq. 7.4})$$

On x_i és la diferència del frotis i , \bar{x} la mitjana aritmètica i n el número de frotis.

Per tant, en base a aquests frotis, el valor final del recompte d'esquistòcits a l'hora de fer passar un conjunt de cèl·lules d'un pacient pel model escollit és el següent:

$$\text{Recompte amb el model (\%)} = \text{Recompte veritable (\%)} \pm (0.92 \pm 0.97)\% \quad (\text{Eq. 7.5})$$

L'elevada desviació es deu a la dispersió en les diferències dels recomptes. El valor que més contribueix és el 3.287 per la seva major distància a la mitja, inclús és casi el doble que la següent distància més gran (la del frotis 9). Si aquest valor considerat extrem s'eliminés, la desviació estàndard disminuiria

fins un 0.62. A més, l'altre problema que causa l'elevada desviació és la poca quantitat de frotis disponibles. Tot i tractar-se d'un trastorn estrany, si hi hagués un augment de frotis, el número d'imatges per entrenar el model augmentaria, provocaria millors mètriques i les diferències serien menors, donant lloc a un recompte més precís i exacte.

Tot i així, com tots els recomptes d'esquistòcits superen amb distància el llindar establert de l'1%, els pacients pateixen de MAHA, diagnòstics que concorden amb els dels facultatius.

8. Anàlisi de l'impacte ambiental

Les conseqüències del correcte funcionament del projecte deriven en una reducció de l'impacte ambiental i social.

La finalitat final de l'algoritme és incloure'l en el procés de diagnòstic clínic d'anèmia hemolítica microangiopàtica o, juntament amb trombocitopènia, per la sospita d'anèmia microangiopàtica trombòtica. És a dir, per a la classificació binària d'esquistòcits i altres eritròcits i el recompte dels primers.

Gràcies al nou software, el temps de diagnòstic es redueix. Si el resultat és conclusiu i el pacient presenta el trastorn, es pot aplicar un tractament mèdic d'hora. No obstant, l'algoritme no substitueix completament els experts sinó que els serveix d'ajuda, sobretot en els primers dies d'ús.

L'únic impacte ambiental en un correcte funcionament seria la despesa energètica del servidor amb l'algoritme implementat. En cas d'averies, es generaria un impacte ambiental degut a la tecnologia utilitzada per avaluar l'error. Si es solucionés, no hi hauria res més a fer, però si l'algoritme no fos d'utilitat, es donaria la volta als punts anteriorment comentats.

Respecte l'impacte ambiental durant el desenvolupament del projecte, existeix la despesa energètica de l'ordinador utilitzat, la qual genera diòxid de carboni i afavoreix, desgraciadament a l'efecte hivernacle.

El portàtil té les següents característiques:

- Família: Lenovo ideapad 330-15IKB
- Processador: Intel® Core™ i7-7500U CPU @ 2.70 GHz 2.90 GHz
- RAM instal·lada: 16,0 GB
- Targeta gràfica: AMD Radeon™ 530
- Sistema operatiu: Windows 10 Home de 64 bits

Considerant 25 hores per crèdit i 24 crèdits del TFG, el temps emprat en la realització del treball és de 600 hores. Tenint en compte llum artificial i un consum mitjà de 150 W = 0,150 kWh, la despesa energètica total és aproximadament:

$$Despesa\ energètica = 600h * \frac{0.150kW}{1h} = 90kWh$$

Assumint 0.14 €/kWh, el cost és de:

$$Despesa\ econ\omicron mica = \frac{0.14\text{€}}{kWh} * 90kWh = 12.6\text{€}$$

Per últim segons la companyia, 1 kWh equival a 0.20 kg CO₂, [66] per tant:

$$Impacte\ ambiental = 0.20 \frac{kgCO_2}{kWh} * 90kWh = 18kgCO_2$$

9. Conclusions

El treball exposat té com a resultat final un model basat en xarxes neuronals convolucionals per a la classificació i detecció automàtica d'esquistòcits en els frotis de sang perifèrica i el seu recompte pel diagnòstic del trastorn d'anèmia hemolítica microangiopàtica.

Gràcies a la varietat de perspectives referenciades, he après les bases biològiques i tecnològiques involucrades en l'estudi. He reforçat els meus coneixements per justificar l'aplicació d'ambdues branques en un mecanisme comú.

L'anàlisi del conjunt de dades inicials és el primer component del procés pràctic i un molt important. Ha sigut un repte organitzar-ho adequadament degut a les diferents vies a disposició i per l'efecte directe de la seva sortida en els resultats finals. El balanceig de les dades, per exemple, és imprescindible per la correcta separació entre classes.

Els 15 models els creo a partir de l'estructura d'una CNN des de zero i l'ajust dels paràmetres. Amb aquesta acció, trobo el model amb millor rendiment. El primer de tots ells, basat en DysplasiaNet, ja aconsegueix unes bones mètriques, però intento accentuar-les amb la variació de la mida dels lots d'entrenament i validació, el número de filtres per capa convolucional, l'addició de regularització a part del drop-out, l'optimitzador i el learning rate i el número d'epochs o iteracions.

Tot i presentar 5 assajos, el millor model seleccionat amb un llindar de classificació de 0.5 es troba en el primer, amb una exactitud del 94.93%. No obstant, tot i arribar a una exactitud inclús superior, justifico que aquell model no és l'adequat per agafar valors aleatoris durant l'entrenament.

La següent conclusió que obtinc del treball és la importància de la selecció del valor llindar en una classificació binària. Durant els assajos faig servir el llindar per defecte de 0.5 que indica que si la xarxa neuronal assigna una probabilitat final major a 0.5, la imatge es classifica com esquistòcit, en cas contrari es classifica com no esquistòcit. Quan calculo la corba ROC, trobo el valor llindar que maximitza la sensibilitat del model, resultant ser de 0.29. A l'aplicar-ho al testing per cèl·lula s'observa una millora en l'exactitud general. No obstant, per a l'etapa del recompte d'esquistòcits selecciono el llindar de 0.5 perquè el de 0.29 no és d'utilitat i afecta als resultats negativament donat el desbalanceig de les classes, fet a tenir en compte.

Finalment, trobo les matrius de confusió i les mètriques de cada frotis per després fer el recompte en base al llindar de l'1% segons les recomanacions de l'ICSH. Tots els recomptes superen amb escreix el llindar, sent els pacients diagnosticats amb MAHA amb un error de 0.99 ± 0.97 , la desviació estàndard tant elevada deguda principalment a la limitació d'imatges disponibles.

Resumint, crec que la poca diferència entre els recomptes veritables i els calculats a partir del model comproven el seu bon funcionament. És a dir, l'algoritme és capaç de separar esquistòcits i altres cèl·lules vermells majoritàriament eritròcits, complint així els objectius principals del treball satisfactòriament.

Per tant, suggereixo com accions futures, en primer lloc, la verificació del model amb un conjunt d'imatges inicials més elevat, ja que només disposava d'11 frotis i no tenia d'altres a l'abast per dur a terme una prova de concepte amb la qual comparar els resultats. Aquestes imatges inclús provenir d'altres hospitals per establir un algoritme estandarditzat que no tingui en compte la tinció de les cèl·lules.

En els objectius no he inclòs la utilització de models de CNN preentrenats amb extracció de característiques o *fine-tuning* perquè l'exactitud assolida amb una CNN des de zero ha sigut excel·lent i aplicar una xarxa molt més complexa en un problema on una arquitectura més bàsica dona bons resultats, podria resultar en un mal entrenament. Això no obstant, seria interessant veure la diferència amb aquestes tècniques.

El recompte d'esquistòcits és significatiu quan representa la principal anomalia morfològica, cosa que no es pot saber sense observar el frotis al microscopi. Per tant, com a perspectiva futura, també suggereixo una classificació multi-classe amb la inclusió d'altres alteracions i comparar els diferents recomptes per diagnosticar MAHA o un trastorn alternatiu.

La finalitat del treball com a última instància és l'aplicació de l'algoritme com a eina de recolzament en el flux de treball d'un laboratori clínic. Espero haver contribuït en la creació d'un algoritme eficient que agilitzi la gestió del personal des del moment on ja està feta la preparació del frotis sanguini fins el diagnòstic i, per tant, un tractament ràpid.

Pressupost i/o Anàlisi Econòmica

El projecte s'ha realitzat en unes condicions accessibles i gratuïtes, i no s'ha obtingut cap remuneració econòmica pel seu desenvolupament. Tot i així, en un entorn professional, el treball inclouria els costos del material emprat i els costos d'enginyeria.

Material i software

L'ordinador personal és imprescindible per la cerca d'informació, redacció de la memòria i creació dels algorismes, així com el Microsoft 365 Personal per l'ús de l'aplicació Word. Per la segmentació inicial de les imatges ja digitalitzades (cost no tingut en compte per ja ésser implementat), es necessita la llicència de MATLAB®.

Taula 0.1.a. Costos de material i software.

Material / software	Quantitat (unitat)	Preu unitari (€/unitat)	Preu total (€)
Ordinador Lenovo ideapad 330-151IKB	1	629,0	629,0
Microsoft 365 Personal	1	69,0	69,0
MATLAB®	1	800,0	800,0
TOTAL (IVA inclòs)			1.498,0

El software utilitzat per la creació dels codis és totalment lliure i gratuït.

Mà d'obra

Més del 98% de mà d'obra prové d'enginyers qualificats per la realització del treball. El percentatge restant són de facultatius en l'àmbit mèdic.

Enginyeria

El temps dedicat pel graduat enginyer correspon a les hores corresponents dels 24 crèdits del treball, com s'ha comentat a l'*apartat 8*. El director i la co-directora, tots dos amb doctorat, han fet el seguiment i la revisió del treball, a part de la seva aportació de coneixements.

Taula 0.2.b. Costos d'enginyeria.

<i>Facultatius enginyeria</i>	Temps (h)	Preu unitari (€/h)	Preu total (€)
<i>Enginyer graduat</i>	600	30,0	18.000,0
<i>Director</i>	30	40,0	1.200,0
<i>Co-directora</i>	30	40,0	1.200,0
	IVA (21%)		4.284,0
	TOTAL		24.684,0

Altres serveis

A més del director i la co-directora, 3 facultatius del Grup de Recerca d'Hematologia de l'Hospital Clínic han aportat els seus coneixements en la segmentació d'imatges i revisió general d'algunes parts del treball.

Taula 0.3.c. Costos de medicina.

<i>Facultatius mèdics</i>	Temps (h)	Preu unitari (€/h)	Preu total (€)
<i>Facultatiu 1</i>	6	40,0	240,0
<i>Facultatiu 2</i>	3	40,0	120,0
<i>Facultatiu 3</i>	3	40,0	120,0
	IVA (21%)		100,8
	TOTAL		580,8

Pressupost final

Taula 0.4.d. Pressupost final.

<i>Tipus de cost</i>	Preu total (€)
<i>Material / Software</i>	1.498,0
<i>Facultatius d'enginyera</i>	9.438,0
<i>Facultatius mèdics</i>	435,6
PREU FINAL	11.317,6

El preu total ascendiria fins **11.317,6 €**, però tenint en compte la presència d'un servidor amb les característiques de la Taula 0.1., el preu podria disminuir fins a **9.819,3 €**.

Bibliografia

- [1] Pugsley, M.K., & Tabrizchi, R. 2000. "The vascular System: An overview of structure and function." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44 (2) (Elsevier), 333-340. [En línia]. Disponible a: [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8). [Última consulta: 22 de maig de 2021].
- [2] Fung, Y. C. 1993. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. ISBN 0387979476.
- [3] Bertran, Prieto, P. *Los 5 tipos de vasos sanguíneos (y características)*. MédicoPlus. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/2wwfrhzf>. [Última consulta: 22 de maig de 2021].
- [4] Visible Body. (2021). *Estructura y función de los vasos sanguíneos: Cómo la red del sistema circulatorio ayuda a proporcionar energía a todo el cuerpo*. [En línea]. Disponible a: <https://tinyurl.com/ux9wuuyv>. [Última consulta: 22 de maig de 2021].
- [5] Gupta, J. I., & Shea, M. J. (2019). *Biology of the Blood Vessels*. Manual MSD. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/wuh5am9k>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [6] WebStockReview. *Lungs clipart heart blood vessel*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/mv2ppate>. [Última consulta: 13 de maig de 2021].
- [7] American Society of Hematology. (2021). *Blood Basics*. [En línia]. Disponible a: <https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [8] Moraleda Jiménez J. M. (2017). *Pregrado de Hematología*. 4ta ed. Madrid: Luzán 5, S. A. ISBN 978-84-7989-874-8.
- [9] Lanza, R., & Atala, A. (2009). *Essentials of Stem Cell Biology*. 2nd ed. San Diego, London, Waltham. Elsevier. ISBN: 978-0-12-409503-8. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-06957-8>.
- [10] Elsevier Connect. (2019). *Hematopoyesis: claves de la generación de todas las células sanguíneas*. Elsevier. [En línia] Disponible a: <https://tinyurl.com/5n8uhf9h>. [Última consulta: 22 de maig de 2021].
- [11] Romero, H., & Caraballo, A. (2019). *Hematología práctica*. 2nd ed. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, Consejo de Publicaciones. ISBN 978-980-11-1954-8.
- [12] Klinken, S. P. (2002). *Cells in focus: Red blood cells*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34 (12), 1513-1518 (Elsevier). [En línia]. Disponible a: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00087-0). [Última consulta: 22 de maig de 2021].

- [13] Bretts, J. G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2021). "Leukocytes and Platelets" In *Anatomy & Physiology*. Houston: OpenStax. ISBN 978-1-947172-04-3. Disponible a: <https://tinyurl.com/cv4zrbu3>. [Última consulta: 15 de juny de 2021].
- [14] University of Rochester Medical Center. *What Are White Blood Cells?* [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/5btj2d4z>. [Última consulta: 15 de juny de 2021].
- [15] Nall, R. (2020). *What to know about white blood cells*. Medical News Today. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/3rnkyen>. [Última consulta: 15 de juny de 2021].
- [16] Boundless Anatomy and Physiology. *White Blood Cells*. Lumen Learning. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/ejtm2amc>. [Última consulta: 15 de juny de 2021].
- [17] 123RF. [En línia]. Disponible a: <https://es.123rf.com/>. [Última consulta: 22 de maig de 2021].
- [18] University of Rochester Medical Center. *What Are Platelets?* [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/43d8fxjd>. [Última consulta: 15 de juny de 2021].
- [19] Adewoyin, AS., & Nwogoh, B. (2014). *Peripheral blood film – A review*. Annals of Ibadan Postgraduate Medicine, 12(2), 71-79 (NCBI). [En línia]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4415389/>. [Última consulta: 30 de maig de 2021].
- [20] Campuzano Maya, G. (2008). *Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos*. Medicina & Laboratorio, 14 (7-8), 311-357. [En línia]. Disponible a: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8b.pdf>. [Última consulta: 30 de maig de 2021].
- [21] Taberero Caturla, J., Serrano, G., Carles Galcerán, J., & Ruiz Alcaraz, A. E. *Peripheral blood test*. Hospital Vall d'Hebron. [En línia]. Disponible a: <https://hospital.vallhebron.com/en/diagnostic-tests/peripheral-blood-test>. [Última consulta: 30 de maig de 2021].
- [22] Prevención de la salud. *Procesado de muestras en el laboratorio de la clínica (I)*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/uhkvzha>. [Última consulta: 30 de maig de 2021].
- [23] Ulloa Rosero, B., Tapia, C., Toscano Gallardo, C., Pozo Larco, C. (2017). *Fundamentos de hematología*. Quito, Ecuador: Edimec. ISBN 9978-978-13-119-0. Disponible a: <https://tinyurl.com/3r42jkkz>. [Última consulta: 15 de maig de 2021].
- [24] Lewis, S. M., Bain, B. J., & Bates, I. (2007). *Dacie y Lewis. Hematología Práctica*. 10a ed. Madrid: Elsevier. ISBN 978-84-8086-229-5.

- [25] MedSchool. *The Blood Film*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/2zs8jir3>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [26] World Health Organization. *Global anaemia prevalence and number of individuals affected*. Disponible a: <https://tinyurl.com/er9wwstr>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [27] American Society of Hematology. (2021). *Anemia*. [En línia]. Disponible a: <https://www.hematology.org/education/patients/anemia>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [28] Bain, B. J. (2015). *Blood cells. A practical guide*. 5a ed. London: Wiley Blackwell.
- [29] Merino, A. (2014-2015). *Alteraciones morfológicas de los eritrocitos*. Barcelona: Educación continuada en el laboratorio clínico, 20: 41-64. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/2fkbsury>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [30] Zini, G., d'Onofrio, G., Briggs, C., Erber, W., Jou, J. M., Lee, S. H., McFadden, S., Vives-Corrons, J. L., Yutaka, N., & Lesesve, J. F. (2012). *ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes*. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34 (2), 107-116. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01380.x>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [31] Bull, B. S., & Khun, I. N. (1970). *The production of schistocytes by fibrin strands (A scanning electron microscope study)*. *Blood*, 35 (1), 104-111. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1182/blood.V35.1.104.104>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [32] Thomas, M. R., & Scully, M. (2021). *How I treat microangiopathic hemolytic anemia in patients with cancer*. *Blood*, 137 (10), 1310-1317. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1182/blood.2019003810>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [33] Braunstein, E. M. (2020). *Microangiopathic Hemolytic Anemia*. MSD Manual. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/58d343ss>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [34] Joly, B. S., Coppo, P., & Veyradier, A. (2017). *Thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Blood*, 129 (21), 2836-2846. [En línia]. Disponible a: <https://doi-org/10.1182/blood-2016-10-709857>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [35] Canpolat, N. (2015). *Hemolytic uremic syndrome*. *Turk Pediatri Arsivi*, 50 (2), 73-82. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.5152/tpa.2015.2297>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [36] National Kidney Foundation. *Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/3z39hsnr>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].

- [37] National Heart, Lung, and Blood Institute (2019). *Disseminated Intravascular Coagulation*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/yfrxv3jk>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [38] March of Dimes. (2019). *Hellp Syndrome*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/ymcahsun>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [39] Schapkaitz, E., & Halefom Mezgebe, M. (2017). *The clinical significance of schistocytes: a prospective evaluation of the International Council for Standardization in Hematology Schistocyte uidelines*. *Turkish Journal of Hematology*, 34 (1), 59-63. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0359>. [Última consulta: 2 de juny de 2021].
- [40] Fogg, A. (2018). *A History of Machine Learning and Deep Learning*. Import.io. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/try8fwks>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [41] Chollet, F. (2018). *Deep Learning with Python*. New York: Manning Publications Co. ISBN 9781617294433.
- [42] Crespo, I. (2020). *Una selva de sinapsis. Lo que escondes en tu cerebro*. 1a ed. Barcelona: Paidós. ISBN 978-84-493-3721-5.
- [43] McCulloch, W. S., & Pitts, W. (1943). *A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity*. *Bulletin of Mathematical Biology*, 5, 115-133, Barcelona. [En línia] Disponible a: <https://doi.org/10.1007/BF02478259>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [44] Chandra, A. L. (2018). *McCulloch-Pitts Neuron – Mankind’s first mathematical model of a biological neuron*. Towards data science. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/j8s3kt83>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [45] CS231n. *Convolutional neural networks for visual recognition*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/437yttt2>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [46] Raschka, S., & Mirjalili, V. (2017). *Python Machine Learning. Machine Learning and Deep Learning with Python, scikit-learn, and TensorFlow*. 2nd ed. Birmingham: Packt Publishing Ltd. ISBN 978-1-78712-593-3.
- [47] Freire, E., & Silva, S. (2019). *Redes neuronales*. Bootcamp AI, Medium. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/3h58tfma>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [48] Numerentur.org. *FA ReLU*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/4jutr7rd>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].

- [49] Nielsen, M. (2019). *Neural Networks and Deep Learning*. [En línia]. Disponible a: <http://neuralnetworksanddeeplearning.com/index.html>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [50] Rumelhart, D. E., Williams, R. J., & Hinton, G. E. (1986). *Learning representations by back-propagation errors*. *Nature*, 323 (6088), 533-536. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1038/323533a0>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [51] Acevedo A, Alférez S, Merino A, Puigví L, Rodellar J. *Recognition of peripheral blood cell images using convolutional neural networks*. *Comput Methods Programs Biomed* [Internet]. Elsevier B.V.; 2019; 180:105020. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105020>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].
- [52] Prabhu, R. (2019). *Understanding of Convolutional Neural Network (CNN) – Deep Learning*. Medium. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/aj92s44w>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [53] Bagnato, J. I. (2020). *Aprende Machine Learning. Teoría + Práctica Python*. España. ISBN 978-84-09-25816-1.
- [54] Brownlee, J. (2019). *How to avoid overfitting in deep learning neural networks*. *Machine Learning Mastery*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/fc2u5ubk>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [55] Amazon Web Services. *Amazon Machine Learning: Developer Guide*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/fkm29dch>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [56] Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I., & Salakhutdinov, R. (2014). *Dropout: A Simple Way to Prevent Neural Networks from Overfitting*. *Journal of Machine Learning Research*, 15 (56), 1929-1958. [En línia]. Disponible a: <https://jmlr.org/papers/v15/srivastava14a.html>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [57] Versloot, C. (2019). *What is Dropout? Reduce overfitting in your neural network*. *Machine Curve*. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/cxy5yuap>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [58] Durán, J. (2019). *Técnicas de Regularización Básicas para Redes Neuronales*. Medium. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/tz8prvdv>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [59] Open Data Science. (2019). *Image Augmentation for Convolutional Neural Networks*. Medium. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/4r44t3dc>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].
- [60] Gandhi, A. (2021). *Data Augmentation | How to use Deep Learning when you have Limited Data – Part 2*. Nanonets. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/d46ur3kz>. [Última consulta: 10 de juny de 2021].

- [61] Acevedo, A., Merino, A., Boldú, L., Molina, A., Alférez, S., & Rodellar, J. (2021). *A new convolutional neural network predictive model for the automatic recognition of hypogranulated neutrophils in myelodysplastic syndromes*. *Computers in Biology and Medicine*, 134, 104479, (Elsevier). [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2021.104479>. [Última consulta: 16 de juny de 2021].
- [62] Kingma, D. P., & Ba, J. L. (2015). *Adam: A method for stochastic optimization*. *International Conference on Learning Representations*. [En línia]. Disponible a: <https://arxiv.org/abs/1412.6980>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].
- [63] Yaqub, M., Feng, J., Sultan Zia, M., Arshid, K., Jia, K., Rehman, Z. U., & Mehmood A. (2020). *State-of-the-Art CNN Optimizer for Brain Tumor Segmentation in Magnetic Resonance Images*. *Brain Sciences*. 10 (7), 427. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.3390/brainsci10070427>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].
- [64] Qian, N. *On the momentum term in gradient descent learning algorithms*. *Neural Network*, 12 (1), 145-151, (Elsevier). [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.1109/MLHPCA14S51975.2020.00011>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].
- [65] Zini, G., & De Cristofaro, R. (2019). *Diagnostic Testing for Differential Diagnosis in Thrombotic Microangiopathies*. *Turkish Journal of Hematology*, 36 (4), 222-229. [En línia]. Disponible a: <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0165>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].
- [66] Gobierno de España - Ministerio Para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2021). *Factores de emisión. Registro de huella de carbono, compensación y proyectos de absorción de dióxido de carbono*. Oficina Española de Cambio Climático, versión 17. [En línia]. Disponible a: <https://tinyurl.com/45terjvd>. [Última consulta: 12 de juny de 2021].

Annex A: recompte d'esquistòcits amb llindar de 0.29

L'annex A té per objectiu mostrar les figures i taules amb el llindar de 0.29 descartat pel recompte d'esquistòcits per frotis.

Matrius de confusió

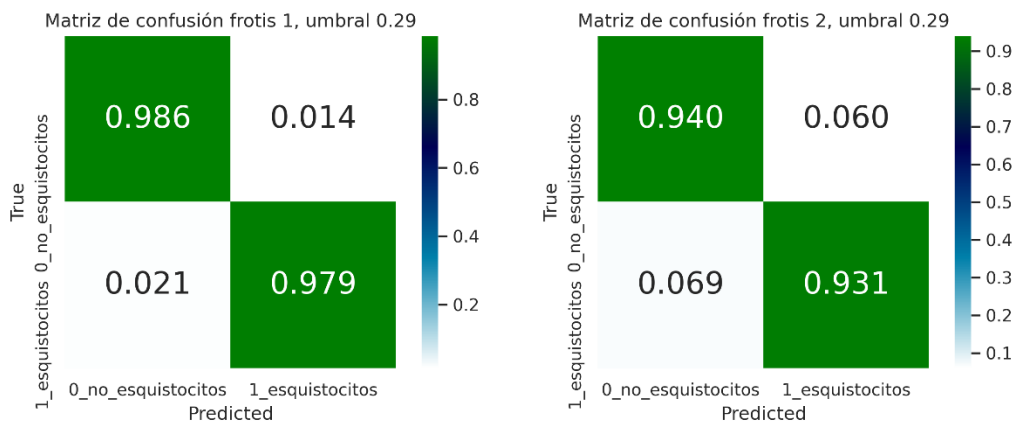


Figura 0.1. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 1. Dreta: frotis 2.

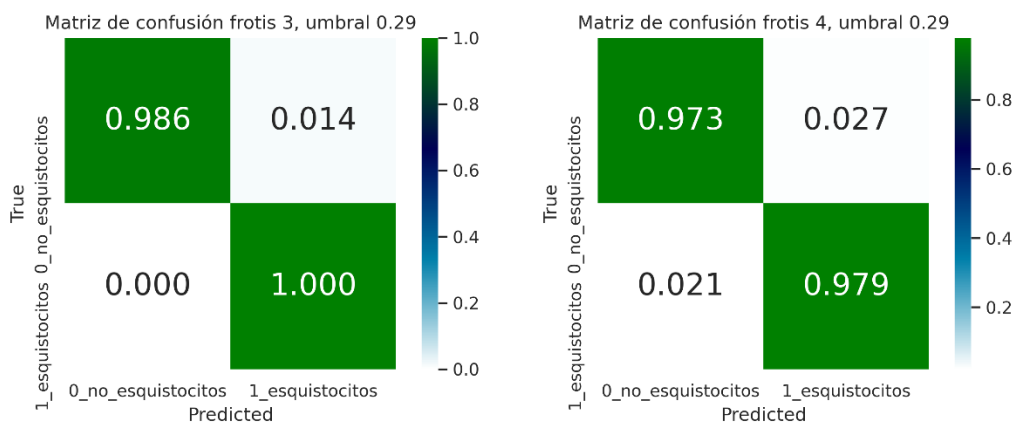


Figura 0.2. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 3. Dreta: frotis 4.

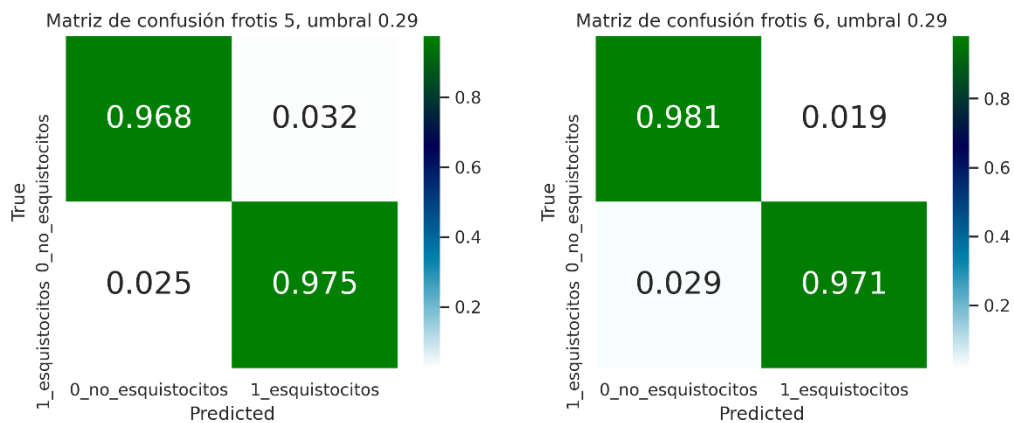


Figura 0.3. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 5. Dreta: frotis 6.

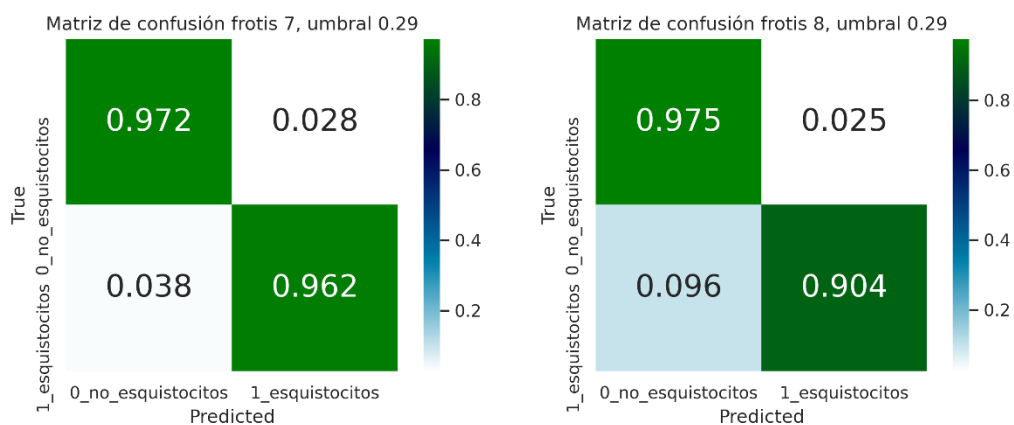


Figura 0.4. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 7. Dreta: frotis 8.

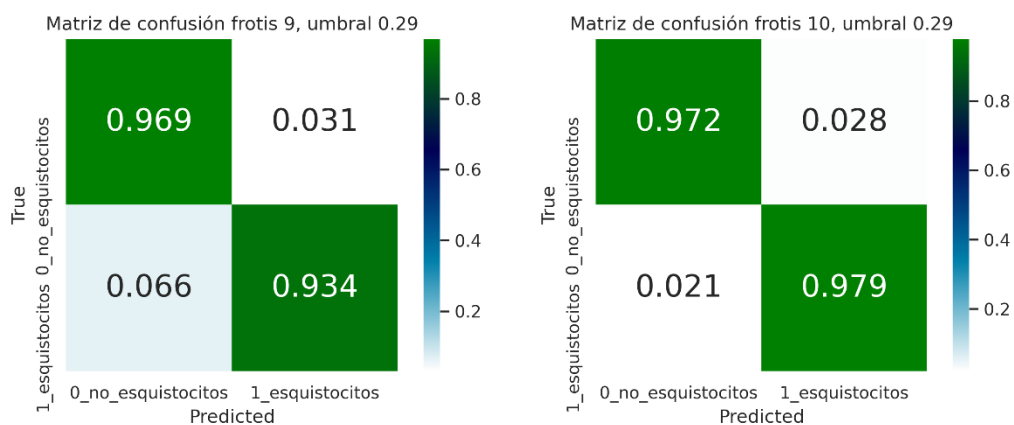


Figura 0.5. Matrius de confusió amb llindar 0.29. Esquerra: frotis 9. Dreta: frotis 10.

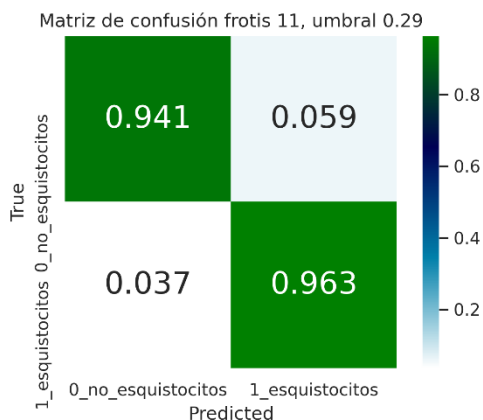


Figura 0.6. Matriu de confusió amb llindar 0.29 del frotis 11.

Mètriques

Taula 0.1.e. Mètriques de cada frotis M4 llindar 0.29.

Frotis	Exactitud	Sensibilitat	Especificitat	Precisió	F2-socre	AUC
Frotis 1	0.9850	0.9786	0.9855	0.8562	0.9514	0.9971
Frotis 2	0.9388	0.9307	0.9399	0.6714	0.8640	0.9877
Frotis 3	0.9867	1.000	0.9858	0.8235	0.9589	0.9999
Frotis 4	0.9742	0.9789	0.9725	0.9254	0.9677	0.9945
Frotis 5	0.9701	0.9751	0.9683	0.9164	0.9628	0.9964
Frotis 6	0.9791	0.9712	0.9811	0.9266	0.9619	0.9970
Frotis 7	0.9705	0.9617	0.9719	0.8445	0.9558	0.9939
Frotis 8	0.9688	0.9041	0.9752	0.7857	0.8777	0.9891
Frotis 9	0.9635	0.9341	0.9687	0.8416	0.9140	0.9898
Frotis 10	0.9729	0.9792	0.9720	0.8198	0.9425	0.9974
Frotis 11	0.9431	0.9634	0.9414	0.5852	0.8531	0.9899

Recompte d'esquistòcits

Taula 0.2.f. Recompte d'esquistòcits per frotis llinar 0.29.

Frotis	Recompte d'esquistòcits (%)		Diferència (amb el model – veritable)	Presència de MAHA
	Veritable	Amb el model		
Frotis 1	8.097	9.254	1.157	SÍ
Frotis 2	11.66	16.17	4.510	SÍ
Frotis 3	6.208	7.539	1.331	SÍ
Frotis 4	25.83	27.33	1.500	SÍ
Frotis 5	26.26	27.94	1.680	SÍ
Frotis 6	19.75	20.70	0.950	SÍ
Frotis 7	13.71	15.62	1.910	SÍ
Frotis 8	9.125	10.50	1.375	SÍ
Frotis 9	15.12	16.78	1.660	SÍ
Frotis 10	11.49	13.73	2.240	SÍ
Frotis 11	7.907	13.02	5.113	SÍ

L'error = $(2.13 \pm 1.38) \%$