

**MICROESTACION DE PROCESAMIENTO DIGITAL  
DE IMAGENES BIOMEDICAS.**

Corkidi Blanco Gabriel      Márquez Flores Jorge  
Centro de Instrumentos de la UNAM.

**Resumen.**

Se describen los elementos y aplicaciones de una microestación de procesamiento digital de imágenes en Biomedicina. Para su mejor entendimiento, se explica el contexto en que interviene dicho sistema.

**CONTEXTO DE UNA MICROESTACION DE PDI EN BIOMEDICINA.**

La alta especialización de la Biomedicina, por la complejidad de sus objetos de estudio, involucra aspectos multidisciplinarios e interdisciplinarios, así como métodos de análisis e instrumentación muy específicos. Para comprender esta especificidad metodológica y de instrumentación, en el campo del análisis de las imágenes biomédicas, es conveniente dar una descripción del contexto de un sistema de Procesamiento Digital de Imágenes (en adelante PDI) en Biomedicina, lo cual nos permitirá entender su diseño, sus características y dominio de uso.

En el orden natural en que se desarrolla un proceso de análisis y solución de algunos problemas biomédicos, tenemos los siguientes aspectos (Fig. 1):

**OBJETO BIOLÓGICO.** Como punto de partida se cuenta con un organismo biológico vivo o muerto y/o una muestra del mismo: tejido, células, o incluso sustancias bioquímicas. Esta fuente de información es la que determina el carácter biológico-médico de las metodologías de análisis posteriores.

**INVESTIGACION BASICA Y DIAGNOSTICO CLINICO.** Dicha muestra biológica es sujeta a estudio, con el fin de una comprensión básica y/o de diagnóstico. El fundamento de un estudio biomédico es un desarrollo teórico desde el punto de vista de la Fisiología, la Farmacobiología, la Biofísica, etc. En el caso más específico de la Medicina, el diagnóstico clínico consiste en una caracterización e identificación de diferentes patologías.

**DISCIPLINA.** El análisis requerido en la investigación o diagnóstico cae dentro del ámbito de diferentes disciplinas como son: el Análisis de Señales Biomédicas, la Citología (células), la Histología (tejidos), la Bioquímica (por ejemplo, la tinción de diferentes elementos o sustancias, etc). Una parte importante de la información bajo estudio, puede estar contenida en forma de imágenes o señales bidimensionales interpretables visualmente, o con ayuda de instrumentación específica. A este tipo de imágenes las llamaremos **IMAGENES BIOMEDICAS** (en adelante IB).

**DETECCION.** Hay diferentes técnicas para producir y registrar una IB. Una clasificación general es en términos del tratamiento del objeto biológico:

**IN VIVO.** Cuando la detección de las señales o imágenes se obtiene directamente del organismo vivo. Como ejemplos tenemos las radiografías, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), las Tomografías, las Ecografías, las técnicas de la Medicina Nuclear, etc.

**IN VITRO.** Cuando el análisis se realiza con muestras aisladas del sujeto (tejido, células). Los recursos de detección de la imagen se pueden ejemplificar con la microscopía óptica, la microscopía electrónica y el análisis macroscópico (por ejemplo la macro-auto-radiografía).

**ANALISIS y METODOS CLASICOS.** Tradicionalmente la IB producida por las técnicas antes mencionadas, es analizada mediante una fotografía, o directamente sobre la preparación biológica con la ayuda de una retícula situada en el objetivo del microscopio, o bien una cámara lúcida. Aun sin la ayuda de un equipo computarizado, el analista deba realizar ciertos procesos manuales que le permitan llegar a un resultado cuantitativo.

Dentro de los pasos y las técnicas de análisis de dicha imagen mencionaremos principalmente:

- Mejoras y realces, los cuales pueden realizarse desde la etapa de tinción, el uso adecuado de medios de contraste, etc.; y en la detección, mediante, por ejemplo, el Koeller y filtros ópticos del microscopio.

- Segmentación visual, que consiste en el reconocimiento y extracción del objeto a cuantificar. Los criterios de segmentación pueden ser tan subjetivos como la experiencia del operador en algunas preparaciones biológicas.

- Cuantificación, que puede consistir en un conteo de acuerdo a los criterios de segmentación, y la morfometría de objetos con la ayuda de retículas.

- Finalmente, se integra y organiza la información cuantitativa y cualitativa del análisis realizado por medio de los datos obtenidos, análisis estadístico, gráficas (distribuciones, histogramas), etc.

**PDI.** Con el advenimiento de computadoras cada vez más poderosas y accesibles, a todo este trabajo clásico se ha incorporado una opción de automatización cada vez mayor, contando con elementos de análisis que incluso tradicionalmente no era posible realizar, como el de síntesis de imágenes o gráficos a partir de cortes seriados, o que de alguna forma destaquen exclusivamente las características de interés. La capacidad computacional con que se puede contar hoy, permite usar técnicas de cálculo intensivo, que manualmente resultaban imprácticas o inoperables.

Las contribuciones de PDI al análisis de una IB complementan y agilizan la mayoría de las técnicas descritas, al realizar



Fig. 1

automáticamente operaciones de identificación de objetos, conteo, etc.

Como ejemplos concretos, mencionaremos a continuación las operaciones de carácter más general.

- Mejora y realce de la Imagen.

- Manipulación del intervalo dinámico de la señal de video de entrada. Esta manipulación puede realizarse de la entrada a la memoria mediante un ajuste por programa de la ganancia y del offset del sistema de adquisición y mediante tablas de entrada.

- Manejo de funciones de transferencia y tablas de búsqueda (LUT's) de la memoria a la salida (despliegue); permiten enfatizar parte de la imagen a expensas de otras partes ("stretching").

- Corrección fotométrica y calibración de intensidades. En los casos en que un gradiente de grises debe corresponder repetitivamente a una escala calibrada, es necesario una corrección fotométrica, en base a los valores extremos que se manejan tanto en la imagen como en el fondo respectivo, el cuál es también corregido.

- Filtros digitales y analógicos. Permiten descartar información inútil, tal como ruido o fondo de cierta frecuencia; detectar o realzar bordes, suavizar detalles, etc. El filtrado es un área muy extensa de PDI, y poco accesible mediante métodos clásicos. Algunos filtros importantes son: las convoluciones que comprenden a los laplacianos, para detectar bordes, las clases (medias, dilataciones, erosiones), para suprimir ruido, y los realces de nitidez (sharpening); los procesos de suavizamiento y los filtros pasa banda, que permiten filtrar una banda de frecuencias espaciales específica.

- Igualación de histogramas. Este proceso permite la manipulación de la distribución de intensidades en una imagen, a partir del histograma de la misma o de una porción cuya distribución se quiere mejorar.

- Segmentación automática y morfología. Dado un criterio proporcionado por el usuario (o que puede incluso ser calculado a partir de un modelo previamente programado), es posible detectar con el sistema de PDI contornos de diferentes objetos. Típicamente, el criterio usado es el de segmentación del histograma, en que a partir de un nivel de gris de la imagen (o por diferentes intervalos), se identifican cuerpos conexos (o sea, isocontornos de niveles de gris), separando la imagen en información interior y exterior a dichos cuerpos. Existen otros métodos de segmentación por métodos heurísticos y más especializados a un tipo de imagen (por ejemplo, la detección de arterias coronarias, etc.). Cabe hacer notar que el proceso de segmentación y reconocimiento de formas de una IB es uno de los eslabones más complejos y delicados de PDI.

- Cuantificación. Una vez identificados los contornos y objetos de interés, son almacenados, y se toman medidas de área, perímetro, factor de forma (compacidad), ejes principales, etc., a partir de los cuáles se clasifican y separan objetos. El tratamiento organizado de esta información proceda mediante el acceso y manipulación de

### MICROESTACION DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES

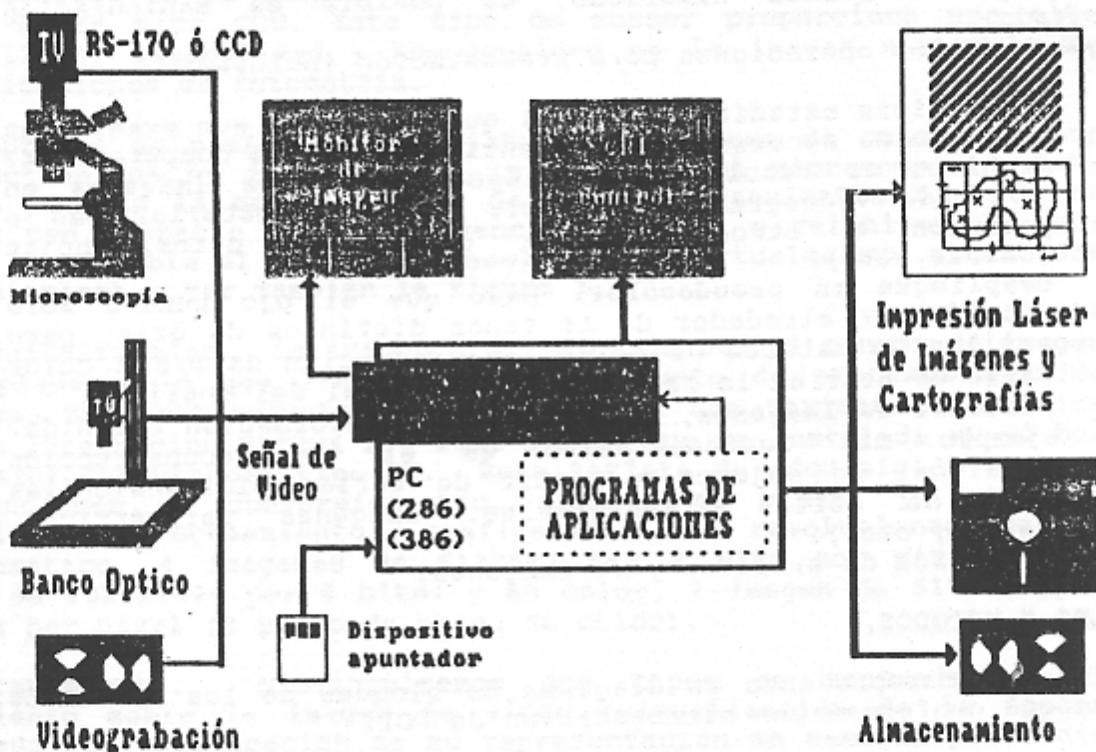


Fig. 2

estructuras de datos; por ejemplo, se puede clasificar los objetos en aquellos con área grande, alta compacidad y densidad óptica en cierto intervalo, y eliminar aquellos con área pequeña o baja compacidad.

Otra forma de cuantificación es la fotometría y la densitometría óptica, en que se analizan las distribuciones de intensidades de niveles de gris (densidad óptica) en diversas partes de la imagen. Si interesan valores absolutos, se requiere de pasos previos de calibración y corrección fotométrica.

- **Presentación de Resultados (salidas).** En la presentación de resultados se obtienen listas específicas de datos, y en la interpretación se puede caracterizar globalmente la imagen; por ejemplo, puede concluirse que la muestra contiene tantas células de tal y tal tipo, con un error estimado dado. Traducida la información de una imagen a series numéricas, es posible su manipulación computarizada.

Algunas de las operaciones para presentación incluyen:

- El análisis estadístico, en el que los datos son examinados en conjunto. Se recurre con frecuencia a gráficas comparativas.

- Archivos de resultados y almacenamiento de imágenes en disco, cinta, videograbación, etc., para su posterior uso o incorporación a otros sistemas (bases de datos, hojas electrónicas, etc).

- Despliegue en pseudocolor. Dado que el ojo humano sólo puede distinguir alrededor de 16 tonos distintos de gris, pero varios miles de matices de color, la traducción de B/N a color arbitrario es útil en la representación visual del análisis.

- Síntesis de imágenes, a partir de la información obtenida. El ejemplo más representativo es el de reconstrucción tridimensional de objetos a partir de series bidimensionales (imágenes de cortes transversales, imágenes paramétricas, tomografías, etc.).

- Impresión de gráficas y de imágenes.

## MATERIALES Y METODOS.

La figura 2 representa un diagrama de bloques de los distintos elementos que conforman una microestación de PDI.

Para describir el sistema, lo dividimos en los siguientes subconjuntos:

- **Sistema de formación de la imagen.**

Tres sistemas de formación de la imagen están disponibles en la microestación BIOCUM-UNAM:

- **Microscopio óptico.** El análisis de preparaciones es efectuado en un microscopio equipado para alumbrado en transmisión e incidencia. La salida para fotografía es usada para adaptar una cámara de TV con la ayuda de una montura C. El montaje comprende una "cámara lúcida" que permite proyectar o superponer una imagen externa al microscopio.

- **Banco óptico fotométrico.** La determinación de regiones de interés macroscópicas sobre preparaciones histológicas de gran

tamaño, así como la cuantificación de densidad óptica en documentos histo-auto-radiográficos, requiere de un sistema de alumbrado especial tipo negatoscopio de alta homogeneidad y estabilidad.

- **Proyector de cortes histológicos.** El reconocimiento visual de ciertas regiones, células, es a veces difícil después de la degradación introducida por un sensor determinado (por ejemplo la cámara TV), sobre la imagen de la preparación. La proyección amplificada de la preparación por métodos ópticos da una imagen cuya resolución depende del material óptico utilizado. Esta imagen puede ser proyectada en una tableta gráfica para la captura interactiva de la información biológica.

- **Detección de la imagen.** La detección se hace por medio de una cámara de TV tipo CCD. Este tipo de sensor proporciona una alta sensibilidad, estabilidad y homogeneidad en la imagen necesaria en las aplicaciones de fotometría.

- **Captore de posición del objeto.** Un sistema de sensores X, Y optoelectrónicos es instalado en la platina del microscopio. Este sistema permite la medida lineal de los desplazamientos X, Y de la platina con respecto a una referencia absoluta o relativa. De esta manera, es posible el manejo de resoluciones virtuales muy altas (64K x 64K pixeles). Ver también la figura 3.

- **Digitalización.** La imagen proporcionada por el sensor de imagen es acoplada a lo que llamamos el subconjunto de procesamiento de imágenes. Este subconjunto está formado por una tarjeta electrónica de alta integración MATROX PIP 1024 x 1024 que va instalada en el bus de la microcomputadora tipo AT. Esta tarjeta de adquisición realiza las funciones de conversión A/D, memoria de video, y funciones primitivas de procesamiento y graficación. Las resoluciones son: en monocromático, 4 imágenes de 512X512 por 8 bits por pixel o una imagen de 1024X1024 por 8 bits; y en color, 1 imagen de 512X512 por 24 bits por pixel (8 por cada plano de color).

- **Tratamiento.** Distinguiremos dos tipos de tratamiento: el tratamiento sobre la imagen de video (visualización de la imagen procesada sin modificación de su representación en memoria por medio de las tablas de entrada y salida), y el procesamiento sobre la imagen memorizada (aplicación de la función de transformación sobre la memoria de la imagen).

- **Visualización y edición.** Aparte de la visualización y edición en el monitor de imagen, el sistema permite editar las IB en papel bond, con la ayuda de una impresora tipo laser. La reproducción obtenida con esta impresora es binaria (formada por puntos blancos y negros). Los tonos de gris son reproducidos mediante tramado de puntos en una matriz que codifica a cada pixel.

- **Elementos de Captura.** Consideramos los elementos que intervienen en la captura o selección de información en tres categorías de imagen:

- Captura sobre una imagen óptica. Para evitar la pérdida de calidad de la imagen inherente al proceso de adquisición, consideraremos un proceso altamente interactivo, en que, como caso típico, se proyecta la muestra histológica sobre una tableta gráfica, superponiendo al campo un cursor ó pluma electrónica que permiten seleccionar el contorno o contar las células directamente sobre la imagen proyectada (ver figura 3).

- Captura sobre una imagen digital.

En modo semiautomático, la captura se realiza mediante un ratón, dada una zona predefinida (un cuadro, por ejemplo) o un cursor, que aparecen superpuestos a la imagen digital.

En modo automático, el sistema cuenta con un algoritmo de segmentación poligonal automático. Se especifica un umbral de segmentación (nivel de gris) y una aproximación poligonal (fineza del contorno).

- Unidad de cómputo (gestión). La microestación de la UDIPI del CIUNAM está basada en computadoras PC-AT compatibles o PC-386/286. Esta computadora controla los diferentes periféricos tales como la tarjeta de PDI, los captores de posición X, Y, la impresora laser de imágenes, así como los dispositivos de entrada como la tableta gráfica, el ratón, etc.

#### SOFTWARE Y APLICACIONES.

Dentro de las funciones y aplicaciones de una microestación de PDI, y tomando el caso concreto del sistema BIOCUM-UNAM, tenemos las siguientes:

#### **FUNCIONES GENERALES:**

- Manipulación de imágenes: adquisición, visualización, determinación de umbral en tiempo real de imágenes digitales (blanco y negro, pseudo color y color verdadero), correcciones fotométricas, manejo de planos de imagen (zoom, reducción, etc), manejo independiente del plano imagen y del plano gráfico (almacenamiento, copia, intercambio, borrado, etc), superposición de gráficas y de texto, almacenamiento en soporte magnético u óptico.
- Procesamiento de imágenes: Operaciones aritméticas y lógicas, filtraje, convoluciones, alisado, mejora de contrastes, igualación de histogramas, manipulación de las tablas de color.
- Análisis fotométrico: Medida de niveles de gris, perfiles, histogramas.
- Segmentación automática: Extracción de contornos y representación por polígonos (vectores), umbral y fineza del contorno ajustables, conteo de objetos.
- Morfometría: Calibración, etiquetado de objetos, categorías, medida de 12 parámetros diferentes sobre contornos adquiridos por segmentación poligonal.
- Utilerías: Mascarillas de entrada y de despliegue, impresión laser de imágenes, la coordinación de la etapa de captura con el control automático de platinas móviles, etc. A estos módulos se

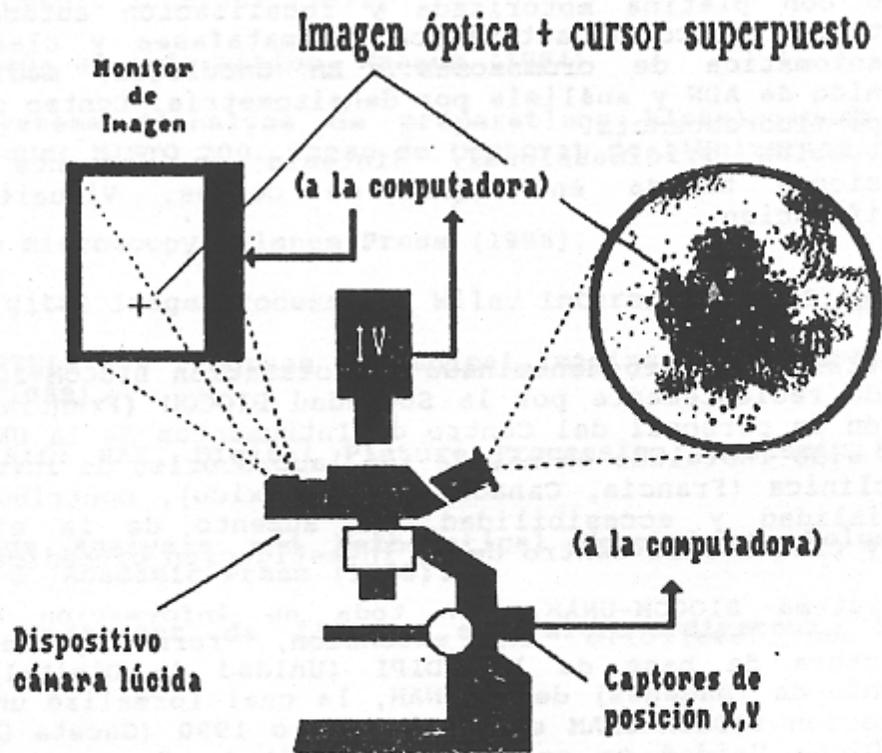
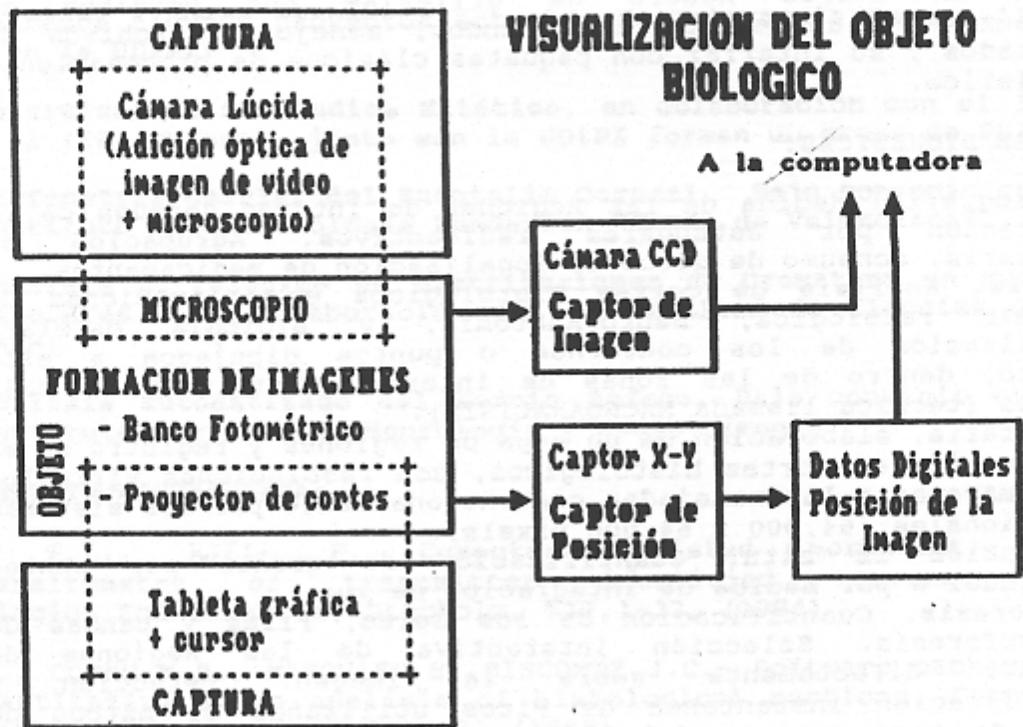


Fig. 3

agrega un cierto número de utilerías que permiten el encadenamiento automático de comandos, manejo de archivos de resultados y su interfaz con paquetes clásicos de procesamiento estadístico.

#### APLICACIONES BIOMEDICAS:

- Auto-radiografía. Medida de las Regiones de interés después de la calibración por estándares radioactivos. Agrupación de Receptores, consumo de glucosa, localización de medicamentos.
- Histología. Análisis de cortes histológicos en aplicaciones de Anatomía Patológica, Neuro-Anatomía, y Biología celular. Visualización de los contornos o puntos dibujados a alto aumento, dentro de las zonas de interés determinadas a bajo aumento (técnica llamada MACROANALISIS). Cartografía, elaboración de un mapa de regiones y registro de su localización en cortes histológicos, con resoluciones virtuales mucho mayores a las manejadas convencionalmente por los sistemas tradicionales (64,000 x 64,000 pixels). Híbrida in situ. Cuantificación de granos por conteo individual o por medida de integración de luz.
- Electroforesis. Cuantificación de los Geles, Films y bandas de Electroforesis. Selección interactiva de las Regiones de interés, directamente sobre la imagen. Detección y cuantificación instantánea de Picos utilizando el método de línea de base y un modelado Gaussiano. Resultados numéricos normalizados (Rf y Concentración).
- Cariotipos/Citología. Análisis celular por medio de microscopio óptico con platina motorizada y focalización automática. En Cariotipo, detección automática de metafases y clasificación semi-automática de cromosomas.. En Oncología, medición del contenido de ADN y análisis por densitometría. Conteo de células por epi-fluorescencia.
- Reconstrucción Tridimensional. Síntesis de imágenes en tres dimensiones basada en series de cortes. Visualización y cuantificación.
- Etc.

#### CONCLUSIONES:

El sistema descrito denominado Microestación BIOCUM-200-500 fue desarrollado recientemente por la Sociedad BIOCUM (Francia), con la colaboración de personal del Centro de Instrumentos de la UNAM. Dicho sistema ha sido instalado en más de 100 laboratorios de investigación básica y clínica (Francia, Canadá, EUA y México), contribuyendo con su potencialidad y accesibilidad, al aumento de la eficiencia, precisión y creatividad dentro de la investigación biomédica.

El sistema BIOCUM-UNAM, con toda su información técnica y capacidad de desarrollo en extensión, forma parte de la infraestructura de base de la UDIPI (Unidad de Digitalización y Procesamiento de Imágenes) del CIUNAM, la cual formalizó un convenio de colaboración BIOCUM-UNAM el pasado Enero 1990 (Gaceta UNAM Enero 25/90). Dicha Unidad se encuentra capacitada (recursos humanos y materiales) para llevar a cabo desarrollos específicos en PDI.

Mencionaremos algunos proyectos actuales de relevancia que se llevan a cabo en la UDIPI:

- Determinación del Índice Mitótico, en colaboración con el IIMAS y el IIB, quienes, junto con la UDIPI forman un grupo de PDI.
- Morfometría Celular del Endotelio Corneal. Bajo convenio con el Instituto de Oftalmología Fundación "Conde de Valenciana".
- Análisis Morfológico de Distribuciones de Cromatina en Núcleos Celulares. En colaboración con la Facultad de Ciencias de la UNAM.
- Análisis automatizado del Nervio Safeno. Bajo convenio con el Instituto Nacional de Neurología y Neuro-cirugía.

**BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA:**

- AGNATI F.L., KJELL F. Computer assisted morphometry and microdensitometry of transmitter identified neurons. Acta Physiologica Scandinavica, Stockolm, 532,1-32, (1984)
- ALBE X., CORNU M.B., MARGULES S., BISCONTE J.C.- Software package for the quantitative image analysis of histological sections. Computers and Biomedical Research 18,313-333 (1985).
- BARTELS PH., BIBBO M., WIED GL.- Modeling of histologic images by computer. Acta Cytol. 20,62-67 (1976)
- BIJAOUI A., Image et information, Masson (1984)
- CORKIDI G.- Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: HISTO 200. Thèse de Doctorat de l'Univerité Paris XII (1989)
- INDUE S., Video microscopy, Plenum Press (1986).
- PRATT W. K., Digital Image Processing, Wilay Interscience (1978).
- PRESTON K., BARTELS P.- Progress in Medical Imaging, Springer-Verlag New York Inc. (1988).
- ROSENFELD A., A:C: KAK, Digital Picture Processing, Academic Press (1976).
- SERRA J., Image Analysis and Mathematical Morphology. Volume 1 (1978), Volume 2 ,Academic Press (1988).
- TOUMAZAT J.- Traitement de l'image sur micro-ordinateur, Sybex (1987).